



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118354784 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 16

(21) 申请号 202280080610.X

(22) 申请日 2022.12.14

(30) 优先权数据

21214519.7 2021.12.14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/085794 2022.12.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/110983 EN 2023.06.22

(71) 申请人 分子合作伙伴股份公司

地址 瑞士

(72) 发明人 S·方泰纳 A·博斯哈特

B·施莱思 D·斯坦纳

M·瓦尔瑟

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 殷骏

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书59页

序列表(电子公布) 附图32页

(54) 发明名称

具有双重结合特异性的经设计的重复结构域及其用途

(57) 摘要

本发明涉及产生对两个靶标具有结合特异性的经设计的重复结构域的方法,其中此类重复结构域与其两个靶标的结合是互相排斥的。所述经设计的重复结构域优选地是经设计的锚蛋白重复结构域。本发明还提供此类经设计的重复结构域和包含此类重复结构域的重组蛋白质,以及此类重复结构域作为分子开关,诸如例如控制治疗剂的活化或失活的开关的用途。本发明还涉及编码此类重复结构域或重组蛋白质的核酸,包含此类重组蛋白质、重复结构域或核酸、重组表达载体和宿主细胞的药物组合物,以及此类蛋白、核酸或药物组合物在用于治疗疾病诸如癌症的方法中的用途。

1. 一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性;以及

(ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价连接所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块通过接头共价连接,其中所述接头优选地是肽接头或非结合重复模块。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价合并所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5}M 的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合并且/或者其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5}M 的解离常数(K_D)与所述第二靶标结合。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述第一重复结构域是锚蛋白重复结构域并且所述第二重复结构域是锚蛋白重复结构域,并且/或者其中所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

8. 一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域能够通过前述权利要求中任一项所述的方法获得。

9. 一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域对第一靶标具有第一结合特异性并且对第二靶标具有第二结合特异性,其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

10. 根据权利要求9所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5}M 的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合并且/或者其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5}M 的解离常数(K_D)与所述第二靶标结合。

11. 根据权利要求9至10中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

13. 根据权利要求9至12中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复

结构域包含至少一个内部重复模块,所述至少一个内部重复模块包含选自SEQ ID NO:75至81的序列。

14.根据权利要求9至13中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63、83至85和97至100,以及(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74以及(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中任一者的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,和/或(iii)包含选自由以下项组成的组的序列的至少一个内部重复模块:(1)SEQ ID NO:40至46以及(2)其中SEQ ID NO:40至46中任一者的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。

15.一种重组蛋白质,所述重组蛋白质包含根据权利要求8至14中任一项所述的经设计的重复结构域。

16.根据权利要求15所述的蛋白质,其中所述蛋白质还包含治疗剂,其中所述治疗剂优选地是结合分子。

17.一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据权利要求8至14中任一项所述的经设计的锚蛋白重复结构域,或根据权利要求15至16中任一项所述的蛋白质。

18.一种药物组合物,所述药物组合物包含以下中的一者或多者:(i)根据权利要求8至14中任一项所述的经设计的重复结构域,(ii)根据权利要求15至16中任一项所述的重组蛋白质,和/或(iii)根据权利要求17所述的核酸,以及任选地药学上可接受的载剂或稀释剂。

19.一种治疗医学病症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求8至14中任一项所述的经设计的重复结构域、根据权利要求15至16中任一项所述的重组蛋白质、根据权利要求17所述的核酸或根据权利要求18所述的药物组合物的步骤。

具有双重结合特异性的经设计的重复结构域及其用途

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年12月14日提交的EP21214519的优先权的权益。该专利申请的公开内容以引用方式整体并入本文用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及产生对两个靶标具有结合特异性的经设计的重复结构域的方法,其中此类重复结构域与其两个靶标的结合是互相排斥的。所述经设计的重复结构域优选地是经设计的锚蛋白重复结构域。本发明还提供此类经设计的重复结构域和包含此类重复结构域的重组蛋白质,以及此类重复结构域作为分子开关,诸如例如控制治疗剂的活化或失活的开关的用途。本发明还涉及编码此类重复结构域或重组蛋白质的核酸,包含此类重组蛋白质、重复结构域或核酸、重组表达载体和宿主细胞的药物组合物,以及此类蛋白、核酸或药物组合物在用于治疗疾病诸如癌症的方法中的用途。

背景技术

[0004] 在药物功效和安全性之间找到最佳平衡是开发靶向药物的持续性挑战。已经探索了许多策略来提高药物的精确性和特异性并由此限制它们的不良副作用。尽管一些策略可能已达到临床前概念证明,但当转变到临床应用时,它们中的许多都面临障碍。因此,找到可靠地控制药物分子在体内的治疗活性的速率、时间和/或位置的机制仍然是非常期望的。

[0005] 抗体及其固有的亲和性和选择性特性广泛用于治疗。使抗体能够在某些条件下活化可以提供一层控制以将它们的治疗效果集中在期望的作用部位。为此,可以将抗体工程化以变得对内源或外源刺激诸如光、温度、pH、酶活性、离子、效应分子和抗原组合具有应答性(Lucchi,R.等人,2021,ACS Central Science,7(5),724-738)。

[0006] 肿瘤微环境(TME)提供了一系列可以潜在地被探索作为药物活化的触发剂的生化信号。例如,已经开发了感测细胞外三磷酸腺苷(ATP)水平的抗体通/断开关机制,与健康组织相比,细胞外三磷酸腺苷(ATP)水平在TME中明显升高。已经报道称此类Switch AntibodyTM(或Switch-Ig[®])分子在10mM ATP的存在下开始结合其靶标,并且在100mM ATP下始终显示与非开关对照抗体相当的活性,而在1mM ATP下显示可忽略的活性。然而它们的产生需要耗时耗力的程序,该程序包括鉴定要用作文库模版的抗ATP抗体,设计和构建在其互补决定区(CDR)中具有ATP结合基序的抗体的合成文库,并通过噬菌体淘选鉴定ATP依赖性抗原结合性抗体(Mimoto,F.等人,2020,Cell Reports,33(12),108542)。

[0007] 在嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法的背景下已经开发了药物活化开关的其他方法(Yu,S.等人,2019,Molecular Cancer,18(1),1-13)。已经设计了CAR的接通开关,其中工程化T细胞的活化取决于靶抗原和触发CAR模块异源二聚化的小分子的存在。单独的小分子或抗原都不能活化CAR T细胞。这些依赖小分子的接通开关方法可以通过控制T细胞活性的时间、位置和剂量来减轻毒性(Wu,C.Y.等人,2015,Science,350(6258);Zajc,C.U.等人,2020,PNAS,117(26),14926-14935)。关断开关机制也可以通过依赖于蛋白降解调控来实

施。此类关断开关的示例取决于可以诱导CAR降解的来那度胺(Revlimid®)。为了关断CAR信号传导,来那度胺诱导降解决定子标记的CAR的泛素化和随后的蛋白酶体降解。当小分子水平下降时,CAR信号传导可通过CAR蛋白的翻译来恢复(Jan,M.等人,2021,Science Translational Medicine,13(575);WO 2019/089592 A1)。然而,此类减轻过继细胞疗法中的不良作用的定制机制不能总是应用于非细胞治疗模式。

[0008] 另一种控制机制由基于变构调控的可逆性通/断分子开关提供。变构蛋白可以充当分子开关,其中分子与不同于蛋白活性位点的位点的结合会改变所述蛋白的构象。尽管作为生物传感器更普遍,但已经设计了模块变构开关来通过效应分子控制蛋白的活性。在一种此类设计中,具有互相排斥结合位点的合成双配体分子通过接头与感兴趣的蛋白融合。在不存在效应分子的情况下,双配体结合蛋白的活性位点,从而抑制蛋白的活性。在效应物的存在下,效应物与配体分子的结合会释放蛋白的抑制剂,从而活化蛋白(Schena,A.等人,2015,Nature Communications,6(1),1-10;WO 2015/067302 A1)。然而,将这种方法应用于治疗相关的靶标受到需要选择或鉴定待通/断的靶标的特异性变构抑制剂分子的限制。其他限制可能来自于融合双配体的设计要求,在这种特定情况下,该融合双配体包括荧光染料。

[0009] 还已经提出了包含替代性结合支架(单抗体和设计的锚蛋白重复蛋白(或DARPin))的模块化蛋白开关(Nicholes,N.等人,2016,Protein Engineering,Design and Selection,29(2),77-85;WO 2003/078575 A2)。在这种方法中,结合支架包含输入结构域,诸如对麦芽糖结合蛋白(MBP)具有结合亲和力的DARPin,并且还包含输出结构域(诸如 β -内酰胺酶),该输出结构域融合至该输入结构域的选定位点中,诸如在DARPin的第一内部重复序列和第二内部重复序列之间。尽管观察到一些预期的开关活性(即 β -内酰胺酶的支架结合配体依赖性酶活性),但与相应的非融合DARPin相比,表现出开关特性的融合DARPin遭受对其配体的亲和力的显著损失。此外,当试图通过诱变将这些开关构建体的适用性推广到其他配体时,在重新定向结合支架的特异性方面仅观察到有限的成功。

[0010] 总的来说,当前可用的分子药物开关方法耗时、耗成本和/或耗力,并且在它们的能力和方面受到限制。因此,仍然需要新的分子开关设计。此类开关设计可用于控制蛋白活性,例如可用于基于蛋白的治疗剂中。

发明内容

[0011] 本发明提供了产生对两个靶标具有结合特异性的经设计的重复结构域的方法,并且其中所述结构域与其两个靶标的结合是互相排斥的。所述经设计的重复结构域优选地是经设计的锚蛋白重复结构域。本发明还提供此类经设计的锚蛋白重复结构域和包含此类重复结构域的重组蛋白质,以及此类重复结构域作为分子开关,诸如例如控制治疗剂的活化或失活的开关的用途。另外,本发明提供了编码此类重复结构域或重组蛋白质的核酸,包含此类重组蛋白质、重复结构域或核酸、重组表达载体和宿主细胞的药物组合物,以及此类蛋白、核酸或药物组合物在用于治疗哺乳动物(包括人)的疾病诸如癌症的方法中的用途。

[0012] 在一个方面,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶

标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性;以及

[0014] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

[0015] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种可通过上述方法获得的经设计的重复结构域。

[0017] 在另一方面,本发明提供了一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域对第一靶标具有第一结合特异性并且对第二靶标具有第二结合特异性,并且其中所述重复结构域与第一靶标和第二靶标的结合是互相排斥的。

[0018] 本发明的经设计的重复结构域仅以互相排斥方式结合它们的两个靶标,即在重复结构域与一个靶分子结合后,所述结构域与另一个靶分子的结合受到阻止,这主要是由于位阻效应。

[0019] 本发明的重复结构域可有利地用作分子通/断开关机制,使得能够条件性活化或失活治疗剂的生物活性。治疗剂的此类生物活性可以是例如治疗剂与生物靶标的结合。在此类情景下,本发明的重复结构域与治疗剂化学连接,并且所述重复结构域的第一靶分子是治疗剂,而第二靶分子是传感器靶分子。优选地,此类传感器靶分子与病理状况有关,例如在病理状况中选择性表达或过表达的分子。一种此类病理状况是癌症,并且所述传感器靶分子在肿瘤组织中选择性表达或过表达。

[0020] 因此,在另一方面,本发明提供了包含本发明的此类经设计的重复结构域的重组蛋白质。在一个特定方面,包含本发明的此类经设计的重复结构域的此类重组蛋白质还包含治疗剂。在一个方面,治疗剂是结合分子。在另一方面,所述结合分子包含锚蛋白结合结构域。

[0021] 本发明的重组蛋白质中治疗剂的状态(活性/接通或无活性/关断)取决于本发明的经设计的重复结构域与其第一靶标和第二靶标的结合。在一个方面,在接通状态下,本发明的经设计的重复结构域不能结合其第一靶标(例如,治疗剂),这是由于存在第二靶标(例如,传感器靶标)并且基本上结合至经设计的重复结构域(参见,例如图3A中的接通开关)。因此,第一靶标(例如,治疗剂)是未结合且有活性的。在关断状态下,实际上不存在第二靶标,因此经设计的重复结构域结合第一靶标(例如,治疗剂),从而阻止其正常活性。

[0022] 在另一方面,本发明提供了包含本发明的此类经设计的重复结构域的重组蛋白质,这些重组蛋白质不进一步包含治疗剂。本发明的此类重组蛋白质的状态(活性/接通或无活性/关断)还可以取决于本发明的经设计的重复结构域与其第一靶标和第二靶标的结合。在接通状态下,本发明的经设计的重复结构域可以结合其第一靶标(例如,细胞表面受体),这是由于第二靶标(例如,传感器靶标)不大量存在并且因此不结合至经设计的重复结构域(参见,例如,图3B中的关断开关)。因此,第一靶标(例如,细胞表面受体)被本发明的经设计的重复结构域结合,从而其生物活性得以活化或抑制。在关断状态下,第二靶标(例如,传感器靶标)大量存在,因此与经设计的重复结构域结合,从而阻止经设计的重复结构域与第一靶标结合。

[0023] 在另一方面,本发明提供了编码本发明的经设计的重复结构域或编码本发明的重组蛋白质的分离的核酸,包含此类核酸的重组表达载体,包含此类表达载体的宿主细胞和包含本发明的经设计的重复蛋白、重组蛋白质、核酸、重组表达载体和/或宿主细胞以及至少一种药学上可接受的载剂或稀释剂的药物组合物。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种治疗医学病症的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物的步骤。在一个特定方面,所述医学病症是癌症。

[0025] 在另一方面,本发明提供了本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物,其用于治疗医学病症的方法中。在一个特定方面,所述医学病症是癌症。

[0026] 基于本文提供的公开内容,本领域技术人员将认识到或仅能够使用常规实验来确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同物。此类等同物旨在由以下实施方案(E)涵盖。

[0027] E1.一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0028] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性;以及

[0029] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

[0030] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0031] E2.根据E1所述的方法,其中所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价连接所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。

[0032] E2.1.根据E2所述的方法,其中所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块通过接头共价连接。

[0033] E2.2.根据E2.1所述的方法,其中所述接头是肽接头或非结合重复模块。

[0034] E3.根据E1所述的方法,其中所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价合并所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。

[0035] E4.根据E1至E3中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。

[0036] E5.根据E4所述的方法,其中所述N-末端封端模块与所述第一重复结构域中包含的N-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少90%的同一性,并且所述C-末端封端模块与所述第二重复结构域中包含的C-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少90%的同一性。E6.根据E1至E5中任一项所述的方法,其中所述第一重复结构域的所述部分包含N-末端封端模块和至少一个重复模块,并且其中所述第二重复结构域的所述部分包含C-末端封端模块和至少一个重复模块。

[0037] E7.根据E1至E6中任一项所述的方法,其中所述第一重复结构域的N-末端片段与

所述第二重复结构域的C-末端片段共价结合。

[0038] E8.根据E1至E7中任一项所述的方法,其中步骤(ii)包括去除所述第一重复结构域的C-末端封端模块并去除所述第二重复结构域的N-末端封端模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含所述第一重复结构域的所述C-末端封端模块和所述第二重复结构域的所述N-末端封端模块。

[0039] E9.根据E1至E8中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时抑制所结合的靶标的生物活性。

[0040] E10.根据E1至E9中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者的结合空间位阻所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者的结合。

[0041] E11.根据E1至E10中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合。

[0042] E12.根据E1至E11中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第二靶标结合。

[0043] E13.根据E1至E12中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域以第一结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者结合并且以第二结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者结合,其中所述第一结合亲和力与所述第二结合亲和力的比率在1:1和 $1:10^5$ 之间。

[0044] E14.根据E1至E13中任一项所述的方法,其中所述第一靶标和所述第二靶标位于不同的分子上。

[0045] E15.根据E1至E14中任一项所述的方法,其中所述第一重复结构域是锚蛋白重复结构域并且所述第二重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0046] E16.根据E1至E15中任一项所述的方法,其中所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0047] E17.一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域能够通过前述实施方案中任一项所述的方法获得。

[0048] E18.一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域对第一靶标具有第一结合特异性并且对第二靶标具有第二结合特异性,其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0049] E19.根据E18所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时抑制所结合的靶标的生物活性。

[0050] E20.根据E18至E19中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者的结合空间位阻所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者的结合。

[0051] E21.根据E18至E20中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合。

[0052] E22.根据E18至E21中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第二靶标结合。

[0053] E23.根据E18至E22中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复

结构域以第一结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者结合并且以第二结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者结合,其中所述第一结合亲和力与所述第二结合亲和力的比率在1:1和1:10⁵之间。

[0054] E24.根据E18至E23中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述第一靶标和所述第二靶标位于不同的分子上。

[0055] E25.根据E18至E24中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少三个重复模块。

[0056] E26.根据E18至E25中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块、至少两个内部重复模块、至少三个内部重复模块或至少四个内部重复模块。

[0057] E27.根据E18至E26中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域中包含的所有内部重复模块有助于第一和/或第二结合特异性。

[0058] E28.根据E18至E27中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个有助于与所述第一靶标结合的内部重复模块,并且其中所述经设计的重复结构域包含至少一个有助于与所述第二靶标结合的内部重复模块。

[0059] E29.根据E18至E28中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0060] E30.根据E18至E29中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基。

[0061] E31.根据E18至E30中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,所述至少一个内部重复模块包含选自SEQ ID NO:75至81的序列。

[0062] E32.根据E18至E31中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63和83至85,以及(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74,以及(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0063] E32.1.根据E18至E32中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63、83至85和97至100,以及(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中任一者中的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74以及(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中任一者的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列,和/或(iii)包含选自由以下项组成的组的序列的至少一个内部重复模块:(1)SEQ ID NO:40至46以及(2)其中SEQ ID NO:40至46中任一者的至多9个氨基酸被另一个氨基酸取代的序列。

[0064] E33.根据E18至E32.1中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重

复结构域包含至少一个内部重复模块,所述至少一个内部重复模块包含选自以下项组成的组的序列:(1)SEQ ID NO:40至46,以及(2)其中SEQ ID NO:40和46中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0065] E34.根据E18至E33中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35至36,以及(2)其中SEQ ID NO:35至36中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:38,以及(2)其中SEQ ID NO:38中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0066] E35.根据E18至E34中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,其中对应于SEQ ID NO:39的位置3、4、6、11、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0067] E36.根据E18至E35中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个N-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:36的位置4、5、8、11和/或12的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0068] E37.根据E18至E36中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含至少一个C-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:38的位置3、4、6、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0069] E38.根据E18至E37中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含两个内部重复模块,其中所述两个内部重复模块中N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述两个内部重复模块中C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基。

[0070] E39.根据E18至E37中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含三个内部重复模块,其中所述三个内部重复模块中最N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述三个内部重复模块中最C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述三个内部重复模块中中间的内部重复模块包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。

[0071] E40.根据E39所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:6至10,以及(2)与SEQ ID NO:6至10中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0072] E41.根据E18至E37中任一项所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含四个内部重复模块,其中所述四个内部重复模块中最N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,其中所述四个内部重复模块中最C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述四个内部重复模块中第二最N-末端的内部重复模块和第二最C-末端的内部重复模块中的每一者都包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。

[0073] E42.根据E41所述的经设计的重复结构域,其中所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:11至13,以及(2)与SEQ ID NO:11至13中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

- [0074] E43.一种重组蛋白质,所述重组蛋白质包含根据权利要求17至42中任一项所述的经设计的重复结构域。
- [0075] E44.根据E43所述的蛋白质,其中所述蛋白质还包含治疗剂。
- [0076] E45.根据E44所述的蛋白质,其中所述治疗剂是结合分子。
- [0077] E46.根据E45所述的蛋白质,其中所述结合分子包含经设计的锚蛋白重复结构域。
- [0078] E47.根据E45或E46所述的蛋白质,其中所述结合分子是T细胞衔接器。
- [0079] E48.一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据E17至E42中任一项所述的经设计的重复结构域,或根据E43至E47中任一项所述的蛋白质。
- [0080] E49.一种重组表达载体,所述重组表达载体包含根据E48所述的核酸。
- [0081] E50.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据E49所述的重组表达载体。
- [0082] E51.一种药物组合物,所述药物组合物包含以下的一种或多种:(i)根据E17至E42中任一项所述的经设计的重复结构域,(ii)根据E43至E47中任一项所述的重组蛋白质,(iii)根据E48所述的核酸,和/或(iv)根据E49所述的重组表达载体,以及任选地药学上可接受的载剂或稀释剂。
- [0083] E52.一种治疗医学病症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据E17至E42中任一项所述的经设计的重复结构域、根据E43至E47中任一项所述的重组蛋白质、根据E48所述的核酸或根据E51所述的药物组合物的步骤。
- [0084] E53.根据E52所述的方法,其中所述医学病症是癌症。
- [0085] E54.根据E17至E42中任一项所述的经设计的重复结构域、根据E43至E47中任一项所述的重组蛋白质、根据E48所述的核酸或根据E51所述的药物组合物,其用于治疗医学病症的方法中。
- [0086] E55.根据E54使用的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物,其中所述医学病症是癌症。

附图说明

[0087] 图1:本发明的经设计的重复结构域的例示,如本发明的经设计的锚蛋白重复结构域所举例说明,也称为“2合1DARPin”或“开关DARPin”(6)。DARPin通常包含N-末端封端(N-封端)、一个或多个内部重复模块(最常见的是一个、两个或三个)和C-末端封端(C-封端)。靶标(或抗原)结合互补位(或结合表面)(4,5)是由这些重复模块中的一个或几个重复模块形成的连续表面。2合1DARPin可以通过将N-封端加上结合靶标A的第一DARPin的一个或几个内部重复模块与C-封端加上结合靶标B的第二DARPin的一个或几个内部重复模块遗传组合而形成(两个亲本DARPin示为(1)和(2))。所得2合1DARPin(6)则通常含有N-封端、C-封端和至少一个内部重复模块,最常见的是两个内部重复模块(称为N2C)、三个内部重复模块(N3C)或四个内部重复模块(N4C)。它可以含有甚至更多的内部重复模块(NxC)。2合1DARPin能够结合靶标A和靶标B,但不能同时结合(参见图2)。另外,2合1DARPin中的一个或几个内部重复模块可以是混合(或合并)重复模块(7)。如果重复模块的结合表面包含来自第一亲本重复蛋白的相应模块的至少一个靶标相互作用残基和来自第二亲本重复蛋白的相应模块的至少一个靶标相互作用残基,则该重复模块称为混合重复模块。

[0088] 图2:例示了互相排斥结合的概念。由于2合1DARPin的两个互补位的紧密接近或重

叠(重叠表示为斜条纹),该分子能够单独结合靶标A(图2A)或靶标B(图2B),但不能同时结合两个靶标(图2C),因为靶标A和靶标B两者的同时结合受空间位阻。空间冲突由靶标A和靶标B之间的星号表示。

[0089] 图3:包含本发明的2合1DARPin的构建体的一般示例。这些示例性构建体也称为“开关药物DARPin”。在图3A中,示出了示例性接通开关机制,其中2合1DARPin以互相排斥方式结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如药物分子),并且化学连接至所述靶标B(例如药物分子)。作为开关药物DARPin的一部分的靶标B的状态(例如活性或非活性药物)由2合1DARPin与靶标A的相互作用条件性调控,其中靶标A被2合1DARPin结合导致结合的靶标B(因此,活性药物)的释放。在图3B所示的示例性关断开关设置中,2合1DARPin设计成结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如细胞受体)。由所述2合1DARPin与靶标B的相互作用产生的下游活性可以在靶标A与2合1DARPin结合时被条件性地关断。在此类开关药物DARPin中,2合1DARPin可进一步连接至其他结合结构域或分子。

[0090] 图4:根据本发明的开关药物DARPin作为接通和关断开关以条件性地调控T细胞衔接器(TCE)的示例性设计。在接通开关概念(图4A)中,T细胞衔接器包含结合CD3的DARPin(靶标B)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的DARPin。使用可结合并阻断结合CD3的DARPin的互补位,并且可以另选地结合主要存在于肿瘤微环境中的分子(表示为靶标A)的2合1DARPin。该2合1DARPin与TCE化学连接以形成开关药物DARPin。高浓度的靶标A诱导结合CD3的DARPin(靶标B)的释放,使得能够募集细胞毒性T细胞和在表达TAA的肿瘤细胞和T细胞之间形成免疫突触。在示例性关断开关概念(图4B)中,使用结合靶标A(传感器靶标)并且另选地结合靶标B(CD3)的2合1DARPin。在这种情况下,TCE包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的DARPin,与所述2合1DARPin化学连接。在高浓度的靶标A后,TCE可以通过与靶标A结合而沉默,从而防止TCE与T细胞上的CD3结合。

[0091] 图5:可用作VEGF触发的T细胞衔接器开关药物DARPin的2合1DARPin的详细图示。如图1所示的2合1DARPin通过组合对VEGF具有高亲和力的第一结合VEGF的DARPin(也称为“VEGF结合物”(SEQ ID NO:1))和靶向结合CD3的DARPin的互补位的第二DARPin(也称为“ α -CD3 DARPin阻断剂”(SEQ ID NO:2))而产生。因此,通过组合N-封端加上来自VEGF结合物的一个或两个内部重复模块和一个或两个内部重复模块加上 α -CD3 DARPin阻断剂的C-封端,可以产生VEGF调控的2合1DARPin。5A-5B:根据本发明的VEGF结合物、 α -CD3 DARPin阻断剂和8种2合1DARPin设计的氨基酸序列比对。图5A示出了N3C 2合1DARPin(即2合1DARPin 11、12、13、15和17,分别对应于SEQ ID NO:6、7、8、9和10),并且图5B示出了N4C 2合1DARPin(即2合1DARPin 18、19和20,分别对应于SEQ ID NO:11、12和13)。在重复编号行中以黑色边界框出的数字指示互补位位置。5C-5D:描绘了DARPin互补位的可视化方法,以3D(图5C)和2D(图5D)格式表示DARPin互补位的表面。图5C示出了N3C DARPin(含有N-封端、3个内部重复和C-封端的DARPin)的卡通图示,在每个重复模块中具有突出显示的互补位位置。图5D提供了位置图,该位置图示出了每个重复模块的互补位的位置包括框架残基或潜在的靶标相互作用残基。图5C或图5D中的虚线例示相同残基在3D图示和2D图示中的相对取向。5E:来自图5A-图5B的以2D图示描绘的VEGF结合物、 α -CD3 DARPin阻断剂和8种2合1DARPin的互补位。2D图示下方的条指示重复模块是取自VEGF结合物、 α -CD3 DARPin阻断剂,还是 α -CD3 DARPin阻断剂和VEGF结合物之间的混合重复模块。

[0092] 图6:单独的VEGF结合物、 α -CD3 DARPin阻断剂和8种2合1-DARPin与VEGF和 α -CD3 DARPin结合的表面等离子体共振 (SPR) 数据。6A:图6D的三种不同类型的SPR实验的示意图。6B:在单迹线SPR测量中评估VEGF结合物与其靶标 (VEGF₁₆₅) 的结合 (详细数据参见US9458211B1)。6C:记录了 α -CD3 DARPin阻断剂针对结合靶CD3的DARPin的多迹线SPR数据,而没有测量到对VEGF的结合。6D:8种2合1DARPin结合固定化VEGF或 α -CD3 DARPin的多迹线SPR数据,以及在不存在和存在130nM可溶性VEGF的情况下结合 α -CD3 DARPin的单迹线SPR数据。

[0093] 图7:通过ELISA测得的开关药物DARPin与VEGF的残余结合。两种不同格式的8个His标记的开关药物DARPin结合生物素化VEGF₁₆₅的数据,该生物素化VEGF结合至链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板。经由HRP标记的抗His抗体检测结合。分析格式A的四种开关药物DARPin([α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[2合1DARPin])和格式B的四种开关药物DARPin([2合1DARPin]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]),并使用VEGF结合物作为对照。

[0094] 图8:开关特性分析。包含不同格式的2合1DARPin 13、15、17或18的本发明的His标记的开关药物DARPin结合生物素化scCD3 ϵ γ (生物-scCD3 ϵ γ) 的ELISA数据,该生物素化scCD3 ϵ γ 结合至链霉亲和素包被的微量滴定板。经由HRP标记的抗His抗体检测结合。8A:在存在和不存在100nM VEGF的情况下,开关药物DARPin 15-1、17-1或18-1 (格式1) 与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。格式1表示以[α -CD3结合物]-[2合1DARPin]的顺序格式化的构建体。示出了在存在和不存在VEGF的情况下开关药物DARPin的EC50的变化。在存在和不存在100nM VEGF的情况下 α -CD3单-DARPin作为对照。8B:在存在和不存在100nM VEGF的情况下,开关药物DARPin13-3、15-3、17-3或18-3 (格式3) 与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。格式3表示以[2合1DARPin]-[Ni2C]-[α -CD3结合物]的顺序格式化的构建体,Ni2C表示非结合DARPin。示出了在存在和不存在VEGF的情况下开关药物DARPin的EC50的变化。在存在和不存在100nM VEGF的情况下 α -CD3单-DARPin作为对照。8C:在存在和不存在100nM VEGF的情况下,开关药物DARPin17-A和18-A (格式A) 与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。格式A表示以[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[2合1DARPin]的顺序格式化的构建体。示出了在存在和不存在VEGF的情况下开关药物DARPin的EC50的变化。 α -CD3单-DARPin作为对照。8D:在存在和不存在100nM VEGF的情况下,开关药物DARPin 17-B和18-B (格式B) 与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。格式B表示以[2合1DARPin]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]的顺序格式化的构建体。示出了在存在和不存在VEGF的情况下开关药物DARPin的EC50的变化。 α -CD3单-DARPin作为对照。

[0095] 图9:VEGF滴定分析。格式1([α -CD3结合物]-[2合1DARPin])或格式3([2合1DARPin]-[Ni2C]-[α -CD3结合物])的His标记的开关药物DARPin结合生物-scCD3 ϵ γ 的ELISA数据,该生物-scCD3 ϵ γ 结合至链霉亲和素包被的微量滴定板。9A:对开关药物DARPin 17-1进行滴定 (左图) 或保持在10nM的恒定浓度,其中可溶性VEGF从100nM滴定至 ~ 0.1 nM (右图)。可以观察到开关药物DARPin 17-1的VEGF依赖性结合曲线。9B:与9A相同,但使用开关药物DARPin 17-3,其中Ni2C是非结合DARPin。开关药物DARPin 17-3的固定和VEGF的滴定产生稳健的VEGF依赖性结合曲线。9C:对开关药物DARPin 18-3进行滴定 (左图) 或保持在100nM的恒定浓度,其中可溶性VEGF从500nM滴定至 ~ 0.5 nM (右图)。检测到稳健的VEGF依赖性结合信号。

[0096] 图10:本发明的四种开关药物DARPin构建体的均相时间分辨荧光 (HTRF) 数据。

10A:在不存在可溶性VEGF的情况下HTRF设置的示意图。生物-scCD3 ϵ v被铕标记的链霉亲和素分子结合,而开关药物DARPin构建体被d2标记的抗His抗体结合。在不存在VEGF的情况下,开关药物DARPin优先处于其闭合构象,因此预计到低信号强度。10B:添加可溶性VEGF后,开关药物DARPin打开并且预计结合信号会增加。10C:在不存在或存在100nM VEGF的情况下,开关药物DARPin 13-3、15-3、17-3或18-3的HTRF信号是PBS的x倍。对于所有四种构建体可观察到信号强度的明显差异。10D:滴定VEGF至恒定浓度的与图10C中相同的开关药物DARPin(20nM)的HTRF信号(PBS的倍数)。

[0097] 图11:在不存在或存在VEGF(100nM或400nM)的情况下开关药物DARPin 17-B的Jurkat细胞结合实验。其中2合1DARPin与VEGF结合物交换的对照构建体用作对照。

[0098] 图12:开关药物DARPin 13-A、13-B、15-A、15-B、17-A、17-B、18-A和18-B的T细胞活化测定(CD69+细胞以CD8+细胞的%表示)。如图所示,格式A(图12A)对应于:[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[2合1DARPin]且格式B(图12B)对应于:[2合1DARPin]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]。另外,使用TCE对照构建体([α -CD123结合物]-[α -CD3结合物])和Switchdrug形式对照(形式A使用[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[α -VEGF结合物],形式B使用[α -VEGF结合物]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物])。在不存在和存在100nM VEGF的情况下确定T细胞活化,并且在每张图中示出添加VEGF后EC50的变化。

[0099] 图13:应用于评估感兴趣的亲本DARPin与共价结合形成2合1DARPin的相容性的示例性剖析方法。该方法用于确定基于两个亲本重复结构域的后续组合设计的最佳起始点。图解示出了对亲本DARPin的N-末端侧的评估。C-末端侧的评估遵循相同的逻辑并且是类似的。在步骤1、2和4中的每个步骤中,产生包含模板非结合重复结构域(诸如SEQ ID NO:5)的一个或多个重复模块的亲本DARPin变体,随后测试所述变体与亲本DARPin的靶标的结合。在步骤3中,产生包含经修饰的封端模块和少一个内部重复模块的亲本DARPin的变体,随后测试所述变体与亲本DARPin的靶标的结合。进一步的详情在实施例9中提供。IR代表内部重复模块,N代表N-末端封端模块,C代表C-末端封端模块。

[0100] 图14:对麦芽糖结合蛋白(MBP)和氨基糖苷磷酸转移酶(APH)具有互相排斥结合特异性的2合1DARPin(即2合1DARPin 21(SEQ ID NO:90)和2合1DARPin 22(SEQ ID NO:91))的表征。14A:尺寸排阻色谱法(SEC)图谱。14B:2合1DARPin 21、2合1DARPin 22和亲本DARPin1号(SEQ ID NO:86)和2号(SEQ ID NO:87)与所示靶标APH或靶标MBP结合的多迹线SPR分析的应答曲线。亲本DARPin 1号与MBP结合(图5),亲本DARPin 2号与APH结合(图6)。14C:第一SPR竞争性结合测定的结果。2合1DARPin 21和2合1DARPin 22与不同浓度的可溶性MBP预温育40分钟,然后使样品在APH包被的SPR芯片上运行(图1和图3)。MBP充当结合APH的竞争剂,如通过MBP依赖性应答曲线(图2和图4)所观察到的。14D:第二SPR竞争性结合测定的结果。2合1DARPin 21和2合1DARPin 22与不同浓度的可溶性APH预温育40分钟,然后使样品在MBP包被的SPR芯片上运行(图1和图3)。APH充当结合MBP的竞争剂,如通过APH依赖性应答曲线(图2和图4)所观察到的。14E:基于竞争性ELISA的结合测定的结果。将最终浓度为100nM的2合1DARPin 21和2合1DARPin 22与连续稀释的MBP一起温育1小时,然后暴露于包被在ELISA板上的APH靶标。MBP充当结合APH的竞争剂,如通过MBP依赖性应答曲线所观察到的。14F:通过ELISA测得的2合1DARPin与靶标MBP(图1)或APH(图2)的独立结合。亲本DARPin 1号和2号用作阳性对照。在所示的不同浓度下测试2合1DARPin和亲本DARPin。

[0101] 图15:对scCD3 ϵ γ 和靶标A具有互相排斥结合特异性的2合1DARPin(即2合1DARPin 23(SEQ ID NO:92)、2合1DARPin 24(SEQ ID NO:93)和2合1DARPin 25(SEQ ID NO:94))的表征。15A:尺寸排阻色谱法(SEC)图谱。15B:2合1DARPin 23、2合1DARPin 24、2合1DARPin 25和亲本DARPin 3号(SEQ ID NO:3)和4号(SEQ ID NO:88)与所示靶标scCD3 ϵ γ 或靶标A结合的多迹线SPR分析的应答曲线。亲本DARPin 4号与靶标A结合(图7),亲本DARPin 3号与scCD3 ϵ γ 结合(图8)。15C:SPR竞争性结合测定的结果。将2合1DARPin 23与不同浓度的可溶性靶标A预温育4.5小时,然后使样品在生物-scCD3 ϵ γ 包被的SPR芯片上运行(图1)。靶标A充当结合scCD3 ϵ γ 的竞争剂,如通过靶标A依赖性应答曲线(图2)所观察到的。15D:2合1DARPin与它们两个靶标的结合的互相排斥性可以另选地通过基于HTRF的竞争性结合测定来测量。评估在不同浓度的非生物素化靶标A竞争剂的存在下2合1DARPin 23、2合1DARPin 24和2合1DARPin 25与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。对于所有测试的2合1DARPin,观察到与scCD3 ϵ γ 的结合的靶标A浓度依赖性减少。15E:通过ELISA测得的2合1DARPin与靶标A(图1)或scCD3 ϵ γ (图2)的独立结合。亲本DARPin 3号和4号用作阳性对照。在所示的不同浓度下测试2合1DARPin和亲本DARPin。

[0102] 图16:2合1DARPin 21(SEQ ID NO:90)、2合1DARPin 22(SEQ ID NO:91)、2合1DARPin 23(SEQ ID NO:92)、2合1DARPin 24(SEQ ID NO:93)和2合1DARPin 25(SEQ ID NO:94)以及亲本DARPin 1号、2号、3号和4号的2D互补位图示。黑色或白色单元格指示每个残基的来源。粗体表示的残基是共有残基。斜体表示的残基与亲本序列相比是突变的残基,因此既不直接来源于第一亲本也不直接来源于第二亲本。

具体实施方式

[0103] 如本文所公开和例示的,本公开在第一方面提供了产生经设计的重复结构域,优选经设计的锚蛋白重复结构域的方法,所述经设计的重复结构域对两个靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与两个靶标的结合是互相排斥的。

[0104] 经设计的锚蛋白重复结构域是经设计的锚蛋白重复蛋白的结构单元。经设计的重复蛋白文库(包括经设计的锚蛋白重复蛋白文库)(W02002/020565;Binz等人, Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004; Stumpp等人, Drug Discov. Today 13, 695-701, 2008)可以用于选择以高亲和力结合到其靶标的靶标特异性的经设计的重复结构域。此类靶标特异性的经设计的重复结构域进而可以用作用于治疗疾病的重组结合蛋白的有价值的组分。

[0105] 经设计的锚蛋白重复蛋白是一类结合分子,其具有克服单克隆抗体限制的潜力,从而允许新型治疗方法。此类锚蛋白重复蛋白可以包含单个经设计的锚蛋白重复结构域,或者可以包含两个、三个、四个、五个或更多个具有相同或不同靶标特异性的经设计的锚蛋白重复结构域的组合(Stumpp等人, Drug Discov. Today 13, 695-701, 2008; 美国专利号9,458,211)。仅包含单个经设计的锚蛋白重复结构域的锚蛋白重复蛋白为小蛋白质(14kDa),其可被选择为以高亲和力和特异性结合给定靶蛋白。这些特征以及在一种蛋白中组合两个、三个、四个、五个或更多个经设计的锚蛋白重复结构域的可能性使得经设计的锚蛋白重复蛋白成为理想的激动性、拮抗性和/或抑制性药物候选物。此外,此类锚蛋白重复蛋白可被工程化以携带各种效应子功能,例如细胞毒性剂或半衰期延长剂,从而实现全新的药物形式。总之,经设计的锚蛋白重复蛋白为具有超过现有抗体药物的潜力的下一代蛋白质治

疗剂的示例。

[0106] 经设计的锚蛋白重复结构域的结合特异性由每个重复结构域中包含的重复模块的性质决定。内部重复模块和末端封端模块(C-封端或N-封端模块)两者可以有助于所述特异性。出乎意料地,本发明的方法允许通过组合两个亲本重复结构域的重复模块来产生对两个靶标具有互相排斥结合特异性的单个经设计的重复结构域(或单结构域)。因此,对第一靶标和第二靶标中每一者的所述结合特异性继承自对亲本重复结构域各自靶标的结合特异性。本发明的此类经设计的重复结构域保持了常规经设计的重复结构域的有利特性,包括结合特征。本发明的经设计的重复结构域可用于进一步扩大重复蛋白的应用,例如作为控制机制诸如蛋白开关。

[0107] 定义

[0108] 除非本文另外定义,否则结合本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。一般来讲,结合本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学使用的命名法以及其技术是本领域熟知的和常用的那些。

[0109] 除非另外说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被理解为开放式术语。如果本发明的各方面被描述为“包括”特征,则还设想到“由该特征组成”或“基本上由该特征组成”的实施方案。除非另外提出权利要求,否则本文所提供的任何和全部实例或示例性语言(例如“诸如”)仅仅旨在更好地举例说明本公开,并且并不用来限制本公开的范围。说明书中的任何语言都不应理解为表示任何不受权利要求书保护的要素是实施本公开所必需的。除了在操作示例中,或在另外指明的情况下,本文所用的表示成分或反应条件的量的所有数字在所有情况下均应理解为由相关领域的技术人员将理解的术语“约”修饰。除非另有说明,否则如本文所用的术语“约”等同于给定数值的 $\pm 10\%$ 。

[0110] 除非本文另外说明,否则本文对值的范围的表述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值和每个端点的简略方法,并且每个单独值和端点并入本说明书中,如同其在本文中被单独地表述一样。

[0111] 术语“核酸”是指多核苷酸分子,其可以是单链或双链的核糖核酸(RNA)分子或脱氧核糖核酸(DNA)分子,包括DNA或RNA的经修饰形式和人造形式。核酸可以以分离的形式存在,或者被包含在重组核酸分子或载体中。

[0112] 在本发明的上下文中,术语“蛋白质”是指包含多肽的分子,其中多肽的至少一部分通过在单个多肽链内和/或多个多肽链之间形成二级、三级和/或四级结构而具有或能够获得限定的三维排列。如果蛋白质包含两个或更多个多肽链,则各个多肽链可非共价连接或共价连接,例如通过两个多肽之间的二硫键连接。通过形成二级和/或三级结构而单独具有或能够获得限定的三维排列的蛋白质部分被称为“蛋白质结构域”。这种蛋白质结构域是本领域技术人员熟知的。

[0113] 在重组蛋白质、重组多肽等中使用的术语“重组”是指所述蛋白质或多肽是通过使用本领域技术人员熟知的重组DNA技术产生的。例如,可将编码多肽的重组DNA分子(例如,通过基因合成产生)克隆到细菌表达质粒(例如,pQE30,QIAgen公司)、酵母表达质粒、哺乳动物表达质粒或植物表达质粒,或者能够体外表达的DNA中。如果例如将此类重组细菌表达

质粒插入适当的细菌(例如,大肠杆菌(*Escherichia coli*))中,则这些细菌可产生由该重组DNA编码的多肽。对应产生的多肽或蛋白质被称为重组多肽或重组蛋白质。

[0114] 在本发明的上下文中,术语“多肽”涉及由多个(即两个或更多个)经由肽键连接的氨基酸的链组成的分子。优选地,多肽由八个以上经由肽键连接的氨基酸组成。术语“多肽”还包括通过半胱氨酸的S-S桥连接在一起的氨基酸的多个链。多肽是本领域技术人员熟知的。

[0115] 术语“靶标”是指单个分子,诸如核酸分子、多肽或蛋白、碳水化合物或任何其他天然或非天然存在的分子,包括此类单个分子的任何部分,或者两种或更多种此类分子的复合物。靶标可以是全细胞或组织样品,或者可以是任何非天然的分子或部分。优选地,靶标是天然存在的或非天然的多肽或含有化学修饰(例如,通过天然或非天然磷酸化、乙酰化或甲基化修饰)的多肽。

[0116] 专利申请W02002/020565和Forrer等人,2003(Forrer,P.,Stumpp,M.T.,Binz,H.K.,Pluckthun,A.,2003.FEBS Letters 539,2-6)包含重复蛋白特征和重复结构域特征、技术和应用的一般描述。术语“重复蛋白”是指包含一个或多个重复结构域的蛋白质。优选地,重复蛋白包含一个、两个、三个、四个、五个或六个重复结构域。此外,所述重复蛋白可包含附加的非重复蛋白质结构域、多肽标签和/或肽接头。重复结构域可以是结合结构域。

[0117] 术语“重复结构域”是指包含两个或更多个连续重复模块作为结构单元的蛋白质结构域,其中所述重复模块具有结构和序列同源性。任选地,重复结构域还包含N-末端和/或C-末端的封端模块。为了清楚起见,封端模块可以是重复模块,并且因此可以有助于重复结构域的两个或更多个连续重复模块。本领域从业人员根据以下各项的示例熟知此类重复结构域、重复模块和封端模块、序列基序以及结构同源性和序列同源性:锚蛋白重复结构域(Binz等人,J.Mol.Biol.332,489-503,2003;Binz等人,2004,loc.cit.;W02002/020565;W02012/069655)、富含亮氨酸的重复结构域(W02002/020565)、三角形四肽重复结构域(Main,E.R.,Xiong,Y.,Cocco,M.J.,D'Andrea,L.,Regan,L.,Structure 11(5),497-508,2003)和玃狨重复结构域(W02009/040338)。本领域技术人员还熟知,此类重复结构域不同于包含重复氨基酸序列的蛋白质,其中每个重复氨基酸序列能够形成单个结构域(例如纤连蛋白的FN3结构域)。

[0118] 术语“锚蛋白重复结构域”是指包含两个或更多个连续锚蛋白重复模块作为结构单元的重复结构域,其中所述锚蛋白重复模块具有结构同源性和序列同源性。

[0119] 如在“重复结构域的部分”(诸如此类)中使用的术语“部分”包括重复结构域的一部分或整个重复结构域。此类部分可以包括此类重复结构域中包含的一个或多个重复模块或此类重复结构域的序列中包含的氨基酸的任何片段或链段。优选地,如本文所述的重复结构域的部分包含重复结构域的氨基酸序列的不少于10个(更优选地不少于20个,甚至更优选地不少于30个)连续氨基酸。更优选地,此类部分包含重复结构域的至少一个完整重复模块。

[0120] 如在经设计的重复蛋白、经设计的重复结构域等中所用,术语“经设计的”是指此类重复蛋白和重复结构域分别是人造的并且在自然界中不存在的性质。本发明的结合结构域是经设计的重复结构域。优选地,本发明的经设计的重复结构域是经设计的锚蛋白重复结构域。

[0121] 术语“重复模块”是指经设计的重复结构域的重复氨基酸序列和结构单元,其最初来源于天然存在的重复蛋白的重复单元。包含在重复结构域中的每个重复模块来源于天然存在的重复蛋白家族或亚家族(优选地锚蛋白重复蛋白家族)的一个或多个重复单元。此外,包含在重复结构域中的每个重复模块可以包含从同源重复模块导出的“重复序列基序”,该同源重复模块从靶标上选择的重复结构域获得并且具有相同的靶标特异性。如本发明中使用的重复模块涵盖内部重复模块和封端模块,诸如N-末端和C-末端封端模块。“内部重复模块”是指侧接两个重复模块的重复模块。换句话说,内部重复模块在N-末端侧接一个重复模块且在C-末端侧接另一个重复模块。

[0122] 因此,术语“锚蛋白重复模块”是指最初来源于天然存在的锚蛋白重复蛋白的重复单元的重复模块。锚蛋白重复蛋白是本领域技术人员熟知的。经设计的锚蛋白重复蛋白先前已有描述;参见,例如,国际专利公开号W02002/020565、W02010/060748、W02011/135067、W02012/069654、W02012/069655、W02014/001442、W02014/191574、W02014/083208、W02016/156596和W02018/054971,所有这些均全文以引用方式并入。通常,锚蛋白重复模块包含约31个至33个氨基酸残基,这些氨基酸残基形成由环隔开的两个 α 螺旋。

[0123] 重复模块可以包含具有为了选择靶标特异性重复结构域而在文库中未被随机化的氨基酸残基的位置(“非随机化位置”或“固定位置”在本文中可互换使用)和具有为了选择靶标特异性重复结构域而在文库中已被随机化的氨基酸残基的位置(“随机化位置”)。非随机化位置包含框架残基,也可以包含靶标相互作用残基。随机化位置包含靶标相互作用残基。“已被随机化”意指在重复模块的氨基酸位置处允许两个或更多个氨基酸,例如,其中允许通常二十种天然存在的氨基酸中的任一种,或者其中允许二十种天然存在的氨基酸中的大多数,诸如除半胱氨酸之外的氨基酸,或除甘氨酸、半胱氨酸和脯氨酸之外的氨基酸。

[0124] 术语“互补位”或“结合表面”是指重复结构域的提供对一个或多个靶标的结合特异性的区域。如本文所用的互补位可包含靶标相互作用残基和框架残基。互补位残基的位置定义如下:

[0125] 在内部重复模块中,对应于SEQ ID NO:39的位置3、4、6、11、14和/或15的位置包含靶标相互作用残基,并且对应于SEQ ID NO:39的位置10的位置包含框架残基;在N-末端封端模块中,对应于SEQ ID NO:36的位置4、5、8、11和/或12的位置包含靶标相互作用残基,并且对应于SEQ ID NO:36的位置7的位置包含框架残基;在C-末端封端模块中,对应于SEQ ID NO:38的位置3、4、6、14和/或15的位置包含靶标相互作用残基,并且对应于SEQ ID NO:38的位置10和11的位置包含框架残基。

[0126] 术语“重复序列基序”是指从一个或多个重复模块导出的氨基酸序列。优选地,所述重复模块来自对相同靶标具有结合特异性的重复结构域。此类重复序列基序包含框架残基位置和靶标相互作用残基位置。所述框架残基位置对应于重复模块的框架残基位置。同样,所述靶标相互作用残基位置对应于重复模块的靶标相互作用残基的位置。重复序列基序包含非随机化位置和随机化位置。

[0127] 术语“重复单元”是指包含一种或多种天然存在的蛋白质的序列基序的氨基酸序列,其中所述“重复单元”存在于多个拷贝中,并且表现出确定蛋白质折叠的所有所述基序共有的限定的折叠拓扑结构。此类重复单元的示例包括富含亮氨酸的重复单元、锚蛋白重复单元、犰狳重复单元、三十四肽重复单元、HEAT重复单元和富含亮氨酸的变体重复单元。

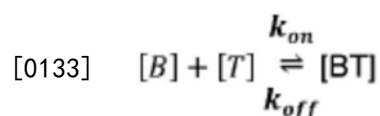
[0128] 术语“靶标相互作用残基”是指有助于与靶标直接相互作用的重复模块的氨基酸残基。此类残基的贡献可以例如在结合测定中(例如在诱变研究中)进行测试,以鉴定重复结构域以其原始结合亲和力或量(即其在不存在任何突变的情况下的结合亲和力或量)结合靶标所需的、足够的和/或必需的残基。在本发明的上下文中,与未突变的重复结构域与靶标之间的结合相互作用相比,如果重复结构域与靶标之间至少10%的结合相互作用的丧失是由所述结构域内的残基突变引起的,则认为所述残基有助于与所述靶标的相互作用。靶标相互作用残基还可以通过与靶标结合的重复结构域的结构分析来确定。

[0129] 术语“框架残基”是指重复模块的氨基酸残基,其有助于折叠拓扑结构,即有助于所述重复模块的折叠或有助于与相邻模块的相互作用。此类贡献可为与重复模块中其他残基的相互作用,或是对如 α -螺旋或 β -片层中存在的多肽主链构象的影响,或是参与形成直链多肽或环的氨基酸延伸。

[0130] 此类框架和靶标相互作用残基可通过分析由物理化学方法(诸如X射线晶体学、NMR和/或CD光谱)获得的结构数据,或通过与结构生物学和/或生物信息学领域从业者熟知的已知和相关结构信息进行比较来鉴定。

[0131] 术语“结合特异性”、“对靶标具有结合特异性”、“特异性地结合到靶标”、“以高特异性结合到靶标”、“特异于靶标”或“靶标特异性”等意指,结合蛋白或结合结构域以比其结合到不相关蛋白(诸如大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MBP))更低的解离常数结合(即,其以更高的亲和力结合)到靶标。优选地,靶标的解离常数(K_D)是MBP的对应解离常数的至少 $1/10^2$ 、更优选地至少 $1/10^3$ 、更优选地至少 $1/10^4$,或更优选地至少 $1/10^5$ 。确定蛋白质-蛋白质相互作用的解离常数的方法,诸如基于表面等离子共振(SPR)的技术(例如,SPR均衡分析)或等温滴定量热法(ITC)是本领域技术人员熟知的。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下进行测量,则具体蛋白质-蛋白质相互作用的测量 K_D 值可以是变化的。因此,优选地利用标准化蛋白质溶液和标准化缓冲液(诸如,PBS)来进行 K_D 值的测量。

[0132] 任何分子与另一种分子的结合由两种力控制,即结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。任何结合物[B]对靶标[T]的亲和力则可由平衡解离常数 K_D 表示,其为 k_{off}/k_{on} 的商。



[0134] k_{on} 是结合反应的二阶速率常数,单位为 $M^{-1}s^{-1}$,而解离反应 k_{off} 是一阶速率常数,单位为 s^{-1} 。由此清楚的是,缔合反应取决于反应物的浓度,而解离独立于浓度,遵循简单的指数衰减函数。

[0135] 测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的,其中任一种均可用于本发明的目的。例如,如本文所示例的,特定结合部分对药物分子靶标的结合亲和力可表示为 K_D 值,其是指结合部分和药物分子靶标的解离常数。 K_D 是解离速率(也称为“解离率(k_{off})”)与缔合速率或“结合率(k_{on})”的比率。因此, K_D 等于 k_{off}/k_{on} 并且表示为摩尔浓度(M),并且 K_D 越小,结合的亲和力越强。

[0136] K_D 值可使用任何合适的方法测定。用于测量 K_D 的一种示例性方法是表面等离子体共振(SPR)(参见例如Nguyen等人,Sensors (Basel).2015年5月5日;15(5):10481-510)。 K_D 值可通过SPR使用生物传感器系统诸如BIACORE®系统来测量。BIAcore动力学分析包括

例如分析抗原与其表面具有固定的分子(例如包含表位结合结构域)的芯片的结合和解离。用于确定蛋白质的 K_D 的另一种方法是使用生物层干涉测量法进行的(参见例如Shah等人, *J Vis Exp.* 2014; (84):51383)。 K_D 值可使用OCTET®技术(Octet QKe系统, ForteBio)测量。另选地或另外地,也可使用KinExA®(动力学排除测定)测定,购自Sapidyne Instruments(Boise, 同上)。本文涵盖适用于评估两个结合配偶体之间的结合亲和力的任何方法。表面等离子体共振(SPR)是特别优选的。最优选地,在PBS中并通过SPR确定 K_D 值。通过SPR分析对结合靶标的经设计的重复结构域的 K_D 的典型和优选的确定描述于实施例2中。

[0137] 术语“PBS”意指含有137mM NaCl、10mM磷酸盐和2.7mM KCl并且pH为7.4的磷酸盐缓冲水溶液。

[0138] 术语“双重结合特异性”或“双重特异性”是指本发明的经设计的重复结构域对两个靶标具有结合特异性的特性,其中这两个靶可以是单个靶分子上的两个表位或其中所述两个表位中的每个表位位于不同靶分子上的两个表位。这些表位优选彼此不同。

[0139] 如共价结合重复模块中使用的术语“共价结合”包括“共价连接”和“共价合并”所述重复模块。共价连接两个重复模块是指通过化学键诸如肽键直接连接所述重复模块。共价连接涵盖通过直接肽键或通过所述重复模块之间的接头的连接。此类接头可以是非肽化学接头或肽接头,其中所述肽接头可以是包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸的任何合适的肽接头。另选地,所述肽接头是完整的非结合重复模块。本文描述了非结合重复模块的示例。共价合并两个(亲本)重复模块是指从两个亲本重复模块产生单个杂合重复模块的过程。此类杂合重复模块包含来自两个亲本重复模块的序列元件。

[0140] 术语“合并模块”或“混合模块”是指重复模块,优选锚蛋白重复模块,可通过共价合并两个亲本重复模块获得,并且包含第一亲本重复模块的至少一个靶标相互作用残基和第二亲本重复模块的至少一个靶标相互作用残基。

[0141] 如互相排斥结合中所用的术语“互相排斥性”或“互相排斥”是指本发明的经设计的重复结构域能够仅以基本上非同时的方式结合第一靶标和第二靶标的特性。在此类互相排斥结合中,所述第一靶标与重复结构域的结合影响所述第二靶标与重复结构域的结合(和/或反之亦然),使得基本上防止所述第一靶标和所述第二靶标的同时结合。这种效应的根本原因包括空间位阻和/或互补位的重叠。在本发明的上下文中,如果当与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者结合时,所述重复结构域不能结合超过1%、超过2%、超过3%、超过4%、超过5%、超过10%、超过15%、超过20%、超过25%、超过30%、超过35%、超过40%、超过45%或超过50%摩尔当量的另一靶标,则认为本发明的经设计的重复结构域与其第一靶标和第二靶标之间的结合相互作用是互相排斥的。此类互相排斥性的程度可以通过竞争结合测定来测量,其中将第一靶标与重复结构域的结合与第二靶标与重复结构域的结合进行比较。如本领域技术人员已知的,此类竞争结合测定可以从抗体领域中使用的标准竞争结合测定进行修改。

[0142] 如本文所用的术语“治疗剂”是指提供治疗效果的药物、分子、核酸、蛋白、组合物或其他物质。术语“治疗剂”和“药物”可互换使用。

[0143] 在整个本公开中,除非明确定义,否则关于“第一”和“第二”实体的顺序或取向,如

例如在第一靶标和第二靶标、第一重复结构域和第二重复结构域、第一结合特异性和第二结合特异性等中所用,并不意在指定一个特定的顺序或取向,并且涵盖替代方案。换句话说,除非另外明确定义,否则对此类第一实体和第二实体的任何提及也涵盖其中第一实体对应于第二实体并且第二实体对应于第一实体的替代顺序。

[0144] 根据本发明的生产方法

[0145] 在一个方面,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0146] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性;以及

[0147] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

[0148] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0149] DARPin(经设计的锚蛋白重复蛋白)是包含锚蛋白重复结构域的重复蛋白,该锚蛋白重复结构域通常包含一个或多个内部重复模块,这些内部重复模块除了它们的随机化位置之外是相同或相似的,并且侧接N-末端和C-末端封端重复模块(参见,例如Binz等人2003)。如本文所用,术语“重复模块”涵盖内部重复模块和末端重复模块(C-封端模块和N-封端模块)。典型的内部重复模块的33个氨基酸位置中有27个氨基酸位置是高度保守的,而其他6个氨基酸位置是较不保守的,并且在很大程度上负责锚蛋白重复结构域与其靶标的特异性相互作用(Binz等人2003)。锚蛋白重复结构域的互补位由主要由内部重复模块和有时还有封端重复模块的这些可变位置形成的连续表面形成。

[0150] 本发明的发明人已经令人惊讶地发现,具有双重且互相排斥的结合特异性的单个经设计的重复结构域(即单结构域)可以通过组合来自两个亲本重复结构域的氨基酸序列元件(诸如重复模块)来生成,其中亲本重复结构域优选地都是锚蛋白重复结构域,并且所生成的具有双重且互相排斥的结合特异性的经设计的重复结构域因此也是锚蛋白重复结构域。

[0151] 根据本发明的生产方法的基本概念例示于图1。正如从图1中可以看出,第一(亲本)重复结构域(1)的对第一靶标(靶标A)具有结合特异性的一部分和第二(亲本)重复结构域(2)的对第二靶标(靶标B)具有结合特异性的一部分可以共价结合以形成新设计的重复结构域。示出了亲本重复结构域的相应互补位或结合表面((4)和(5))。此类新形成的经设计的重复结构域在本文中也称为“2合1DARPin”或“开关DARPin”(6)。此类经设计的重复结构域可以以互相排斥方式结合两个靶标A和B,即结合靶标A或靶标B。另外,经设计的重复结构域中的一个或几个内部重复模块可以是混合(或合并)重复模块(7)。如果重复模块的互补位包含来自第一亲本重复蛋白中的相应模块的至少一个靶标相互作用残基和来自第二亲本重复蛋白中的相应模块的至少一个靶标相互作用残基,则该重复模块称为混合重复模块。本发明的经设计的重复结构域的互相排斥结合特性例示于图2中。由于本发明的经设计的重复结构域的两个互补位的紧密接近或重叠,所述经设计的重复结构域能够单独结合靶

标A(图2A)或靶标B(图2B),但不能同时结合两个靶标(图2C),因为靶标A和靶标B两者的同时结合受空间位阻。这种互相排斥的结合特征因此使得能够设计用于药物分子或其他靶分子(诸如例如细胞表面受体)的条件性活化或失活的接通或关断开关,如图3和图4中所例示。这种互相排斥结合特征也将本发明的经设计的重复结构域与其他锚蛋白重复蛋白格式区别开(Mohan,K.等人,2019,Science,364(6442);WO 2020/190852 A2)。

[0152] 如本发明中所用的共价结合包括共价连接或共价合并亲本重复模块。这种区别取决于与亲本模块中包含的靶标相互作用残基相比,由共价结合产生的重复模块中包含的靶标相互作用残基的性质和位置。共价连接第一亲本重复模块和第二亲本重复模块意指通过化学键诸如肽键连接两个亲本重复模块。另选地,共价连接是指通过接头连接所述第一重复模块和第二重复模块。

[0153] 共价合并第一亲本重复模块和第二亲本重复模块产生单个合并(或混合)重复模块,该单个合并(或混合)重复模块包含来自第一亲本重复模块的至少一个靶标相互作用残基和来自第二亲本重复模块的至少一个靶标相互作用残基。因此,k个合并重复模块可以从共价合并2k个亲本重复模块获得。此类共价结合的效应是由于两个靶标之间的空间位阻,所产生的经设计的重复结构域只能以互相排斥方式结合两个靶标。在共价合并的情况下,任何合并重复模块的存在都可以进一步增强经设计的重复结构域的互相排斥结合效应,这是由于此类合并模块可以在给定的时间结合一个合并或另一个靶标的事实。

[0154] 因此,在一个实施方案中,所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价连接所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。共价连接此类重复模块可通过本领域熟知的方法实现,并且可牵涉任何类型的共价键。在一个优选的实施方案中,所述共价连接牵涉肽键。在一个优选的实施方案中,所述共价结合包括共价连接所述第一重复结构域的一个重复模块和所述第二重复结构域的一个重复模块。在另一个实施方案中,所述共价结合包括通过接头共价连接所述第一重复结构域的一个重复模块和所述第二重复结构域的一个重复模块。在一个实施方案中,所述接头是化学非肽接头。在另一个实施方案中,所述接头是肽接头,其中优选所述肽接头包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在另一个实施方案中,所述接头是非结合重复模块。此类非结合重复模块的示例由SEQ ID NO:89提供。

[0155] 在一个实施方案中,所述共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块包括共价合并所述第一重复结构域的所述至少一个重复模块和所述第二重复结构域的所述至少一个重复模块。在另一个实施方案中,所述第一重复结构域的一个重复模块可与所述第二重复结构域的一个重复模块共价合并。在另一个实施方案中,所述第一重复结构域的两个重复模块可与所述第二重复结构域的两个重复模块共价合并。在另一个实施方案中,所述第一重复结构域的三个重复模块可与所述第二重复结构域的三个重复模块共价合并。

[0156] 在一些实施方案中,所述第一重复结构域和/或所述第二重复结构域可独立地包含至少1个重复模块、至少2个重复模块、至少3个重复模块、至少4个重复模块、至少5个重复模块或至少6个重复模块。在一些实施方案中,所述第一重复结构域和/或第二重复结构域可独立地包含1至6个重复模块、2至6个重复模块、3至6个重复模块、4至6个重复模块或5至6

个重复模块。在一些实施方案中,所述第一重复结构域和/或第二重复结构域可独立地包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块。在一些实施方案中,所述第一重复结构域和/或第二重复结构域可独立地包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块以及至少1个内部重复模块、至少2个内部重复模块、至少3个内部重复模块或至少4个内部重复模块。在一些实施方案中,所述第一重复结构域和/或第二重复结构域可独立地包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块以及1至4个内部重复模块、1至3个内部重复模块或1至2个内部重复模块。

[0157] 在一些优选的实施方案中,所述第一重复结构域包含3至5个重复模块,并且所述第二重复结构域包含3至5个重复模块。在一些更优选的实施方案中,包含3至5个重复模块的所述第一重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、1至3个内部重复模块和C-末端封端模块,并且包含3至5个重复模块的所述第二重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、1至3个内部重复模块和C-末端封端模块。

[0158] 在一些优选的实施方案中,所述第一重复结构域和第二重复结构域中的每个重复结构域包含4个重复模块。在一些更优选的实施方案中,包含4个重复模块的所述第一重复结构域和第二重复结构域中的每个重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、两个内部重复模块和C-末端封端模块。

[0159] 在一些优选的实施方案中,所述第一重复结构域和第二重复结构域中的每一个重复结构域包含5个重复模块。在一些更优选的实施方案中,包含5个重复模块的所述第一重复结构域和第二重复结构域中的每个重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、三个内部重复模块和C-末端封端模块。

[0160] 在一些优选的实施方案中,所述第一重复结构域包含4个重复模块,并且所述第二重复结构域包含5个重复模块。在一些更优选的实施方案中,包含4个重复模块的所述第一重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、两个内部重复模块和C-末端封端模块,并且包含5个重复模块的所述第二重复结构域从N-末端至C-末端包含:N-末端封端模块、三个内部重复模块和C-末端封端模块。

[0161] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及两个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及三个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及四个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及五个内部重复模块。在任何上述实施方案中,“和”连接词是优选的。因此,在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及两个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及三个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及四个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经

设计的重复结构域包含N-末端封端模块和C-末端封端模块,以及五个内部重复模块。

[0162] 在一个实施方案中,所述N-末端封端模块与所述第一重复结构域中包含的N-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性。

[0163] 在一个实施方案中,所述C-末端封端模块与所述第二重复结构域中包含的C-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性。

[0164] 在一个实施方案中,所述N-末端封端模块与所述第一重复结构域中包含的N-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性,并且所述C-末端封端模块与所述第二重复结构域中包含的C-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性。

[0165] 因此,在一个具体实施方案中,所述N-末端封端模块与所述第一重复结构域中包含的N-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少90%的同一性,并且所述C-末端封端模块与所述第二重复结构域中包含的C-末端封端模块在氨基酸序列上具有至少90%的同一性。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域中包含的重复模块的数目对应于第一重复结构域的所述部分中包含的重复模块和第二重复结构域的所述部分中包含的重复模块的总和。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域中包含的重复模块的数目对应于 $n-m$,其中 n 是第一重复结构域的所述部分中包含的重复模块和第二重复结构域的所述部分中包含的重复模块的总和,并且 m 是所述经设计的重复结构域中合并模块的数目。

[0166] 在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分包含重复模块链,该重复模块链包含 x 个重复模块和/或第二重复结构域的所述部分包含重复模块链,该重复模块链包含 y 个重复模块,其中 x 是选自1至所述第一重复结构域中包含的重复模块总数的范围内的整数,并且 y 是选自1至所述第二重复结构域中包含的重复模块总数的范围内的整数。

[0167] 在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分可选自由以下项组成的组:所述第一重复结构域中2个重复模块的链、3个重复模块的链、4个重复模块的链、5个重复模块的链和6个重复模块的链,并且/或者第二重复结构域的所述部分可选自由以下项组成的组:所述第二重复结构域中包含的2个重复模块的链、3个重复模块的链、4个重复模块的链、5个重复模块的链和6个重复模块的链。在一些实施方案中,与对应的第一重复结构域或第二重复结构域中包含的重复模块的顺序相比,所述链是重复模块的连续链。在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分包含整个第一重复结构域和/或第二重复结构域的所述部分包含整个第二重复结构域。在上述实施方案中,第一重复结构域的所述部分的长度或大小可以独立于第二重复结构域的所述部分的长度或大小。

[0168] 在一个实施方案中,所述第一重复结构域的所述部分包含所述第一重复结构域的

N-末端封端模块和至少一个内部重复模块,并且所述第二重复结构域的所述部分包含所述第二重复结构域的C-末端封端模块和至少一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述第一重复结构域的所述部分包含所述第一重复结构域的C-末端封端模块和至少一个内部重复模块,并且所述第二重复结构域的所述部分包含所述第二重复结构域的N-末端封端模块和至少一个内部重复模块。在一个替代实施方案中,所述第一重复结构域的所述部分包含所述第一重复结构域的至少一个内部重复模块,并且所述第二重复结构域的所述部分包含所述第二重复结构域的N-末端封端模块、C-末端封端模块和至少一个内部重复模块。

[0169] 在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分可代表所述第一重复结构域的氨基酸序列的1%至5%、1%至10%、1%至15%、1%至20%、1%至25%、1%至30%、1%至35%、1%至40%、1%至45%、1%至50%、1%至55%、1%至60%、1%至65%、1%至70%、1%至75%、1%至80%、1%至85%、1%至90%、1%至95%或1%至100%并且/或者第二重复结构域的所述部分可代表所述第二重复结构域的氨基酸序列的1%至5%、1%至10%、1%至15%、1%至20%、1%至25%、1%至30%、1%至35%、1%至40%、1%至45%、1%至50%、1%至55%、1%至60%、1%至65%、1%至70%、1%至75%、1%至80%、1%至85%、1%至90%、1%至95%或1%至100%。

[0170] 在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分可代表所述第一重复结构域的氨基酸序列的1%至100%、5%至100%、10%至100%、15%至100%、20%至100%、25%至100%、30%至100%、35%至100%、40%至100%、45%至100%、50%至100%、55%至100%、60%至100%、65%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、85%至100%、90%至100%或95%至100%,并且/或者第二重复结构域的所述部分可代表所述第二重复结构域的氨基酸序列的1%至100%、5%至100%、10%至100%、15%至100%、20%至100%、25%至100%、30%至100%、35%至100%、40%至100%、45%至100%、50%至100%、55%至100%、60%至100%、65%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、85%至100%、90%至100%或95%至100%。

[0171] 在一些实施方案中,第一重复结构域的所述部分可代表所述第一重复结构域的氨基酸序列的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%,并且/或者第二重复结构域的所述部分可代表所述第二重复结构域的氨基酸序列的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%。在上述实施方案中,第一重复结构域的所述部分的长度或大小可以独立于第二重复结构域的所述部分的长度或大小。在一些实施方案中,与第一重复结构域和第二重复结构域的对应氨基酸序列相比,所述部分是连续的氨基酸序列。

[0172] 在一些实施方案中,第一重复结构域的任何此类部分与所述第一重复结构域的对应氨基酸序列在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性,并且/或者第二重复结构域的任何此类部分与所述第二重复结构域的对应氨基酸序列在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至

少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性。

[0173] 在一个实施方案中,所述第一重复结构域的N-末端片段可与所述第二重复结构域的C-末端片段共价结合。在另一个实施方案中,所述第一重复结构域的C-末端片段可与所述第二重复结构域的N-末端片段共价结合。

[0174] 在一些实施方案中,第一重复结构域的此类片段可代表对应于所述第一重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的1%至5%、1%至10%、1%至15%、1%至20%、1%至25%、1%至30%、1%至35%、1%至40%、1%至45%、1%至50%、1%至55%、1%至60%、1%至65%、1%至70%、1%至75%、1%至80%、1%至85%、1%至90%、1%至95%或1%至100%的氨基酸序列,并且/或者第二重复结构域的此类片段可代表对应于所述第二重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的1%至5%、1%至10%、1%至15%、1%至20%、1%至25%、1%至30%、1%至35%、1%至40%、1%至45%、1%至50%、1%至55%、1%至60%、1%至65%、1%至70%、1%至75%、1%至80%、1%至85%、1%至90%、1%至95%或1%至100%的氨基酸序列。

[0175] 在一些实施方案中,第一重复结构域的此类片段可代表对应于所述第一重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的1%至100%、5%至100%、10%至100%、15%至100%、20%至100%、25%至100%、30%至100%、35%至100%、40%至100%、45%至100%、50%至100%、55%至100%、60%至100%、65%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、85%至100%、90%至100%或95%至100%的连续氨基酸链段,并且/或者第二重复结构域的此类片段可代表对应于所述第二重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的1%至100%、5%至100%、10%至100%、15%至100%、20%至100%、25%至100%、30%至100%、35%至100%、40%至100%、45%至100%、50%至100%、55%至100%、60%至100%、65%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、85%至100%、90%至100%或95%至100%的氨基酸序列。

[0176] 在一些实施方案中,第一重复结构域的此类片段可代表对应于所述第一重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%的氨基酸序列,并且/或者第二重复结构域的此类片段可代表对应于所述第二重复结构域的氨基酸序列中包含的连续氨基酸的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%的氨基酸序列。在上述实施方案中,第一重复结构域的所述片段的长度或大小可以独立于第二重复结构域的所述片段的长度或大小。

[0177] 在一个优选的实施方案中,重复结构域的片段对应于从所述重复结构域(诸如上述实施方案中的第一重复结构域或第二重复结构域)的一个末端(N-末端或C-末端)开始的氨基酸序列。如本文所用,共价结合重复结构域的N-末端片段与另一重复结构域的C-末端片段包括共价连接或共价合并两个片段。

[0178] 在一些实施方案中,第一重复结构域的任何此类片段与所述第一重复结构域的对应该氨基酸序列在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至

少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性,并且/或者第二重复结构域的任何此类片段与所述第二重复结构域的对应氨基酸序列在氨基酸序列上具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%的同一性。

[0179] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括在步骤(i)之后的步骤(i)(2),其中步骤(i)(2)包括评价所述第一重复结构域和/或所述第二重复结构域在N末端侧和/或在C末端侧与另一重复结构域共价结合的相容性。所述评价的程度可根据所述第一重复结构域和第二重复结构域的结构特性以及它们各自的靶标而变化。在一些实施方案中,所述评价至少包括确定所述第一重复结构域的N-末端封端模块和/或C-末端封端模块是否有助于所述第一重复结构域与所述第一靶标的结合,和/或确定所述第二重复结构域的N-末端封端模块和/或C-末端封端模块是否有助于所述第二重复结构域与所述第二靶标的结合。在一些实施方案中,所述评价包括确定所述第一重复结构域的N-末端封端模块和/或C-末端封端模块和与所述N-末端封端模块和/或C-末端封端模块相邻的内部重复模块是否有助于所述第一重复结构域与所述第一靶标的结合,和/或确定所述第二重复结构域的N-末端封端模块和/或C-末端封端模块和与所述N-末端封端模块和/或C-末端封端模块相邻的内部重复模块是否有助于所述第二重复结构域与所述第二靶标的结合。

[0180] 进行这种结合贡献确定的示例性方式是产生所述第一重复结构域和/或第二重复结构域的变体并且随后进行结合测定以确定在变体中进行的修饰是否影响它们的结合特性,诸如导致结合的丧失或结合的维持。基于变体评价的结果,可以推断所述第一重复结构域和/或第二重复结构域的共价结合相容性。用于所述评价或结合贡献确定的测定法包括ELISA结合测定法或本领域技术人员已知的任何其他合适的测试测定法。当使用ELISA结合测定法时,约50nm、约100nm、约150nm、约200nm、约250nm、约300nm、约350nm或约400nm的EC50值可用作阈值来分类是否发生结合丧失或是否维持结合。优选地,使用300nm的EC50值作为此类阈值。

[0181] 此类共价结合相容性的确定描述于实施例9.1中(所使用的方法也称为剖析法)。

[0182] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0183] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性,

[0184] (i)(2) 确定所述第一重复结构域和/或所述第二重复结构域是否与在N-末端侧和/或C-末端侧与另一重复结构域共价结合相容;以及

[0185] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

[0186] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0187] 在一个实施方案中,本发明方法的步骤(ii)还包括去除所述第一重复结构域的C-末端封端模块和去除所述第二重复结构域的N-末端封端模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含所述第一重复结构域的所述C-末端封端模块和所述第二重复结构域的所述N-末端封端模块。

[0188] 在一个实施方案中,本发明方法的步骤(ii)还包括去除所述第一重复结构域的C-末端封端模块和/或去除所述第二重复结构域的N-末端封端模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含所述第一重复结构域的所述C-末端封端模块和/或所述第二重复结构域的所述N-末端封端模块。

[0189] 在一个实施方案中,本发明方法的步骤(ii)还包括去除所述第一重复结构域的N-末端封端模块和/或去除所述第二重复结构域的C-末端封端模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含所述第一重复结构域的所述N-末端封端模块和/或所述第二重复结构域的所述C-末端封端模块。

[0190] 在一个实施方案中,本发明方法的步骤(ii)还包括从所述第一重复结构域的C-末端去除一个或多个重复模块并从所述第二重复结构域的N-末端去除一个或多个重复模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含来自所述第一重复结构域的C-末端的所述一个或多个重复模块和来自所述第二重复结构域的N-末端的所述一个或多个重复模块。在一个实施方案中,所述方法的步骤(ii)还包括从所述第一重复结构域的N-末端去除一个或多个重复模块并从所述第二重复结构域的C-末端去除一个或多个重复模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含来自所述第一重复结构域的N-末端的所述一个或多个重复模块和来自所述第二重复结构域的C-末端的所述一个或多个重复模块。

[0191] 在一个实施方案中,本发明方法的步骤(ii)还包括从所述第一重复结构域的C-末端去除一个或多个重复模块和/或从所述第二重复结构域的N-末端去除一个或多个重复模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含来自所述第一重复结构域的C-末端的所述一个或多个重复模块和/或来自所述第二重复结构域的N-末端的所述一个或多个重复模块。在一个实施方案中,所述方法的步骤(ii)还包括从所述第一重复结构域的N-末端去除一个或多个重复模块和/或从所述第二重复结构域的C-末端去除一个或多个重复模块,使得所述经设计的重复结构域中不包含来自所述第一重复结构域的N-末端的所述一个或多个重复模块和/或来自所述第二重复结构域的C-末端的所述一个或多个重复模块。

[0192] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括步骤(ii)(2),其中步骤(ii)(2)包括确定步骤(ii)中形成的经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是否是互相排斥的。经设计的重复结构域的此类互相排斥靶标结合的示例性确定描述于实施例9中。

[0193] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0194] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性,

[0195] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;以及

[0196] (ii) (2) 确定步骤(ii)中形成的所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是否是互相排斥的;

[0197] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0198] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0199] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性,

[0200] (i) (2) 确定所述第一重复结构域和/或所述第二重复结构域是否与在N-末端侧和/或C-末端侧与另一重复结构域共价结合相容;

[0201] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;以及

[0202] (ii) (2) 确定步骤(ii)中形成的所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是否是互相排斥的;

[0203] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括步骤(ib):比较所述第一重复结构域中包含的重复模块的靶标相互作用残基与所述第二重复结构域中包含的重复模块的靶标相互作用残基,并且选择第一重复结构域的所述至少一个重复模块和第二重复结构域的所述至少一个重复模块用于共价结合。

[0205] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种产生经设计的重复结构域的方法,所述方法包括以下步骤:

[0206] (i) 提供第一重复结构域和第二重复结构域,其中所述第一重复结构域对第一靶标具有结合特异性并且所述第二重复结构域对第二靶标具有结合特异性;

[0207] (ib) 比较所述第一重复结构域中的靶标相互作用残基与所述第二重复结构域中的靶标相互作用残基,并选择所述第一重复结构域的一部分和所述第二重复结构域的一部分;以及

[0208] (ii) 通过共价结合所述第一重复结构域的至少一个重复模块和所述第二重复结构域的至少一个重复模块,将第一重复结构域的所述部分和第二重复结构域的所述部分连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域;

[0209] 其中所述经设计的重复结构域对所述第一靶标具有结合特异性并且对所述第二靶标具有结合特异性,并且其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0210] 在一些优选的实施方案中,所述第一靶标和/或所述第二靶标是具有生物活性的分子。许多具有生物活性的分子是本领域技术人员已知的。具有生物活性的分子的一个示例是细胞表面受体的激动剂或拮抗剂或调节剂以及细胞表面受体本身。正如本领域技术人

员已知的,具有生物活性的分子可以例如通过与细胞表面上的受体相互作用起作用,从而刺激、抑制或调节细胞表面受体的活性。细胞表面受体的此类活性又常常牵涉携带该受体的细胞的细胞内信号传导途径,其中该信号传导途径包含生物活性分子,诸如酶,例如蛋白激酶和转录因子。更通常地,具有生物活性的分子可以通过与一种或多种结合配偶体结合来发挥它们的生物活性。此类分子的结合配偶体可以是细胞外蛋白、细胞内蛋白或跨膜蛋白,诸如例如可溶性受体、膜结合受体、配体、细胞因子、酶、结合蛋白或结构蛋白。因此,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时抑制所结合的靶标的生物活性。在另一个实施方案中,所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时活化所结合的靶标的生物活性。在另一个实施方案中,所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时调节所结合的靶标的生物活性。

[0211] 在本发明的上下文中,具有生物活性的靶分子的优选示例是任何合成的或天然存在的分子,诸如多肽或蛋白,这些分子适用于诊断、治愈、减轻、治疗或预防疾病、疾患、病症或感染,或存在于活的生物体中。在一个实施方案中,具有生物活性的靶分子是药物分子。在一个实施方案中,所述药物分子是T细胞衔接器。

[0212] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者的结合空间位阻所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者的结合。

[0213] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域对所述第一靶标的结合亲和力可以以解离常数(K_D)值来描述。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合。在某些实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在进一步的实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 值为或小于:约1000nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1nM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约100pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约10pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在再另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。

[0214] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域对所述第二靶标的结合亲和力可以以解离常数(K_D)值来描述。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解

离常数 (K_D) 与所述第二靶标结合。在某些实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第二靶标结合的 K_D 为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在进一步的实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第二靶标结合的 K_D 值为或小于:约1000nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1nM的 K_D 值与所述第二靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约100pM的 K_D 值与所述第二靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约10pM的 K_D 值与所述第二靶标结合。在再另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1pM的 K_D 值与所述第二靶标结合。

[0215] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域对所述第一靶标和所述第二靶标中的每一者的结合亲和力可以以解离常数 (K_D) 值来描述。在此类实施方案中, K_{D1} 表示所述经设计的重复结构域与所述第一靶标之间的解离常数,并且 K_{D2} 表示所述经设计的重复结构域与所述第二靶标之间的解离常数。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的每一者结合, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在示例性实施方案中, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地等于或小于:约100nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地小于或等于约1nM。在另一个示例性实施方案中, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地小于或等于约100pM。在另一个示例性实施方案中, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地小于或等于约10pM。在根据本发明的方法的再另一个示例性实施方案中,经设计的重复结构域以独立地小于或等于约1pM的 K_{D1} 和 K_{D2} 与第一靶标和第二靶标中的每一者结合。

[0216] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以第一结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者结合并且以第二结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中

的另一者结合,其中所述第一结合亲和力与所述第二结合亲和力的比率在1:1和 $1:10^5$ 之间。在进一步的实施方案中,所述比率可以等于约1:1、1:10、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 或 $1:10^5$ 。

[0217] 在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标位于不同的分子上。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是位于不同分子上的表位。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标位于同一分子上。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是同一分子上的表位。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是同一分子上的不同表位。在一些优选的实施方案中,所述第一靶标是存在于肿瘤微环境中的分子(诸如例如,VEGF),并且所述第二靶标分子是CD3结合结构域的互补位(例如,对CD3具有结合特异性的(经设计的)锚蛋白重复结构域)。

[0218] 在一个实施方案中,所述第一重复结构域是锚蛋白重复结构域并且所述第二重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0219] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0220] 本发明的重复结构域

[0221] 在一个方面,本发明提供了可通过或通过根据本发明的方法获得的经设计的重复结构域。

[0222] 在一个方面,本发明提供了一种经设计的重复结构域,所述经设计的重复结构域对第一靶标具有第一结合特异性并且对第二靶标具有第二结合特异性,其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的。

[0223] 因此本发明的经设计的重复结构域是双特异性分子,即对两个(优选不同的)靶标具有双重结合特异性。本发明的经设计的重复结构域的互相排斥结合特性例示于图2中,并且以上在本发明的生产方法的上下文中以及在所附实施例中详细解释。

[0224] 在一些优选的实施方案中,所述第一靶标和/或所述第二靶标是具有生物活性(如上文所定义)的分子。因此,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时抑制所结合的靶标的生物活性。换句话说,经设计的重复结构域与靶标的结合基本上或显著地干扰或竞争靶标与其天然结合配偶体的结合,从而通过与本发明的经设计的重复结构域的结合来抑制靶标的生物活性。在一个替代实施方案中,所述经设计的重复结构域当与所述第一靶标或所述第二靶标结合时,通过结合该靶标来诱导生物活性(如上文所述)。

[0225] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者的结合空间位阻所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者的结合。

[0226] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标的结合亲和力可以以解离常数(K_D)值来描述。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第一靶标结合。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-13} M至约 10^{-14} M、约 10^{-14} M至约 10^{-14} M。

10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在进一步的实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 值为或小于:约1000nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1nM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约100pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约10pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在再另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。

[0227] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域对所述第二靶标的结合亲和力可以以解离常数(K_D)值来描述。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以低于 10^{-5} M的解离常数(K_D)与所述第二靶标结合。在某些实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在进一步的实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标结合的 K_D 值为或小于:约1000nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1nM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约100pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约10pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。在再另一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域以小于或等于约1pM的 K_D 值与所述第一靶标结合。

[0228] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域对所述第一靶标和所述第二靶标中的每一者的结合亲和力可以以解离常数(K_D)值来描述。在此类实施方案中, K_{D1} 表示所述经设计的重复结构域与所述第一靶标之间的解离常数,并且 K_{D2} 表示所述经设计的重复结构域与所述第二靶标之间的解离常数。在一个示例性实施方案中,所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标中的每一者结合, K_{D1} 和 K_{D2} 独立地为约 10^{-5} M或更小、约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小、约 10^{-12} M或更小、约 10^{-13} M或更小、约 10^{-14} M或更小、约 10^{-5} M至约 10^{-15} M、约 10^{-6} M至约 10^{-15} M、约 10^{-7} M至约 10^{-15} M、约 10^{-8} M至约 10^{-15} M、约 10^{-9} M至约 10^{-15} M、约 10^{-10} M至约 10^{-15} M、约 10^{-11} M至约 10^{-15} M、约 10^{-12} M至约 10^{-15} M、约 10^{-5} M至约 10^{-14} M、约 10^{-6} M至约 10^{-14} M、约 10^{-7} M至约 10^{-14} M、约 10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。

10^{-8} M至约 10^{-14} M、约 10^{-9} M至约 10^{-14} M、约 10^{-10} M至约 10^{-14} M、约 10^{-11} M至约 10^{-14} M、约 10^{-12} M至约 10^{-14} M、约 10^{-5} M至约 10^{-13} M、约 10^{-6} M至约 10^{-13} M、约 10^{-7} M至约 10^{-13} M、约 10^{-8} M至约 10^{-13} M、约 10^{-9} M至约 10^{-13} M、约 10^{-10} M至约 10^{-13} M、约 10^{-11} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-12} M至约 10^{-13} M。在示例性实施方案中, K_D1 和 K_D2 独立地等于或小于:约1000nM、约100nM、约50nM、约25nM、约10nM、约5nM、约2nM、约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约50pM、约25pM、约10pM、约5pM、约2pM、约1pM、约500fM、约250fM、约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM或约1fM。在一个示例性实施方案中, K_D1 和 K_D2 独立地小于或等于约1nM。在另一个示例性实施方案中, K_D1 和 K_D2 独立地小于或等于约100pM。在另一个示例性实施方案中, K_D1 和 K_D2 独立地小于或等于约10pM。在根据本发明的方法的再另一个示例性实施方案中,经设计的重复结构域以独立地小于或等于约1pM的 K_D1 和 K_D2 与第一靶标和第二靶标中的每一者结合。

[0229] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域以第一结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的一者结合并且以第二结合亲和力与所述第一靶标和所述第二靶标中的另一者结合,其中所述第一结合亲和力与所述第二结合亲和力的比率在1:1和 $1:10^5$ 之间。在进一步的实施方案中,所述比率可以等于约1:1、1:10、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 或 $1:10^5$ 。

[0230] 在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标位于不同的分子上。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是位于不同分子上的表位。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标位于同一分子上。在一个实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是同一分子上的表位。在一个优选的实施方案中,所述第一靶标和所述第二靶标是同一分子上的不同表位。在一些优选的实施方案中,所述第一靶标是存在于肿瘤微环境中的分子(诸如例如,VEGF),并且所述第二靶标分子是CD3结合结构域的互补位(例如,(经设计的)锚蛋白重复结构域)。

[0231] 在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少1个重复模块、至少2个重复模块、至少3个重复模块、至少4个重复模块、至少5个重复模块或至少6个重复模块。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含1至6个重复模块、2至6个重复模块、3至6个重复模块、4至6个重复模块或5至6个重复模块。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块。在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块以及至少1个内部重复模块、至少2个内部重复模块、至少3个内部重复模块或至少4个内部重复模块。在一些实施方案中,经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块和1至4个内部重复模块、1至3个内部重复模块或1至2个内部重复模块。

[0232] 在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少两个重复模块。在另一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少三个重复模块。在另一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少四个重复模块。在另一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少五个重复模块。在另一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少六个重复模块。在另一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少七个重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少一个内部重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少两个内部重复

模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少三个内部重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及至少四个内部重复模块。

[0233] 在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及一个内部重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及两个内部重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及三个内部重复模块。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块和/或C-末端封端模块,以及四个内部重复模块。在任何上述实施方案中,“和”连接词是优选的,即所述经设计的重复结构域除内部重复模块外优选包含N-末端封端模块和C-末端封端模块。

[0234] 因此,在一些实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和至少一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和一个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和两个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和三个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和四个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和五个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和六个内部重复模块。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含N-末端封端模块、C-末端封端模块和七个内部重复模块。

[0235] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域中包含的所有内部重复模块有助于第一结合特异性和/或第二结合特异性。在一些实施方案中,所述第一结合特异性和/或第二结合特异性牵涉所述内部重复模块中包含的靶标相互作用残基。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域中包含的所有重复模块有助于第一结合特异性和/或第二结合特异性。在一些实施方案中,所述第一结合特异性和/或第二结合特异性牵涉所述重复模块中包含的靶标相互作用残基。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个有助于与所述第一靶标结合的内部重复模块,并且其中所述经设计的重复结构域包含至少一个有助于与所述第二靶标结合的内部重复模块。

[0236] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且/或者其中所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述经设计的重复结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基。上述实施方案中的任何组合都是可能的,例如,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含与所述第一靶标结合的至少一个靶标相互作用残基,并且其中所述经设计的重复结构域包含与所述第二靶标结合的至少一个靶标相互作用残基。确定此类贡献的方法或参与蛋白之间或蛋白与肽之间的结合相互作用的氨基酸残基,诸如例如丙氨酸扫描诱变,是本领域技术人员熟知的。

[0237] 在一个优选的实施方案中,所述经设计的重复结构域是锚蛋白重复结构域。

[0238] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,所述至少一个内部重复模块包含选自SEQ ID NO:75至81的序列。

[0239] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含:(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63和83至85和(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74和(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。因此,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63和83至85,以及(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74,以及(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0240] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含:(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63、83至85和97至100和(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74和(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。因此,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含(i)包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35、36、47至63、83至85和97至100,以及(2)其中SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或(ii)包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:37、38和64至74,以及(2)其中SEQ ID NO:37、38和69中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0241] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含(i)与SEQ ID NO:35、36、47、53、59、60、83和84中的任何一个具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的N-末端封端模块,和/或(ii)包含与SEQ ID NO:37、38和69中的任何一个具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的C-末端封端模块。

[0242] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,该至

少一个内部重复模块包含选自以下项组成的组的序列：(1) SEQ ID NO:40至46和(2) 其中 SEQ ID NO:40和46中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。因此，在一个实施方案中，所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块，该至少一个内部重复模块包含选自以下项组成的组的序列：(1) SEQ ID NO:40至46，以及(2) 其中 SEQ ID NO:40和46中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。在一个实施方案中，所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块，该至少一个内部重复模块包含与 SEQ ID NO:40至46中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列。

[0243] 在一个实施方案中，所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块，该至少一个内部重复模块包含选自以下项组成的组的序列：(1) SEQ ID NO:40至46和(2) 其中 SEQ ID NO:40和46中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列；并且其中所述经设计的重复结构域还包含：

[0244] (i) 包含选自以下项组成的组的序列的C-末端封端模块：(1) SEQ ID NO:35至36和(2) 其中 SEQ ID NO:35至36中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列；和/或

[0245] (ii) 包含选自以下项组成的组的序列的C-末端封端模块：(1) SEQ ID NO:38和(2) 其中 SEQ ID NO:38中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0246] 因此，在一个实施方案中，所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块，该至少一个内部重复模块包含选自以下项组成的组的序列：(1) SEQ ID NO:40至46，以及(2) 其中 SEQ ID NO:40和46中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列；并且其中所述经设计的重复结构域还包含：

[0247] (i) 包含选自以下项组成的组的序列的N-末端封端模块：(1) SEQ ID NO:和35至36，以及(2) 其中 SEQ ID NO:35至36中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列；和/或

[0248] (ii) 包含选自以下项组成的组的序列的C-末端封端模块：(1) SEQ ID NO:38，以及(2) 其中 SEQ ID NO:38中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0249] 在一个实施方案中，所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块，该至少一个内部重复模块包含与 SEQ ID NO:40至46中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列；并且其中所述经设计的重复结构域还包含：

[0250] (i) 包含与 SEQ ID NO:35至36中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列的N-末端封端模块;和/或

[0251] (ii) 包含与SEQ ID NO:38中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列的C-末端封端模块。

[0252] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含:

[0253] (i) 包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:35至36和(2)其中SEQ ID NO:35至36中的任一者中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或

[0254] (ii) 包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:38和(2)其中SEQ ID NO:38中的至多9个、或至多8个、或至多7个、或至多6个、或至多5个、或至多4个、或至多3个、或至多2个、或至多1个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0255] 因此,在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含:

[0256] (i) 包含选自由以下项组成的组的序列的N-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:和35至36,以及(2)其中SEQ ID NO:35至36中任一者中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列;和/或

[0257] (ii) 包含选自由以下项组成的组的序列的C-末端封端模块:(1)SEQ ID NO:38,以及(2)其中SEQ ID NO:38中的至多9个氨基酸被另一氨基酸取代的序列。

[0258] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含:

[0259] (i) 包含与SEQ ID NO:35至36中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列的N-末端封端模块;和/或

[0260] (ii) 包含与SEQ ID NO:38中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列的C-末端封端模块。

[0261] 在涉及重复模块中的氨基酸取代的任何上述实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的位置和/或框架残基的位置。因此,在一些实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的位置。在其他实施方案中,所述取代可发生在框架残基的位置。在其他实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的位置和框架残基的位置。

[0262] 更具体地,在内部重复模块中,靶标相互作用残基的位置是对应于SEQ ID NO:39的位置3、4、6、11、14和15的位置,并且构架残基的位置是对应于除了SEQ ID NO:39的所述位置3、4、6、11、14和15之外的位置的位置。因此,在涉及内部重复模块中的氨基酸取代的任何上述实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的任何此类位置和/或框架残基的位置。

[0263] 在N-末端封端模块中,靶标相互作用残基的位置是对应于SEQ ID NO:36的位置4、

5、8、11和12的位置,并且框架残基的位置是对应于除了SEQ ID NO:36的所述位置4、5、8、11和12之外的位置的位置。因此,在涉及N-末端封端模块中的氨基酸取代的任何上述实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的任何此类位置和/或框架残基的位置。

[0264] 在C-末端封端模块中,靶标相互作用残基的位置是对应于SEQ ID NO:38的位置3、4、6、14和15的位置,并且框架残基的位置是对应于除了SEQ ID NO:38的所述位置3、4、6、14和15之外的位置的位置。因此,在涉及C-末端封端模块中的氨基酸取代的任何上述实施方案中,所述取代可发生在靶标相互作用残基的任何此类位置和/或框架残基的位置。

[0265] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,其中对应于SEQ ID NO:39的位置3、4、6、11、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基,并且其中对应于SEQ ID NO:39的位置10的位置处的残基是框架残基。

[0266] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个内部重复模块,其中对应于SEQ ID NO:39的位置3、4、6、11、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0267] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个N-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:36的位置4、5、8、11和/或12的位置处的残基是靶标相互作用残基,并且其中对应于SEQ ID NO:36的位置7的位置处的残基是框架残基。

[0268] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个N-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:36的位置4、5、8、11和/或12的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0269] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个C-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:38的位置3、4、6、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基,并且其中对应于SEQ ID NO:38的位置10和/或11的位置处的残基是框架残基。

[0270] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含至少一个C-末端封端模块,其中对应于SEQ ID NO:38的位置3、4、6、14和/或15的位置处的残基是靶标相互作用残基。

[0271] 在一些实施方案中,根据本发明的所述经设计的重复结构域包含互补位。此类互补位由所述重复结构域中包含的重复模块形成,并且更精确地由这些重复模块的每个重复模块中包含的靶标相互作用残基形成。因此,在一些实施方案中,此类互补位基本上被分成两个区域,其中所述区域中的每个区域均包含有助于第一结合特异性或第二结合特异性的重复模块。在此类实施方案中,互补位区域不重叠。在其他实施方案中,一些重复模块由于一个或多个靶标相互作用残基与两个靶标相互作用,可能有助于两种结合特异性,并且因此互补位的两个区域在一定程度上重叠。

[0272] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含两个内部重复模块,其中所述两个内部重复模块中N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述两个内部重复模块中C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基。

[0273] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含三个内部重复模块,其中所述三个内部重复模块中最N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述三个内部重复模块中最C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述三个内部重复模块中中间的内部重复模块包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:6至10和(2)与SEQ

ID NO:6至10中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列。因此,在一个更具体的实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:6至10,以及(2)与SEQ ID NO:6至10中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0274] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含四个内部重复模块,其中所述四个内部重复模块中最N-末端的内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,其中所述四个内部重复模块中最C-末端的内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述四个内部重复模块中第二最N-末端的内部重复模块和第二最C-末端的内部重复模块中的每一者都包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:11至13和(2)与SEQ ID NO:11至13中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列。因此,在一个更具体的实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:11至13,以及(2)与SEQ ID NO:11至13中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0275] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含六个内部重复模块,其中所述六个内部重复模块中最N-末端的三个内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,其中所述六个内部重复模块中最C-末端的两个内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述六个内部重复模块中第四最N-末端的内部重复模块(或第三最C-末端的内部重复模块)包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:92和(2)与SEQ ID NO:92具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列。因此,在一个更具体的实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:92,以及(2)与SEQ ID NO:92具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0276] 在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域包含七个内部重复模块,其中所述七个内部重复模块中最N-末端的三个内部重复模块包含与所述第一靶标结合的靶标相互作用残基,其中所述七个内部重复模块中最C-末端的两个内部重复模块包含与所述第二靶标结合的靶标相互作用残基,并且其中所述七个内部重复模块中第四和第五最N-末端的内部重复模块(或第三和第四最C-末端的内部重复模块中的每一者)包含与所述第一靶标和/或第二靶标结合的靶标相互作用残基。在一个具体实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:90、91、93和94和(2)与SEQ ID NO:90、91、93和94中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列。因此,在一个更具体的实施方案中,所述经设计的重复结构域包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1) SEQ ID NO:90、91、93和94,以及(2)与SEQ ID NO:90、91、93和94中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0277] 此外,本发明的任何重复结构域的序列可以任选地在其N-末端包含G、S或GS。此外,本发明的任何重复结构域的序列可以任选地在倒数第二个位置的A被L取代和/或在最后一个位置的A被N取代。

[0278] 重组蛋白质

[0279] 本发明的经设计的重复结构域可以遗传融合至其他组分,诸如例如治疗剂,并且此类融合物也可互换地称为“重组蛋白质”或“构建体”。在此类构建体中,经设计的重复结构域可充当融合的治疗剂的接通或关断开关。

[0280] 图3示出了包含本发明的经设计的重复结构域的构建体的一般示例。这些示例性构建体也称为“开关药物DARPin”。在接通开关设置(图3A)中,本发明的经设计的重复结构域以互相排斥方式结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如药物分子),并且与所述靶标B(例如药物分子)化学连接。作为开关药物DARPin的一部分的靶标B的状态(例如活性或非活性药物)由本发明的经设计的重复结构域与靶标A的相互作用条件性调控,其中靶标A被本发明的经设计的重复结构域结合导致结合的靶标B(因此,活性药物)的释放。在图3B所示的示例性关断开关设置中,本发明的经设计的重复结构域设计成结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如细胞受体)。由本发明的经设计的重复结构域与靶标B的相互作用产生的下游活性可以在靶标A与本发明的经设计的重复结构域结合时被条件性地关断。本发明的经设计的重复结构域可进一步连接至其他结合结构域或分子。

[0281] 因此,在一个方面,本发明提供了包含本发明的经设计的重复结构域的重组蛋白质。在一个实施方案中,所述蛋白还包含治疗剂。在一个实施方案中,所述治疗剂是结合分子。在另一个实施方案中,所述结合分子是经设计的锚蛋白重复结构域。

[0282] 本发明的此类重组蛋白质可以以不同的格式生成。在一个实施方案中,所述治疗剂融合在本发明的经设计的重复结构域的N-末端侧。在一个实施方案中,所述治疗剂融合在本发明的经设计的重复结构域的C-末端侧。在一些实施方案中,所述治疗剂与本发明的经设计的重复结构域直接连接。在一些实施方案中,肽接头用于将本发明的经设计的重复结构域连接至所述治疗剂。在一些实施方案中,所述治疗剂被另外的分子(诸如一个或多个锚蛋白重复结构域)与本发明的经设计的重复结构域分开。

[0283] 在一个实施方案中,本发明的重组蛋白质包含附加的重复结构域时,例如本发明的重组蛋白质包含本发明的经设计的重复结构域和两个或更多个其他锚蛋白重复结构域,所述两个或更多个锚蛋白重复结构域(例如所述两个或三个锚蛋白重复结构域)可以用肽接头连接。在一个实施方案中,所述肽接头是富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。在一个实施方案中,所述肽接头是SEQ ID NO:82的富含脯氨酸-苏氨酸的肽接头。本领域已知的其他接头也可用于连接重复结构域(参见,例如WO 2021/116469)。

[0284] 在一些实施方案中,本发明的经设计的重复结构域中包含的第一结合区和第二结合区(或互补位)中的每一者均可以具有限定的功能。在一个实施方案中,所述经设计的重复结构域被描述为包含传感器部分和阻断剂部分,其中所述传感器部分对应于第一结合区

或第二结合区中的一个结合区,并且所述阻断剂部分对应于重复结构域的另一个结合区。因此,在此类构建体中,本发明的经设计的重复结构域具有对传感器靶标的第一结合特异性和对阻断剂靶标的第二结合特异性。在优选的实施方案中,所述阻断剂靶标是治疗剂,并且所述传感器靶标可以根据治疗剂、应用或背景按需要选择。基于所选治疗剂和传感器靶标,可以如本公开中所述那样产生经设计的重复结构域,并且随后使用本领域技术人员已知的方法将其遗传融合至其他组分,特别是融合至治疗剂。

[0285] 免疫细胞衔接器诸如T细胞衔接器(TCE)或自然杀伤(NK)细胞衔接器可有利地用作本发明的重组蛋白质中的融合配偶体。TCE通常包含CD3结合结构域和肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白质包含本发明的经设计的重复结构域,本发明的经设计的重复结构域具有对TCE的 α -CD3结合结构域(阻断剂靶标)的第一结合特异性和对传感器靶标的第二结合特异性。所述经设计的重复结构域结合TCE并抑制其活性,只要所述传感器靶标不结合至所述经设计的重复结构域即可。高浓度的传感器靶标诱导CD3结合结构域(阻断剂靶标)的释放,使得能够募集细胞毒性T细胞和在表达TAA的肿瘤细胞和T细胞之间形成免疫突触。此类实施方案在图4A中表示。

[0286] 本文公开的示例举例说明了包含TCE和本发明的经设计的重复结构域的各种重组蛋白质(或构建体),该TCE包含CD3结合结构域,优选结合CD3的DARPin,且任选地包含CD123结合或非结合(占位)结构域,本发明的经设计的重复结构域具有对所述CD3结合结构域(阻断剂靶标)的互补位的第一结合特异性和对VEGF(传感器靶标)的第二结合特异性。在一些实施方案中,本发明的经设计的重复结构域对传感器靶标的亲和力高于所述重复结构域对阻断剂靶标的亲和力。

[0287] 因此,在一个实施方案中,本文所述的治疗剂是结合分子,其中所述结合分子是免疫细胞衔接器。在一个具体实施方案中,所述结合分子是TCE。

[0288] 在一个实施方案中,本发明的重组蛋白质在本发明的经设计的重复结构域的N-末端侧包含 α -CD3结合结构域。在一个实施方案中,本发明的重组蛋白质在本发明的经设计的重复结构域的C-末端侧包含 α -CD3结合结构域。在一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白质从N-末端至C-末端包含:本发明的经设计的重复结构域、另一个结合或非结合结构域和 α -CD3结合结构域。在另一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白质从N-末端至C-末端包含:TAA结合结构域、 α -CD3结合结构域和本发明的经设计的重复结构域。在一个更优选的实施方案中,本发明的重组蛋白质从N-末端至C-末端包含:本发明的经设计的重复结构域、TAA结合结构域和 α -CD3结合结构域。在具体实施方案中,所述TAA结合结构域具有SEQ ID NO:4中所示的CD123结合结构域的氨基酸序列。在具体实施方案中,所述非结合结构域具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0289] 在一个实施方案中,本发明的重组蛋白质包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:15至30和(2)与SEQ ID NO:15至30中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%、至少99%或至少100%氨基酸序列同一性的序列。在一个实施方案中,所述重组蛋白质包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:(1)SEQ ID NO:15至30,以及(2)与SEQ ID NO:15至30中的任一者具有至少80%氨基酸序列同一性的序列。

[0290] 在其他实施方案中,所述经设计的重复结构域被描述为包含传感器部分和阻断剂部分,其中所述传感器部分对应于第一结合区或第二结合区中的一个结合区,并且所述效应部分对应于重复结构域的另一个结合区。因此,在此类构建体中,本发明的重复结构域具有对传感器靶标的第一结合特异性和对效应靶标的第二结合特异性。在一些实施方案中,所述效应靶标是诱导对活细胞的效应的分子。在一些实施方案中,所述效应靶标是细胞表面分子。在一些实施方案中,所述传感器靶标可根据效应靶标、应用或背景按需选择。基于所选效应靶标和传感器靶标,可以如本公开中所述那样产生经设计的重复结构域,并且任选地使用本领域技术人员已知的方法将其融合至其他组分。

[0291] 因此,在一个实施方案中,本发明的重组蛋白质包含本发明的经设计的重复结构域,本发明的经设计的重复结构域具有对效应靶标的第一结合特异性和对传感器靶标的第二结合特异性。只要所述经设计的重复结构域与效应靶标结合,效应靶标就保持活性。在高浓度传感器靶标时,所述传感器靶标与所述经设计的重复结构域的结合通过阻止所述重复结构域与所述效应靶标之间的相互作用而阻止效应靶标的活化。在此类实施方案中,经设计的重复结构域可用作断开开关,也如图3B和图4B所示。

[0292] 核酸、载体和宿主细胞

[0293] 在另一方面,本发明涉及编码本发明的经设计的重复结构域或本发明的重组蛋白质的氨基酸序列的分离的核酸。在一个实施方案中,本发明涉及编码本发明的重组蛋白质的氨基酸序列的分离的核酸。在一个实施方案中,本发明涉及编码本发明的经设计的重复结构域的氨基酸序列的分离的核酸。

[0294] 此外,本发明涉及包含本发明的任何核酸的载体。因此,在另一方面,本发明提供了包含根据本发明的核酸的重组表达载体,其中该载体任选地包含表达控制序列,允许在原核宿主细胞或真核宿主细胞中表达与所述核酸可操作地连接的编码的多肽。可以通过本领域技术人员熟知的方法,例如在MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y., 2001中描述的那些方法将核酸序列插入重组载体中。

[0295] 核酸是本领域技术人员熟知的。使用核酸在大肠杆菌中产生本发明的经设计的锚蛋白重复结构域或重组结合蛋白,例如美国专利第7,417,130号中所述。

[0296] 在另一方面,本发明提供了包含根据本发明的重组表达载体的宿主细胞。宿主细胞可以是,例如,细菌细胞(诸如大肠杆菌或链霉菌)、真菌细胞(诸如曲霉菌(*Aspergillus*))和酵母(诸如酵母菌(*Saccharomyces*))、昆虫细胞、哺乳动物细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、C1 27小鼠细胞系、叙利亚地鼠细胞的BHK细胞系、人胚肾293(HEK 293)细胞)。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞或HEK 293细胞。宿主细胞可用于例如表达本发明的重组蛋白质。

[0297] 组合物

[0298] 本发明还涉及药物组合物,这些药物组合物包含本文所述的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸和/或重组表达载体中的一种或多种以及药学上可接受的载剂或稀释剂。本发明还涉及使用本文公开的所述药物组合物的用途和治疗方法。下面更详细地描述本发明所包括的方法和用途。

[0299] 如上所述,本发明的经设计的重复结构域可用于提供治疗剂的条件性活化和/或

失活机制(例如接通开关或关断开关机制)。因此,在一些实施方案中,经设计的重复结构域基本上不改变治疗剂在体内的生物效应,除了抑制治疗剂(经设计的重复结构域的阻断剂靶标)以外,只要经设计的重复结构域的传感器靶标不存在并且基本上结合至所述经设计的重复结构域。

[0300] 本文所述的药物组合物可以使用本领域已知的方法制备。

[0301] 药物组合物任选地包含药学上可接受的载剂或赋形剂或稀释剂。标准药物载剂包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液诸如油/水或水/油乳液以及各种类型的润湿剂。

[0302] 药物组合物可包含任何其他药学上可接受的成分,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气溶胶推进剂、空气置换剂、碱化剂、抗结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、抗菌剂、基料、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、涂布剂、着色剂、干燥剂、洗涤剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、溶解增强剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳液稳定剂、填料、成膜剂、风味增强剂、调味剂、流动增强剂、胶凝剂、粒化剂、湿润剂、润滑剂、粘膜粘附剂、膏剂基料、膏剂、含油溶媒、有机基料、锭剂基料、颜料、增塑剂、抛光剂、防腐剂、螯合剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基料、界面活性剂、表面活性剂、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张度剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水混溶性共溶剂、水软化剂或润湿剂。参见例如Handbook of Pharmaceutical Excipients第三版,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press,London,UK,2000年),其全文以引用方式并入。Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980年),其全文以引用方式并入。在一个实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含以下中的一者或多者:(i)根据本发明的经设计的重复结构域,(ii)根据本发明的重组蛋白质,(iii)根据本发明的核酸,和/或(iv)根据本发明的重组表达载体,以及至少一种药学上可接受的载剂或稀释剂。

[0303] 根据本发明的治疗用途和方法

[0304] 在本发明的上下文中,术语“医学病症”、“疾病”和“疾患”可互换使用,包括但不限于癌症。在一个优选的实施方案中,所述医学病症是癌症。

[0305] 在另一方面,本发明提供了一种治疗医学病症的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的经设计的重复结构域、本发明的重组蛋白质、本发明的核酸或本发明的药物组合物的步骤。

[0306] 还提供了本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物,其用于治疗医学病症的方法中。

[0307] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物用于治疗疾病的用途。为此目的,向有需要的患者施用治疗有效量的根据本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物。

[0308] 在一个实施方案中,本发明涉及一种治疗医学病症的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物的步骤。

[0309] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物用于治疗医学病症的用途。在一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物,其用于治疗医学病症。

[0310] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸

或药物组合物作为用于治疗医学病症的药物的用途。

[0311] 在一个实施方案中,本发明涉及一种使用本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物来治疗医学病症的方法。在一个实施方案中,本发明涉及一种用于制造用于治疗医学病症的药物的方法,其中本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物是该药物的活性成分。

[0312] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物用于制造药物的用途。

[0313] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物用于制造用于治疗医学病症的药物的用途。

[0314] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物用于制造用于治疗医学病症(优选瘤性疾病,更优选癌症)的药物的用途。

[0315] 在一些优选的实施方案中,所述医学病症是癌症。

[0316] 在一些实施方案中,所述患者是哺乳动物。在优选地实施方案中,患者是人。

[0317] 在一些实施方案中,本发明的所述经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物的单次施用可能是足够的。在其他实施方案中,重复施用可能是必需的。各种因素将影响施用的次数和频率,诸如受试者的年龄和一般健康状况,以及治疗剂的性质和典型的剂量方案。

[0318] 本文所述的经设计的重复结构域、重组蛋白质、核酸或药物组合物可与另一种治疗剂组合使用。每种治疗剂可同时施用(例如,在相同药物中或同时施用)、并行施用(即,在单独的药物中以任何顺序一个接一个地施用)或以任何顺序依次施用。当组合疗法中的治疗剂为不同剂型(例如,一种药剂是片剂或胶囊剂,并且另一种药剂是无菌液体)和/或以不同给药方案施用时,顺序施用可能是有用的,例如,至少每日施用的镇痛剂和较不频繁施用的生物治疗剂,诸如每周一次或每两周一次。

[0319] 本发明不限于实施例中描述的具体实施方案。

[0320] 实施例

[0321] 下文公开的起始材料和试剂是本领域技术人员已知的,是可商购获得的和/或可使用熟知的技术制备。

[0322] 材料

[0323] 化学品购自Sigma-Aldrich(USA)。寡核苷酸来自Microsynth(Switzerland)。除非另有说明,否则DNA聚合酶、限制酶和缓冲液来自New England Biolabs(USA)或Fermentas/Thermo Fisher Scientific(USA)。诱导型大肠杆菌表达菌株用于克隆和蛋白质产生,例如大肠杆菌XL1-blue(Stratagene,USA)或BL21(Novagen,USA)。用于SPR测量的NLC芯片来自BioRad(BioRad,USA)。HTRF试剂来自Cisbio(Cisbio,France)。泛T细胞分离试剂盒来自Miltenyi Biotec(Germany)。检测抗体抗hCD8来自BD Pharmingen™(BD,USA)且抗hCD69来自BioLegend(BioLegend,USA)。

[0324] 分子生物学

[0325] 除非另有说明,否则根据已知方案执行方法(参见例如Sambrook J.,Fritsch E.F.和Maniatis T.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory 1989,New York)。

[0326] 经设计的锚蛋白重复蛋白文库

[0327] 用于生成经设计的锚蛋白重复蛋白文库的方法已经描述于以下中:例如,美国专利号7,417,130;Binz等人,2003,同前;Binz等人,2004,同前。通过此类方法,可构建具有随机化锚蛋白重复模块和/或随机化封端模块的经设计的锚蛋白重复蛋白文库。例如,此类文库可相应地基于固定的N-末端封端模块或随机化的N-末端封端模块、一个或多个随机化的重复模块、以及固定的C-末端封端模块或随机化的C-末端封端模块来组装(参见,例如WO 2021/116462中提供的N-末端封端模块和C-末端封端模块)。优选地,此类文库被组装成在重复或封端模块的随机化位置处不具有氨基酸C、G、M、N(在G残基前面)和P中的任一者。

[0328] 此外,此类文库中的此类随机化模块可包含具有随机化氨基酸位置的附加的多肽环插入。此类多肽环插入的示例是抗体的互补决定区(CDR)环文库或从头生成的肽文库。例如,可以使用人核糖核酸酶L的N-末端锚蛋白重复结构域的结构(Tanaka, N., Nakanishi, M, Kusakabe, Y, Goto, Y., Kitade, Y, Nakamura, K. T., EMBO J. 23(30), 3929-3938, 2004)作为指导来设计此类环插入。类似于其中将十个氨基酸插入在靠近两个锚蛋白重复的边界存在的 β -转角中的这种锚蛋白重复结构域,锚蛋白重复蛋白文库可以包含插入在锚蛋白重复结构域的一个或多个 β -转角中的可变长度(例如,1个至20个氨基酸)的随机化环(具有固定位置和随机化位置)。

[0329] 锚蛋白重复蛋白文库的N-末端封端模块优选具有RILLAA、RILLKA或RELLKA基序,并且锚蛋白重复蛋白文库的任何此类C-末端封端模块优选具有KLN、KLA或KAA基序。

[0330] 此类锚蛋白重复蛋白文库的设计可由与靶标相互作用的锚蛋白重复结构域的已知结构来指导。由其蛋白数据库(PDB)唯一登录号或识别码(PDB-ID)识别的此类结构的示例为1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V20、3UXG、3TWQ-3TWX、1N11、1S70和2ZGD。

[0331] 已经描述了经设计的锚蛋白重复蛋白文库(诸如N2C和N3C经设计的锚蛋白重复蛋白文库)的示例(美国专利号7,417,130;Binz等人,2003,同前;Binz等人,2004,同前)。N2C和N3C中的数字描述了存在于N末端和C末端封端模块之间的随机化重复模块的数量。

[0332] 用于定义重复单元和模块内部的位置的命名法基于Binz等人,2004(同前),修改之处在于,锚蛋白重复模块和锚蛋白重复单元的边界移位一个氨基酸位置。例如,Binz等人2004(同前)的锚蛋白重复模块的位置1对应于本公开的锚蛋白重复模块的位置2,因而Binz等人2004(同前)的锚蛋白重复模块的位置33对应于本公开的以下锚蛋白重复模块的位置1。

[0333] 实施例1:2合1DARPin的设计

[0334] 概要

[0335] DARPin(经设计的锚蛋白重复蛋白)是包含一个或多个内部重复模块的重复蛋白,这些内部重复模块除了它们的随机化位置之外是相同的,并且侧接N-末端和C-末端封端重复模块(Binz等人2003)。如本文所用,术语“重复模块”涵盖内部重复模块和末端重复模块(C-封端模块和N-封端模块)。它们的33个氨基酸位置中有27个氨基酸位置是高度保守的,而其他6个氨基酸位置是较不保守的,并且在很大程度上负责锚蛋白重复序列与其靶标的相互作用(Binz等人2003)。DARPin的互补位由连续表面形成,该连续表面由内部重复序列和有时还有封端重复模块的这些可变位置形成。因此,DARPin结构提供了固有的模块性,以将一个DARPin的互补位缩短、延长或融合到另一个DARPin的互补位中。

[0336] 如图1所例示,结合靶标A的第一DARPin(1)和结合靶标B的第二DARPin(2)可在期望数目的重复模块后分裂,并遗传组合成另一DARPin的互补片段。示出了它们的相应互补位或结合表面((4)和(5))。以此方式,可生成单结构域“2合1DARPin”(或“开关DARPin”(6))。此类2合1DARPin可以以互相排斥方式结合两个靶标A和B,即结合靶标A或靶标B。另外,2合1DARPin中的一个或几个内部重复模块可以是混合(或合并)重复模块(7)。如果重复模块的互补位包含来自第一亲本重复蛋白中的相应模块的至少一个靶标相互作用残基和来自第二亲本重复蛋白中的相应模块的至少一个靶标相互作用残基,则该重复模块称为混合重复模块。2合1DARPin的互相排斥结合特性例示于图2中。由于2合1DARPin的两个互补位的紧密接近或重叠,该分子能够单独结合靶标A(图2A)或靶标B(图2B),但不能同时结合两个靶标(图2C),因为靶标A和靶标B两者的同时结合受空间位阻。这种互相排斥结合特征因此使得能够设计用于药物分子的条件性活化或失活的接通开关或关断开关。这种互相排斥结合特征也将2合1DARPin与其他锚蛋白重复蛋白格式区别开(Mohan,K.等人,2019, Science,364(6442);WO 2020/190852 A2)。

[0337] 图3示出了包含本发明的2合1DARPin的构建体的一般示例。这些示例性构建体也称为“开关药物DARPin”。在接通开关设置(图3A)中,2合1DARPin以互相排斥方式结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如药物分子),并且与所述靶标B(例如药物分子)化学连接。作为开关药物DARPin的一部分的靶标B的状态(例如活性或非活性药物)由2合1DARPin与靶标A的相互作用条件性调控,其中靶标A被2合1DARPin结合导致结合的靶标B(因此,活性药物)的释放。在图3B所示的示例性关断开关设置中,2合1DARPin设计成结合靶标A(例如传感器靶标)或靶标B(例如细胞受体)。由所述2合1DARPin与靶标B的相互作用产生的下游活性可以在靶标A与2合1DARPin结合时被条件性地关断。此类2合1DARPin可进一步连接至其他结合结构域或分子。

[0338] T细胞衔接器是用于2合1DARPin概念验证的理想药物分子

[0339] T细胞衔接器(TCE,也称为T细胞双特异性物)将T细胞募集至靶细胞,并且已知是已经显示出令人印象深刻的临床结果的非常有效的药物。然而,它们常常遭受严重的副作用,例如中靶、脱肿瘤毒性。2合1DARPin可有利地用于向TCE的活化增加另一安全层性,以便减少这种中靶、脱肿瘤效应。在接通开关概念(图4A)中,T细胞衔接器包含结合CD3的DARPin(靶标B)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的DARPin。使用可结合并阻断结合CD3的DARPin的互补位,并且可以另选地结合例如主要存在于肿瘤微环境中的分子(表示为靶标A)的2合1DARPin。该2合1DARPin与TCE化学连接以形成开关药物DARPin。当结合靶标A时,2合1DARPin释放TCE(靶标B)的CD3结合结构域,从而使其能够与CD3结合,并且从而导致在T细胞、药物和靶细胞之间形成三分子复合物。

[0340] 在示例性关断开关概念(图4B)中,使用结合靶标A(传感器靶标)并且另选地结合靶标B(CD3)的2合1DARPin。在这种情况下,TCE包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的DARPin,与前述2合1DARPin化学连接。在高浓度的靶标A后,TCE可以通过与靶标A结合而沉默,从而防止TCE与T细胞上的CD3结合。

[0341] 对VEGF以及TCE的 α -CD3结合物具有互相排斥结合特异性的2合1DARPin的设计

[0342] 基于图4A中例示的接通开关概念,设计由第一结合VEGF的DARPin(SEQ ID NO:1)和靶向结合CD3的DARPin的互补位的第二DARPin(也称为“ α -CD3 DARPin阻断剂”(SEQ ID

NO:2))的组合产生的2合1DARPin。这两个亲本DARPin序列基于先前的工作:VEGF-结合物公开于W0 2016/156596中,并且 α -CD3 DARPin结合物如美国临时申请第63126356号和第63182394号中所公开的那样获得。

[0343] 通过组合来源于VEGF-结合物的N-末端封端重复模块和内部重复模块以及来源于 α -CD3 DARPin-阻断剂的C-末端内部重复模块和封端重复模块来设计2合1DARPin(图5A-图5B)。通过组合不同数目的VEGF-结合物和 α -CD3 DARPin-阻断剂的重复模块,总共设计29种构建体。所述重复模块存在于亲本结合物中(完好)时是组合的或者与亲本结合物相比包含其他的氨基酸修饰(混合或合并重复模块)。

[0344] 来自29种构建体的8种2合1DARPin表现出与VEGF和 α -CD3 DARPin靶标结合,并且被选择用于进一步表征,如以下段落中所述。在所述八种2合1DARPin中,五种是图5A中所示的N3C结构域(即2合1DARPin 11、12、13、15和17,分别对应于SEQ ID NO:6、7、8、9和10),并且三种是图5B中所示的N4C结构域(即2合1DARPin 18、19和20,分别对应于SEQ ID NO:11、12和13)。参与DARPin与其靶标结合的残基是本领域技术人员已知的或可鉴定的,并且一起形成DARPin上的互补位(或限定结合表面)。在本发明的2合1DARPin中,如果与两个亲本DARPin(即2合1DARPin由其组合而成的DAPRins)的互补位相比,残基在2合1DARPin的互补位内占据相同位置,则将该残基标记为共有。在这种情况下,可以通过将2合1DARPin序列与亲本VEGF-结合物和 α -CD3 DARPin-阻断剂比对并比较从VEGF-结合物的N-末端或 α -CD3 DARPin-阻断剂的C-末端看到的互补位位置来确定共有残基(例如,对于N3C 2合1DARPin 11、12、13、15和17,而非对于N4C 2合1DARPin 18、19和20,位置N_5是VEGF-结合物和 α -CD3 DARPin-阻断剂之间的共有残基,因为 α -CD3 DARPin-阻断剂的N-封端与所述N4C 2合1DARPin的内部重复序列1对齐)。在图5A-图5B中,2合1DARPin中包含的互补位残基根据它们的来源被进一步突出显示,即以黑色(来自 α -CD3 DARPin阻断剂)或白色(来自VEGF结合物)突出显示,并且所述互补位位置也在重复编号行中指示(用黑色边界框出数字)。

[0345] 为了便于设计2合1DARPin,特别是关于混合重复模块的生成,开发了2D-图示法。图5C示出了N3C DARPin(即具有N-封端、三个内部重复序列和C-封端的DARPin)的示例性卡通视图。标记构成DARPin的结合表面的位置(N-末端封端、C-末端封端或内部重复序列,按照重复序列进行编号)。这些残基的取向允许将它们组织成2D图示,如图5D所示(3D视图(5C)和2D视图(5D)中的虚线方框突出显示相同的残基链段)。图5D相应地示出了每个重复模块的互补位的位置包括框架残基或潜在的靶标相互作用残基。该位置图可进一步扩展至包含附加的内部重复结构域的重复结构域,例如N4C重复结构域将包含具有与N3C中的重复序列相同的位置图的附加的“重复序列4”模块。因此,该2D图示提供了2合1DARPin的改进的可视化。图5E示出了VEGF结合物、 α -CD3 DARPin-阻断剂和八种2合1DARPin设计的2D图示。残基的着色如图5A-图5B中所定义。

[0346] 设计的2合1DARPin的高水平和可溶性表达

[0347] 在大肠杆菌细胞中表达29种不同的2合1DARPin设计,并根据标准方案使用其His标签纯化。使用5ml固定过夜培养物(TB, 1%葡萄糖、50mg/l氨苄青霉素;37°C)接种150ml培养物(TB, 50mg/l氨苄青霉素, 37°C)。在600nm处1.0至1.5的吸光度下,用1mM IPTG诱导培养物并在37°C处温育4小时-5小时,同时振荡。将培养物离心,并将所得沉淀重悬于10ml TBS₅₀₀中(50mM Tris-HCl、500mM NaCl, pH 8)并储存于-20°C,然后将其解冻,与50KU DNA

酶/ml和1mg/mL溶菌酶混合并裂解(超声处理或法式滤压壶(French press))。裂解后,将样品离心并且收集上清液并过滤。将咪唑(20mM最终浓度)添加到匀浆中。根据本领域技术人员已知的标准方案和树脂,将蛋白在台式镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)柱上进行纯化,随后进行脱盐柱(NAP-25)步骤。从大肠杆菌培养物(每升培养物至多200mg锚蛋白重复蛋白)中纯化高度可溶性2合1锚蛋白重复蛋白,如从4%-12% SDS-PAGE估计的纯度>95%。通过尺寸排阻色谱法、Protein表面等离子共振(SPR)靶亲和评估、ELISA、靶蛋白竞争HTRF实验和/或SDS-PAGE对这些非格式化的(或单结构域)2合1DARPin进行生物物理表征。

[0348] 实施例2:2合1DARPin的SPR结合测定

[0349] 本发明的2合1DARPin部分的重要特征是其对其第一靶标和第二靶标(在该示例性设计中为VEGF分子和 α -CD3 DARPin)的亲合力。甚至更重要的是,2合1DARPin与固定的 α -CD3 DARPin靶标的结合应当在可溶性VEGF的存在下被削弱以允许转换机制。

[0350] 使用表面等离子体共振(SPR)测定法来确定2合1DARPin对CD3结合结构域的结合亲和力和解离速率,该CD3结合结构域通常可包含在TOE分子诸如SEQ ID NO:31中。

[0351] 使用Bio-Rad Protein XPR36仪器以PBS-T(0.005% Tween 20)作为运行缓冲液产生所有SPR数据。根据BioRad手册对新的中性抗生物素蛋白传感器芯片(NLC)进行空气初始化和条件化。

[0352] 29种最初生成的设计中有8种2合1DARPin候选物表现出与VEGF的结合,涵盖了一系列亲和力,而29种构建体中有19种表现出与CD3结合结构域的结合。在29种构建体中,8种构建体表现出与VEGF和 α -CD3DARPin(2合1DARPin 11、12、13、15、17、18、19和20,分别对应于SEQ ID NO 6至13)的结合。还生成了SEQ ID NO:1的亲本VEGF结合物和SEQ ID NO:2的 α -CD3 DARPin阻断剂的SPR数据。针对具有SEQ ID NO:3的生物素化CD3特异性结合结构域和针对芯片固定的VEGF₁₆₅测试结合(图6A)。数据是在25°C下以50nM、12.5nM、3.12nM、0.781nM和0.195nM(即多迹线)的5种结合物浓度生成的,除了亲本VEGF结合物仅在50nM的单一浓度下(单迹线)测量以外。用SEQ ID NO:1和2的两种亲本结合物获得的SPR迹线示于图6B-图6C中。SEQ ID NO:6至13的2合1DARPin表现出与VEGF和 α -CD3 DARPin的结合,具有不同的亲和力,如图6D(第1列和第2列)中所观察到的。结果提供在下表1中。

[0353] 生成结合至芯片上具有SEQ ID NO:3的生物素化CD3特异性结合结构域的SEQ ID NO:6至13的2合1DARPin的进一步SPR数据。在存在或不存在130nM VEGF(与2合1DARPin一起预温育)的情况下,以50nM的单一浓度生成数据。图6D的最右列示出相应的SPR迹线。

[0354] 表1:

[0355]

	靶标 (配体)										
	生物素化的 CD3 特异性结合结构域 (配体 1) : SEQ ID NO: 3					VEGF ₁₆₅ (配体 2)					
	kon	koff	K _D	Rmax	Chi2	kon	koff	K _D	Rmax	Chi2	K _D 比率 (配体 1/配体 2)
构建体 (分析物)	[x10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	[x10 ⁻³ s ⁻¹]	[nM]	[RU]	[RU]	[x10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	[x10 ⁻³ s ⁻¹]	[nM]	[RU]	[RU]	
VEGF-结合物 (SEQ ID NO: 1)	ND	0.0	ND	ND	ND	6.46	0.14	0.21	180.0	25.0	NA
α-CD3 DARPIn-阻 断剂 (SEQ ID NO: 2)	8.26	0.0892	0.11	144	4.2-7.9	未结合	未结合	未结合	未结合	未结合	NA
2 合 1 DARPIn 11 (SEQ ID NO: 6)	6.91	0.67	0.96	74.95	11.91	13.80	15.30	11.10	246.6	31.3	8.65 x10 ⁻²
2 合 1 DARPIn 12 (SEQ ID NO: 7)	6.24	0.81	1.30	74.80	11.13	15.90	10.60	6.66	270.4	43.2	1.95 x10 ⁻¹
2 合 1 DARPIn 13 (SEQ ID NO: 8)	6.93	8.00	11.50	94.62	15.09	32.90	2.68	0.81	52.7	6.20	14.2
2 合 1 DARPIn 15 (SEQ ID NO: 9)	1.51	205.0	1360.0	58.19	6.71	41.10	0.10	0.02	68.0	87.80	5.91 x10 ⁴
2 合 1 DARPIn 17 (SEQ ID NO: 10)	5.99	23.50	392.0	58.63	29.27	46.30	0.85	0.18	65.0	8.50	2.18 x10 ³
2 合 1 DARPIn 18 (SEQ ID NO: 11)	5.14	0.87	1.70	83.18	10.60	11.60	0.12	0.10	353.6	ND	17.0
2 合 1 DARPIn 19 (SEQ ID NO: 12)	4.50	0.20	0.44	86.27	14.58	13.80	94.90	68.50	64.3	4.60	6.47 x10 ⁻³
2 合 1 DARPIn 20 (SEQ ID NO: 13)	3.50	0.50	1.44	94.30	16.23	12.90	0.09	0.69	263.2	ND	2.09

[0356] 随后从这八种2合1DARPIn中,选择四种以格式化多DARPIn格式(也称为开关药物DARPIn),以构成包括TAA结合结构域和CD3结合结构域的可转换T细胞衔接器药物,如下文进一步公开。

[0357] 实施例3:开关药物DARPIn格式概述

[0358] 根据标准程序将开关药物DARPIn构建体克隆成格式1([α-CD3-结合物]-[2合1DARPIn])、格式3([2合1DARPIn]-[Ni2C]-[α-CD3结合物])、格式A([α-TAA结合物]-[α-CD3结合物]-[2合1DARPIn])和格式B([2合1DARPIn]-[α-TAA结合物]-[α-CD3结合物]),其中Ni2C是非结合DARPIn(SEQ ID NO:5)并且α-TAA结合物是结合α-CD123的DARPIn结构域(SEQ ID NO:4)。在所有这些测试的构建体格式中,附加了N-末端His 6-标签(SEQ ID NO:34)。

[0359] 按照与实施例1类似的程序表达和纯化开关药物DARPIn,除了以格式A和格式B格式化的构建体,在IMAC纯化后,根据本领域技术人员已知的标准方案和树脂,在AKTExpress™系统上通过尺寸排阻色谱法进行附加的纯化步骤。通过尺寸排阻色谱法和SDS-PAGE对候选物进行生物物理表征。

[0360] 实施例4:评估开关药物DARPIn与VEGF的残余结合的ELISA测定

[0361] 评估以下开关药物DARPIn构建体与VEGF(生物素化VEGF)的残余结合:

[0362] 开关药物DARPIn 13-A(格式A的2合1DARPIn13(SEQ ID NO:23),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0363] 开关药物DARPIn 15-A(格式A的2合1DARPIn15(SEQ ID NO:24),具有融合到其N-

末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0364] 开关药物DARPin 17-A (格式A的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:25), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0365] 开关药物DARPin 18-A (格式A的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:26), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0366] 开关药物DARPin 13-B (格式B的2合1DARPin13 (SEQ ID NO:27), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0367] 开关药物DARPin 15-B (格式B的2合1DARPin15 (SEQ ID NO:28), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0368] 开关药物DARPin 17-B (格式B的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:29), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0369] 开关药物DARPin 18-B (格式B的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:30), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34))。

[0370] 将这些构建体与VEGF的结合与SEQ ID NO:1的VEGF结合结构域进行比较 (图7)。

[0371] 实验条件如下:将nunc Maxisorp板用66nM中性抗生物素蛋白包被,洗涤,用BSA封闭并负载100nM的生物素化VEGF₁₆₅ (VEGF)。然后施加开关药物DARPin的滴定,温育并洗涤。用抗RGS (his) 4mAb HRP缀合物检测结合的his标记的构建体,并用TMB底物检测。

[0372] 可以观察到格式A或格式B的构建体与VEGF结合结构域相比在EC50方面的显著差异。一般而言,所测试的开关药物DARPin的结合EC50与图6D中呈现的SPR值高度相关。因此,这些数据显示,测试的封闭形式的开关药物DARPin (即,没有任何可溶性VEGF竞争2合1DARPin与 α -CD3DARPin的结合) 提供可用于开关机制的浓度窗口。

[0373] 实施例5:用于研究开关药物DARPin的开关特性的ELISA测定

[0374] ELISA测定提供了确定开关药物DARPin构建体与靶标的结合的简单且定性的方式。评估在存在和不存在VEGF的情况下开关药物DARPin与scCD3 ϵ γ 的结合的差异。将2合1DARPin 13、15、17或18中的每一种组装到格式1、格式3、格式A或格式B的开关药物DARPin中用于滴定实验。将所述开关药物DARPin与恒定浓度的VEGF (100nM) 混合,并测试与scCD3 ϵ γ 的结合。在存在和不存在100nM VEGF的情况下,单价CD3结合结构域 (SEQ ID NO:3) 用作阳性对照 (图8A-图8D)。在存在和不存在VEGF的情况下构建体的EC50的差异可称为“活化窗口”。比较图8A和图8B,似乎在可以比较的开关药物DARPin构建体的特定示例的活化窗口方面,格式3是优良的。

[0375] 所测试的开关药物DARPin的详情 (图8A至图8D) 如下:

[0376] 图8A

[0377] 开关药物DARPin 15-1 (格式1的2合1DARPin15 (SEQ ID NO:16), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0378] 开关药物DARPin 17-1 (格式1的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:17), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0379] 开关药物DARPin 18-1 (格式1的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:18), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34))。

[0380] 格式1=[α -CD3结合物]-[2合1DARPin],

[0381] 图8B

[0382] 开关药物DARPin 13-3 (格式3的2合1DARPin13 (SEQ ID NO:19), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0383] 开关药物DARPin 15-3 (格式3的2合1DARPin15 (SEQ ID NO:20), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0384] 开关药物DARPin 17-3 (格式3的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:21), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0385] 开关药物DARPin 18-3 (格式3的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:22), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0386] 格式3=[2合1DARPin]-[Ni2C]-[α -CD3结合物]。

[0387] 图8C

[0388] 开关药物DARPin 17-A (格式A的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:25), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0389] 开关药物DARPin 18-A (格式A的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:26), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0390] 格式A=[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[2合1DARPin],

[0391] 图8D

[0392] 开关药物DARPin 17-B (格式B的2合1DARPin17 (SEQ ID NO:29), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0393] 开关药物DARPin 18-B (格式B的2合1DARPin18 (SEQ ID NO:30), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0394] 格式B=[2合1DARPin]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]。

[0395] 开关药物DARPin 13-3和开关药物DARPin 18-3在不存在VEGF的情况下几乎不显示结合,但在存在VEGF的情况下显示与bscCD3 ϵ γ 的稳健结合。相反,对照CD3结合结构域 (SEQ ID NO:3) 的EC50不受VEGF添加的影响。格式A和格式B (含有 α -CD123结合结构域而不是如同格式1和格式3中的非结合Ni2C DARPin结构域) 表现出与格式1和格式3所观察到的类似行为 (图8C和图8D)。总之,开关药物DARPin 17-B提供了最大的活化窗口 (~178倍), 同时在添加100nM VEGF后, 它的结合可以完全恢复到CD3结合结构域对照。

[0396] 实验条件如下:将nunc Maxisorp板用66nM中性抗生物素蛋白包被,洗涤,用BSA封闭并负载20nM的生物素化scCD3 ϵ γ 。滴定与VEGF混合的开关药物DARPin,并与VEGF一起预温育1天以建立热力学平衡。将这些样品负载到ELISA板上,温育并洗涤,之后如上所述检测到结合的开关药物DARPin。

[0397] 因此,这些数据支持100nM VEGF的存在或不存在可产生测试的开关药物DARPin与它们的CD3靶标结合的活化窗口。

[0398] 接下来,评估VEGF浓度对开关药物DARPin的结合的影响。将如上所述的开关药物DARPin 17-1、17-3和18-3保持在恒定浓度,同时滴定VEGF的浓度。图9A显示,当固定在10nM的浓度并与滴定量的VEGF温育时,开关药物DARPin 17-1可以剂量依赖性地重新获得与scCD3 ϵ γ 的结合。开关药物DARPin 17-3和18-3的结果在图9B和图9C中类似地表示,图显示包含2合1DARPin 17的两个构建体的格式3与格式1相比是优良的,因为在不存在VEGF的情

况下构建体不显示结合,但与CD3的结合可以以VEGF剂量依赖性方式重新获得。

[0399] 因此,这些数据支持示例性开关药物DARPin与其靶CD3的结合可由VEGF以剂量依赖性方式调节。

[0400] 实施例6:作为验证的HTRF测定

[0401] 均相时间分辨荧光 (HTRF) 是确定蛋白相互作用的非常快速且完全基于溶液的测定。为了验证以上呈现的ELISA测定的结果,对开关药物DARPin 13-3、15-3、17-3或18-3进行测试(这些构建体的详情示于实施例5中)。将所述开关药物DARPin (20nM最终浓度) 与1nM (最终浓度) scCD3 ϵ γ 、1:200 (最终浓度) 抗FLAG-d2 HTRF抗体-FRET受体缀合物 (Cisbio) 和1:200 (最终浓度) 抗strep-Tb抗体FRET供体缀合物 (Cisbio, France) 混合。测定原理例示于图10A-图10B中。如果适用,VEGF以100nM (最终浓度) 添加 (图10C) 或以2.5倍稀释步骤从1 μ M开始滴定 (图10D)。将混合物添加到384孔板的孔中并温育90分钟。使用340nm激发波长及用于背景荧光检测的620 $\pm$ 10nm发射滤光片和用于检测特异性结合的荧光信号的665 $\pm$ 10nm发射滤光片,在Tecan M1000上读出HTRF。图10C-图10D所示的结果证实,观察到开关药物DARPin 13-3、15-3、17-3或18-3的活化窗口与实施例5中ELISA测定的结果类似。

[0402] 因此,该数据类似地支持开关药物DARPin TCE与其靶CD3的结合可由VEGF以剂量依赖性方式调节。

[0403] 实施例7:Jurkat细胞结合测定

[0404] 在该测定中使用以下构建体:

[0405] 开关药物DARPin 17-B (格式B的2合1DARPin 17 (SEQ ID NO:29), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0406] 格式B对照构建体 (SEQ ID NO:33的[α -VEGF结合物]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34))。

[0407] 通过流式细胞术 (流式细胞仪FACS Canto) 测量开关药物DARPin 17-B与Jurkat细胞上的人CD3的结合。将在存在和不存在VEGF (100nM或400nM) 的情况下的开关药物DARPin 17-B或格式B对照构建体的滴定物与每孔100'000个Jurkat细胞在4 $^{\circ}$ C下温育60分钟。洗涤后,通过1:100稀释的抗-五-组氨酸抗体 (4 $^{\circ}$ C温育30分钟) 检测开关药物DARPin的CD3结合。随后洗涤细胞并进行live-dead染色 (aqua, 1:1000, Thermofisher), 并重悬于Cytofix固定缓冲液 (BD Biosciences) 中。通过流式细胞术测量结合在活细胞上的Alexa Fluor 488的平均荧光强度的中值,并使用GraphPad Prism 8对数据作图 (图11)。

[0408] 在不存在VEGF的情况下,开关药物DARPin 17-B在较高构建体浓度 (>1 μ M) 下仅显示最小程度的结合,而添加100nM VEGF使结合回复至与格式B对照构建体类似的水平。将VEGF水平增加至400nM对Jurkat细胞结合没有附加的影响。

[0409] 实施例8:T细胞活化测定

[0410] 通过对CD8+T细胞上的CD69活化标志物进行FACS测量,在体外短期T细胞活化测定中评估开关药物DARPin的特异性和效力。

[0411] 所测试的开关药物DARPin的详情如下:

[0412] 图12A:

[0413] 开关药物DARPin 13-A (格式A的2合1DARPin 13 (SEQ ID NO:23), 具有融合到其N-末端的His标签 (SEQ ID NO:34)),

[0414] 开关药物DARPin 15-A(格式A的2合1DARPin 15(SEQ ID NO:24),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0415] 开关药物DARPin 17-A(格式A的2合1DARPin 17(SEQ ID NO:25),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0416] 开关药物DARPin 18-A(格式A的2合1DARPin 18(SEQ ID NO:26),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0417] 格式A=[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[2合1DARPin]。

[0418] 对照:

[0419] 对照TCE(SEQ ID NO:31的[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物],具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0420] 格式A对照构建体(SEQ ID NO:32的[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]-[α -VEGF结合物],具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34))。

[0421] 图12B:

[0422] 开关药物DARPin 13-B(格式B的2合1DARPin 13(SEQ ID NO:27),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0423] 开关药物DARPin 15-B(格式B的2合1DARPin 15(SEQ ID NO:28),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0424] 开关药物DARPin 17-B(格式B的2合1DARPin 17(SEQ ID NO:29),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0425] 开关药物DARPin 18-B(格式B的2合1DARPin 18(SEQ ID NO:30),具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0426] 格式B=[2合1DARPin]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物]。

[0427] 对照:

[0428] 对照TCE(SEQ ID NO:31的[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物],具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34)),

[0429] 格式B对照构建体(SEQ ID NO:33的[α -VEGF结合物]-[α -CD123结合物]-[α -CD3结合物],具有融合到其N-末端的His标签(SEQ ID NO:34))。

[0430] 将20'000个靶肿瘤细胞(Molm-13细胞,表达CD123)和100'000个效应T细胞(来自健康献血者的泛T细胞)与开关药物DARPin样品的连续稀释液在600 μ M人血清白蛋白的存在下在37 $^{\circ}$ C共温育48小时(效应细胞与靶细胞比率为5:1)。所有开关药物DARPin样品和对照在+4 $^{\circ}$ C下在有或无VEGF的情况下预温育至少48小时。48小时后,洗涤细胞,并用1:5'000Live/Dead FITC(Thermo Fisher)、1:250小鼠抗人CD8 Pasific Blue(BD)和1:250来自BioLegend的小鼠抗hCD69-APC(BioLegend,US)抗体在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。洗涤和固定后,在流式细胞仪Attune Nxt上分析细胞。通过测量Live/Dead阴性和CD8阳性门控T细胞上的CD69阳性细胞来评估T细胞活化情况。使用FlowJo软件分析FACS数据,并使用GraphPad Prism 8对数据作图。用来自两个个体人供体的泛T细胞进行两次测定。如图12A-图12B所表示,对开关药物DARPin 13-A、13-B、15-A、15-B、17-A、17-B、18-A和18-B进行测试并与对照TCE以及相应的格式A或格式B对照构建体进行比较。对于两种格式,包含2合1DARPin 17的开关药物DARPin显示出最佳活化窗口(即,在不存在和存在100nM VEGF的情况下EC50的差

异),对于开关药物DARPin 17-B观察到75倍的最大窗口(图12B)。即使在不存在VEGF的情况下,格式B对照构建体也没有达到对照TCE的效力。因此,向对照TCE的N-末端添加第二结合部分降低了效力。因此,预计开关药物DARPin可最大程度地在VEGF的存在下达到格式B对照构建体的效力,开关药物DARPin 15-B或17-B就是这种情况。对于开关药物DARPin 13-B或18-B,添加100nM VEGF不足以完全活化构建体。

[0431] 实施例9:附加的2合1DARPin的产生和表征

[0432] 已经产生并表征了根据本发明的其他2合1DARPin。除非另有说明,否则本部分描述的实验基本上按照实施例1-6中描述的程序进行。

[0433] 9.1概述

[0434] 从四种不同的靶特异性亲本DARPin开始,设计并产生2合1DARPin。结果通过5种代表性的功能性2合1DARPin呈现。基于亲本DARPin,这些2合1DARPin可分类为两个不同家族,如表2和表3中详述:

[0435] 表2:亲本DARPin(单特异性):

亲本编号	SEQ ID NO	结合靶标
1	86	麦芽糖结合蛋白(MBP)
2	87	氨基糖苷磷酸转移酶(APH)
3	3	scCD3 ϵ γ
4	88	靶标A

[0437] 表3:2合1DARPin(双重特异性):

2合1DARPin	家族	SEQ ID NO	来源	结合靶标
21	1	90	亲本1号和2号	APH和MBP
22	1	91	亲本1号和2号	APH和MBP
23	2	92	亲本3号和4号	靶标A和scCD3 ϵ γ
24	2	93	亲本3号和4号	靶标A和scCD3 ϵ γ
25	2	94	亲本3号和4号	靶标A和scCD3 ϵ γ

[0439] 一般适用的方法在下文部分9.1中描述,这些方法可任选地用于促进本发明的经设计的重复结构域(诸如2合1DARPin)的设计和表征。

[0440] 为了促进本发明的经设计的重复结构域的设计,可以对一个亲本重复结构域或两个亲本重复结构域进行剖析,以确定亲本重复结构域是否相容于在N-末端侧和/或C-末端侧与另一亲本重复结构域(或其片段)连接,以形成具有双重结合特异性的经设计的重复结构域,其中与两个靶标的结合是互相排斥的。此类剖析为随后亲本重复结构域(或其片段)的组合提供了最佳起点。该剖析包括一系列系统测定,其中产生和评价感兴趣的亲本重复结构域的变体。对于每个产生的变体,测试结合其靶标的能力以确定N-末端封端模块、C-末端封端模块和/或与N-末端封端模块或C-末端封端模块相邻的内部重复模块对于靶标结合是否重要。这种迭代结合评估可以例如通过ELISA进行。用于将变体分类为已经丧失靶标结合的变体或已经维持靶标结合的变体的示例性阈值,如下文进一步描述的,是大约300nM的EC₅₀(即,较高的EC₅₀值意味着变体已经丧失结合,而较低的EC₅₀值意味着变体已经维持结合)。亲本重复结构域的此类剖析可包括一个或多个步骤,这些步骤在下面进一步描述(步骤1至4)并且也在图13中针对亲本DARPin例示。图13仅示出了对亲本DARPin的N-末端侧的

评估的步骤。对亲本DARPin的C-末端侧的评估的步骤是类似的并且遵循相同的逻辑。下面描述并在图13中例示的步骤是示例性的,并不意在是限制性的。

[0441] 步骤1. 将亲本重复结构域的末端封端模块(即N-末端封端模块或C-末端封端模块)替换为相应的模板非结合末端封端模块(诸如例如SEQ ID NO:36或38),并测试所得变体的靶标结合是得以维持还是损伤。这允许确定亲本重复结构域的末端封端模块是否参与靶标结合。

[0442] • 如果靶标结合丧失,则末端封端模块参与靶标结合并且可以进行步骤2(即,对于在步骤1中丧失结合的情况的步骤2的版本);

[0443] • 如果靶标结合维持,则末端封端模块不参与靶标结合并且可以进行步骤2(即,对于在步骤1中维持结合的情况的步骤2的版本);

[0444] 该步骤1(以及随后下面的步骤2、3和/或4)可以针对感兴趣的亲本DARPin的每个末端侧单独进行。

[0445] 步骤2(步骤1的结果是丧失靶标结合)。在步骤1中被替换的亲本重复结构域的末端封端模块现在替换为一组三个连接的重复模块,该组包括(从内部到封端模块)(1)模板非结合性内部重复模块(诸如例如,SEQ ID NO:89),其中引入所替换的封端模块的互补位残基,(2)模板非结合性内部重复模块,和(3)模板非结合性末端封端模块,并且测试所得变体的靶标结合是得以维持还是丧失。另选地,所述替换可以用一组两个连接的重复模块进行,该组包括(从内部到封端模块)(1)模板非结合性内部重复模块,其中引入所替换的封端模块的互补位残基,和(2)模板非结合性末端封端模块。这允许确定如果在代替经设计的重复结构域中的封端模块的经设计的内部重复模块中存在亲本重复结构域的末端封端模块的互补位残基,是否可以维持靶标结合。

[0446] • 如果靶标结合丧失,则所考虑的末端封端模块及其互补位残基对于靶标结合是必需的,并且亲本重复结构域不能与该末端侧上的另一重复结构域连接;

[0447] • 如果靶标结合维持,则所考虑的亲本重复结构域的末端侧与另一(相容的)亲本重复结构域的连接相容。为此,可以去除所考虑的末端封端模块,并且所述末端封端模块的互补位残基必须存在于相邻内部重复模块中,该相邻内部重复模块代替经设计的重复结构域内的封端模块(该内部重复模块来源于所述第二亲本重复结构域或新设计的内部重复模块)。

[0448] 步骤2(步骤1的结果是维持靶标结合)。在步骤1中被替换的亲本重复结构域的末端封端模块现在替换为一组两个连接的重复模块,该组包括(从内部到封端模块)(1)模板非结合性内部重复模块,和(2)模板非结合性末端封端模块,并且测试所得变体的靶标结合是得以维持还是丧失。这允许确定如果亲本重复结构域的末端封端模块被去除并且相邻内部重复模块与另一个重复结构域的内部重复模块组合,是否可以维持靶标结合。

[0449] • 如果靶标结合丧失,则亲本重复结构域不能与所考虑的末端侧上的另一重复结构域连接(用附加的内部重复模块延伸会损害结合);

[0450] • 如果靶标结合维持,则亲本重复结构域与所考虑的末端侧的另一(相容的)母体重复结构域的连接相容,并且可以任选地进行步骤3和步骤4以进一步评估亲本重复结构域的最外面的内部重复模块(即,与所考虑的末端封端模块相邻定位的内部重复模块)是否参与靶标结合。

[0451] 步骤3.在步骤1中被替换的亲本重复结构域的末端封端模块和相邻内部重复模块现在都被模板非结合末端封端模块替换,其中引入所替换的内部重复模块的互补位残基,并且测试所得变体的靶标结合是得以维持还是丧失。这允许确定所述相邻内部重复模块是否必须保持以维持靶标结合,或者如果其互补位残基存在于代替它的末端封端模块中,则它是否可以被去除。

[0452] • 如果靶标结合丧失,则所考虑的相邻内部重复模块参与靶标结合并且应当保持作为本发明的经设计的重复结构域的一部分;

[0453] • 如果靶标结合维持,则可将所考虑的相邻内部重复模块转化为本发明的经设计的重复结构域中的末端封端模块(通过在末端封端模块中具有所述内部重复模块的互补位残基)。

[0454] 步骤4.在步骤1中被替换的亲本重复结构域的末端封端模块和相邻内部重复模块现在都被模板非结合末端封端模块替换,并且测试所得变体的靶标结合是得以维持还是丧失。这允许确定如果亲本重复结构域的末端封端模块和相邻内部重复模块被去除并且被另一重复模块替换,靶标结合是否可以维持。

[0455] • 如果靶标结合丧失,则所考虑的相邻内部重复模块参与靶标结合并且应当保持作为本发明的经设计的重复结构域的一部分。

[0456] • 如果靶标结合维持,则所考虑的相邻内部重复模块不参与靶标结合并且可以在本发明的经设计的重复结构域中省略。

[0457] 关于上述步骤的顺序不是严格要求的,因为可以通过并行地产生和评估多个或所有变体来并行地运行多于一个步骤或所有步骤。此外,上述步骤中的每个步骤可以单独进行或与一个或多个其他步骤组合进行以评估亲本重复结构域的特性。

[0458] 所进行的评估步骤的结果可用于告知本发明的经设计的重复结构域的设计。

[0459] 为了鉴定和表征本发明的经设计的重复结构域,使用本领域已知的和/或如本文所述的技术评估为了生成本发明的经设计的重复结构域而产生的重复结构域的靶标结合特性。为此目的评估的此类生成的重复结构域的特性包括对两种靶标的结合亲和力以及与第一靶标和第二靶标结合的互相排斥特征。

[0460] 该实施例9中描述的2合1DARPin和它们各自的亲本DARPin的2D互补位图示在图16中示出。

[0461] 9.2家族1

[0462] DARPin亲本1号(与MBP结合)和亲本2号(与APH结合)先前已有描述并且分别对应于Binz等人2004, (loc.Cit)的“off7”和Amstutz,P等人,2005,Journal of Biological Chemistry 280.26:24715-24722中的“AR 3b”。根据本领域技术人员已知的标准程序产生这些DARPin。

[0463] 进行如部分9.1中所述的剖析方法。亲本1号和2号的相关信息汇总在表4中:

[0464] 表4:亲本1号和2号的剖析。

亲本编号	重复模块分析					可位于2合1DARPin的 N-末端	可位于2合1DARPin的 C-末端
	N	IR1	IR2	IR3	C		
1	Z	Y	X	X	z	是	是
2	X	X	X	Y	z	是	是,但不是优选的

[0466] 其中X意指该重复模块不能被修饰或延伸;Y意指该重复模块类型可以改变(例如,从内部重复模块转化为末端封端模块);Z意指该重复模块可以被去除;N是N-末端封端模块;C是C-末端封端模块;并且IR1、IR2和IR3分别是N-末端开始的第一内部重复模块、第二内部重复模块和第三内部重复模块。

[0467] 基于该剖析,产生11种2合1DARPin设计,这些设计在C-末端侧包含亲本DARPin 1号且在N-末端侧包含亲本DARPin 2号(第二主要步骤,如部分9.1中所述)。产生包含5个(表5)至10个(表6)范围的内部重复模块的2合1DARPin。

[0468] 表5:最小设计(重叠互补位)。

[0469]	重复模块排列						
	N-末端 DARPin (亲本 2)	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>IR3</u>	<u>C</u>	
	C-末端 DARPin (亲本 1)			N	IR1	IR2	IR3 C
	2 合 1 设计	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>IR3/IR1</u>	IR2	IR3 C

[0470] 表6:最大设计(非重叠互补位)。

[0471]	重复模块排列											
	N-末端 DARPin (亲本 2)	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>IR3</u>	<u>C</u>	<u>Rt</u>	<u>Rt</u>				
	C-末端 DARPin (亲本 1)						Rt	Rt	N	IR1	IR2	IR3 C
	2 合 1 设计	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>IR3</u>	<u>C</u>	<u>Rt</u>	<u>Rt</u>	N	IR1	IR2	IR3 C

[0472] 在表5和表6中,粗体和下划线字体用于指示重复模块的来源;IR3/IR1代表从亲本2的IR3和亲本1的IR1获得的混合重复模块;Rt代表模板内部重复模块(非结合)。此类模板内部重复模块的示例是SEQ ID NO:89。

[0473] 对于两个代表性构建体:2合1DARPin 21(SEQ ID NO:90)和2合1DARPin 22(SEQ ID NO:91),示出了这些2合1设计的重复结构域的特征,每个代表性构建体具有对APH和MBP的双重结合特异性。如实施例1所述进行2合1DARPin的表达。

[0474] SEC分析

[0475] 在Agilent 1200HPLC系统上的GE Superdex 200 5/150Increase GL柱上以0.5ml/min的流速在PBS中分析样品(2mg/ml)。结果示于图14A中。

[0476] 结合亲和力(SPR)

[0477] 如实施例2中所述,通过SPR分析确定2合1DARPin 21和2合1DARPin 22独立地对APH或MBP的结合亲和力。将靶分子(APH或MBP)包被在HC200M芯片上(包被密度:APH为550Rd,MBP为800Rd)。将样品以1/3步骤在PBS-T中稀释,并以300nM、100nM、33.3nM、11.1nM、3.7nM和0nM运行。SPR曲线示于图14B中,KD值示于表7中。与亲本DARPin的相应亲和力相比,2合1DARPin 21和2合1DARPin 22对每个靶标的结合亲和力得以维持。

[0478] 表7:结合亲和力

[0479]	样品	对MBP的亲和力, K_D	对APH的亲和力, K_D
	2合1DARPin 21	44.6nM	66.9nM
	2合1DARPin 22	53nM	52.6nM
	亲本2号	-	147nM
	亲本1号	27.5nM	-

[0480] 该测定中使用的氨基糖苷磷酸转移酶 (APH) 对应于SEQ ID NO:95, 该测定中使用的麦芽糖结合蛋白 (MBP) 对应于SEQ ID NO:96。

[0481] 竞争性结合 (SPR)

[0482] 为了评估2合1DARPin 21和2合1DARPin 22与APH和MBP的结合互相排斥性, 进行两个竞争性SPR测定 (Comp-SPR1和Comp-SPR2)。

[0483] 在Comp-SPR1中, 将APH包被在芯片上, 并将80nM的2合1DARPin与不同浓度的可溶性MBP (2500nM、833nM、277nM、92nM、31nM或0nM) 一起预温育40分钟。MBP充当APH结合的竞争剂。然后将样品进样到芯片上并测量与APH的结合 (图14C部分1) 和部分3))。测量进样结束时的应答 (最大SPR信号) 并针对MBP的浓度作图 (图14C部分2) 和部分4))。图14C部分1) 和部分2) 示出2合1DARPin 21的结果, 图14C部分3) 和部分4) 示出2合1DARPin 22的结果。

[0484] Comp-SPR2对应于反向设置的Comp-SPR1, 即在Comp-SPR2中, 将MBP包被在芯片上, 并将80nM的2合1DARPin与不同浓度的可溶性APH (2500nM、833nM、277nM、92nM、31nM或0nM) 一起预温育40分钟。APH充当MBP结合的竞争剂。然后将样品进样到芯片上并测量与MBP的结合 (图14D部分1) 和部分3))。测量进样结束时的应答 (最大SPR信号) 并针对APH的浓度作图 (图14D部分2) 和部分4))。图14D部分1) 和部分2) 示出2合1DARPin 21的结果, 图14D部分3) 和部分4) 示出2合1DARPin 22的结果。由上述两个竞争性SPR测定得到的IC₅₀值示于表8中:

[0485] 表8: IC₅₀值

[0486]	样品	APH 包被, MBP 竞争剂 (Comp-SPR1)	MBP 包被, APH 竞争剂 (Comp-SPR2)
	2 合 1 DARPin 21	53nM	55nM
	2 合 1 DARPin 22	64nM	47nM

[0487] 如进样结束时SPR信号的下降 (最大SPR信号) 所示, 在每种情况下, 递增浓度的竞争剂会减少与包被靶标的结合。因此, 2合1DARPin 21和22与第一靶标和第二靶标 (MBP和APH) 的结合彼此排斥。

[0488] 竞争性结合 (ELISA)

[0489] 本发明的2合1DARPin的结合互相排斥性可替代地通过基于ELISA的竞争性结合测定来测量。首先用APH包被Nunc Maxisorp板。将最终浓度为100nM的2合1DARPin 21和2合1DARPin 22暴露于1/3步骤MBP连续稀释液 (40000nM、13333nM、4444nM、1481nM、494nM、165nM、54.9nM、18.3nM、6.1nM、2.0nM或0nM) 1小时。随后进行标准读出。结果示于图14E中。可以观察到剂量应答。

[0490] 结合亲和力 (ELISA)

[0491] 在标准ELISA测定中单独测试2合1DARPin 21和2合1DARPin 22与靶标MBP或APH的结合。亲本DARPin 1号和2号用作阳性对照。如实施例4中所述进行测定。结果显示在图14F中, 其中图1) 代表样品与MBP的结合, 图2) 代表样品与APH的结合。

[0492] 9.3家族2

[0493] WO2022129428中描述了DARPin亲本3号 (与scCD3 ϵ γ 结合) 以及scCD3 ϵ γ 靶蛋白本身。根据本领域技术人员已知的标准程序产生这些DARPin。

[0494] 对两个亲本DARPin 3号和4号进行如部分9.1中所述的剖析方法。相关信息汇总在表9和表10中:

[0495] 表9:亲本3号的剖析。

[0496] 亲本编号	重复模块分析				可位于 2 合 1 DARPin 的 N-末端	可位于 2 合 1 DARPin 的 C-末端
	N	IR1	IR2	C		
3	Y	X	X	X	是, 但不是优选的	是

[0497] 表10:亲本4号的剖析。

[0498] 亲本编号	重复模块分析					可位于 2 合 1 DARPin 的 N-末端	可位于 2 合 1 DARPin 的 C-末端
	N	IR1	IR2	IR3	C		
4	X	X	X	X	Y	是	否

[0499] 在表9和表10中,X意指该重复模块不能被修饰或延伸;Y意指该重复模块类型可以改变(例如,从内部重复模块转化为末端封端模块);N是N-末端封端模块;C是C-末端封端模块;并且IR1、IR2和IR3分别是N-末端开始的第一内部重复模块、第二内部重复模块和第三内部重复模块。

[0500] 基于该剖析,产生10种2合1设计的重复结构域,这些在C-末端侧包含亲本DARPin 3号(或其部分)且在N-末端侧包含亲本DARPin 4号(或其部分)(第二主要步骤,如部分9.1中所述)。产生包含6个(表11)至10个(表12)范围的内部重复模块的2合1DARPin。

[0501] 表11:最小设计(重叠互补位)。

[0502]		重复模块排列							
	N-末端 DARPin (亲本 4)	N	IR1	IR2	IR3	C			
	C-末端 DARPin (亲本 3)					<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>C</u>
	2 合 1 设计	N	IR1	IR2	IR3	C/N	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>C</u>

[0503] 其中粗体和下划线字体用于指示重复模块的来源;并且C/N代表从亲本4的C和亲本3的N获得的混合重复模块。

[0504] 表12:最大设计(非重叠互补位)。

		重复模块排列											
[0505]	N-末端 DARPin (亲本 4)	N	IR1	IR2	IR3	C	Rt	Rt	Rt				
	C-末端 DARPin (亲本 3)						<u>Rt</u>	<u>Rt</u>	<u>Rt</u>	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>C</u>
[0506]	2 合 1 设计	N	IR1	IR2	IR3	C	Rt	Rt	Rt	<u>N</u>	<u>IR1</u>	<u>IR2</u>	<u>C</u>

[0507] 其中Rt代表模板内部重复模块(非结合)。此类模板内部重复模块的示例是SEQ ID NO:89。

[0508] 对于三个代表性构建体:2合1DARPin 23(SEQ ID NO:92)、2合1DARPin 24(SEQ ID NO:93)和2合1DARPin 25(SEQ ID NO:94),示出了这些2合1设计的重复结构域的特征,每个代表性构建体具有对scCD3 ϵ γ 和靶标A的双重结合特异性。如实施例1所述进行2合1DARPin的表达。

[0509] 如9.2部分进行SEC分析。结果示于图15A中。

[0510] 结合亲和力(SPR)

[0511] 如实施例2中所述,通过SPR分析确定2合1DARPin 23、2合1DARPin 24和2合1DARPin 25独立地对scCD3 ϵ γ 或靶标A的结合亲和力。将生物素化的靶分子(生物-scCD3 ϵ

γ 或生物-靶标A) 包被在NAD芯片上(包被密度:生物-scCD3 ϵ γ 为460Rd,生物-靶标A为560Rd)。将样品以1/3步骤在PBS-T中稀释,并以333.33nM、111.11nM、37.00nM、12.34nM、4.11nM和0nM运行。SPR曲线示于图15B中,KD值示于表13中。与亲本DARPin的相应亲和力相比,2合1DARPin 23、2合1DARPin 24和2合1DARPin 25对每个靶标的结合亲和力得以维持。

[0512] 表13:结合亲和力

样品	对生物-scCD3 ϵ γ 的亲和力, K_D	对生物-靶标A的亲和力, K_D
2合1DARPin 23	3.81nM	0.024nM
2合1DARPin 24	4.67nM	0.119nM
2合1DARPin 25	4.05nM	0.018nM
亲本3号	2.03nM	-
亲本4号	-	0.160nM

[0514] 竞争性结合 (SPR)

[0515] 以竞争性SPR测定(与部分9.2中的Comp-SPR1和Comp-SPR2类似),评估2合1DARPin 23与scCD3 ϵ γ 和靶标A的结合互相排斥性。

[0516] 将生物素化的scCD3 ϵ γ 包被在NAD芯片上,并将50nM 2合1DARPin与不同浓度的可溶性靶标A(150nM、50nM、16.7nM、5.5nM、1.85nM或0nM)预温育4.5小时。靶标A充当scCD3 ϵ γ 结合的竞争剂。然后将样品进样到芯片上并测量与scCD3 ϵ γ 的结合(图15C部分1))。测量进样结束时的应答(最大SPR信号)并针对靶标A的浓度作图(图15C部分2))。由上述竞争性SPR测定得到的IC50值示于表14中:

[0517] 表14:IC50值

样品	scCD3 ϵ γ 包被,靶标A竞争剂
2合1DARPin 23	34nM

[0519] 如进样结束时SPR信号的下降(最大SPR信号)所示,递增浓度的竞争剂会减少与包被靶标的结合。因此,2合1DARPin 23与第一靶标和第二靶标(scCD3 ϵ γ 和靶标A)的结合彼此排斥。

[0520] 竞争性结合 (HTRF)

[0521] 本发明的2合1DARPin的结合互相排斥性可替代地通过基于HTRF的竞争性结合测定来测量。在该测定中,评估在不同浓度的非生物素化靶标A竞争剂的存在下2合1DARPin与生物-scCD3 ϵ γ 的结合。基本上如实施例6所述进行HTRF测定。已经使用以下参数:1nM生物-scCD3 ϵ γ 、3nM 2合1DARPin,在300nM、100nM、33.333nM、11.111nM、3.704nM、1.235nM、0.412nM、0.137nM、0.046nM、0.015nM和0nM滴定靶标A竞争剂。由该HTRF测定得到的曲线示于图15D中。基于该数据,可以得出结论,在递增浓度的竞争剂(此处为靶标A)的存在下,与第二靶标(此处为scCD3 ϵ γ)的结合受到阻碍,因此2合1DARPin与第一靶标或第二靶标的结合是互相排斥的。

[0522] 结合亲和力 (ELISA)

[0523] 在标准ELISA测定中单独测试2合1DARPin 23、2合1DARPin 24和2合1DARPin 25与靶标scCD3 ϵ γ 或靶标A的结合。亲本DARPin 3号和4号用作阳性对照。如实施例4中所述进行测定。结果显示在图15E中,其中图1)代表样品与靶标A的结合,图2)代表样品与scCD3 ϵ γ 的结合。

[0524] 总之,实施例证明对第一靶标具有第一结合特异性并且对第二靶标具有第二结合特异性的经设计的重复结构域(其中所述经设计的重复结构域与所述第一靶标和所述第二靶标的结合是互相排斥的)可以使用具有不同靶标特异性的许多不同重复结构域作为亲本重复结构域来生成。因此,实施例提供了生成此类经设计的重复结构域的一般适用方法,并建立了具有此类新型特性的经设计的重复结构域的一般概念。

[0525] 按照本说明书内引用的参考文献的教导内容最彻底地理解本说明书。本说明书内的各方面提供了对本发明的各方面的说明,并且不应理解为限制本发明的范围。技术人员容易认识到,本发明涵盖许多其他方面。本公开中引用的所有出版物、专利和GenBank序列均全文以引用方式并入。在以引用方式并入的材料与本说明书矛盾或不一致的程度上,本说明书将取代任何此类材料。对本文任何参考文献的引用不是承认此类参考文献是本发明的现有技术。

[0526] 本领域的技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的特定方面的许多等同物。此类等同物旨在由以下权利要求涵盖。

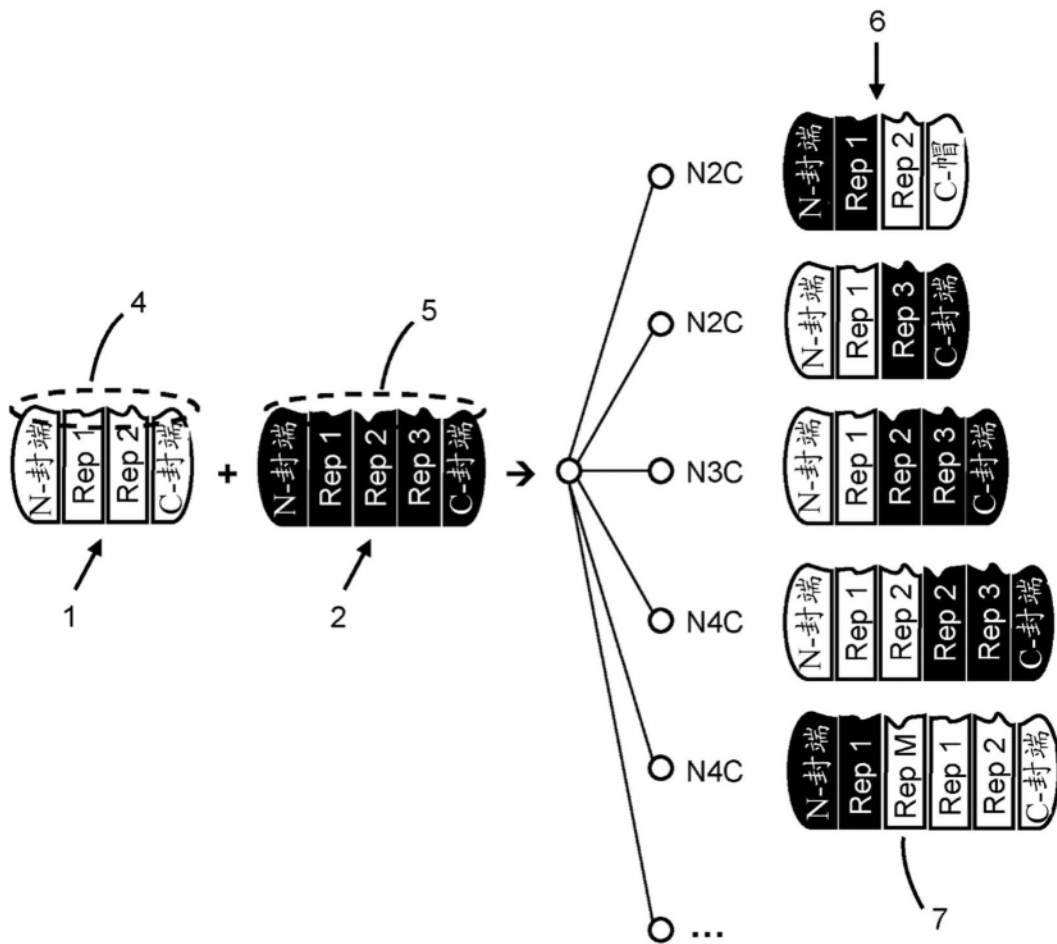


图1

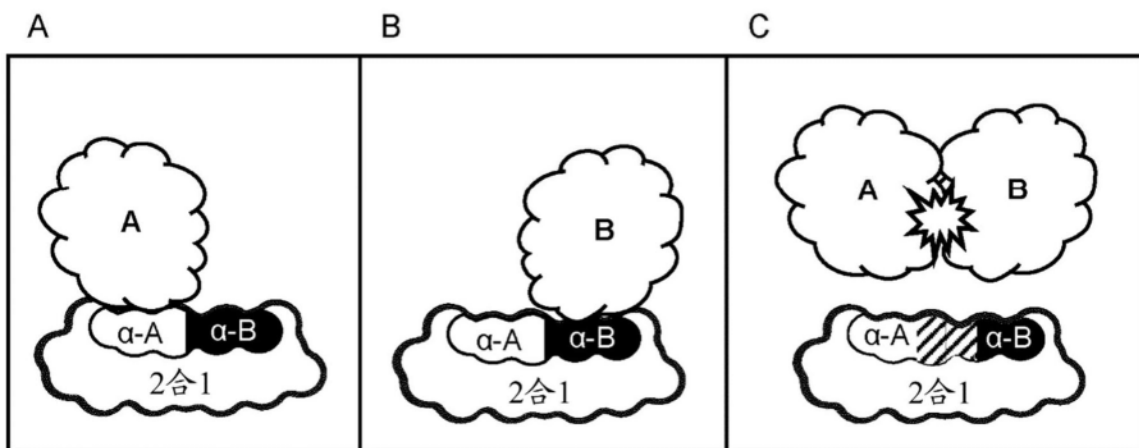


图2

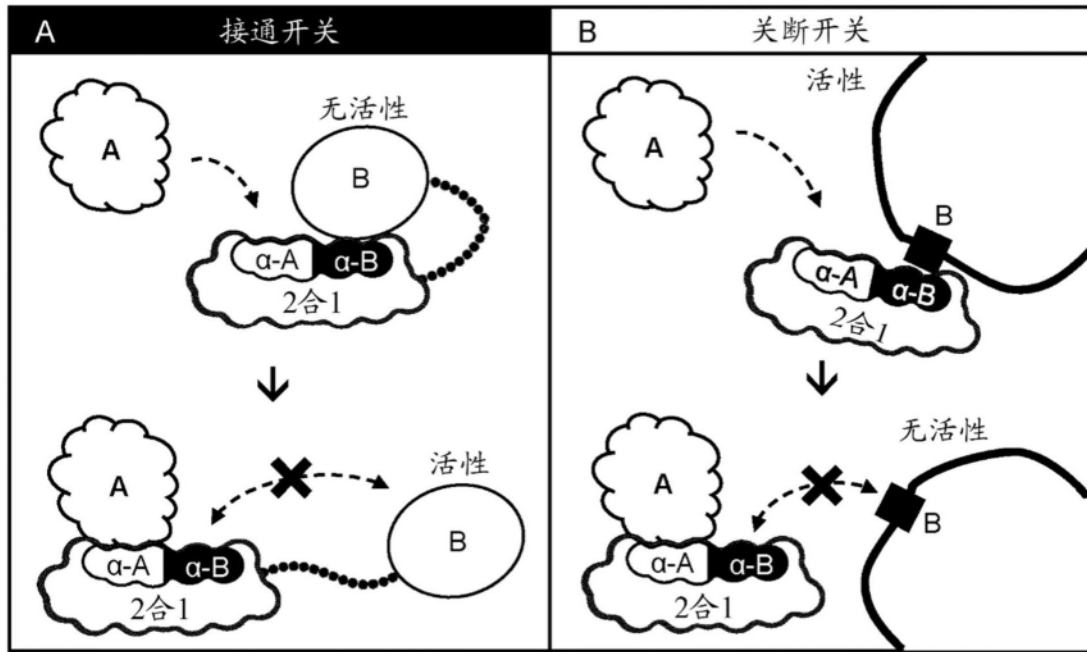


图3

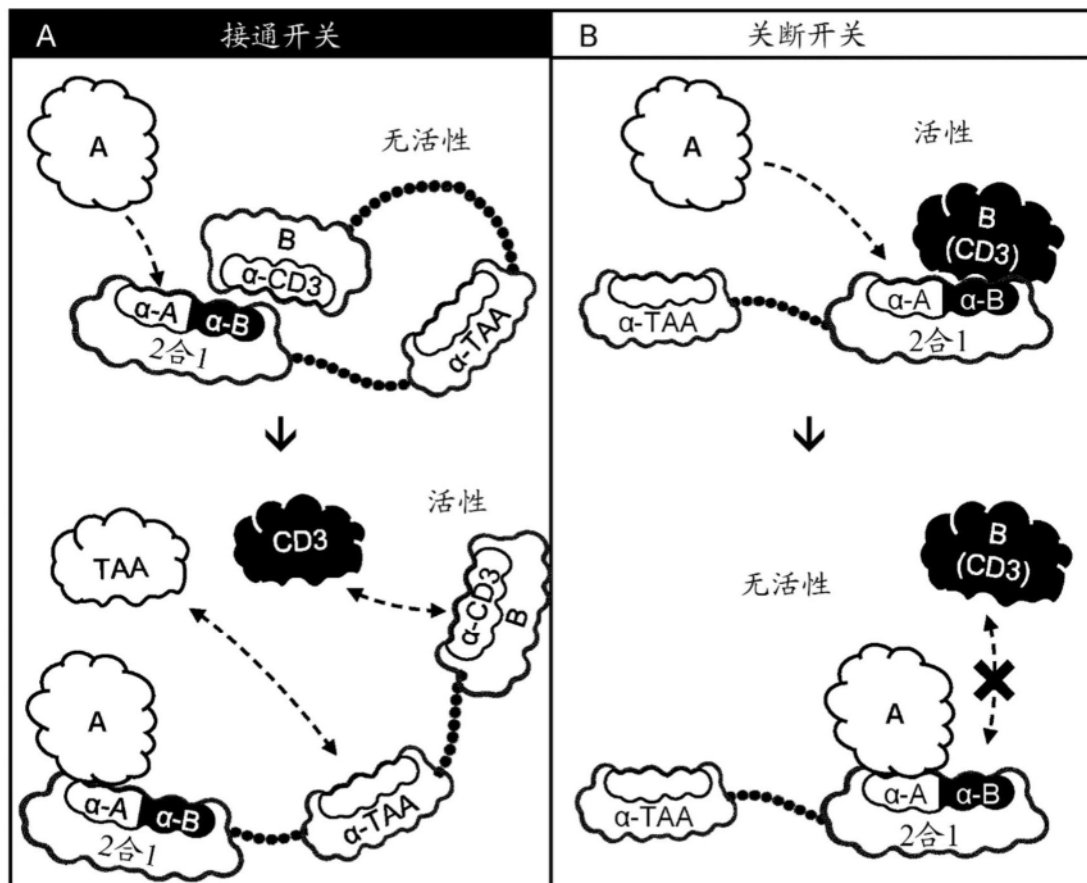


图4

N-封端 (N3C)

结构元件 重复序列编号 DARPin编号	α -螺旋 1															α -螺旋 2										环				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
NCAP																														
N2C VEGF结合物	D	L	D	K	K	L	L	E	A	A	R	A	G	Q	D	D	E	V	R	I	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C α -CD3 DARPin-阻断剂	D	L	G	K	K	L	L	Q	A	A	R	A	G	Q	L	D	E	V	R	E	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C 2合1 DARPin 11	D	L	D	K	K	L	L	E	A	A	R	A	G	Q	D	D	E	V	R	I	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C 2合1 DARPin 12	D	L	D	K	K	L	L	E	A	A	R	A	G	Q	D	D	E	V	R	I	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C 2合1 DARPin 13	D	L	D	K	K	L	L	E	A	A	R	A	G	Q	D	D	E	V	R	I	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C 2合1 DARPin 15	D	L	D	K	K	L	L	E	A	A	R	A	G	Q	D	D	E	V	R	I	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
N3C 2合1 DARPin 17	D	L	G	K	K	L	L	Q	A	A	R	A	G	Q	L	D	E	V	R	E	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A

重复序列1 (N3C)

结构元件 重复序列编号 DARPin编号	β -转角								α -螺旋_1							α -螺旋_2								环									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
重复序列1																																	
VEGF结合物	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
α -CD3 DARPin阻断剂	K	D	A	K	G	L	T	P	L	H	L	A	A	Y	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
2合1 DARPin 11	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
2合1 DARPin 12	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
2合1 DARPin 13	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
2合1 DARPin 15	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A
2合1 DARPin 17	K	D	S	T	G	W	T	P	L	H	L	A	A	P	W	G	H	P	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A

重复序列2 (N3C)

结构元件 重复序列编号 DARPin编号	β -转角															α -螺旋 1										α -螺旋 2										环				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33							
	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96							
重复序列2																																								
VEGF结合物	K	D	F	Q	G	W	T	P	L	H	L	A	A	A	A	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
α -CD3 DARPin-阻断剂	K	D	V	Y	G	W	T	P	L	H	I	A	A	A	S	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 11	K	D	V	Y	G	W	T	P	L	H	I	A	A	A	S	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 12	K	D	V	Y	G	W	T	P	L	H	I	A	A	A	S	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 13	K	D	F	Y	G	W	T	P	L	H	L	A	A	A	A	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 15	K	D	F	Q	G	W	T	P	L	H	L	A	A	A	A	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 17	K	D	F	Q	G	W	T	P	L	H	L	A	A	A	A	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							

重复序列3 (N3C)

结构元件 重复序列编号 DARPin编号	β -转角															α -螺旋_1										α -螺旋_2										环				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33							
	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129							
重复序列3																																								
VEGF结合物	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	D	A	G	H	E	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A												
α -CD3 DARPin-阻断剂	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 11	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 12	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 13	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 15	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							
2合1 DARPin 17	K	D	W	L	G	W	T	P	L	H	L	A	A	S	H	G	H	L	E	I	V	E	V	L	L	K	A	G	A	D	V	N	A							

C-封端 (N3C)

结构元件 重复序列编号 DARPin编号	β -转角								α -螺旋 1							α -螺旋 2													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	
CCAP																													
VEGF结合物	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
α -CD3 DARPin-阻断剂	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
2合1 DARPin 11	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
2合1 DARPin 12	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
2合1 DARPin 13	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
2合1 DARPin 15	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	
2合1 DARPin 17	Q	D	K	S	G	K	T	P	A	D	L	A	A	R	A	G	H	Q	D	I	A	E	V	L	Q	K	A	A	

☒ 共有残基☒ VEGF-结合物残基☒ α -CD3 DARPin-阻断剂残基

图5A

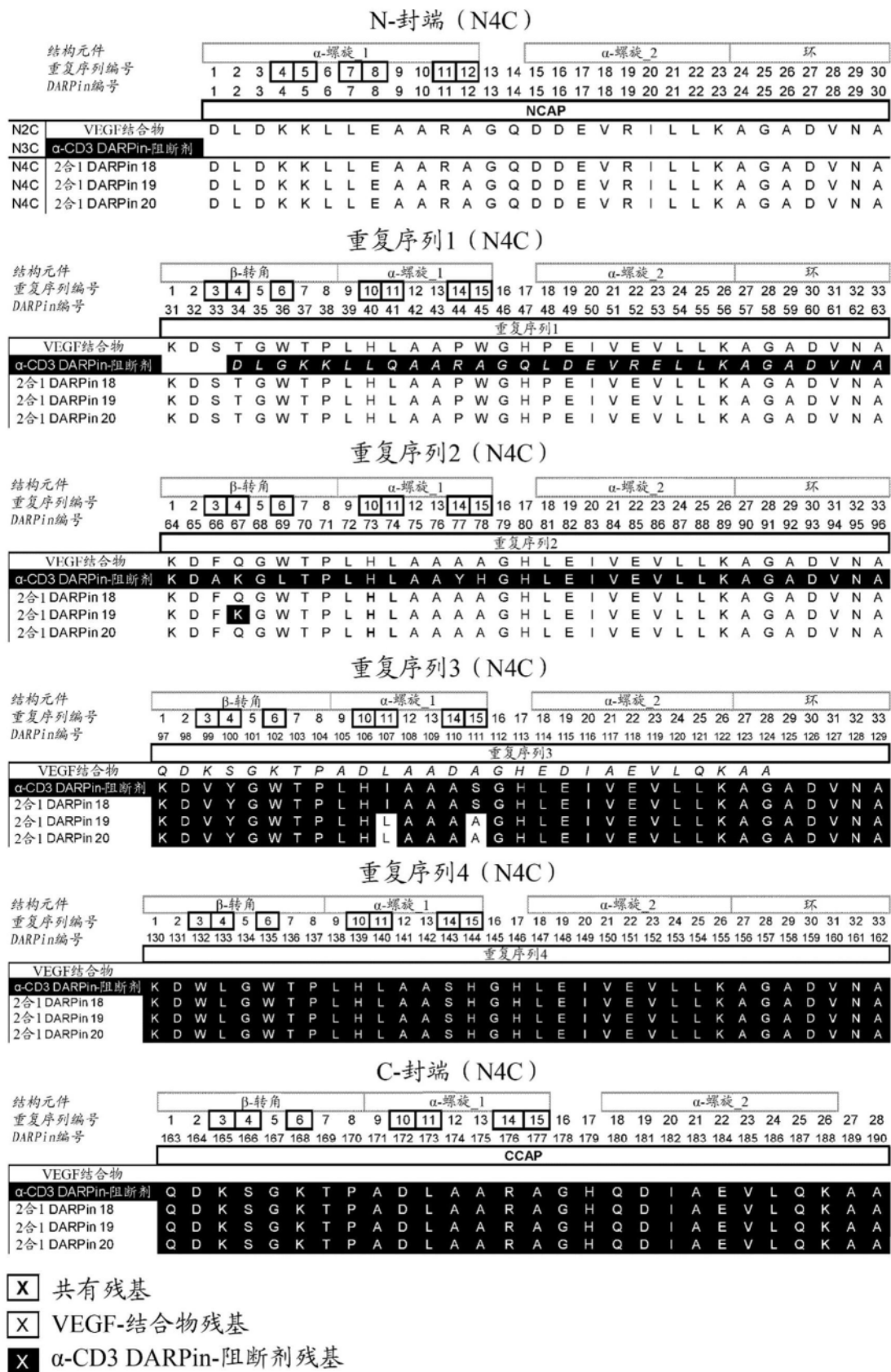


图5B

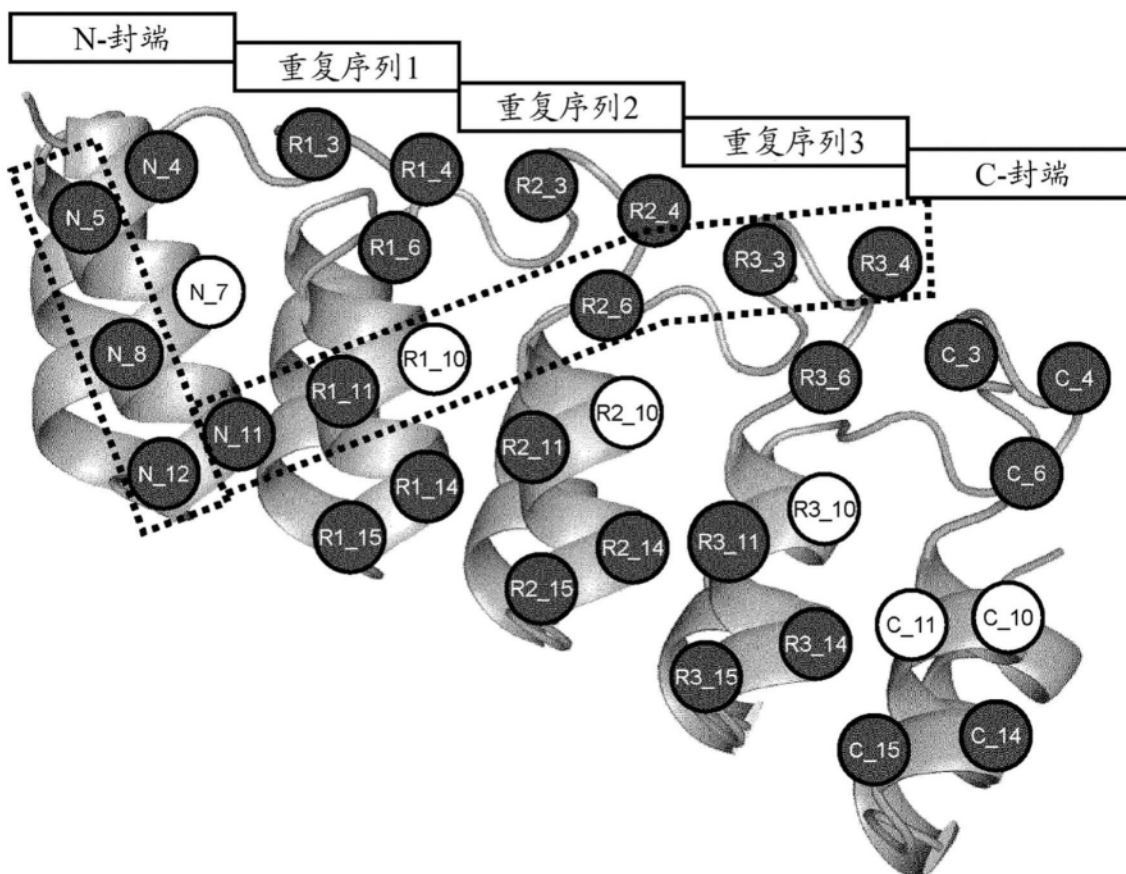


图5C

N-封端		重复序列1		重复序列2		重复序列3		C-封端	
N_5	N_4	R1_3	R1_4						
N_8	N_7		R1_6	R2_3	R2_4				
N_12	N_11	R1_11	R1_10		R2_6	R3_3	R3_4		
		R1_15	R1_14	R2_11	R2_10		R3_6	C_3	C_4
				R2_15	R2_14	R3_11	R3_10		C_6
						R3_15	R3_14	C_11	C_10
								C_15	C_14
N3C									

图例 (5C和5D)



骨架残基的位置



(潜在) 靶标相互作用残基的位置

图5D

名称	2D互补位图示																																								
VEGF结合物	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F Q</td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>K</td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>A D</td></tr></table> VEGF-结合物	N-封端	重复序列1	重复序列2	C-封端	K K	S T			E L	W	F Q		A R	L H	W	K S		W P	L H	K			A A	L D				A D												
N-封端	重复序列1	重复序列2	C-封端																																						
K K	S T																																								
E L	W	F Q																																							
A R	L H	W	K S																																						
	W P	L H	K																																						
		A A	L D																																						
			A D																																						
α -CD3 DARPin- 阻断剂	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>A K</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Q L</td><td>L</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td>H Y</td><td>I H</td><td>W</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td>S A</td><td>L H</td><td>K</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> α-CD3 DARPin-阻断剂	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	A K				Q L	L	V Y			A R	L H	W	W L			H Y	I H	W	K S			S A	L H	K				H S	L D					A R
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																					
K K	A K																																								
Q L	L	V Y																																							
A R	L H	W	W L																																						
	H Y	I H	W	K S																																					
		S A	L H	K																																					
			H S	L D																																					
				A R																																					
2合1DARPin 11	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>I H</td><td>W</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td>S A</td><td>L H</td><td>K</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> VEGF-结合物 α-CD3 DARPin-阻断剂	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	S T				E L	W	V Y			A R	L H	W	W L			W P	I H	W	K S			S A	L H	K				H S	L D					A R
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																					
K K	S T																																								
E L	W	V Y																																							
A R	L H	W	W L																																						
	W P	I H	W	K S																																					
		S A	L H	K																																					
			H S	L D																																					
				A R																																					
2合1DARPin 12	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>W</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>L H</td><td>K</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> VEGF-结合物 混合 α-CD3 DARPin-阻断剂	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	S T				E L	W	V Y			A R	L H	W	W L			W P	L H	W	K S			A A	L H	K				H S	L D					A R
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																					
K K	S T																																								
E L	W	V Y																																							
A R	L H	W	W L																																						
	W P	L H	W	K S																																					
		A A	L H	K																																					
			H S	L D																																					
				A R																																					
2合1DARPin 13	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>W</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>L H</td><td>K</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> VEGF-结合物 混合 α-CD3 DARPin-阻断剂	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	S T				E L	W	F Y			A R	L H	W	W L			W P	L H	W	K S			A A	L H	K				H S	L D					A R
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																					
K K	S T																																								
E L	W	F Y																																							
A R	L H	W	W L																																						
	W P	L H	W	K S																																					
		A A	L H	K																																					
			H S	L D																																					
				A R																																					

图5E

名称	2D互补位图示																																																			
2合1DARPin 15	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F Q</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>L H</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> <table><tr><td>VEGF-结合物</td><td>α-CD3 DARPin-阻断剂</td></tr></table>	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	S T				E L	W	F Q			A R	L H	W L				W P	L H	W L				A A	L H	K S				H S	L D					A R	VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂									
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																																
K K	S T																																																			
E L	W	F Q																																																		
A R	L H	W L																																																		
	W P	L H	W L																																																	
		A A	L H	K S																																																
			H S	L D																																																
				A R																																																
VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂																																																			
2合1DARPin 17	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Q L</td><td>W</td><td>F Q</td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>L H</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> <table><tr><td>混合</td><td>VEGF-结合物</td><td>α-CD3 DARPin-阻断剂</td></tr></table>	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端	K K	S T				Q L	W	F Q			A R	L H	W L				W P	L H	W L				A A	L H	K S				H S	L D					A R	混合	VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂								
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	C-封端																																																
K K	S T																																																			
Q L	W	F Q																																																		
A R	L H	W L																																																		
	W P	L H	W L																																																	
		A A	L H	K S																																																
			H S	L D																																																
				A R																																																
混合	VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂																																																		
2合1DARPin 18	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>重复序列4</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F Q</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W L</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>I H</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>S A</td><td>L H</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> <table><tr><td>VEGF-结合物</td><td>α-CD3 DARPin-阻断剂</td></tr></table>	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端	K K	S T					E L	W	F Q				A R	L H	W L	V Y				W P	L H	I H	W L				A A	S A	L H	K S					H S	L D						A R	VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂	
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端																																															
K K	S T																																																			
E L	W	F Q																																																		
A R	L H	W L	V Y																																																	
	W P	L H	I H	W L																																																
		A A	S A	L H	K S																																															
				H S	L D																																															
					A R																																															
VEGF-结合物	α-CD3 DARPin-阻断剂																																																			
2合1DARPin 19	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>重复序列4</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F K</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W L</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>A A</td><td>L H</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> <table><tr><td>VEGF-结合物</td><td>混合</td><td>α-CD3 DARPin-阻断剂</td></tr></table>	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端	K K	S T					E L	W	F K				A R	L H	W L	V Y				W P	L H	L H	W L				A A	A A	L H	K S					H S	L D						A R	VEGF-结合物	混合	α-CD3 DARPin-阻断剂
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端																																															
K K	S T																																																			
E L	W	F K																																																		
A R	L H	W L	V Y																																																	
	W P	L H	L H	W L																																																
		A A	A A	L H	K S																																															
				H S	L D																																															
					A R																																															
VEGF-结合物	混合	α-CD3 DARPin-阻断剂																																																		
2合1DARPin 20	<table><tr><th>N-封端</th><th>重复序列1</th><th>重复序列2</th><th>重复序列3</th><th>重复序列4</th><th>C-封端</th></tr><tr><td>K K</td><td>S T</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E L</td><td>W</td><td>F Q</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>A R</td><td>L H</td><td>W L</td><td>V Y</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>W P</td><td>L H</td><td>L H</td><td>W L</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td>A A</td><td>A A</td><td>L H</td><td>K S</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>H S</td><td>L D</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A R</td></tr></table> <table><tr><td>VEGF-结合物</td><td>混合</td><td>α-CD3 DARPin-阻断剂</td></tr></table>	N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端	K K	S T					E L	W	F Q				A R	L H	W L	V Y				W P	L H	L H	W L				A A	A A	L H	K S					H S	L D						A R	VEGF-结合物	混合	α-CD3 DARPin-阻断剂
N-封端	重复序列1	重复序列2	重复序列3	重复序列4	C-封端																																															
K K	S T																																																			
E L	W	F Q																																																		
A R	L H	W L	V Y																																																	
	W P	L H	L H	W L																																																
		A A	A A	L H	K S																																															
				H S	L D																																															
					A R																																															
VEGF-结合物	混合	α-CD3 DARPin-阻断剂																																																		

- ☒ 共有残基
- ☒ VEGF结合物衍生残基
- ☒ α-CD3 DARPin-阻断剂衍生残基

图5E(续)

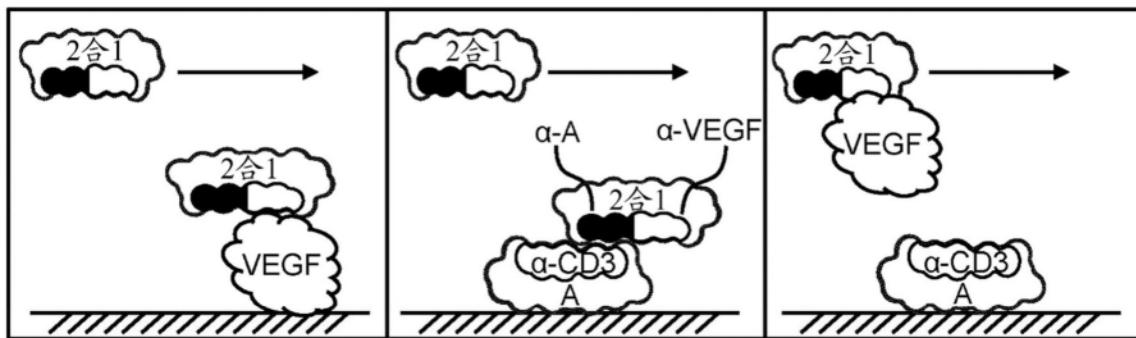


图6A

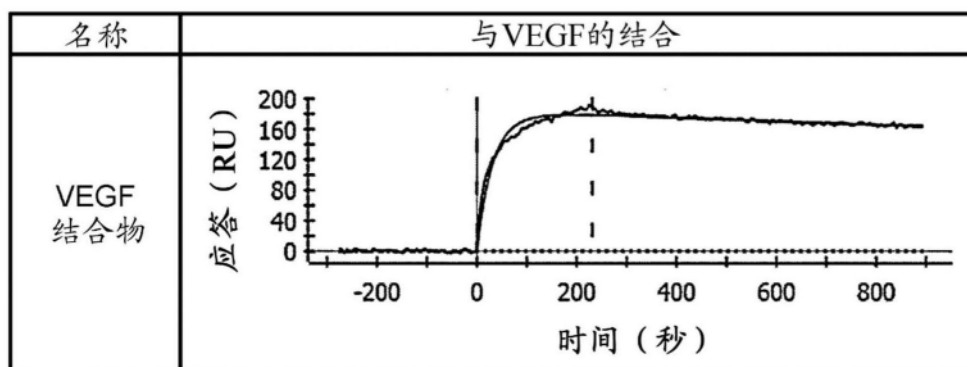


图6B

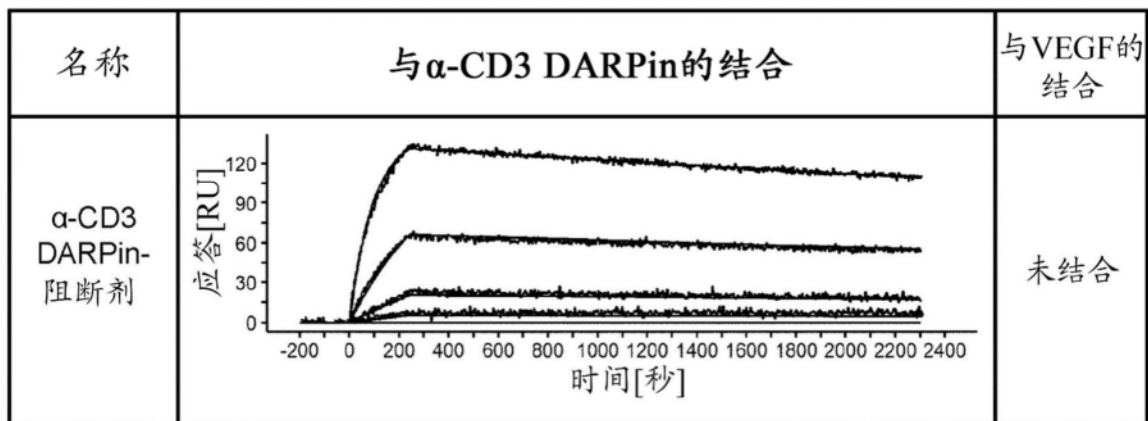


图6C

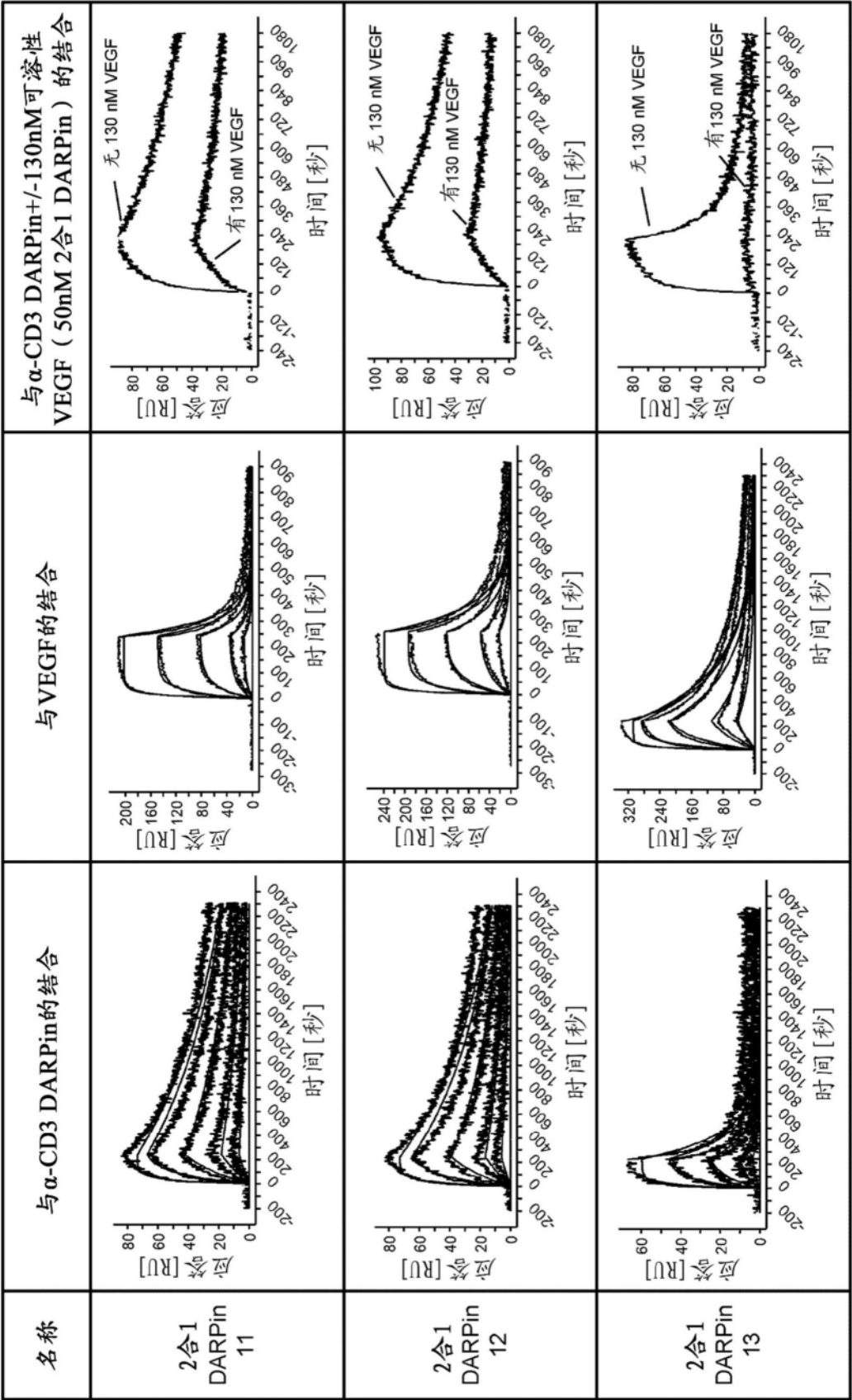


图6D

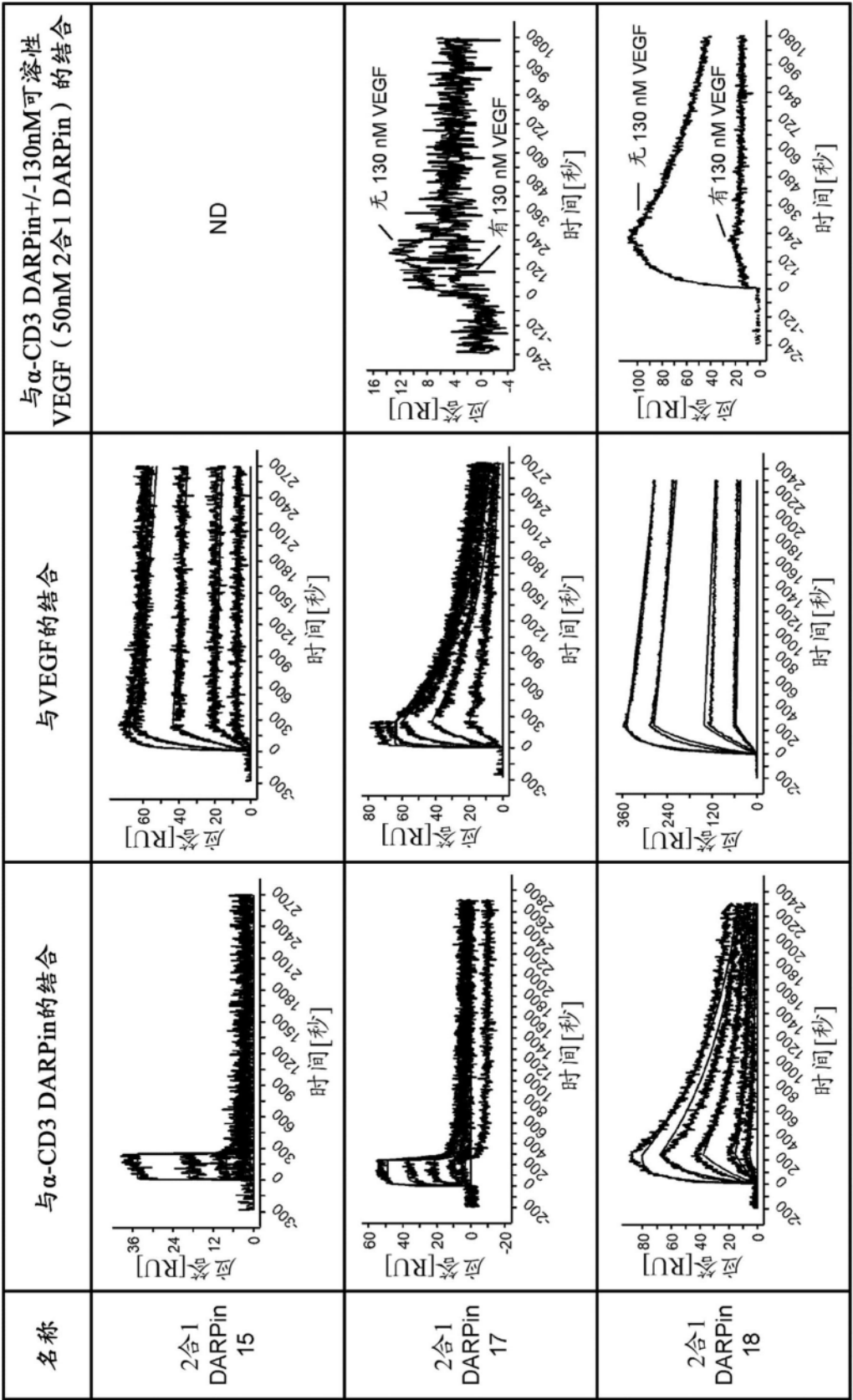


图6D(续)

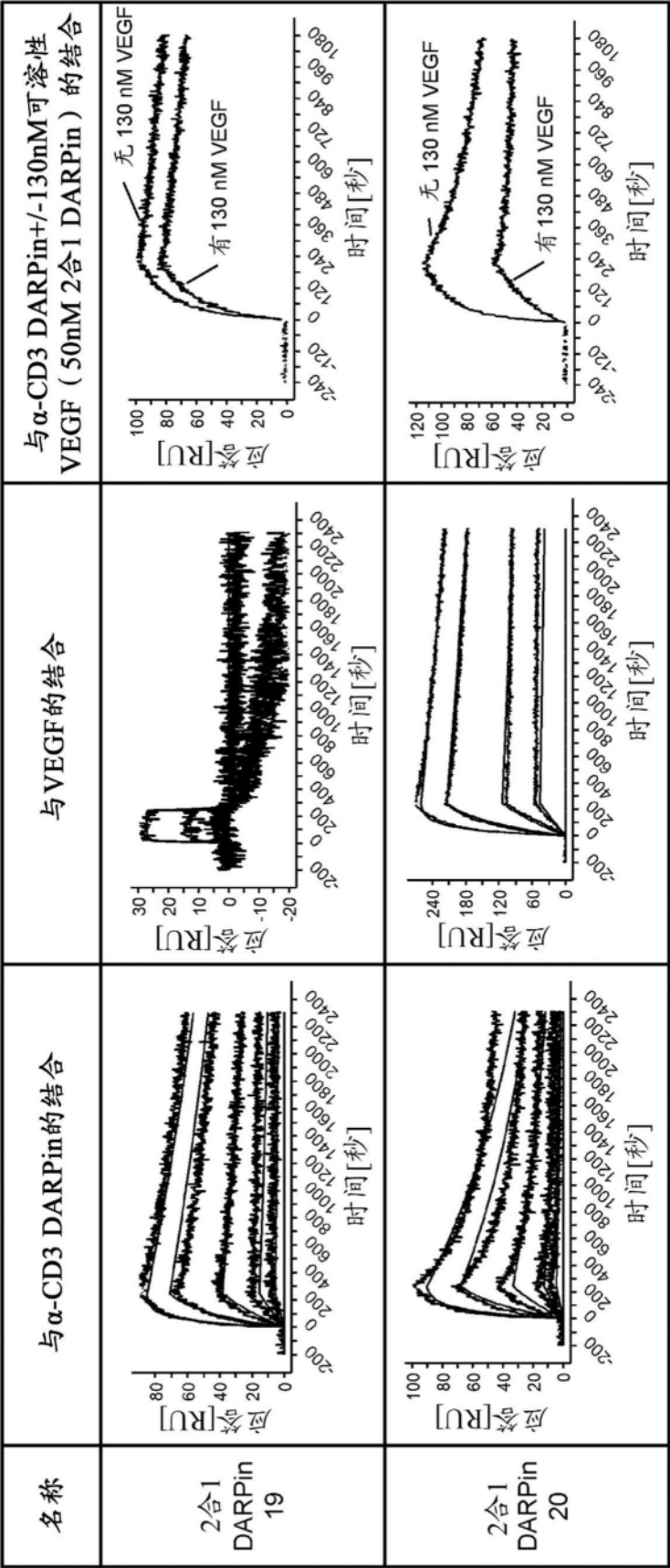
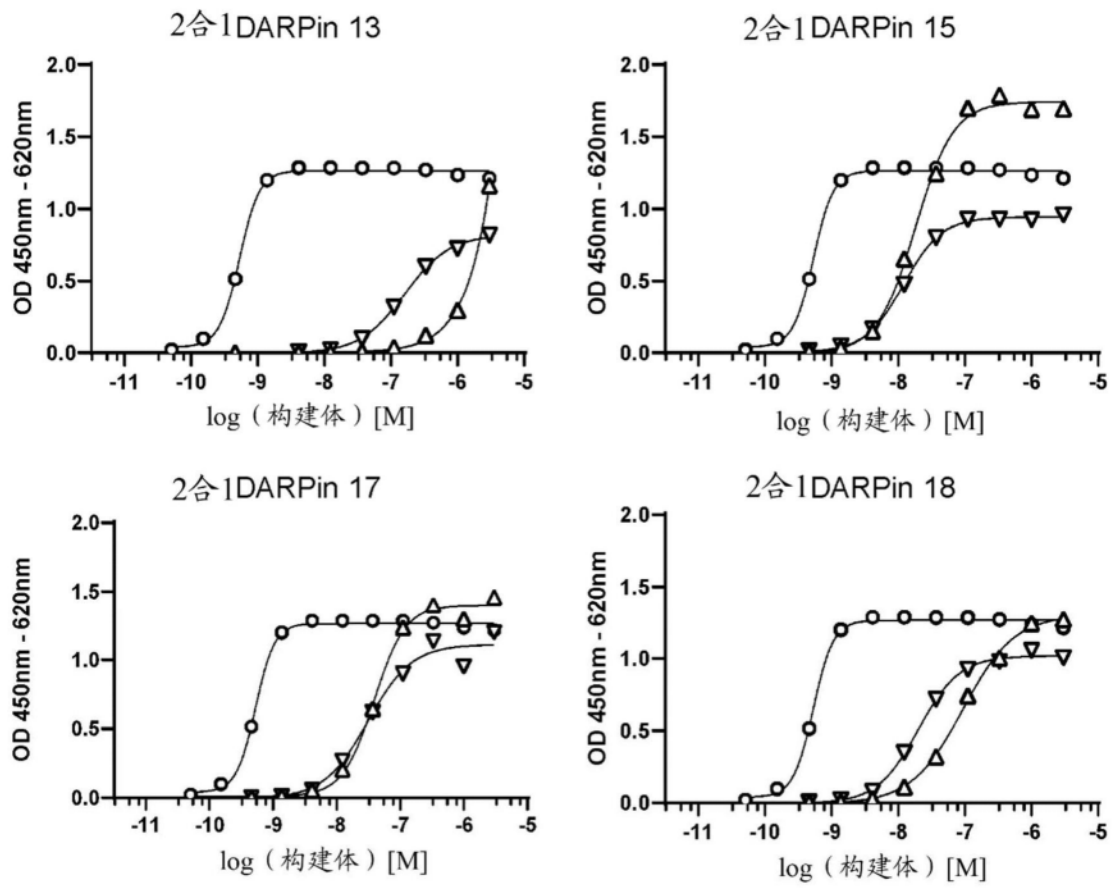


图6D(续)



图例:

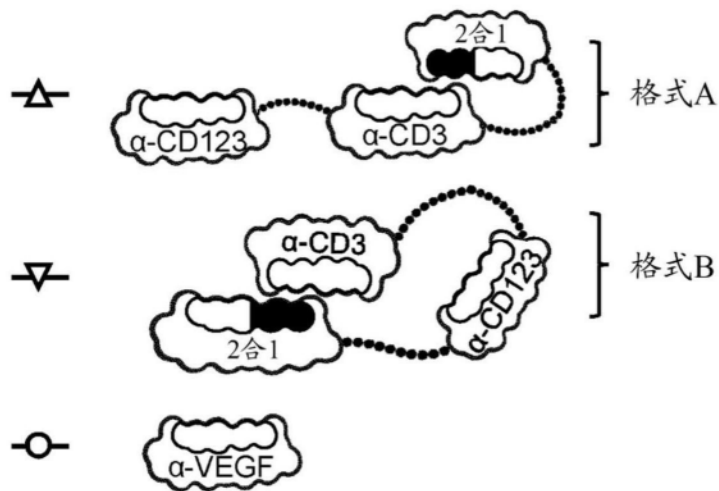
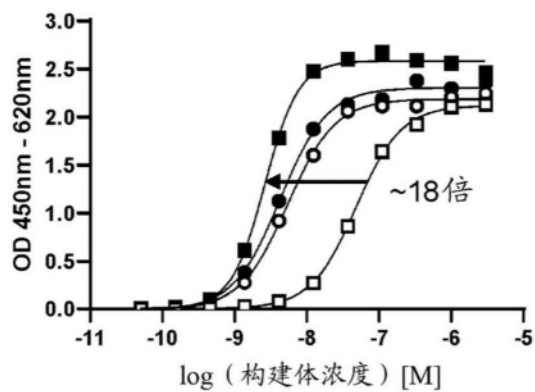
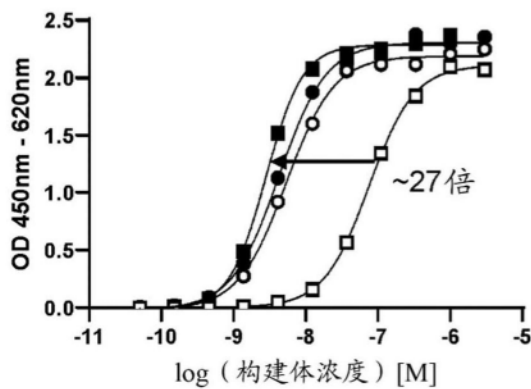


图7

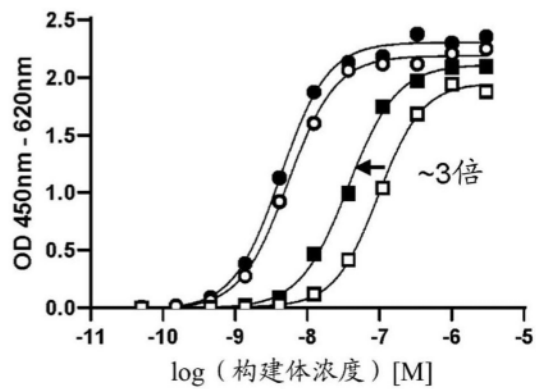
开关药物 DARPin 15-1



开关药物 DARPin 17-1



开关药物 DARPin 18-1



图例:

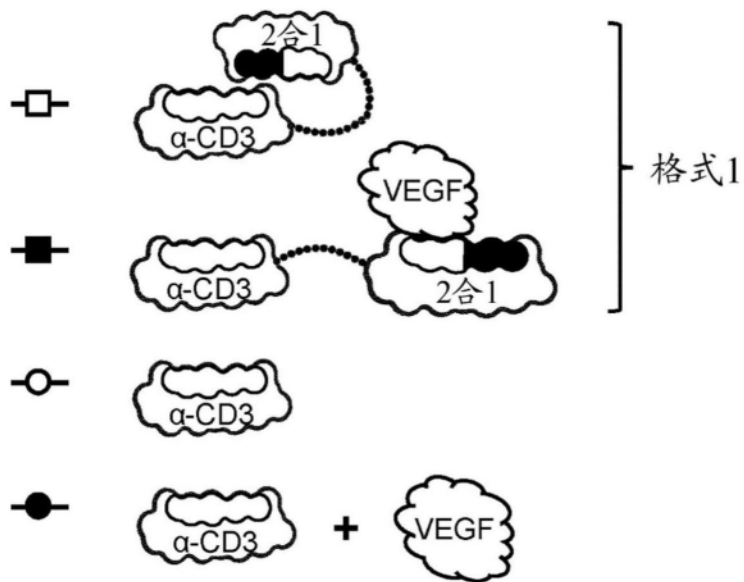
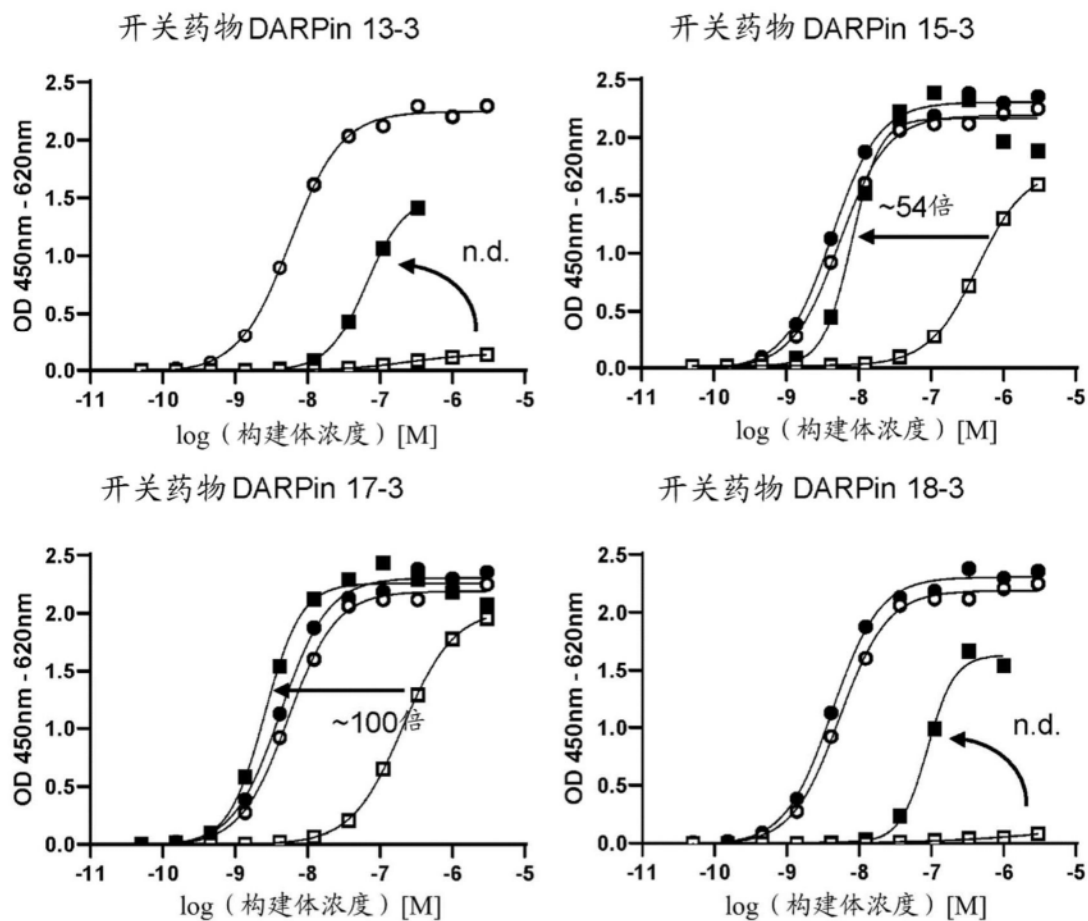


图8A



图例:

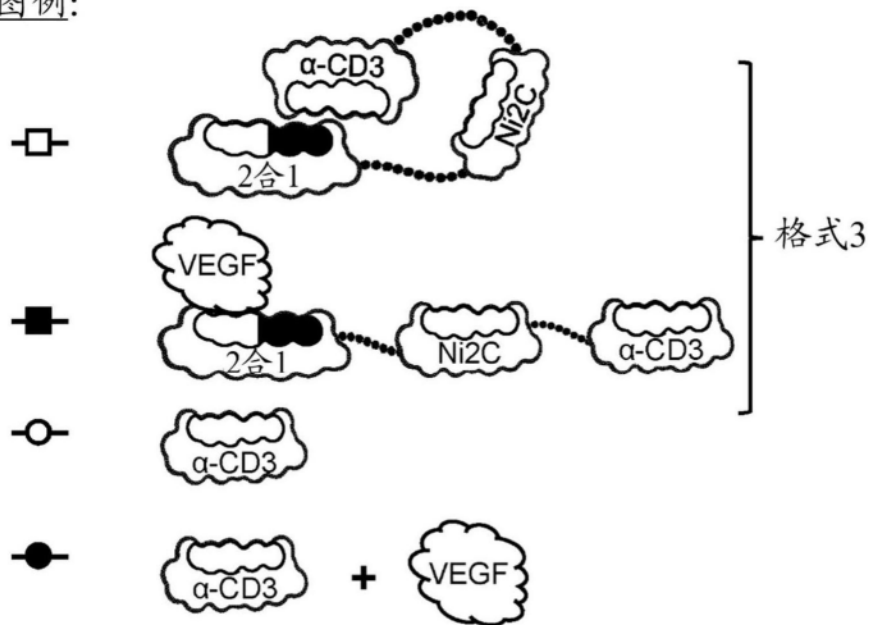
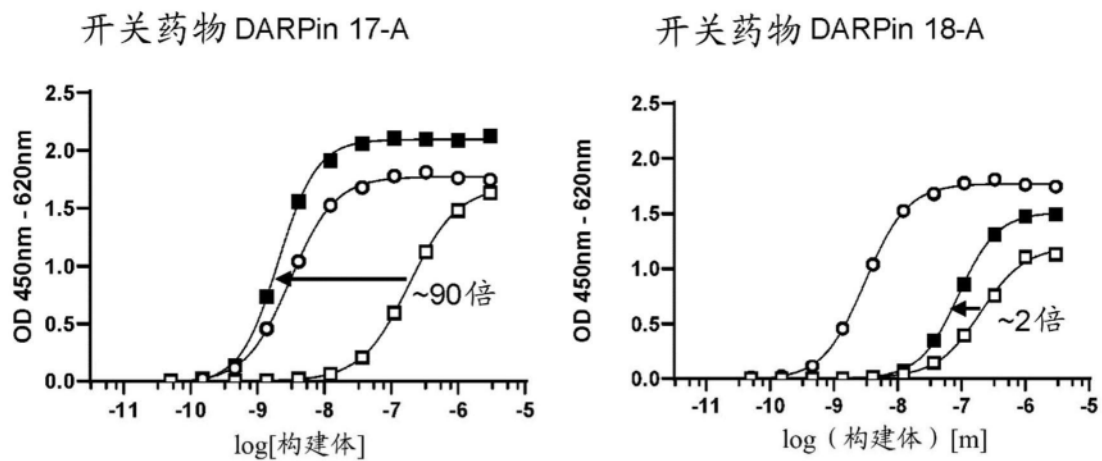


图8B



图例:

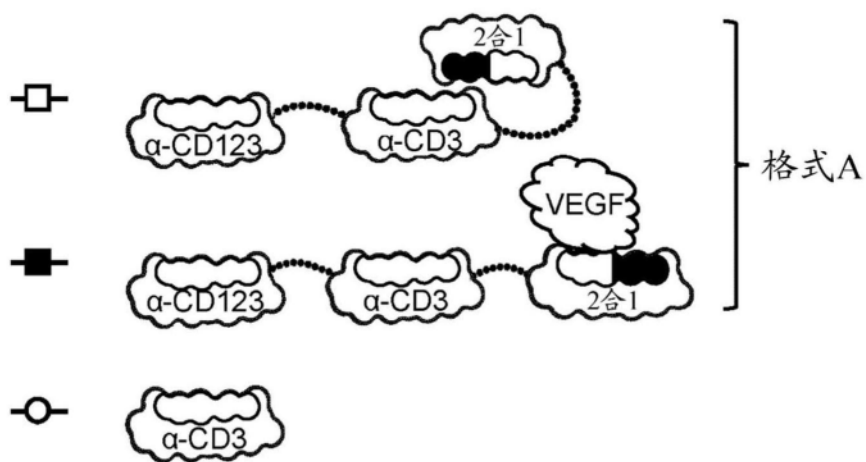
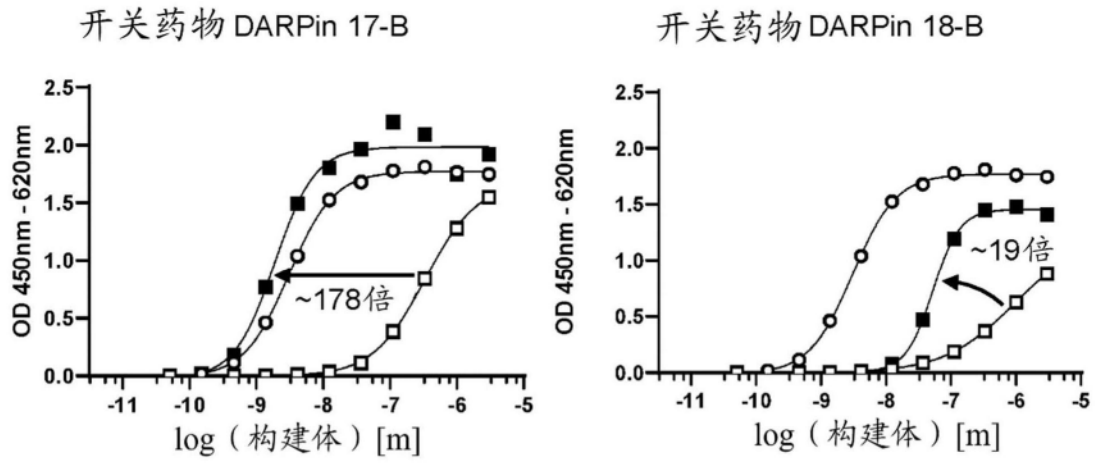


图8C



图例:

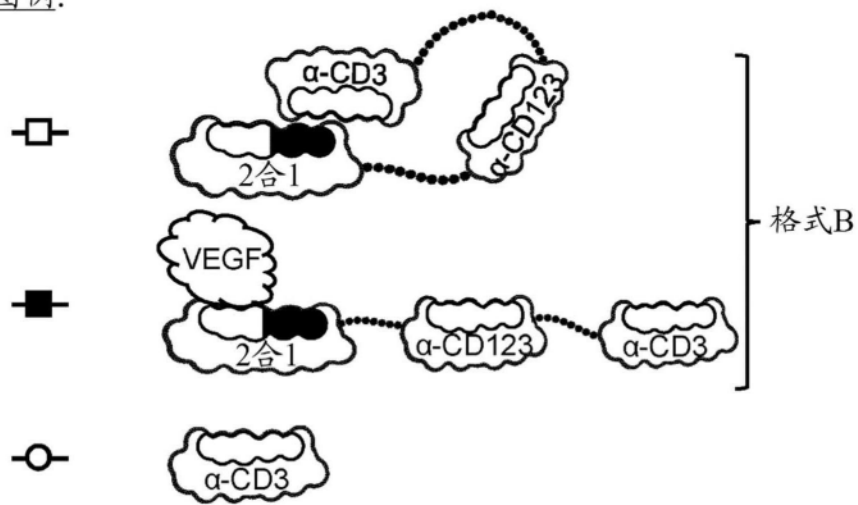
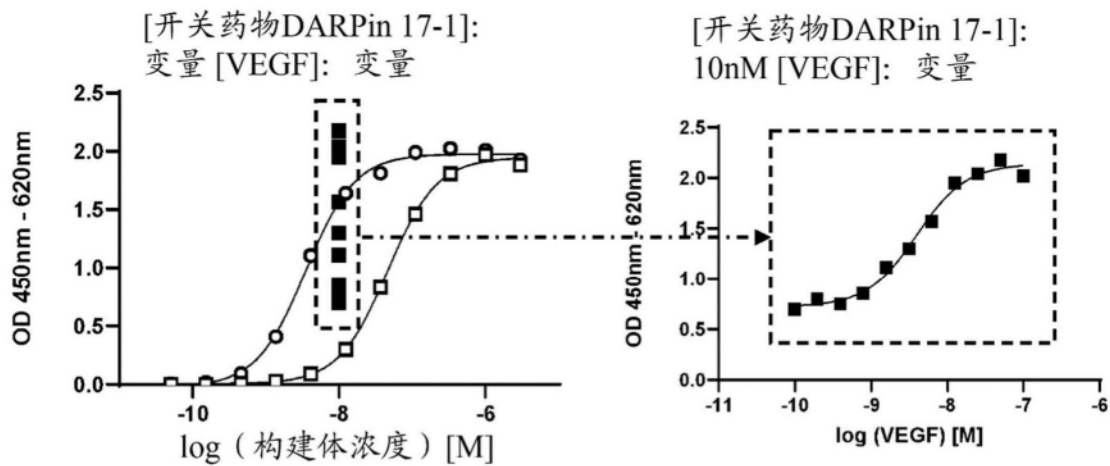


图8D



图例:

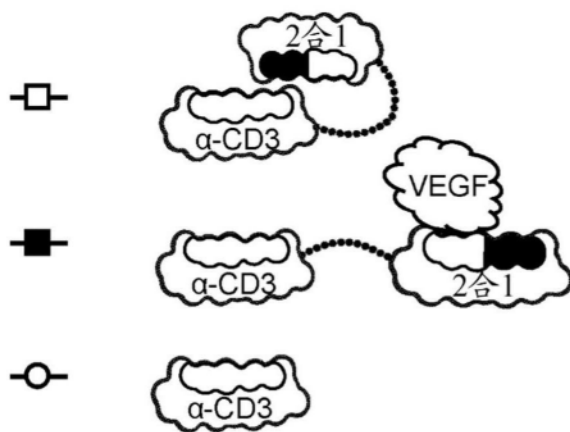


图9A

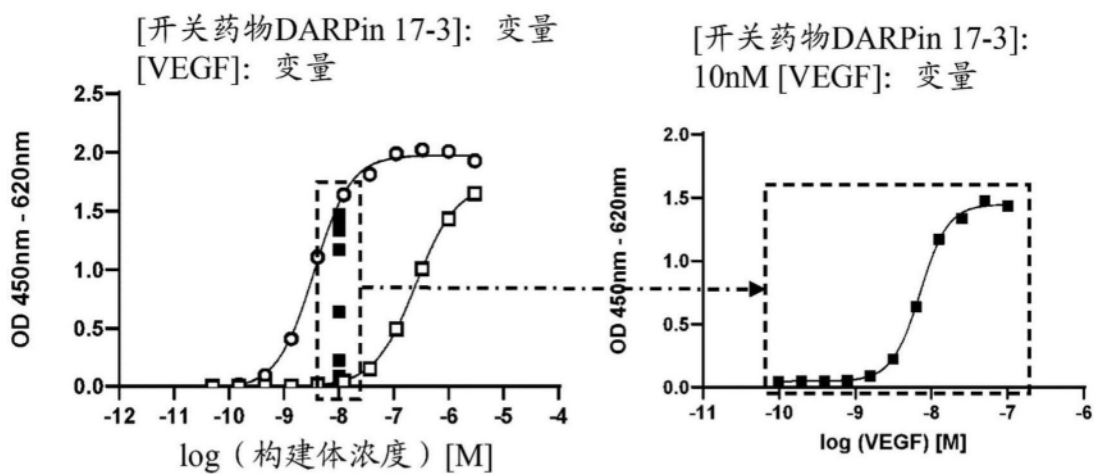
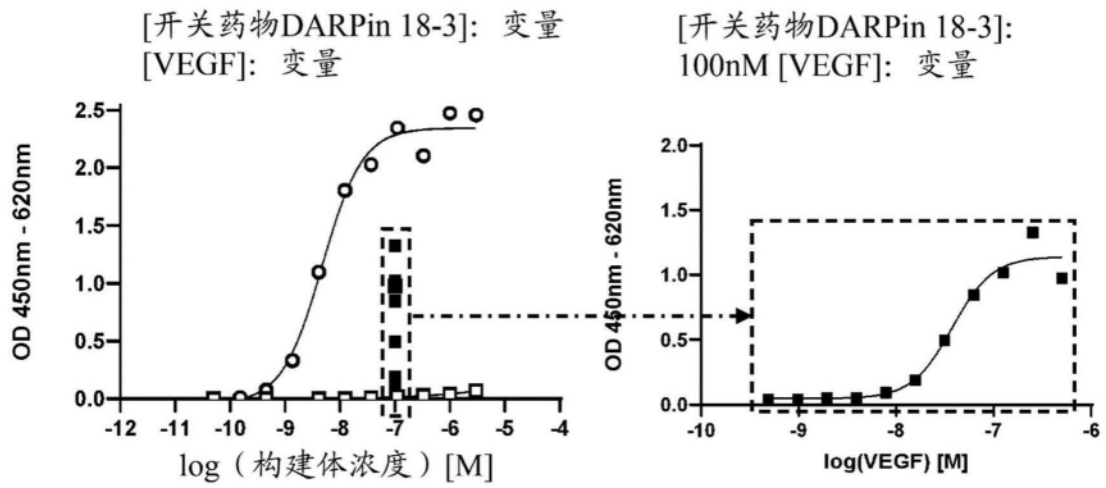


图9B



图例 (9B和9C) :

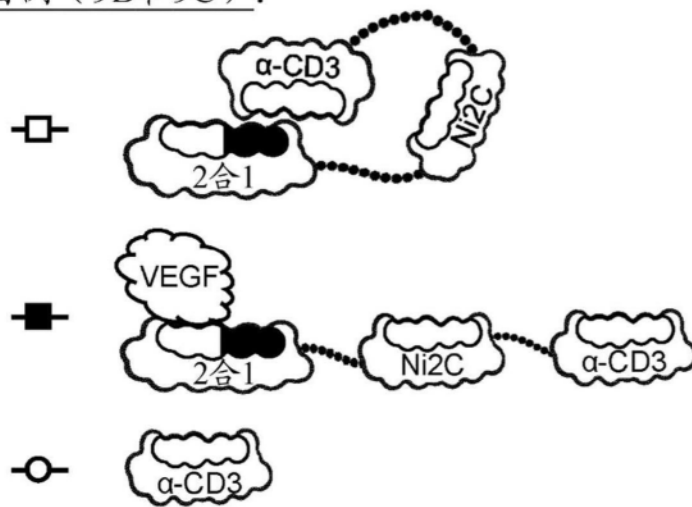


图9C

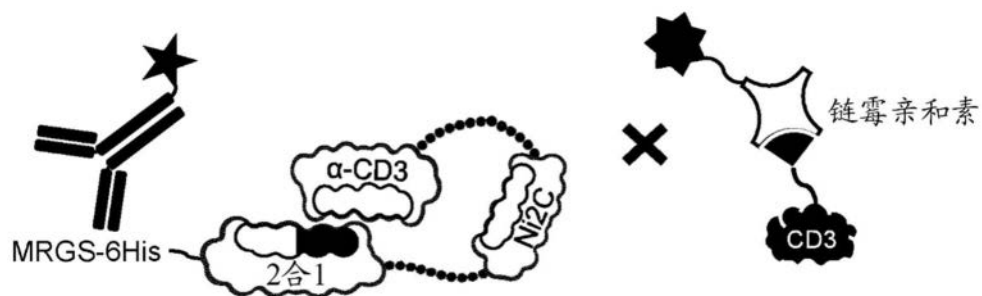


图10A

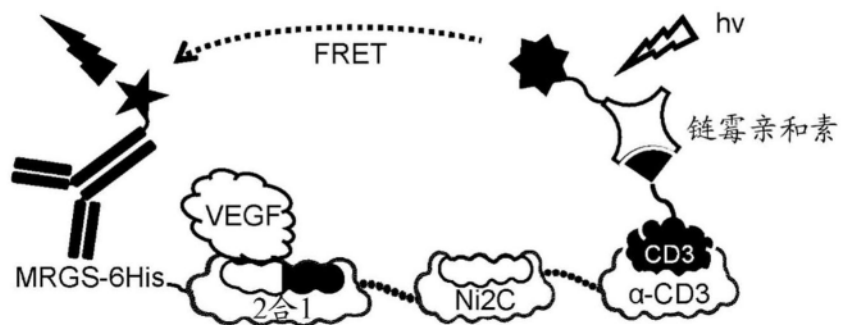


图10B

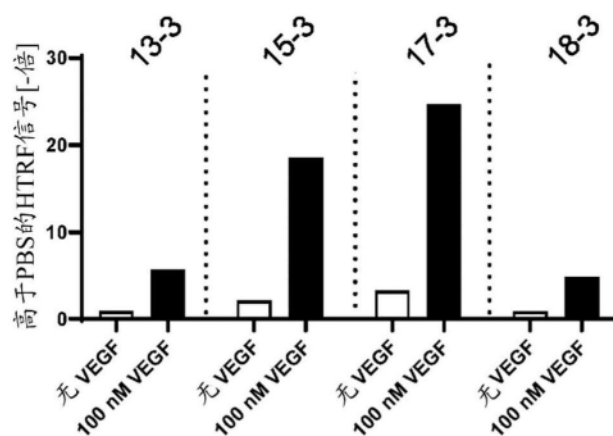


图10C

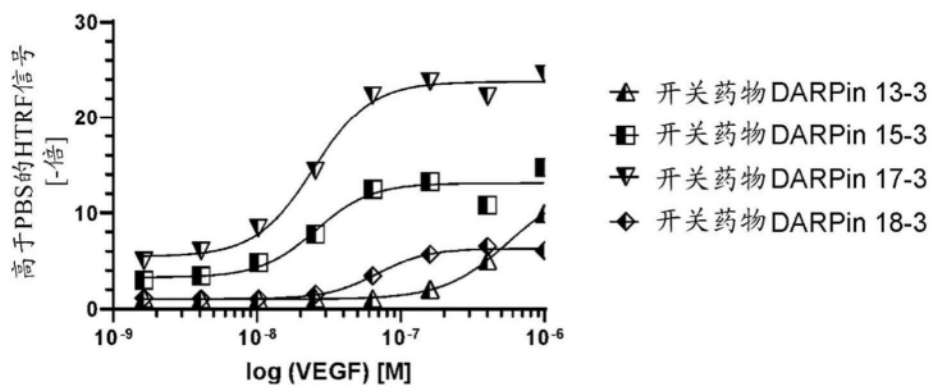
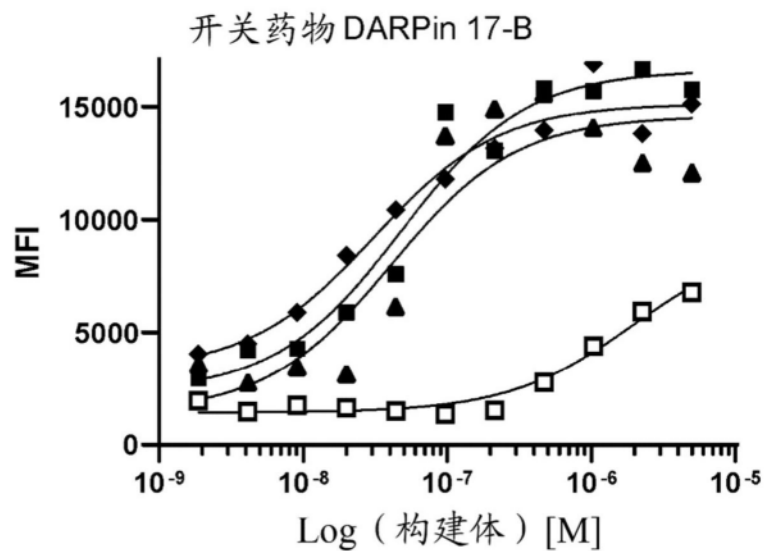


图10D



图例

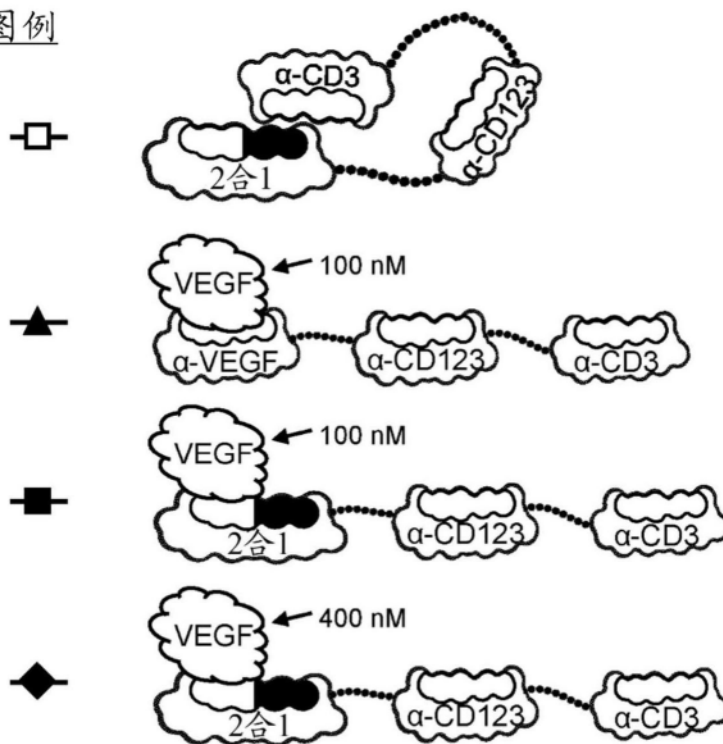


图11

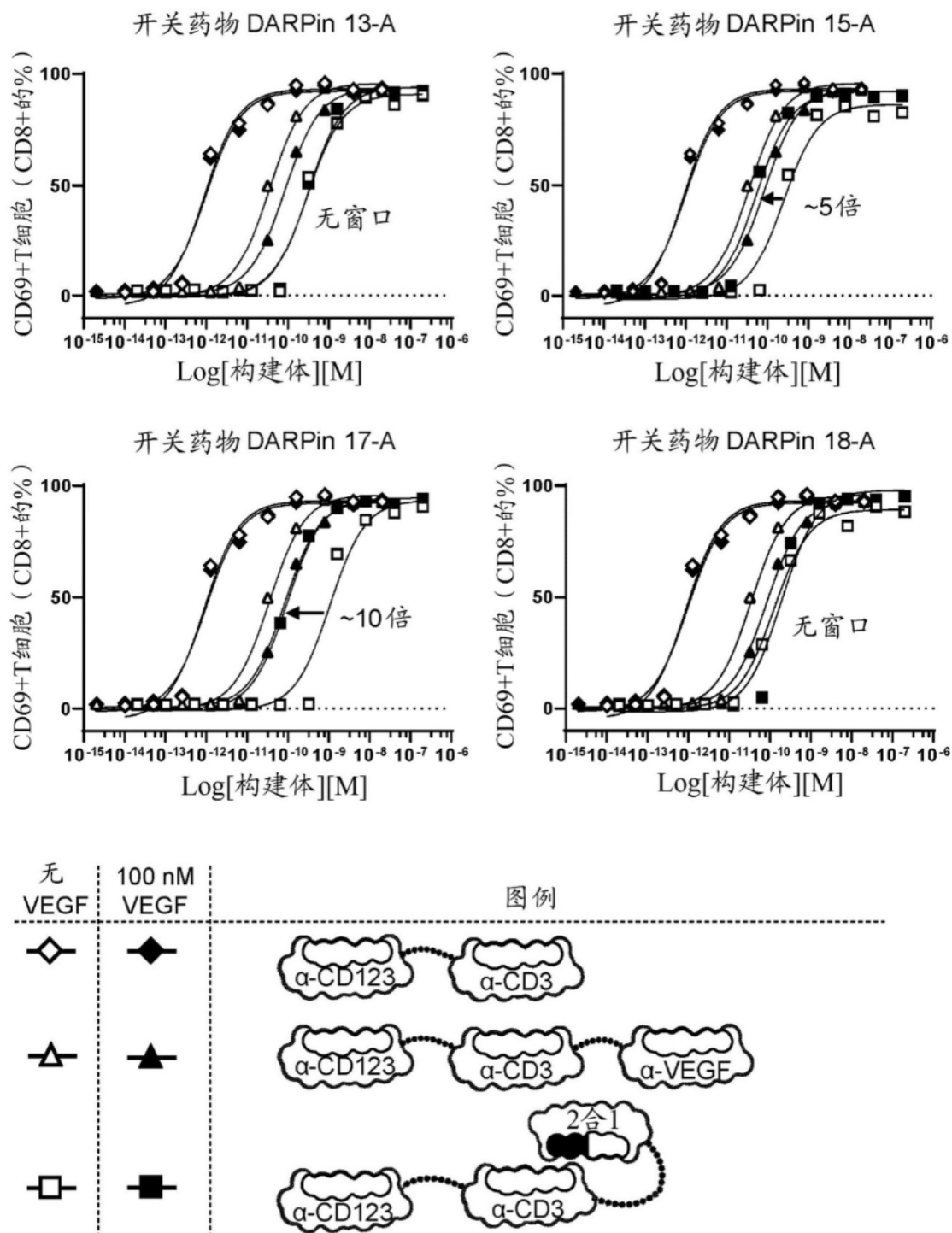


图12A

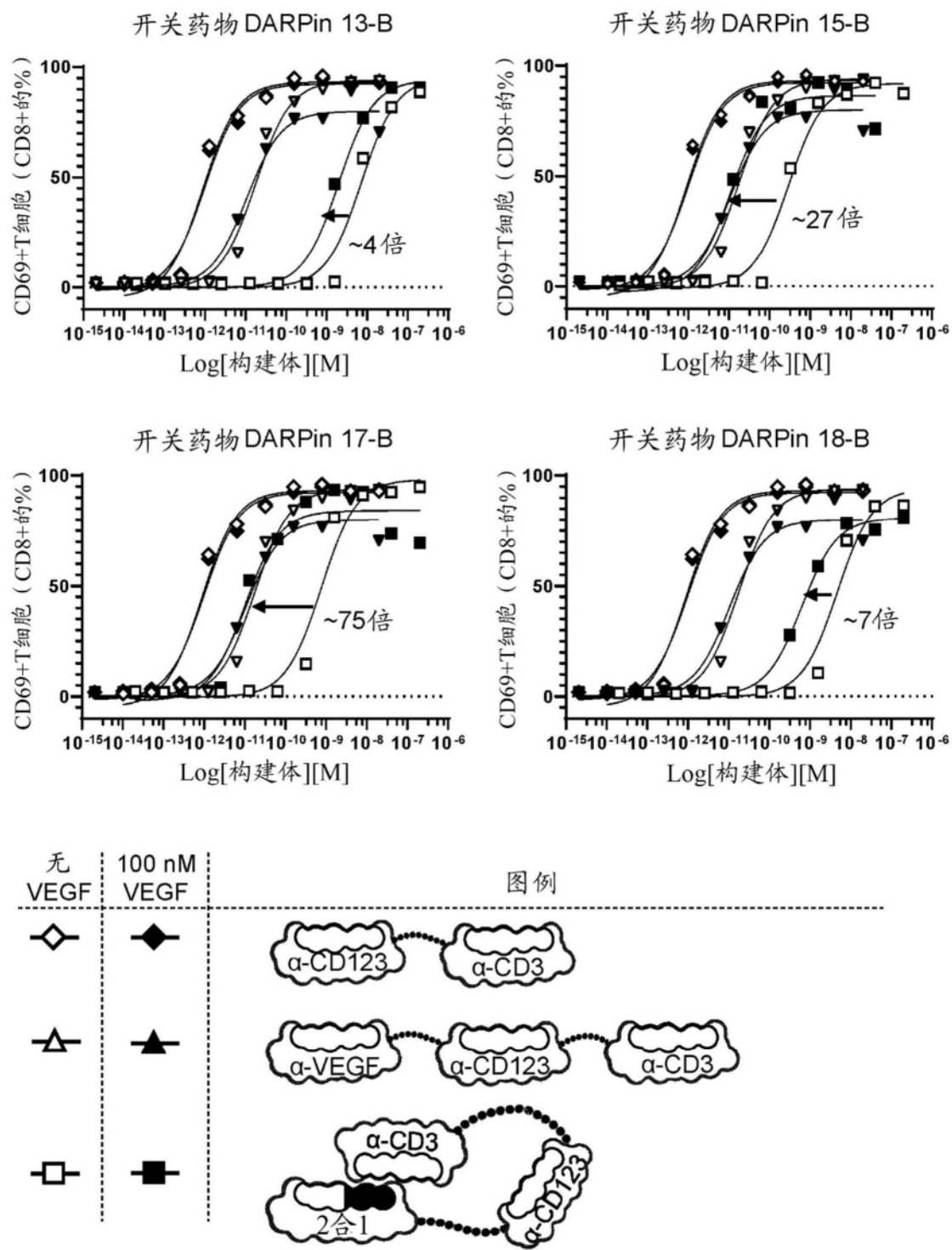


图12B

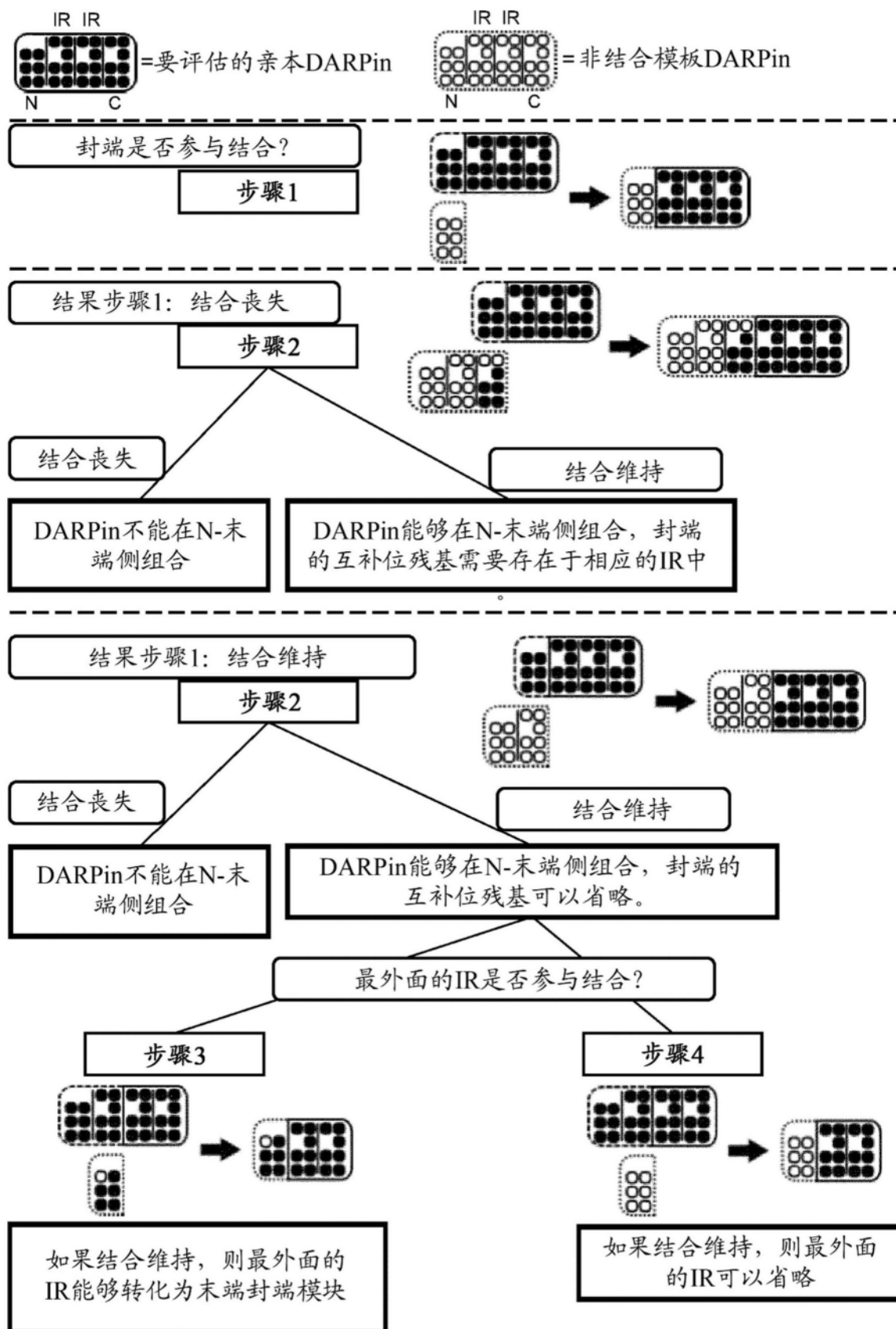


图13

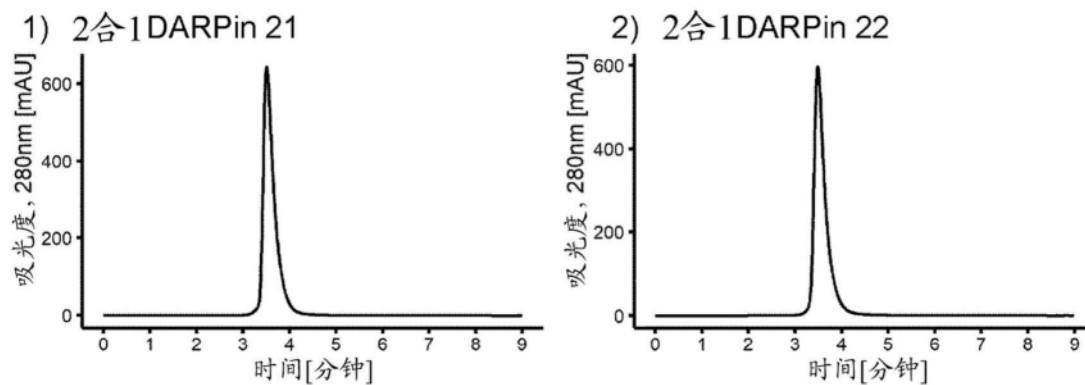


图14A

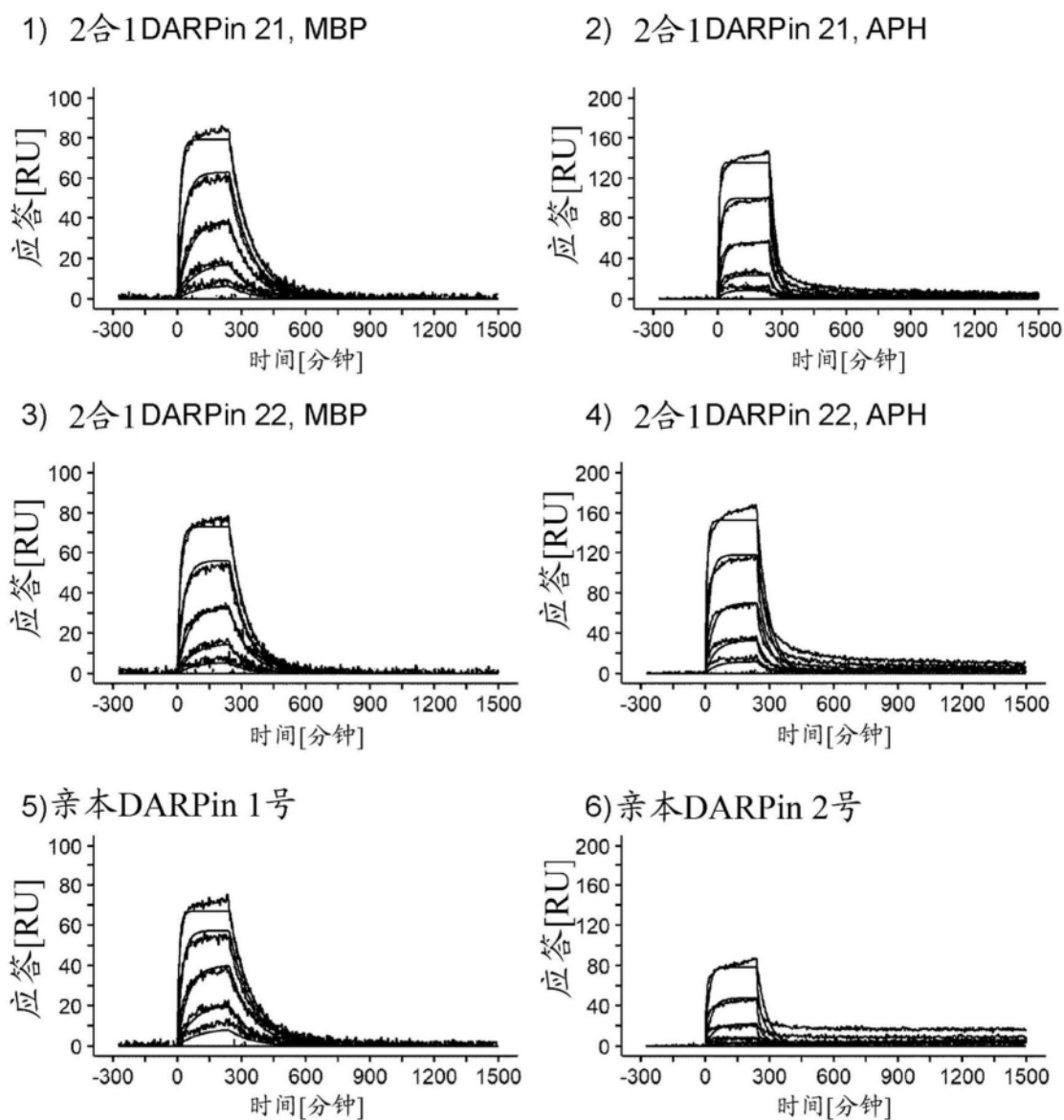


图14B

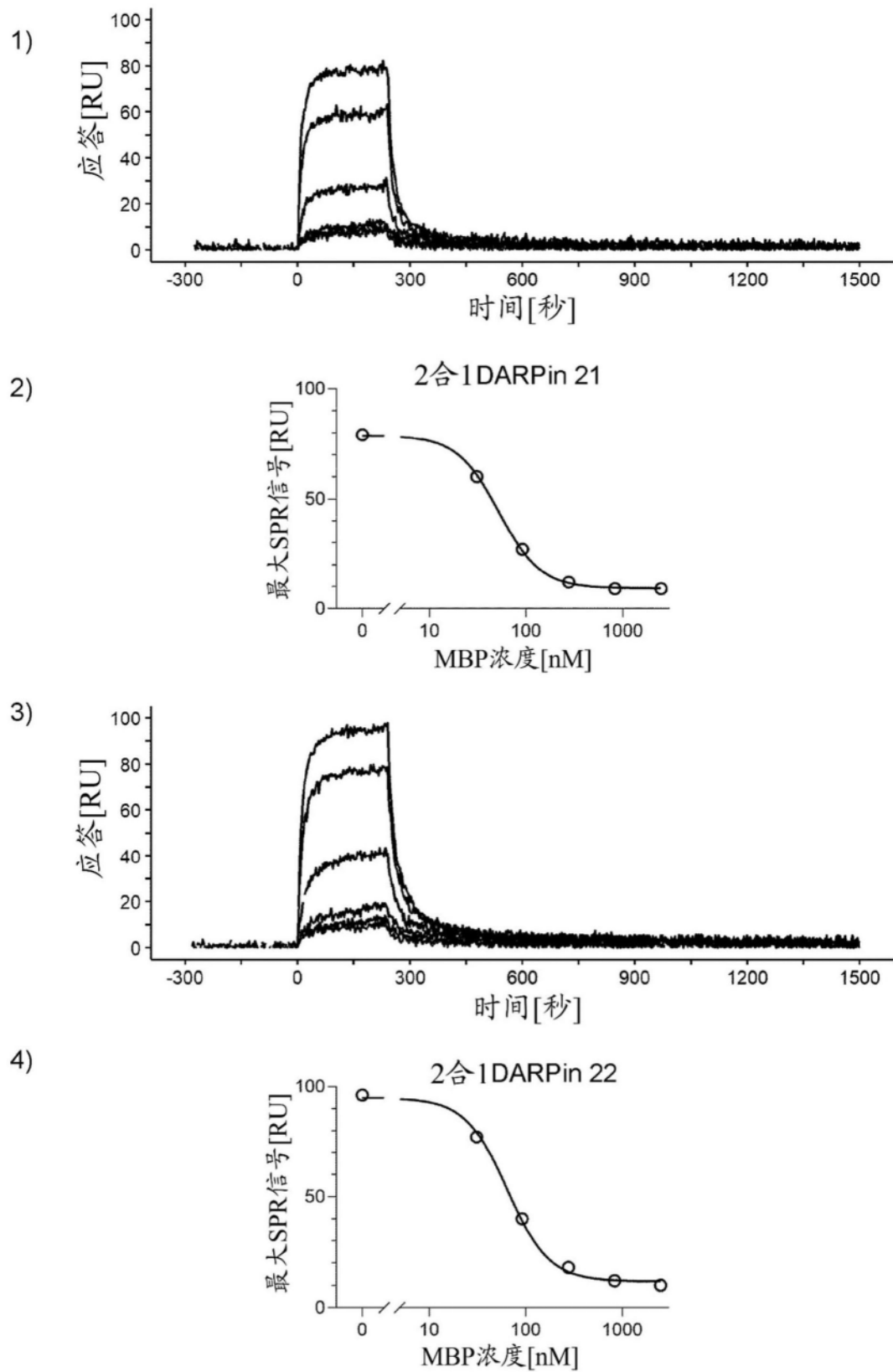


图14C

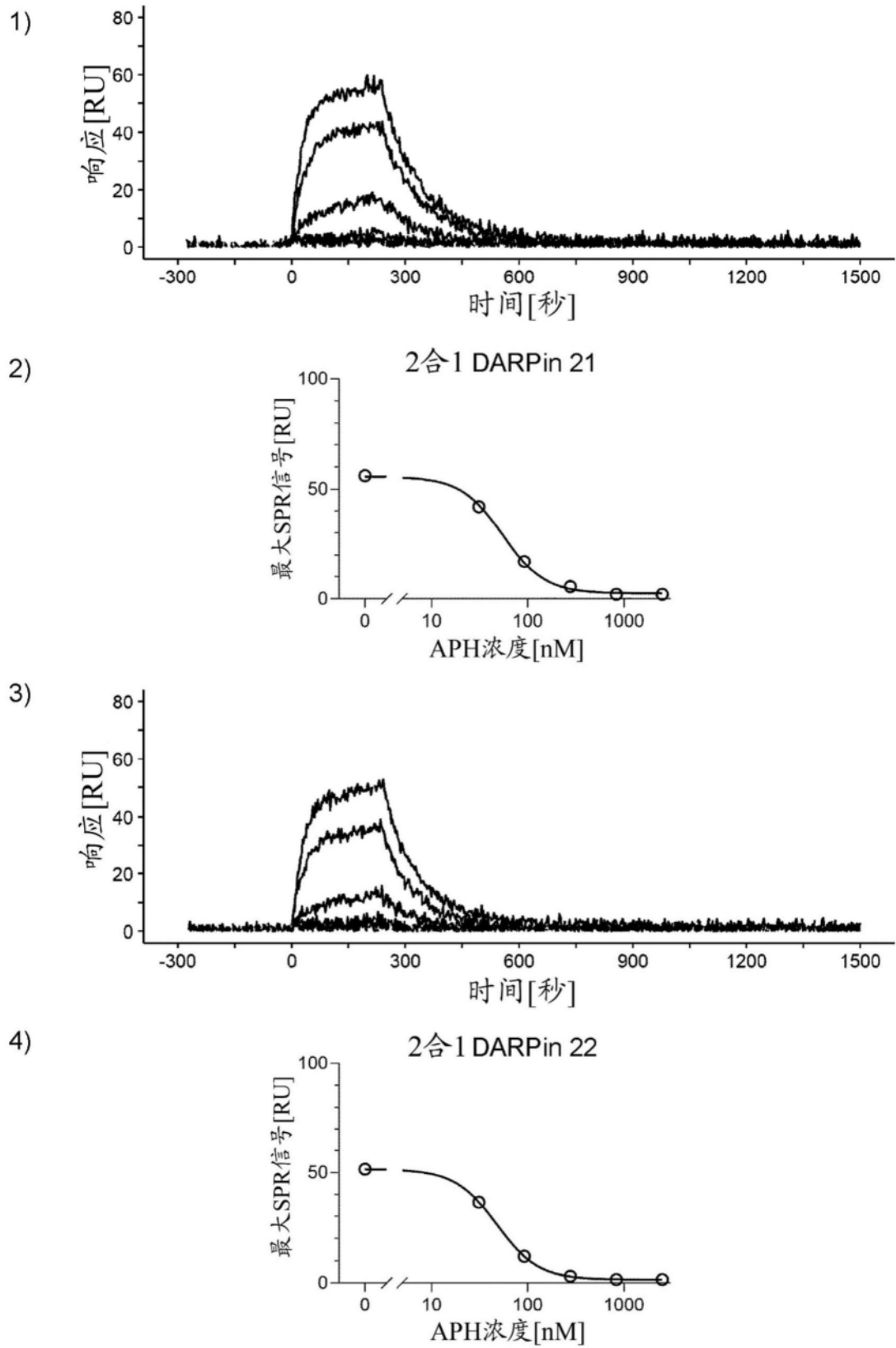


图14D

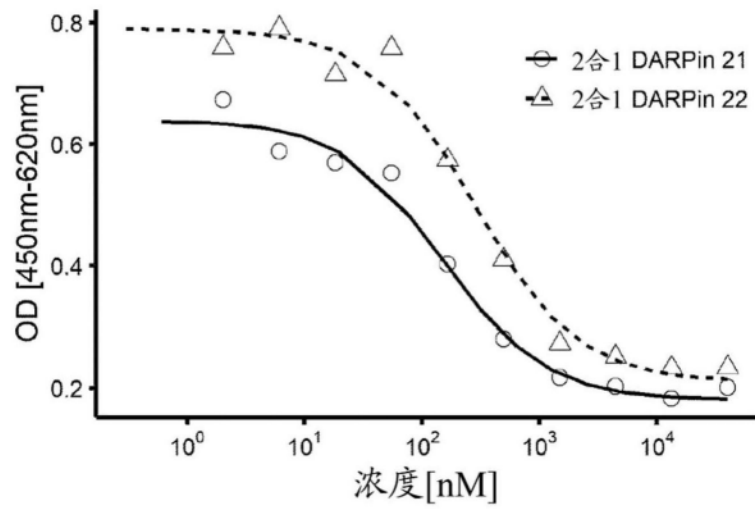


图14E

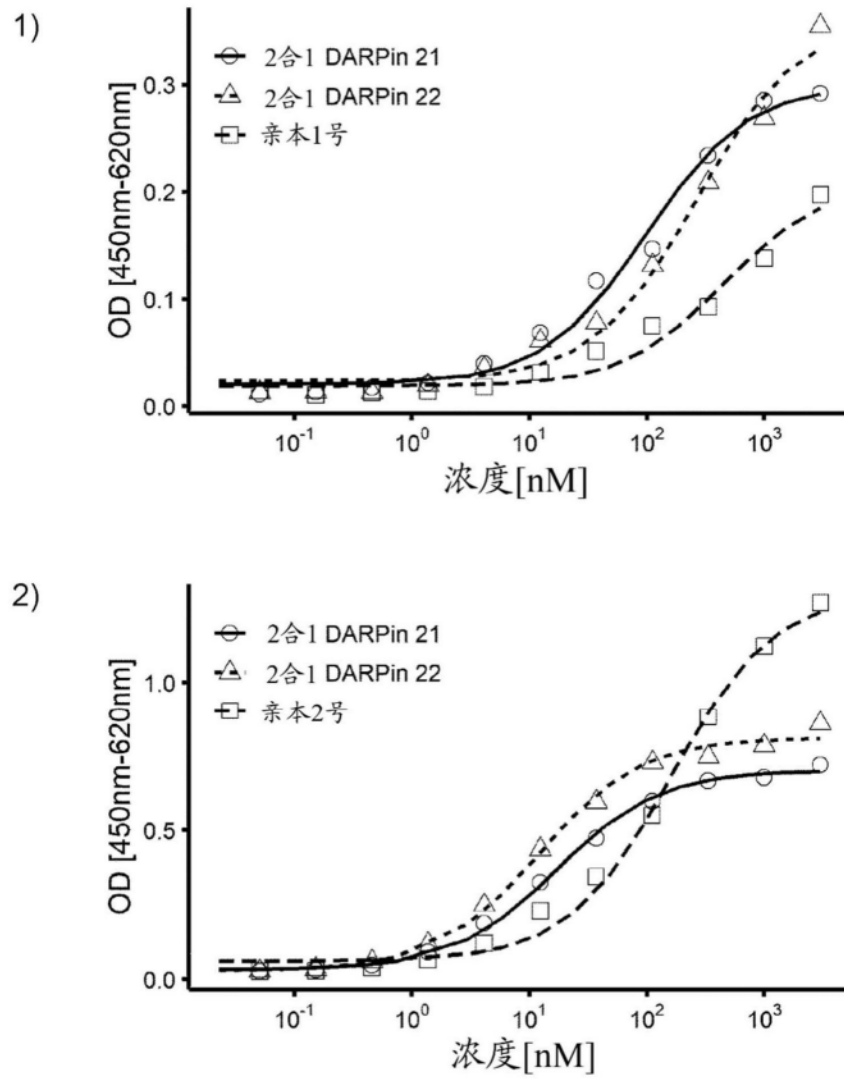


图14F

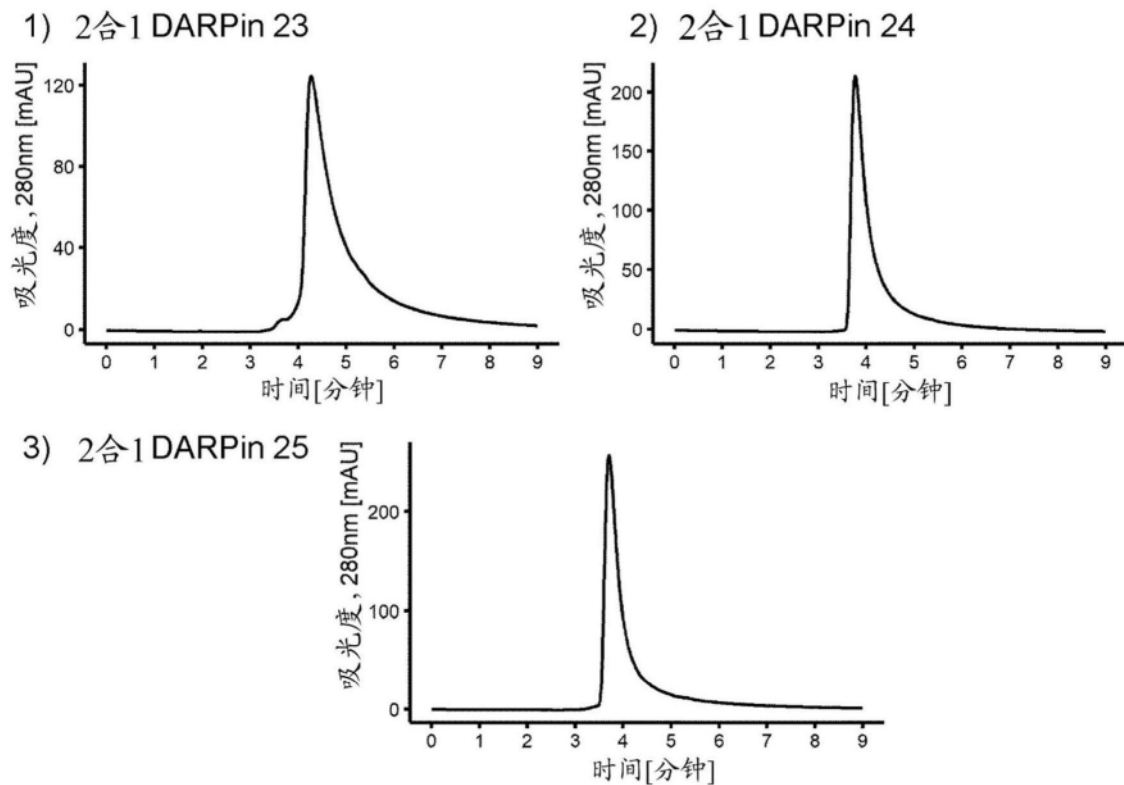


图15A

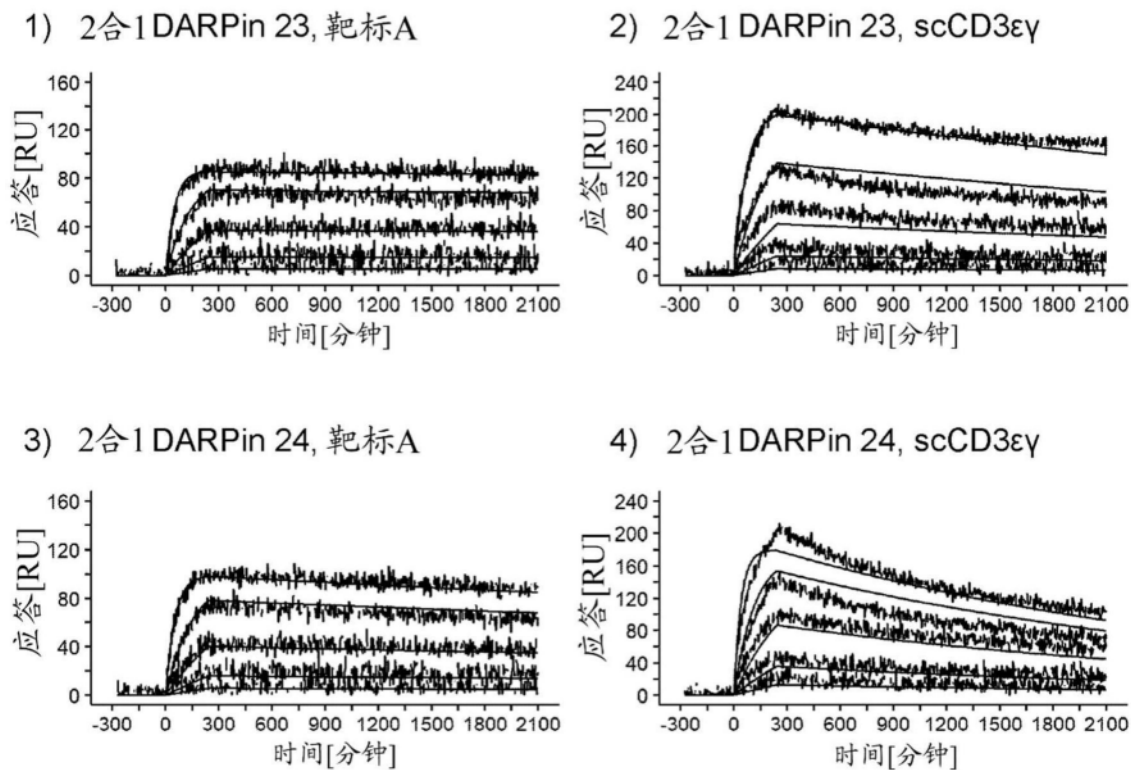
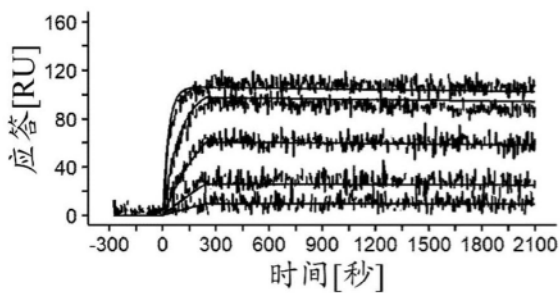
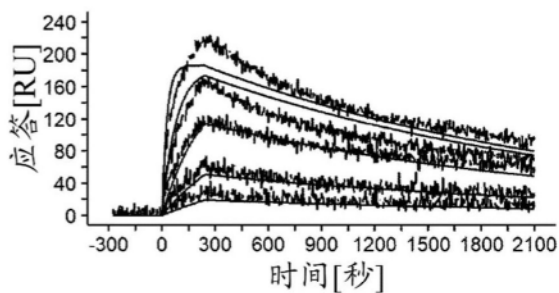


图15B

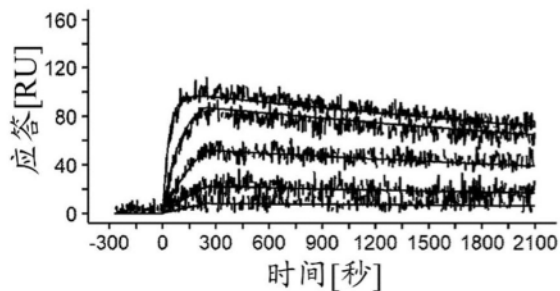
5) 2合1 DARPin 25, 靶标A



6) 2合1 DARPin 25, scCD3εγ



7) 亲本DARPin 4号



8) 亲本DARPin 3号

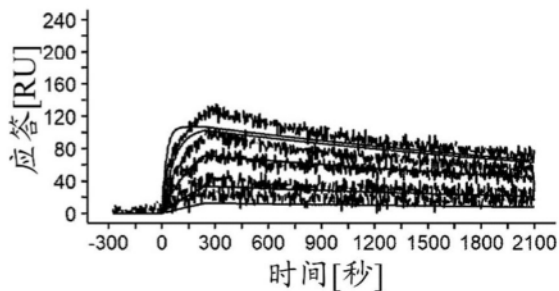
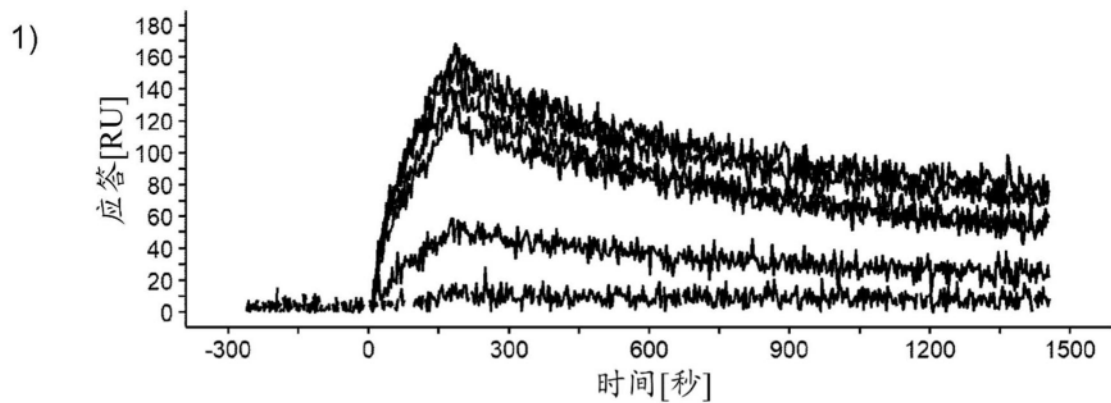


图15B(续)



2)

2合1 DARPin 23

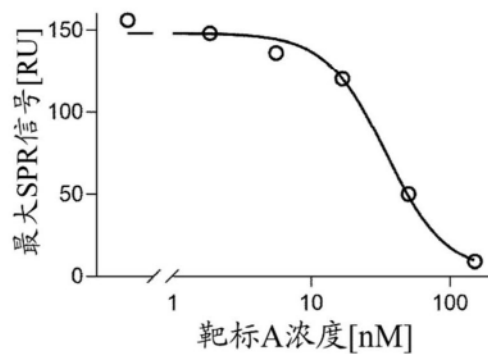


图15C

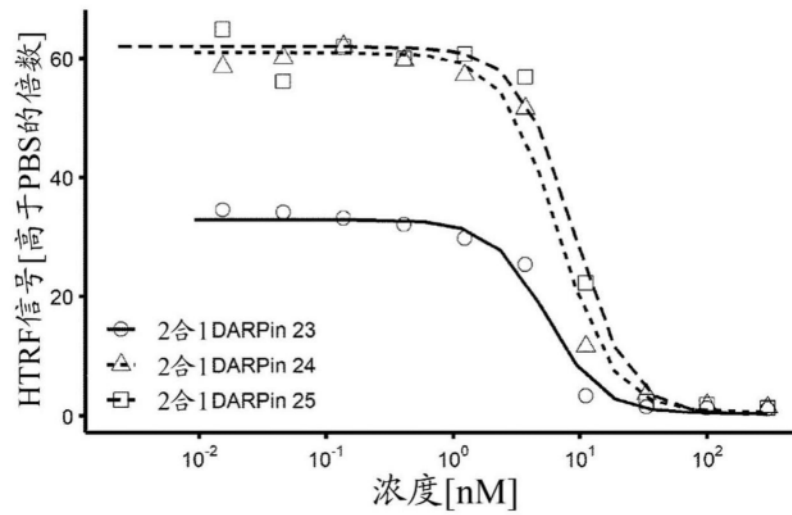


图15D

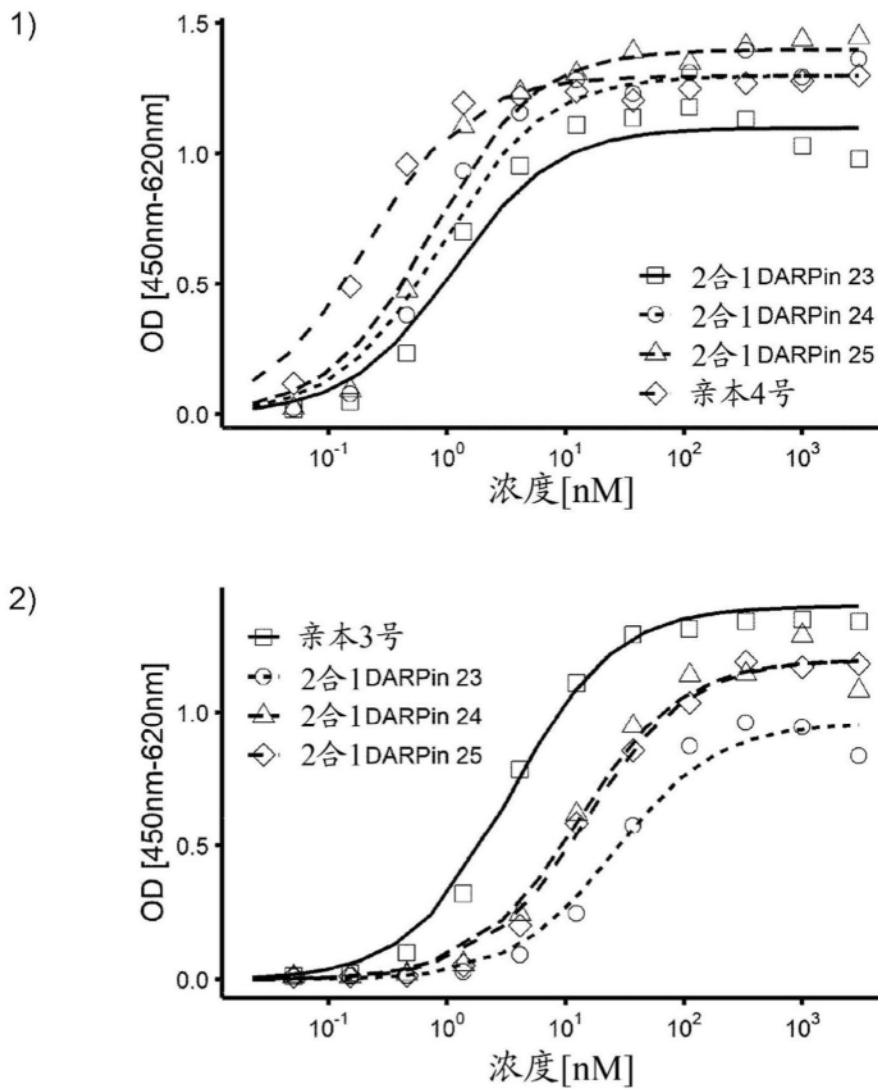
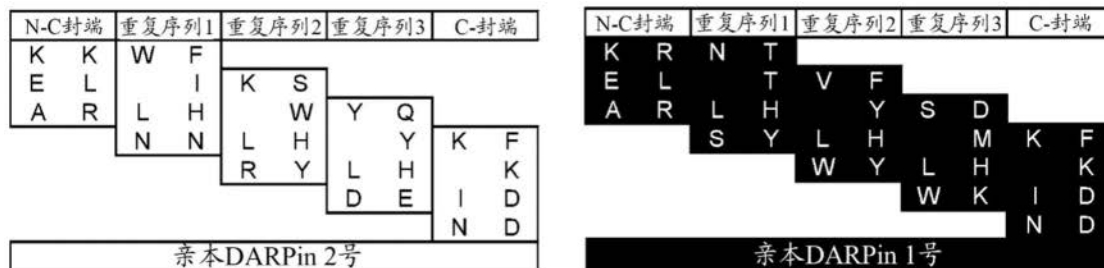
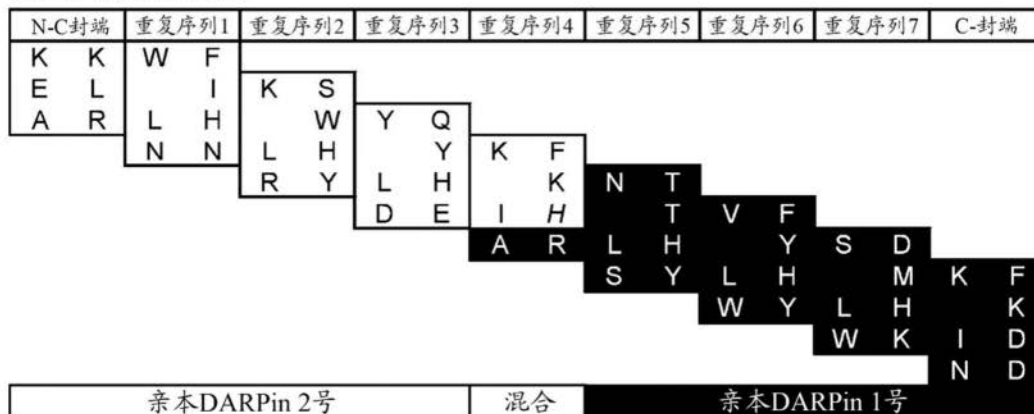


图15E



2合1 DARPin 21



2合1 DARPin 22

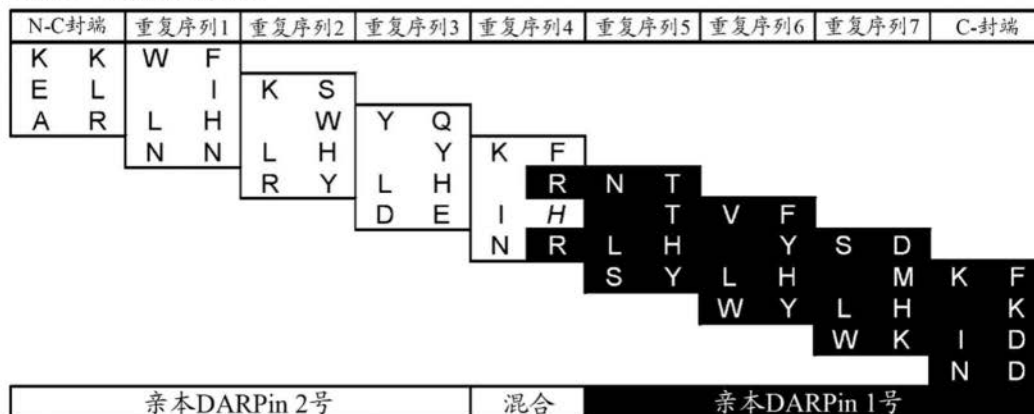


图16

