



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110036034 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201780075319.2

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

(22)申请日 2017.12.08

代理人 郝传鑫

(30)优先权数据

62/432,472 2016.12.09 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28(2006.01)

2019.06.05

C07K 16/18(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/065471 2017.12.08

A61K 39/395(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/107125 EN 2018.06.14

(71)申请人 西雅图遗传学公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 维维安·庄 马修·R·利文古德

彼得·森特

权利要求书3页 说明书30页

序列表34页 附图12页

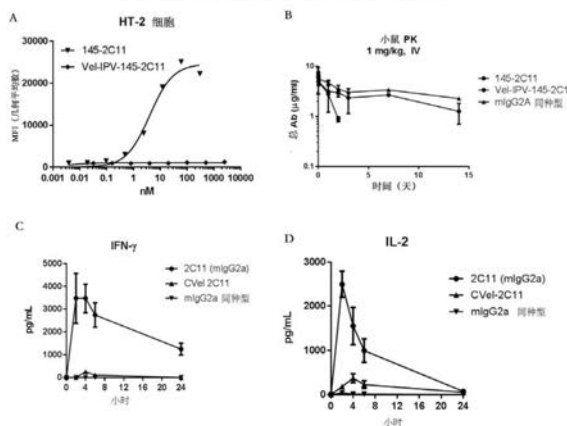
(54)发明名称

卷曲螺旋掩蔽的二价抗体

(57)摘要

本发明提供了包含两个轻链和重链对的二价抗体。一个或两个轻链和重链对的N末端通过包含蛋白酶裂解位点的接头连接到卷曲螺旋形成肽,所述的肽结合以•形成卷曲螺旋,其降低至少一个轻-重链对与靶标的结合的亲和力。

图9A-D: 未掩蔽和掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的比较



1. 包含两个轻链和重链对的二价抗体,其中至少一个对的轻链和重链的N末端通过包含蛋白酶裂解位点的接头与卷曲螺旋形成肽连接,所述的卷曲螺旋形成肽结合,形成降低轻-重链对与靶标的结合的亲和力的卷曲螺旋。

2. 根据权利要求1所述的二价抗体,其中两个所述的对的所述轻链和所述重链通过包含蛋白酶裂解位点的接头与卷曲螺旋形成肽连接,所述的卷曲螺旋形成肽结合,形成降低所述轻-重链对与靶标的结合的亲和力的卷曲螺旋。

3. 根据权利要求1或2所述的二价抗体,其中,所述的肽在不形成二硫键的情况下结合。

4. 根据前述任一项权利要求所述的二价抗体,其与细胞毒性或细胞抑制药物偶联。

5. 根据权利要求4所述的二价抗体,其通过所述二价抗体的半胱氨酸残基与细胞毒性或细胞抑制药物偶联。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的二价抗体,其中两个轻链和重链对为相同的。

7. 根据权利要求1-5中任意一项所述的二价抗体,其中两个轻链和重链对为不同的。

8. 根据权利要求7所述的二价抗体,其中所述的两个轻链和重链对对不同靶标具有特异性。

9. 根据权利要求7所述的二价抗体,其中所述的两个轻链和重链对对同一靶标具有特异性。

10. 根据权利要求8所述的二价抗体,其中一个且仅一个所述的通过对通过包含蛋白酶裂解位点的接头连接至卷曲螺旋形成肽,所述的卷曲螺旋形成肽结合,形成降低所述轻-重链对与靶标的结合的亲和力的卷曲螺旋。

11. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述的轻链包括轻链可变区和轻链恒定区,所述的重链包括重链可变区和重链恒定区。

12. 根据权利要求10所述的二价抗体,其中所述的重链恒定区包括CH1、铰链、CH2和CH3区。

13. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中两条所述的轻链与第一异源肽连接,两条所述的重链与第二异源肽连接。

14. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述的蛋白酶裂解位点为MMP#1或MMP#2中的任一个。

15. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述的靶标或所述的靶标之一是CD19、CD30、LIV-1、CD70或CD74中的任一个。

16. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述的结合降低至少100倍。

17. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述的结合降低200-5000倍。

18. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述结合降低200-1500倍。

19. 根据权利要求4或5所述的二价抗体,其中偶联物的细胞毒性降低至少100倍。

20. 根据权利要求4或5所述的二价抗体,其中偶联物的细胞毒性降低200-5000倍。

21. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述卷曲螺旋形成肽以相同方向与所述重链和所述轻链的所述N末端连接。

22. 根据权利要求1-21中任意一项所述的二价抗体,其中所述卷曲螺旋形成肽以相反方向与所述重链和所述轻链的所述N末端连接。

23. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述卷曲螺旋形成肽的多个拷贝串

联连接至所述重链和所述轻链的N末端。

24. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述接头的长度为1-20、2-15、3-12、4-10、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

25. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述接头具有包含GSIPVSLRSG (SEQ ID NO:43)的氨基酸序列或由GSIPVSLRSG (SEQ ID NO:43)组成的氨基酸序列。

26. 根据前述任一权利要求所述的二价抗体,其中所述蛋白酶裂解位点是MMP2蛋白酶位点。

27. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中由序列QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;由序列QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:31)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

28. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中包含序列QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34)的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;包含序列QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:31)的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

29. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中由序列QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:31)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;由序列组成的肽QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34)提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

30. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中包含序列QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:31)的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;包含序列QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34)的序列提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

31. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中由序列GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;由序列GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:65)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

32. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中包含序列GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64)的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;包含序列GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:65)的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

33. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中由序列GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO:65)组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接

头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;由序列GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64) 组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

34. 根据权利要求1-24中任意一项所述的二价抗体,其中包含序列GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:65) 的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述轻链连接的所述卷曲螺旋形成肽;包含序列GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64) 的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与所述重链连接的所述卷曲螺旋形成肽。

35. 根据权利要求8所述的二价抗体,其中所述靶标的一个是免疫细胞上的表面抗原,另一个是癌细胞上的表面抗原。

36. 根据权利要求35所述的二价抗体,其中所述免疫细胞上的表面抗原是CD3。

卷曲螺旋掩蔽的二价抗体

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2016年12月9日提交的US 62/432,472的权益,其出于所有目的通过引用整体并入。

关于序列列表

[0002] 本申请包括在2017年12月8日创建的名为506990SEQLIST.TXT的文件中的电子序列列表,其包含50千字节,通过引用并入。

背景技术

[0003] 目前基于抗体的治疗方法对预期靶标的选择性可能低于最佳。尽管单克隆抗体与其预期靶标的结合通常具有特异性,但大多数靶标分子对疾病部位不具有特异性,并且可能存在于疾病部位以外的细胞或组织中。

[0004] 已经描述了几种通过改造抗体,以使该抗体具有与能够抑制抗体结合的抑制或掩蔽结构域(inhibitory or masking domain)连接的可裂解接头(cleavable linker),从而克服这些脱靶效应的方法(例如参见:W02003/068934、W02004/009638、W02009/025846、W02101/081173和W02014103973)。可以将该接头设计为被对某些组织或病理特异的酶裂解,从而使抗体能够在所需位置被优先激活。掩蔽部分(masking moieties)可以通过直接结合抗体的结合位点起作用,或者可以通过空间位阻间接起作用。已经提出了各种掩蔽部分、接头、蛋白酶位点和组装形式。掩蔽程度、掩蔽部分与抗体的表达、纯化、偶联或药代动力学的相容性可以在不同形式之间变化。

发明内容

[0005] 本发明提供了包含两个轻链和重链对的二价抗体,其中至少一个对的轻链和重链的N末端通过包含蛋白酶裂解位点的接头与卷曲螺旋形成肽连接;所述卷曲螺旋形成肽结合(associate),以形成降低轻-重链对与靶标的结合亲和力的卷曲螺旋。可选地,两个对的轻链和重链通过包含蛋白酶裂解位点的接头与卷曲螺旋形成肽连接,所述卷曲螺旋形成肽结合,并形成降低轻-重链对与靶标的结合亲和力的卷曲螺旋。

[0006] 可选地,肽在不形成二硫键的情况下结合。可选地,二价抗体与细胞毒性药物或细胞抑制药物偶联(conjugate)。可选地,该细胞毒性药物或细胞抑制药物通过二价抗体的半胱氨酸残基偶联。可选地,两个轻链和重链对是相同的。可选地,两个轻链和重链对是不同的。可选地,轻链包括轻链可变区和轻链恒定区,重链包括重链可变区和重链恒定区。可选地,重链区包括CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。可选地,两条轻链与第一异源肽连接,两条重链与第二异源肽连接。可选地,蛋白酶裂解位点是MMP#1或MMP#2中的任何一个。可选地,靶标是CD19、CD30、LIV-1、CD70或CD74中的任何一个。可选地,结合(binding)减少至少100倍。可选地,结合减少200-5000倍、200-4000倍或200-1500倍。可选地,偶联物的细胞毒性降低至少100倍。可选地,偶联物的细胞毒性降低200-5000倍。可选地,卷曲螺旋形成肽以相同方向与重链和轻链的N末端连接。可选地,卷曲螺旋形成肽以相反方向与重链和轻链的N末端

连接。可选地，卷曲螺旋形成肽的多个拷贝串联连接到重链和轻链的N末端。

[0007] 可选地，包含SEQ ID NO:44的序列的肽或由SEQ ID NO:44的序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。包含SEQ ID NO:47的序列的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与重链连接的卷曲螺旋形成肽。

[0008] 在另一个实施方案中，包含SEQ ID NO:46的序列的肽或由SEQ ID NO:46的序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽。包含SEQ ID NO:47的序列的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头以及与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。

[0009] 在另一个实施方案中，包含

QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34) 的序列的肽或由该序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽。序列为

QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:31) 的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。

[0010] 在另一个实施方案中，包含

QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:34) 的序列的肽或由该序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。序列为

QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:31) 的肽提供了包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽。

[0011] 在另一个实施方案中，包含

GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64) 的序列的肽或由该序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽。序列为

GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:65) 的肽提供了包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。

[0012] 在另一个实施方案中，包含

GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:65) 的序列或由该序列组成的肽提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽。序列为

GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO:64) 的肽提供了包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽。

可选地，接头的长度为1-20、2-15、3-12、4-10、5、6、7、8、9或10个氨基酸。优选的接头具有包含GSIPVSLRSG (SEQ ID NO:48) 或由其组成的氨基酸序列。一些接头包含MMP2蛋白酶位点。

附图说明

[0013] 图1A示出了卷曲螺旋形成肽、接头和蛋白酶位点的例子。在M11CC和M15CC中，SGGGG (SEQ ID NO:22) 和GGGGS (SEQ ID NO:24) 为接头。PLGVR (SEQ ID NO:23) 是蛋白酶裂解位点，其余的序列是卷曲螺旋肽。SEQ ID NO:20是与包含蛋白酶位点的接头连接的M11卷曲螺旋肽 (显示为与轻链连接)；SEQ ID NO:25是与包含蛋白酶位点的接头连接的M11卷曲

肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:21为M11卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:26为M11卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:27是连接至包含蛋白酶位点的接头的M15CC卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),并且SEQ ID NO:29是连接至包含蛋白酶位点的接头的M15卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:28是M15卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:30是M15卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。在Ve1CC中,GS和SG是接头,IPVSLR(SEQ ID NO:33)是蛋白酶裂解位点,其余序列是卷曲螺旋肽。SEQ ID NO:31是连接至包含蛋白酶位点的接头的Ve1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:34是连接至包含蛋白酶位点的接头的Ve1卷曲肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:32是Ve1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:35是Ve1卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。图1A中所示的VEL卷曲螺旋肽可以补充有额外的N末端Q。

[0014] 图1B显示了具有N末端半胱氨酸、接头和蛋白酶位点的卷曲螺旋形成肽的例子。在CM11CC和CM15CC中,SGGGG(SEQ ID NO:22)和GGGGS(SEQ ID NO:24)为接头。PLGVR(SEQ ID NO:23)为蛋白酶裂解位点,其余序列是卷曲螺旋肽。SEQ ID NO:36是连接至包含蛋白酶位点的接头的CM11卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:38是连接至包含蛋白酶位点的接头的CM11卷曲肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:37是CM11卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:39是CM11卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:40是连接至包含蛋白酶位点的接头的CM15卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:42是连接至包含蛋白酶位点的接头的CM15卷曲肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:41是CM15卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:43是CM15卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。在CVe1中,GS和SG是接头,IPVSLR(SEQ ID NO:33)是蛋白酶裂解位点,其余序列是卷曲螺旋肽。SEQ ID NO:44是连接至包含蛋白酶位点的接头的CVe1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),并且SEQ ID NO:46是连接至包含蛋白酶位点的接头的CVe1卷曲肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:45是CVe1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:47是CVe1卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。

[0015] 图2示出了与hBU12ec对照相比,在血浆中培养的各种卷曲螺旋掩蔽抗体的抗体浓度对时间的关系。

[0016] 图3示出了与掩蔽的抗体相接触的肿瘤组织样品。

[0017] 图4示出了使用基于FAC的饱和结合测定法(FACs-based saturation binding assays),与抗原1阳性细胞相结合的掩蔽的抗抗原1抗体(masked anti-antigen 1 antibodies)。

[0018] 图5显示了用于确定肽序列裂解的PLRP-MS的例子。在CVe1中,GS和SG是接头,IPVSLR(SEQ ID NO:33)是蛋白酶裂解位点,其余序列是卷曲螺旋肽。SEQ ID NO:44是连接至包含蛋白酶位点的接头的CVe1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),并且SEQ ID NO:46是连接至包含蛋白酶位点的接头的CVe1卷曲肽(显示为与重链连接)。SEQ ID NO:45是CVe1卷曲螺旋肽(显示为与轻链连接),SEQ ID NO:47是CVe1卷曲螺旋肽(显示为与重链连接)。

[0019] 图6A和6B示出了hAg-2与不同组织中的接头CVe1或Ve1的体内比较数据。图6A示出了在第3天和第4天的hAg-2与肿瘤、肺、肝和血浆中的接头CVe1或Ve1的体内比较数据。图6B示出了在第1、2和4天的hAg-2与肿瘤、肺和血浆中接头Ve1-IPV的体内比较数据。

[0020] 图7A~C示出了在三种不同细胞系中使用CVe1或Ve1卷曲螺旋掩蔽抗Ag2的效果;

所述的三种不同细胞系为HCT116(图7A)、SW780(图7B)和HT1080(图7C)。

[0021] 图8A~C示出了具有不同裂解序列的、未掩蔽的和Ve1掩蔽的抗CD19抗体-药物偶联物的比较。图8A示出了与CD19阳性Ramos细胞结合的、未掩蔽的和Ve1掩蔽的抗CD19ADC；图8B示出了抗CD19ADC对CD19阳性Ramos细胞的抗增殖活性；图8C示出了在NSG小鼠的Ramos异种移植模型中未掩蔽的和Ve1掩蔽的抗CD19抗体-药物偶联物的抗肿瘤活性。

[0022] 图9A~D示出了未掩蔽的和掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的比较。图9A示出了掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的结合活性；图9B示出了BALB/c小鼠中未掩蔽的和掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的靶向介导的药物处置；图9C和D示出了抗CD3抗体145-2C11对细胞因子释放IFN- γ (图9C)和IL-2(图9D)的缓解。

[0023] 图10示出了使用静脉给药至BALB/c小鼠的、具有不同卷曲螺旋结构域的掩蔽的抗-人-Ag2抗体(Anti-human-Ag2antibodies)的稳定性。

[0024] 图11A~C示出了未掩蔽的和掩蔽的抗小鼠Ag2抗体的活性。图11A示出了被VEL和IPV序列掩蔽的小鼠反应性抗Ag2抗体,该VEL和IPV序列与人Ag2抗体上所使用的相同；图11B示出了BALB/c小鼠中掩蔽的抗小鼠Ag2抗体的血小板耗竭研究；图11C示出了掩蔽的抗小鼠Ve1-IPV-Ag2抗体的药代动力学。

[0025] 图12A~D示出了抗小鼠Ag2抗体在A20淋巴瘤模型中的抗肿瘤活性。图12A示出了未掩蔽的和Ve1-IPV掩蔽的抗Ag2抗体对外周Ag2(+)细胞的作用；图12B示出了经未掩蔽的和Ve1-IPV掩蔽的抗Ag2抗体治疗后肿瘤体积随时间的变化；图12C示出了未掩蔽的和Ve1-IPV掩蔽的抗Ag2抗体与外周细胞的结合；图12D示出了未掩蔽的和Ve1-IPV掩蔽的抗Ag2抗体与肿瘤细胞的结合。

[0026] 图13A~C示出了掩蔽对抗Ag2抗体的药代动力学和耐受性的影响。图13A示出了使用通用总抗体(TAb)ELISA的抗Ag2和Ve1-IPV-抗-Ag2的药代动力学；图13B通过比较这些外周Ag2(+)细胞的消耗,示出了使用Ve1-IPV掩蔽抗Ag2的影响；图13C示出了使用Ve1-IPV掩蔽抗Ag2对细胞因子的产生的影响。

[0027] 图14A和14B示出了抗Ag2抗体在L428异种移植物中的抗肿瘤活性。图14A示出了Ve1-PLGLAG-抗-Ag2和Ve1-LALGPG-抗-Ag2治疗后肿瘤体积的变化。图14B示出了Ve1-PLGLAG-抗-Ag2和Ve1-LALGPG-抗-Ag2治疗后L428细胞的变化。

定义

[0028] 分离的抗体或ADC是通常至少50%w/w纯的不含由其产生或纯化带来的干扰蛋白和其它污染物的抗体,但不排除该抗体与预期有助于其使用的过量医药学上可接受的载剂或其它媒剂组合的可能性。干扰蛋白和其它污染物可以包括例如分离出或重组产生抗体的细胞的细胞组分。有时,抗体或ADC是至少60%、70%、80%、90%、95%或99%w/w纯的不含来自生产或纯化的干扰蛋白和污染物。

[0029] 单独的抗体或作为ADC的组分的抗体与其靶抗原的特异性结合意指至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 $10^{10}M^{-1}$ 的亲和力。特异性结合相对至少一个无关靶所发生的非特异性结合在量级上是可检测地更高的并且是可区分的。特异性结合可以是在特定官能团或特定空间配合(例如,锁钥型)之间形成键的结果,而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而,特异性结合不一定意味着单克隆抗体结合一个且仅一个靶标。

[0030] 基本抗体结构单元是亚单元的四聚体。每个四聚体包括多肽链的两个相同对,每

对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每个链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。这个可变区初始表达为连接至可裂解信号肽。无信号肽的可变区有时称作成熟可变区。因此,举例而言,轻链成熟可变区意味着无轻链信号肽的轻链可变区。每个链的羧基端部分界定主要负责效应功能的恒定区。重链恒定区主要负责效应物(effector)功能。

[0031] 轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD以及IgE。在轻链和重链内,可变和恒定区由约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区(一般参看《基础免疫学(Fundamental Immunology)》Paul, W. 编,第2版, Raven Press, N.Y., 1989, 第7章,出于所有目的以全文引用的方式并入)。

[0032] 每个轻/重链对的成熟可变区形成抗体结合位点。因此,完整抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中以外,两个结合位点是相同的。链全部展现由三个高变区,也称为互补决定区或CDR连接的相对保守构架区(FR)的相同通用结构。来自每对的两个链的CDR由构架区对准,能够结合至特异性表位。从N端至C端,轻链与重链都包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4。氨基酸指派给每个域是根据以下的定义:Kabat,《免疫学关注的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991),或Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》196:901-917(1987);Chothia等,《自然(Nature)》342:878-883(1989)。Kabat还提供了广泛使用的编号规定(Kabat编号),其中在不同重链之间或在不同轻链之间的对应残基指派相同的编号。

[0033] 术语“抗体”包括完整抗体和其结合片段。通常,抗体片段与它们从中衍生的完整抗体竞争与靶的特异性结合,包括单独重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、双功能抗体、Dab、纳米抗体和Fv。片段可通过重组DNA技术,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离来产生。术语“抗体”还包括双功能抗体(均二聚Fv片段)或微型抗体(V_L-V_H-CH₃)、双特异性抗体等。双特异性或双功能抗体为具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合位点的人工混合型抗体(参看例如, Songsivilai 和 Lachmann,《临床与实验免疫学(Clin. Exp. Immunol.)》, 79:315-321(1990);KosteIny等人,《免疫学杂志(J. Immunol.)》, 148:1547-53(1992))。术语“抗体”包括抗体自身(“裸抗体”)或偶联至细胞毒性或细胞生长抑制性药物的抗体。

[0034] 术语“表位”指的是抗体所结合的抗原上的位点。表位可以由相连氨基酸或通过一个或多个蛋白质的三级折叠并置的非相连氨基酸形成。由相连氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常失去。表位通常包括呈独特空间构象的至少3个并且更通常至少5个或8~10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如X射线晶体分析法和二维核磁共振。参看例如表位定位方案(Epitope Mapping Protocols),《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,第66卷, Glenn E. Morris编(1996)。

[0035] 识别相同或重叠表位的抗体可以在简单的免疫检验中鉴别,所述免疫检验显示一个抗体与另一个抗体竞争与靶抗原的结合的能力。抗体的表位还可以通过结合至其抗原的抗体的X射线晶体分析法以鉴别接触残基来定义。或者,如果减少或消除一个抗体的结合的

抗原中的所有氨基酸突变会减少或消除另一个抗体的结合,那么两个抗体具有相同的表位。如果减少或消除一个抗体的结合的一些氨基酸突变会减少或消除另一个抗体的结合,那么两个抗体具有重叠的表位。

[0036] 抗体之间的竞争通过检验确定,其中在测试下的抗体抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合(参看例如Junghans等,《癌症研究(Cancer Res.)》50:1495,1990)。如果过量测试抗体(例如,至少2x、5x、10x、20x或100x)使参考抗体的结合抑制如在竞争结合检验中测量的至50%但优选地75%、90%或99%,那么测试抗体与参考抗体竞争。通过竞争检验鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合至相同的表位的抗体和结合至足够接近于由参考抗体结合的表位而使位阻发生的相邻表位的抗体。

[0037] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人类和其它哺乳动物受试者。

[0038] 出于将氨基酸取代分类为保守或非保守的目的,氨基酸如下分组:第I组(疏水侧链):met、ala、val、leu、ile;第II组(中性亲水侧链):cys、ser、thr;第III组(酸性侧链):asp、glu;第IV组(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;第V组(影响链取向的残基):gly、pro;以及第VI组(芳香族侧链):trp、tyr、phe。保守取代涉及相同种类中的氨基酸之间的取代。非保守取代在于将这些种类之一的成员换成另一个种类成员。

[0039] 百分比序列一致性是由最大限度比对的序列来确定。

[0040] 序列同一性可以通过使用算法比对序列来确定,例如在Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis中使用默认间隙参数的BESTFIT、FASTA和TFASTA,或通过检查,以及最佳比对(即,在比较窗口中产生最高百分比的序列相似性)。序列同一性百分比通过比较比较窗口上的两个最佳比对序列、确定两个序列中相同残基出现的位置数以产生匹配位置数、将匹配位置数除以不计算比较窗口中的间隙的匹配和不匹配位置的总数(即窗口大小)、将结果乘以100以得到序列同一性百分比。通过Kabat编号惯例比对抗体序列,使得占据相同编号位置的残基对齐(aligned)。比对后,如果受试者序列(subject sequence)为参考序列,则受试者和参考序列之间的百分比序列同一性是受试者和参考序列中相同氨基酸占据的位置数除以两者的对齐位置总数(未计算间隙)乘以100以转换为百分比。

[0041] “包含”一种或多钟列举要素的组合物或方法可包括其它未特别叙述的要素。举例而言,包含抗体的组合物可仅含有抗体或与其它成分组合。

[0042] 值的范围的指示包括范围内或限定范围的所有整数。

[0043] 抗体效应功能指的是由Ig的Fc域促成的功能。这类功能可以是例如抗体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬或补体依赖性细胞毒性。这种功能可以通过例如Fc效应域与具有吞噬或溶解活性的免疫细胞上的Fc受体的结合或通过Fc效应域与补体系统的补体的结合来实现。通常,由Fc结合细胞或补体组分介导的作用使得靶向的细胞抑制和/或耗尽。抗体的Fc区可以募集Fc受体(FcR)表达细胞并且使其与抗体包被靶细胞并置。表达IgG的表面FcR,包括Fc γ R1II(CD16)、Fc γ R1II(CD32)以及Fc γ R1III(CD64)的细胞可以充当效应细胞用于破坏IgG包被细胞。这类效应细胞包括单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞以及嗜酸性粒细胞。Fc γ R由IgG啮合,活化了抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)。ADCC由CD16⁺效应细胞经由膜孔形成蛋白和蛋白酶的分泌介导,而吞噬作用是由CD32⁺和CD64⁺效应细胞介导(参看《基础免疫学(Fundamental Immunology)》),

第4版,Paul编,Lippincott-Raven,N.Y.,1997,第3、17以及30章;Uchida等,2004,《实验医学杂志(J. Exp. Med.)》199:1659-69;Akewanlop等,2001,《癌症研究(Cancer Res.)》61:4061-65;Watanabe等,1999,《乳癌研究与治疗(Breast Cancer Res. Treat.)》53:199-207)。除了ADCC和ADCP以外,细胞结合的抗体的Fc区还可以活化补体经典路径以引出补体依赖性细胞毒性(CDC)。当抗体与抗原复合时,补体系统的C1q结合至抗体的Fc区。C1q与细胞结合的抗体的结合可以起始涉及C4和C2的蛋白水解活化的一连串事件以产生C3转化酶。由C3转化酶使C3裂解成C3b能够活化包括C5b、C6、C7、C8以及C9的终末补体组分。总的来说,这些蛋白质在抗体包被细胞上形成膜攻击复合物孔。这些孔破坏细胞膜完整性,杀死靶细胞(参看《免疫生物学(Immunobiology)》,第6版,Janeway等,《加兰科学(Garland Science)》,N.Y.,2005,第2章)。

[0044] “细胞毒性效应”是指耗尽、消除和/或杀死靶细胞。“细胞毒性剂”是指对细胞具有细胞毒性效应的制剂。细胞毒性剂可偶联至抗体,或与抗体组合施用。

[0045] “细胞生长抑制效应”是指抑制细胞增殖。“细胞生长抑制剂”是指对细胞具有细胞生长抑制效应的制剂,由此抑制细胞特定亚群的生长和/或扩增。细胞生长抑制剂可偶联至抗体,或与抗体组合施用。

[0046] 术语“医药学上可接受”意指由联邦或州政府的管理机构批准或可批准,或在美国药典或其他公认的药典中列出的适用于动物,更特别是人类。术语“医药学上相容性成分”是指与抗体或ADC组合的药学上可接受的稀释剂,助剂,赋形剂或媒剂。

[0047] 短语“医药学上可接受的盐”是指抗体或其偶联物,或与抗体一起施用的制剂的医药学上可接受的有机或无机盐。示例性盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐,马来酸盐、龙胆酸盐,富马酸盐,葡糖酸盐,葡糖醛酸盐,糖酸盐,甲酸盐,苯甲酸盐,谷氨酸盐,甲磺酸盐,乙磺酸盐,苯磺酸盐,对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'亚甲基双-(2羟基3萘甲酸))盐。医药学上可接受的盐可涉及纳入另一种分子,如乙酸根离子、丁二酸根离子或其它抗衡离子。抗衡离子可为任何使母体化合物上的电荷稳定的有机或无机部分。此外,医药学上可接受的盐在其结构中可具有多于一个带电原子。多个反离子可出现在其中多个带电原子为医药学上可接受的盐的一部分的例子中。因此,医药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。除非从上下文中可明显得知,否则可以以药学上可接受的盐的形式提供掩蔽或未掩蔽形式的任何抗体或抗体药物偶联物。

[0048] 除非从上下文中可明显得知,术语“约”包括在规定值的标准偏差内的值。

[0049] 人源化抗体是遗传工程改造的抗体,其中来自非人类“供体”抗体的CDR移植至人类“接受体”抗体序列中(参看例如Queen,美国专利号5,530,101和5,585,089;Winter,美国专利号5,225,539,Carter,美国专利号6,407,213,Adair,美国专利号5,859,205和6,881,557,Foote,美国专利号6,881,557)。接受体抗体序列可以是例如成熟人类抗体序列、这类序列的复合、人类抗体序列的共有序列,或种系区序列。因此,人源化抗体是具有完全或实质上来自非人类供体抗体的CDR(优选如Kabat定义)和完全或实质上来自人类抗体序列的可变区构架序列和恒定区(如果存在的话)的抗体。除了纳米抗体和dAb以外,人源化抗体包含人源化重链和人源化轻链。当至少85%、90%、95%或100%的对应残基(如由Kabat定义)

在相应的CDR之间相同时,人源化抗体中的CDR实质上来自非人类抗体中的对应CDR。当至少85%、90%、95%或100%的由Kabat定义的对应该残基相同时,抗体链的可变区构架序列或抗体链的恒定区实质上分别来自人类可变区构架序列或人类恒定区。

[0050] 嵌合抗体是非人类抗体(例如小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人类或非人灵长类动物轻链和重链恒定区组合的抗体。这类抗体实质上或完全保留小鼠抗体的结合特异性,并且是人类序列的约三分之二。

[0051] 镶饰抗体是人源化抗体的一种类型,其保留非人类抗体的一些并且通常所有CDR和一些非人类可变区构架残基,但用来自人类抗体序列的对应位置的残基置换可以有助于B或T细胞表位的其它可变区构架残基,例如,暴露残基(Padlan,《分子免疫学(Mol.Immunol.)》28:489,1991)。结果是CDR完全或实质上来自非人类抗体并且非人类抗体的可变区构架通过取代而变为与人类的抗体更相似。

[0052] 抗体-药物偶联物(ADC)包括偶联于药物的抗体。药物是已知或怀疑具有药理活性的化合物,通常具有细胞毒性或细胞抑制活性。

具体实施方式

I. 一般情况

[0053] 本发明提供了抗体,其可变区通过可变区链的N末端与卷曲螺旋形成肽的连接而被掩蔽。卷曲螺旋形成肽彼此结合形成卷曲螺旋(即,肽分别形成螺旋,这些螺旋彼此盘绕)。尽管对于本发明的实践不需要理解机制,但据信卷曲螺旋在空间上抑制抗体结合位点与其靶标的结合。该技术可以在所有形式的抗体上实施,包括二价抗体(即具有两个结合位点)。卷曲螺旋形成肽之间的非共价结合足以形成抑制抗体可变区结合的、稳定的卷曲螺旋;例如,通过各个肽的末端半胱氨酸之间的二硫键进一步连接卷曲螺旋形成肽是不必要的。非天然存在的半胱氨酸的存在可能是不利的,因为它们可能导致错误折叠或错误偶联(misconjugation)问题。通过这种形式掩蔽抗体可以将结合亲和力(和ADC的情况下的细胞毒活性)降低超过一百倍。可以以这种形式掩蔽抗体而不显著损害表达、纯化、偶联、药代动力学或结合或其它针对非掩蔽(unmasking)的活性。

II. 卷曲螺旋

[0054] 卷曲螺旋形成肽是可以彼此结合以形成卷曲螺旋的肽对。“卷曲螺旋”是本领域指涉及缠绕成超螺旋结构的 α -螺旋束的术语。亮氨酸拉链形成肽是结合形成卷曲螺旋的肽的一个实例。在本发明中形成的卷曲螺旋通常由两个卷曲螺旋形成肽形成。卷曲螺旋通过肽上的 α 螺旋以平行或相反的方向形成(图1A和1B中提供了其例子)。卷曲螺旋的进一步的特征在于在纤维束的核心中填充氨基酸侧链,称为“杵进入臼”(knobs-into-holes),其中来自一个螺旋(杵)的残余物填充到由面向螺旋的四个侧链包围的空间(臼)中。参与杵进入臼相互作用的残基通常是疏水的,而外部残基是亲水的,因此卷曲螺旋序列的侧链的化学性质显示出“成七(heptad)”重复。W02011034605提供了卷曲螺旋形成肽中的成七重复的一致公式(consensus formulae)的实例。

公式1: (X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7) n

X1是疏水性氨基酸或天冬酰胺;

X2、X3和X6是任何氨基酸;

X4是疏水性氨基酸；

X5和X7各自是带电荷的氨基酸残基。

公式2: (X1', X2', X3', X4', X5, X6, X7) n

X1' 是疏水性氨基酸或天冬酰胺；

X2'、X'3和X'6各自为任何氨基酸残基；

X4' 是疏水性氨基酸；

X5' 和X7' 各自是带电荷的氨基酸残基；

其中式1和2中的n大于或等于2；以及

其中第一卷曲螺旋形成肽中的每个成七的重复序列包含与第二卷曲螺旋形成肽中的X'7残基电荷相反X5残基，并且第一卷曲螺旋形成肽中的每个成七的重复序列包含与第二卷曲螺旋形成肽中的X'5残基电荷相反X7残基。卷曲螺旋形成肽中的成七重复可以彼此相同或不同，并同时符合式1或2。

[0055] 卷曲螺旋可以是同二聚体或异二聚体。成对的卷曲螺旋肽的实例为：A2B1GASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSE, SEQ ID NO:66和GASTTVAQLRERVKTLRAQNYELEVQRLREQVAQLA, SEQ ID NO:67; CA2B1EACGASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSE, SEQ ID NO:68和EACGASTTVAQLRERVKTLRAQNYELEVQRLREQVAQLA, SEQ ID NO:69; M11LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRY, SEQ ID NO:26和LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEVQVQRL ENEVSQYETRY, SEQ ID NO:21; CM11EACGALEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRY, SEQ ID NO:39和EACGALEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEVQVQRL ENEVSQYETRY, SEQ ID NO:37, ; M15LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRY, SEQ ID NO:30和LEIEAAFLEQNTALETEVAELEVQVQRL ENEVSQYETRY, SEQ ID NO:28; CM15EACGALEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRY, SEQ ID NO:43和EACGALEIEAAFLEQNTALETEVAELEVQVQRL ENEVSQYETRY, SEQ ID NO:41; Ve1 (Q) GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKL, SEQ ID NO:35和(Q) GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQL, SEQ ID NO:32; CVe1 EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKL, SEQ ID NO:47和EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQL, SEQ ID NO:45; Fos-Jun AGLTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILA AH, SEQ ID NO:70和AGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNY, SEQ ID NO:71; CFos-Jun EACGAGL TDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILA AH, SEQ ID NO:72和EACGAGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNY, SEQ ID NO:73; A4B4GKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQ, SEQ ID NO:74和GEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQ, SEQ ID NO:75; 以及CA4B4EACGAGKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQ, SEQ ID NO:76和EACGAGEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQ, SEQ ID NO:77。

[0056] 成对的卷曲螺旋形成肽的一些实例也示出于表1及图1A和1B中。图1A和1B中所示的序列内的连字符描绘了序列的不同区段。从左到右，序列为卷曲螺旋肽、人工接头、人工接头内的蛋白酶裂解位点和人工接头的其余部分。肽序列可以原样使用，或者它们的组分可以在其他组合中使用。例如，Ve1卷曲螺旋形成肽可以与其它接头序列一起使用。显示为与轻链一起使用的序列也可以与重链一起使用，反之亦然。

[0057] 优选的组合是包含SEQ ID NO:44 (图1B中的CVe1CC) 的氨基酸的肽或由SEQ ID NO:44的氨基酸组成的肽，以提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽，和序列SEQ ID NO:46的肽 (CVe1 CC图1B)：提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链

连接的卷曲螺旋形成肽,反之亦然。包含这些序列的肽可以与本文公开的任何抗体连接。

[0058] 另一个优选的组合是包含SEQ ID NO:31 (Ve1CC)或SEQ ID NO:65 (不含N末端Q)的氨基酸的肽或由SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:65的氨基酸组成的肽,以提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与轻链连接的卷曲螺旋形成肽,和序列SEQ ID NO:34 (Ve1CC)或SEQ ID NO:64 (不含N末端Q)的肽,以提供包含蛋白酶裂解位点的接头和与重链连接的卷曲螺旋形成肽,反之亦然。包含这些序列的肽可以与本文公开的任何抗体连接。

表1:卷曲螺旋形成肽

螺旋名	文献
Fos/Jun	Pluckthun 等, Immunotechnology 1997, 3, 83-105
A3B3	Thomas 等, J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 5161-516
A4B4	Thomas 等, J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 5161-516
IAAL3	Litowski 等, J.Biol. Chem. 2002, 277, 37272-37279
CVel	Arndt 等, Structure 2002 10, 1235-1248; Schmidt, Engineering antibodies for improved targeting of solid tumors, Thesis, 2010
antipO	McClain 等, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3151-3152
dHLX	Pluckthun 等, Immunotechnology 1997, 3, 83-105
Vel	Arndt 等, Structure 2002 10, 1235-1248
A2B1	Arndt 等, Structure 2002 10, 1235-1248
M15	Moll 等, Protein Science 2001, 10, 649-655
M11	Moll 等, Protein Science 2001, 10, 649-655

[0059] 还可以使用与这些肽具有至少80%,90%或95%同一性且仍能够形成卷曲螺旋的这些肽的变体。任何取代优选为保守性取代。优选保留成七的重复模式,由此可以将卷曲螺旋形成肽细分为相邻的(contiguous)成七的片段,其符合例如上文所示的公式,该公式按照氨基酸的类型来分类公式中氨基酸占据的位置。优选地,每个成七的氨基酸中不超过1或2个取代,并且任何这样的取代是保守性取代。

[0060] 在N末端残基是Q的任何卷曲螺旋肽序列中,Q是可选的。在N末端残基不是Q的任何卷曲螺旋肽序列中,可以加入Q形成N末端残基。Q作为N末端残基可以促进信号序列处理。

III. 接头和裂解位点

[0061] 接头可以是任何常规用作连接肽结构域的接头的任何氨基酸区段。合适的接头可以有各种长度,例如1~20、2~15、3~12、4~10、5、6、7、8、9或10。一些这样的接头包括聚甘氨酸区段。一些这样的接头包括一个或多个丝氨酸残基,它们通常位于甘氨酸残基侧面的

位置。其它接头包括一个或多个丙氨酸残基。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对地非结构化,因此可以用作组分之间的中性系链(neutral tether)。与甚至是丙氨酸相比,甘氨酸能够进入显著更多的phi-psi空间,并且与具有更长侧链的残基相比受限更少(参见 Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。一些示例性的接头为S(G)_nS形式,其中n为5~20。其它示例性接头为(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如:(GS)_n、(GSGGS)_n[(GSGGS)为SEQ ID NO:49]和(GGGS)_n[(GGGS)为SEQ ID NO:50],其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。接头的一些实例是Ser-(Gly)₁₀-Ser (SEQ ID NO:51)、Gly-Gly-Ala-Ala (SEQ ID NO:52)、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:24)、Leu-Ala-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO:53)、Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:54)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO:55)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:56)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:57)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:58)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:59)等。

[0062] 蛋白酶位点优选被细胞外表达的蛋白酶识别和裂解,从而使其与掩蔽的抗体接触,释放该掩蔽的抗体并使其与其靶标接触;所述的靶标例如受体的细胞外结构域或可溶性配体。几种基质金属蛋白酶位点(MMP1-28)是合适的。MMP在组织重塑中起作用,并且涉及肿瘤过程,例如形态发生、血管生成和转移。一些示例性的蛋白酶位点是PLG-XXX (SEQ ID NO:60) (MMP的众所周知的内源序列)、PLG-VR (SEQ ID NO:23) (WO2014193973)、IPVSLR (SEQ ID NO:33) (Turk等, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:61) (Cytomyx)、GPLGVR (SEQ ID NO:62) (Chang等, Clin. Cancer Res. 2012 Jan 1; 18(1):238-47)、VPMS-MRGG (MMP1, SEQ ID NO:78)、RPFS-MIMG (MMP3, SEQ ID NO:79)、IPES-LRAG (MMP14, SEQ ID NO:80)、-VPLS*LTMG (SEQ ID NO:81) (Turk等, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667)。其他示例性蛋白酶位点是PLGLAG (SEQ ID NO:82)、LALGPG (SEQ ID NO:83)和YGRAA (SEQ ID NO:84)。

[0063] 在早期工作中提供了另外的实例,例如US2013/0309230、WO2009/025846、WO2010/081173、WO2014/107599、WO2015/048329、US20160160263和Ratnikov等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:E4148-E4155 (2014)。

[0064] 图1A和1B示出了附着于包括蛋白酶位点的接头的卷曲螺旋形成肽的一些实例。这些肽的组分由连字符分开(即:卷曲螺旋形成肽-接头的左侧部分-蛋白酶位点-接头的右侧部分)。

IV. 针对卷曲螺旋的抗体和抗体连接(linkage of antibodies)

[0065] 卷曲螺旋形成肽通过包括蛋白酶位点的接头与抗体可变区的N末端连接。典型的抗体包括重链可变区和轻链可变区,在这种情况下,卷曲螺旋形成肽与每个的N末端连接。二价抗体具有两个结合位点,其可以是相同的或不同的。在正常的单特异性抗体中,结合位点是相同的,并且抗体具有两个相同的轻链和重链对。在这种情况下,每条重链与相同的卷曲螺旋形成肽连接,且每条轻链与相同的卷曲螺旋形成肽(其可以与连接至重链的肽相同或不同)连接。

[0066] 在双特异性抗体中,结合位点是不同的并且由两个不同的重链和轻链对形成。结合位点可以对同一靶标上的不同靶标或不同表位具有特异性。如果结合位点对不同靶标具有特异性,则靶标可以在相同细胞(例如,癌细胞上的两种不同表面抗原)或两种不同细胞

(例如,癌细胞上的一种表面抗原和免疫细胞,例如T细胞,上的一种表面抗原)上。例如,双特异性抗体的一个结合位点可针对CD3或4-1BB。

[0067] 在双特异性抗体中,一个结合位点的重链和轻链可变区可以分别与卷曲螺旋形成肽连接。另一结合位点的重链和轻链可变区可能或可能不与卷曲螺旋肽连接。如果两个结合位点的重/轻对都与卷曲螺旋肽连接,则通常两个重链可变区与两个轻链可变区均与相同类型的卷曲螺旋形成肽连接。在例如两个结合位点对同一肿瘤上的表面抗原具有特异性时,对两个结合位点的掩蔽可能是有用的;在例如一个结合位点对肿瘤表面抗原具有特异性而另一个对免疫细胞上的表面抗原具有特异性时,对一个(而非两个)结合位点的掩蔽可能是有用的。可以掩蔽对肿瘤表面抗原或免疫细胞抗原具有特异性的结合位点。一些对肿瘤表面抗原和免疫细胞都具有特异性的双特异性抗体具有两个位点的掩蔽。

[0068] 如上所述,卷曲螺旋形成肽通过包含蛋白酶位点的接头与抗体可变区连接。通常,具有相同蛋白酶裂解位点的相同接头用于将抗体的每个重链或轻链可变区与卷曲螺旋肽连接。蛋白酶裂解位点应易于在预期的靶标组织或病理(例如癌症)中通过细胞外存在的蛋白酶裂解,使得接头裂解并将抗体从掩蔽其活性的卷曲螺旋中释放,从而允许抗体结合其预期靶标,例如细胞表面抗原或可溶性配体。

[0069] 除可变区外,掩蔽的抗体通常包括恒定区的全部或部分,其可包括轻链恒定区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区中的任何一个或全部。与其它抗体一样,可以对一个或多个C末端残基进行蛋白水解加工或衍生化(derivatized)。

[0070] 卷曲螺旋可以由形成同二聚体的相同肽形成或由形成异二聚体的两种不同肽形成。为了形成同二聚体,轻链抗体链和重链抗体链与同一个卷曲螺旋形成肽连接。为了形成异二聚体,轻链抗体链和重链抗体链与不同的卷曲螺旋肽连接。对于一些卷曲螺旋形成肽对,优选地,所述肽对中的一个与重链连接,另一个与抗体的轻链连接,尽管反向也是可能的。

[0071] 每条抗体链可以连接到单个卷曲螺旋形成肽或与多个这种肽串联连接(例如,肽的两个,三个,四个或五个拷贝)。如果是后者,串联连接的肽通常是相同的。此外,如果使用串联连接,轻链和重链通常与相同数量的肽连接。

[0072] 抗体链与卷曲螺旋形成肽的连接可以将抗体的结合亲和力降低例如至少10、50、100、200、500、1000、1500、2000、4000、5000或10,000倍(相对于没有这种连接或在这种连接裂解后的相同抗体而言)。在一些此类抗体中,结合亲和力降低50-10,000、50-5000、50-4000、50-1000、100-10,000、100-5000、100-4000、200-10,000、200-5000、50-1500、100-1500、200-1500、200-1000、500-1500、50-1000、100-1000、200-1000、500-1000、50-500、100-500倍。由于与抗体药物偶联物中的药物连接,抗体的效应物功能(例如ADCC、吞噬作用和CDC或细胞毒性)可以以相同的因子或范围减少。在蛋白水解裂解以解除对抗体的掩蔽时,与其它方面相同但从未被掩蔽的对照抗体相比,恢复的抗体可以具有在实验误差内因子为5、2、1.5,或优选不变的亲和力或效应物功能。

V. 抗体药物偶联物

[0073] 除了与裸抗体的连接之外,卷曲螺旋形成肽可以与偶联至细胞毒性或细胞抑制性部分的抗体连接,成为抗体药物偶联物(ADC)。与裸抗体相比,ADC提供额外的机制,特别是将与抗体连接的毒性部分递送至细胞内部,从而杀死细胞或抑制其增殖。目前市场上销售

两种ADC:brentuximab vedotin(抗CD30;商品名:ADCETRIS®,由西雅图基因公司(Seattle Genetics)和千禧/武田(Millennium/Takeda)销售)和trastuzumab emtansine(抗HER2,商品名:Kadcyla®,由基因泰克公司(Genentech)和罗氏销售)。许多其他ADC处于不同的开发阶段。

[0074] 用于将药物与抗体偶联的技术是众所周知的(参见,例如,Arnon等,《用于癌症治疗中药物免疫靶向的单克隆抗体》(“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs in Cancer Therapy”);《单克隆抗体和癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Reisfeld等编辑,Alan R.Liss,Inc.,1985);Hellstrom等,“用于药物递送的抗体(Antibodies For Drug Delivery)”,在《受控药物递送》中(Controlled Drug Delivery,Robinson等编辑,Marcel Dekker,Inc.,第2版,1987);Thorpe,“癌症治疗中细胞毒性剂的抗体载体:综述(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review)”,在《单克隆抗体’84:生物学和临床应用》中(Monoclonal Antibodies ‘84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等编辑,1985);“放射性标记抗体在癌症治疗中的治疗应用的分析、结果和未来前景(Analysis,Results,and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”,在《用于癌症检测和治疗的单克隆抗体》中(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等编辑,Academic Press,1985);和Thorpe等,1982,Immunol.Rev.62:119-58。还参见例如WO 89/12624)。

[0075] 药物通常通过赖氨酸侧链上的氨基或半胱氨酸侧链上的游离巯基偶联。半胱氨酸残基可以天然存在于抗体中(例如链间二硫键)或通过诱变引入。半胱氨酸含有游离巯基,其比胺更亲核,并且通常是蛋白质中反应性最强的官能团。与大多数胺类不同,巯基通常在中性pH下具有反应性,因此可以在胺存在下选择性地与其他分子连接。该选择性使得巯基成为连接抗体所选用的接头。每分子抗体的药物分子的平均数通常为1、2、3、4、5、6、7或8,例如2-8或3-8。

[0076] 药物可以以降低其活性的方式偶联,除非它从抗体上裂解(例如,通过水解、通过抗体降解或通过裂解剂)。这样的药物通过可裂解的接头与抗体连接,所述可裂解的接头对靶细胞的细胞内环境中的裂解敏感,但对细胞外环境基本上不敏感;这使得当偶联物被靶细胞内化时(例如,在内体中或例如由于pH敏感性或蛋白酶敏感性,在溶酶体环境中或在胞膜窖(caveolar)环境中),偶联物从抗体上裂解下来。

[0077] 通常,ADC包含药物和抗体之间的接头区域。接头在细胞内条件下可以是可裂解的,使得接头的裂解在细胞内环境中(例如,在溶酶体中或内体中胞膜窖内)自抗体释放药物。接头可以是例如被细胞内的肽酶或蛋白酶(包括溶酶体或内体蛋白酶)裂解的肽基接头。通常,肽基接头至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。裂解剂可包括组织蛋白酶B和D以及纤溶酶(参见,例如,Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123)。最典型的是肽基接头,其可被靶细胞中存在的酶裂解。例如,可以使用可被组织蛋白酶B,一种在癌组织中高度表达的巯基依赖性蛋白酶,裂解的肽基接头(例如,包含Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:63)肽的接头)。其它此类接头在例如US 6,214,345中描述。可被细胞内蛋白酶裂解的示例性肽基接头包含Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如US 6,214,345,其描述了用Val-Cit接头合成多柔比星)。使用药物的细胞内蛋白酶释放的一个优

点是当偶联时,剂(agent)通常减弱,并且偶联物的血清稳定性通常很高。

[0078] 可裂解的接头可以是pH敏感的,即在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头在酸性条件下是可水解的。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如脲、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺式乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等,参见,例如,US 5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm. Therapeutics83:67-123;Neville等,1989,Biol.Chem 264:14653-14661)。这种接头在中性pH条件下(例如血液中)相对稳定,但在pH5.5或5.0以下(溶酶体大概的pH值)不稳定。这种可水解的接头的实例是硫醚接头(例如,通过酰基脲键与药物连接的硫醚(参见,例如,US 5,622,929))。

[0079] 其它接头在还原条件下可裂解(例如二硫键接头)。二硫化物接头包括可以使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫基乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯),SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB和SMPT(参见,例如,Thorpe等,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak等,在《免疫偶联物:放射成像和癌症治疗中的抗体偶联物》(Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer,CW Vogel编,Oxford U.Press,1987);还参见美国专利No.4,880,935)形成的二硫化物接头。

[0080] 接头也可作为丙二酸接头(Johnson等,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304),或3'-N-酰胺类似物(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0081] 接头也可以是不可裂解的接头,例如直接连接到药物(例如药物)上的马来酰亚胺-亚烷基-或马来酰亚胺-芳基接头。通过抗体的降解释放活性药物-接头。

[0082] 接头为包含对抗体上存在的基团具有反应性的官能团的接头。例如,接头可以通过接头的硫原子和抗体的硫原子之间的二硫键与抗体连接。作为另一个例子,接头可以通过延伸体单元(Stretcher Unit)的马来酰亚胺基团与抗体的硫原子形成键。硫原子可以来自链间二硫化物的半胱氨酸残基或来自引入抗体的半胱氨酸残基。

[0083] 与抗体偶联的细胞毒性剂的有用类别(classes)包括,例如,抗微管蛋白剂、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、化学疗法增敏剂、吡咯并苯并二氮杂二聚体等。其它示例性的细胞毒性剂类别包括蒽环霉素、奥里斯他汀(auristatin)、喜树碱、倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊苷、美登木素生物碱和长春花生物碱。一些示例性的细胞毒性剂包括奥里斯他汀(例如奥里斯他汀E、AFP、MMAF、MMAE),DNA小沟结合剂(例如烯二炔类(enediynes)和来西菌素(lexitropsins)),多卡米星、紫杉烷类(例如紫杉醇和多西紫杉醇)、长春花生物碱、多柔比星、吗啉代-多柔比星(morpholino-doxorubicin)和氰基吗啉代-多柔比星(cyanomorpholino-doxorubicin)。

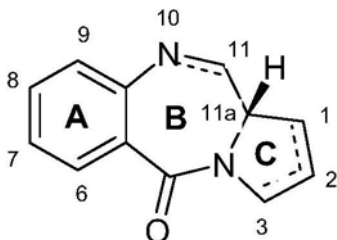
[0084] 细胞毒剂可以是化学治疗剂,例如阿霉素、紫杉醇、美法仑、长春花生物碱、甲氨蝶呤、丝裂霉素C或依托泊苷。该细胞毒剂还可以是CC-1065类似物、加利车霉素、美登素、多拉司他汀10的类似物、根瘤毒素或岩沙海葵毒素(palytoxin)。

[0085] 细胞毒剂也可以是奥里斯他汀。奥里斯他汀可以是奥里斯他汀E衍生物,例如在奥里斯他汀E和酮酸之间形成的酯。例如,奥里斯他汀E可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其它典型的奥里斯他汀包括AFP、MMAF和MMAE。各种奥里斯他

汀的合成和结构在例如US 2005-0238649和US2006-0074008中描述。

[0086] 细胞毒剂可以是DNA小沟结合剂(参见,例如,US 6,130,237)。例如,该小沟结合剂可以是CBI化合物或烯二炔类(例如加利车霉素)。另一类小沟结合剂是吡咯并苯并二氮杂(PBD)二聚体。PBD通过其N10-C11亚胺/碳酰胺部分共价结合到DNA小沟内的鸟嘌呤残基的C2-氨基位置,从而发挥其生物活性。

[0087] PBD的结构通式如下:



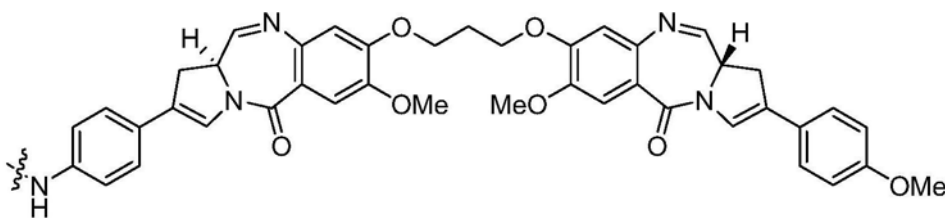
[0088] 它们在芳族A环和吡咯并C环中的取代基的数量、类型和位置以及C环的饱和度方面不同。在B环中的N10-C11位置为亚胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲基醚(NH-CH(OMe)),其为负责烷基化DNA的亲电子中心。所有已知的天然产物在手性C11a位点具有S构型,当从C环看向A环时,这为它们提供了右手扭曲(right-handed twist)。这使得它们具有与B型DNA的小沟具有相同螺旋(isohelicity)的适当三维形状,导致在结合位点处形成紧密吻合。PBD在小沟中形成加合物的能力使它们能够干扰DNA加工,因此它们用作抗肿瘤剂。

[0089] 这些分子的生物活性可以通过将两个PBD单位通过其C8/C'-羟基官能团利用灵活的烯炔基接头结合在一起增效。PBD二聚体被认为形成序列-选择性(sequence-selective)DNA损伤,如回文(palindromic)5'-Pu-GATC-Py-3'链间交联(其被认为是其生物活性的主要原因)。

[0090] 在一些实施例中,基于PBD的抗体-药物共轭物包含一个与抗体连接的PBD二聚体。形成PBD二聚体的单体可以是相同的或不同的,即对称的或非对称的。所述PBD二聚体可与抗体在任何适于与接头偶联的位点连接。例如,在一些实施例中,所述PBD二聚体将具有一个在C2位点的取代,其提供了用于连接所述化合物与所述抗体的锚点(anchor)。在替代实施例中,所述PBD二聚体的位点N10将提供用于连接所述化合物与所述抗体的锚点。

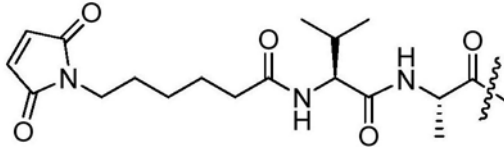
[0091] 基于PBD的抗体-药物偶联物通常包含PBD药物和结合原发癌抗原的抗体之间的接头。所述接头可包含可裂解单位(例如氨基酸或连续的氨基酸序列,其为酶的目标底物)或不可裂解的接头(例如,抗体降解释放的接头)。所述接头可进一步包含用于与抗体连接的马来酰亚胺基团,例如马来酰亚胺己酰基。在一些实施例中,所述接头可以进一步包含自毁型基团,例如对氨基苯甲醇(PAB)单位。

[0092] 用作偶联物的示例性PBD描述于W02011/130613中,并且如下所示,其中波浪线表示与接头连接的位点:

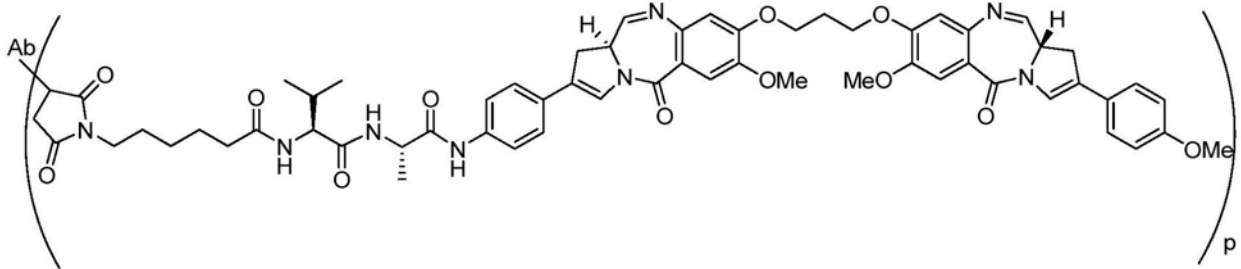


或其药学上可接受的盐。示范性的接头如下所示,其中波浪线显示与所述药物的结合

位点并且所述抗体通过所述马来酰亚胺基团连接。



[0093] 示例性的基于PBD的抗体-药物偶联物包括以下所示的抗体-药物偶联物,其中Ab是本文所述的抗体:

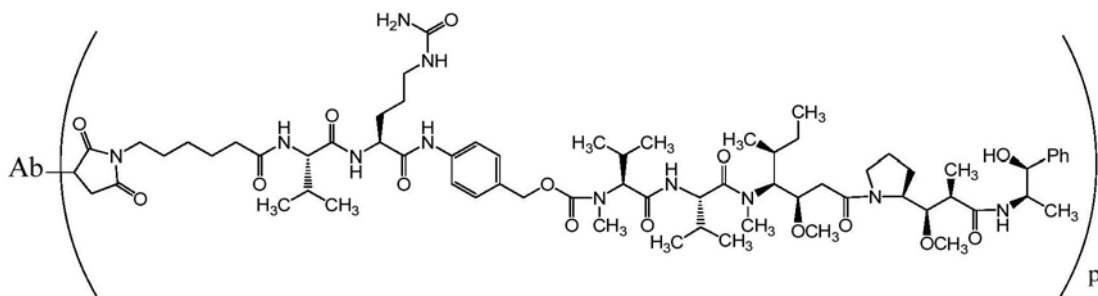


或其药学上可接受的盐。载药量由p表示,即每抗体的药物-接头分子的数量。

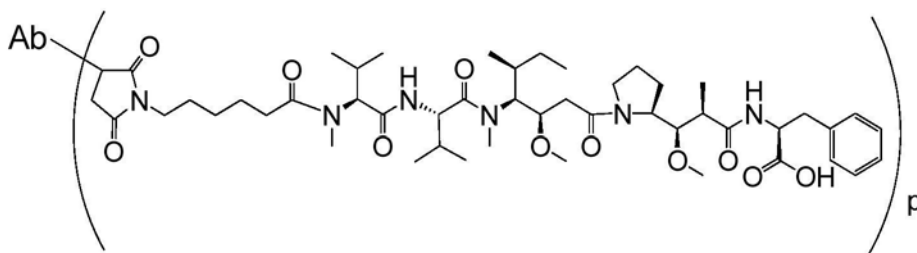
[0094] 细胞毒性或细胞抑制剂可以是抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的实例包括,例如,紫杉烷类(例如, Taxol® (紫杉酚)、Taxotere® (多西他赛))、T67 (Tularik), 长春花生物碱类(例如, 长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨), 和奥里斯他汀(例如奥里斯他汀E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。示例性的奥里斯他汀如下文的式III-XIII所示。其他合适的抗微管蛋白剂包括,例如, 浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(例如埃博霉素A和B)、诺考达唑、秋水仙碱和秋水仙胺 (colcemid)、雌莫司汀、隐藻素 (cryptophysins)、西马多丁, 美登木素、考布他汀、discodermolide, 和软珊瑚醇。

[0095] 细胞毒性剂可为美登木素,另一类的抗微管蛋白剂。例如,美登木素可为美坦辛或含美坦辛的药物接头,例如DM-1或DM-4 (ImmunoGen, Inc.; 还见Chari等, Cancer Res. 52: 127-131)。

[0096] 示例性的抗体药物偶联物包括下文所示的vcMMAE和mcMMAF抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中p代表载药量,并为1至20, Ab为抗体:



vcMMAE



mcMMAF

VI. 靶标

[0097] 抗体包括非人、人源化、人类,嵌合和镶嵌抗体、纳米抗体、dAb、scFV's、Fabs等。一些此类抗体对癌细胞抗原是免疫特异性的,优选为在细胞表面上,并在抗体结合时可内化至细胞内。可以引导抗体的靶标包括癌细胞上的受体及其配体或反受体(例如CD3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD40、CD44、CD52、CD70、CD79a、CD123、Her-2、EphA2、淋巴细胞相关抗原1、VEGF或VEGFR、CTLA-4、LIV-1、nectin-4、CD74和SLTRK-6)。

[0098] 适用于本发明方法的应用的商业抗体及其靶标的一些实例包括本妥昔单抗(brentuximab/brentuximab vedotin)、CD30、阿仑单抗、CD52、利妥昔单抗、CD20、曲妥珠单抗Her/neu、尼妥珠单抗、西妥昔单抗、EGFR、贝伐单抗、VEGF、帕利珠单抗、RSV、阿昔单抗、GpIIb/IIIa、英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗TNF- α 、巴利昔单抗、达利珠单抗、IL-2、奥马珠单抗、IgE、吉妥珠单抗(gemtuzumab)或vadastuximab、CD33、那他珠单抗、VLA-4,维度丽珠单抗(vedolizumab) α 4 β 7、贝利木单抗、BAFF、欧特利克斯株单抗(otelixizumab)、特普利株单抗(teplizumab)CD3、奥法木单抗、奥瑞珠单抗CD20、依帕珠单抗CD22、阿仑单抗(alemtuzumab)CD52、艾库组单抗C5、卡纳单抗IL-1 β 、美泊利单抗IL-5、瑞利珠单抗、托珠单抗IL-6R、优特克单抗、布雷奴单抗(briakinumab)IL-12,23、hBU12(CD19)(US20120294853)、人源化1F6或2F12(CD70)(US20120294863)、BR2-14a和BR2-22a(LIV-1)(W02012078688)。序列表中提供了一些示例性抗体的序列。

VII. 药物组合物和治疗方法

[0099] 根据上述方法产生的掩蔽抗体(包括掩蔽的裸抗体和ADC)以有效方案给药,即意指能够延迟发作、降低严重性、抑制进一步恶化和/或改善其打算治疗的疾病的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和使用频率,所述打算治疗的疾病为,例如癌症、自身免疫疾病或包括上述的任何指征(indication)的感染。如果患者已经患有该疾病,则可以将该方案称为有效治疗方案。如果患者相对于一般人群患病风险较高但尚未出现症状,则可将该方案称为有效预防方案。在一些情况下,相对于历史对照或同一患者的过去经历,可以在个体患者中观察到治疗或预防功效。在其它情况下,相对于未治疗患者的对照群体,可以在接受治疗的患者群体中的临床前或临床试验中证明治疗或预防功效。

[0100] 掩蔽抗体的示例性剂量是1mg/kg至100mg/kg、5mg至50mg/kg、10mg至25mg/kg、1mg/kg至7.5mg/kg,或2mg/kg至7.5mg/kg或3mg/kg至7.5mg/kg受试者的体重,或0.1至20,或0.5至5mg/kg体重(例如,0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg)或作为固定剂量的10至15000、200至15000或500至10,000mg。在一些方法中,每三周或向患者给药一次或更多次,剂量为至少1.5mg/kg、至少2mg/kg,或至少为在3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg或9mg/kg或10mg/kg中的任何剂量。掩蔽的活性单克隆抗体药物偶联物(例如奥里斯他汀)的示例性剂量为1mg/kg至7.5mg/kg,或2mg/kg至7.5mg/kg或3mg/kg至7.5mg/kg受试者的体重,或0.1至20,或0.5至5mg/kg体重(如,0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10毫克/千克)或作为固定剂量的10至1500或200至1500mg。高活性掩蔽的单克隆抗体药物偶联物(例如PBD)的示例性剂量为1.0 μ g/kg至1.0mg/kg,或1.0 μ g/kg至500.0 μ g/kg受试者的体重。在一些方法中,每两周、三周或四周向患者施用掩蔽的ADC。剂量取决于给药频率、患者的状况和对先前治疗的反应(如果有的话)、治疗是预防性的还是治疗性的,以及该疾病是急性的还是慢

性的,以及其他因素。剂量还取决于降低的结合、效应物功能或细胞毒性。通常,与没有掩蔽的相同抗体相比,可以施用更大剂量的掩蔽抗体。

[0101] 给药可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌肉内。给药也可以直接定位(localized),例如进入肿瘤。通过静脉内或皮下给药进入体循环是优选的。静脉内给药可以是,例如,通过30-90分钟的输液或通过单次推注注射。

[0102] 给药频率取决于循环中的掩蔽抗体的半衰期、患者的病情和给药途径,以及其他因素。频率可以是每日、每周、每月、每季度或响应患者病情的变化或所治疗的癌症的进展的不定期。用于静脉内给药的示例性频率是在连续治疗过程中的由每周两次到每季度,尽管也可以更频繁或更不频繁地给药。用于静脉内给药的其它示例性频率为在连续治疗过程中的每周或每四周中的三次,尽管也可以更频繁或更不频繁地给药。对于皮下给药,示例性的给药频率是每日至每月,尽管也可以更频繁或更不频繁地给药。

[0103] 给药的剂量的数量取决于疾病的性质(例如是否呈现急性或慢性症状)和疾病对治疗的反应。对于急性病症或慢性病症的急性加重,1至10剂量通常就足够了。有时单次推注剂量(可选地以分开的形式)足以用于急性病症或慢性病症的急性恶化。在急性病症的复发或急性发作时,可以重复治疗。对于慢性病症,可以定期给予抗体,例如每周、每两周、每月、每季度、每六个月给予至少1年、5年或10年,或患者的一生。

[0104] 用于肠胃外给药的药物组合物优选是无菌的并且基本上是等渗的(240-360mOsm/kg)并且在GMP条件下制备。药物组合物可以以单位剂型提供(即单次给药的剂量)。可以使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂配制药物组合物。配方取决于所选择的给药途径。对于注射,可以将掩蔽的抗体配制在水溶液中,优选在生理上相容的缓冲液中,例如Hank溶液、Ringer溶液或生理盐水或乙酸盐缓冲液(以减少注射部位的不适)。溶液可含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可以是冻干形式,用于在使用前用合适的载体(例如无菌无热原水)构建。液体制剂中抗体的浓度可以是例如1-100mg/ml,例如10mg/ml。

[0105] 用本发明的掩蔽抗体治疗可以与化疗、放射、干细胞治疗、手术、抗病毒、抗生素、免疫抑制或兴奋剂,或能有效对抗所治疗病症的其他治疗方法相结合。可与ADC一起用于治疗癌症或自身免疫疾病的其他药剂的有用类别包括,例如,在癌细胞上表达的其他受体的抗体、抗微管蛋白剂(例如奥里斯他汀)、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、烷基化药剂(如铂配合物,如顺铂、单(铂)、双(铂)和三核铂配合物和卡铂)、蒽环类抗生素、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢物、化疗增敏剂倍癌霉素、依托泊苷、氟化嘧啶、离子载体,lexitropsins、亚硝基脲、platinols、预形成化合物、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、放射增敏剂、类固醇、紫杉烷类、拓扑异构酶抑制剂,长春花生物碱等。

[0106] 与相同的、但不适用掩蔽抗体的治疗方法(例如,化学疗法)相比,使用掩蔽抗体治疗可以使患有肿瘤的患者中位无进展生存时间(median progression-free survival)或总生存时间增加至少30%或40%,但优选为50%、60%至70%或甚至100%或更长。另外或可替代地,与相同的、但不适用掩蔽抗体的治疗方法(例如,化学疗法)相比,使用掩蔽抗体的治疗(例如,标准化疗)可以使肿瘤患者的完全缓解率、部分缓解率或客观缓解率(完全+部分)增加至少30%或40%,但优选地为50%、60%至70%或甚至100%。

[0107] 通常,在临床试验(例如,II期、II/III期或III期试验)中,相对于仅接受标准疗法

(或加安慰剂)的患者的对照组,前述的接受标准治疗加掩蔽抗体的患者的中位无进展生存时间和/或缓解率的增加具有统计学显著性,例如在 $p=0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 水平。完全和部分缓解率由癌症临床试验中常用的客观标准确定,例如由国家癌症研究所和/或食品和药物管理局列出或接受。

[0108] 尽管为了清楚理解的目的已经详细描述了本发明,但显然可以在所附权利要求的范围内实施某些修改。本申请中引用的所有出版物、登录号、网站、专利文献等均出于所有目的通过引用整体并入本文,其程度如同各自单独表示。如果一个引用与不同时间的不同的信息相关联,则意指的是该申请的有效提交日期。有效提交日期是公开有关登记号的最早优先权申请的日期。除非从上下文中明显可知,否则本发明的任何要素、实施方案、步骤、特征或方面可以任意地组合执行。

实施例

实施例1:掩蔽抗体的制备和表征

[0109] 除非另有说明,否则所有化学品均购自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)。除人类MMP2(义翘神州(Sino Biological))外,所有蛋白酶均购自R&D Systems。除非另有说明,否则蛋白酶抑制剂均购自EMD Millipore。根据先前的报道(Jeffrey等,Bioconjugate Chemistry,2013,24,1256-1263)制备含有马来酰亚胺的吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)-接头。根据CD19研究(例如US20120294853)中的报道,制备Mc-MMAF-接头。

抗体生产

[0110] 对Expi HEK细胞、Expi-CHO细胞或CHO-DG44细胞通过瞬时转染或稳定转染表达抗体,并使用MabSelect SuRe柱(GE Healthcare)、尺寸排阻色谱和蛋白后A方法(post-Protein A method)纯化。产生的每种抗体在重链恒定区含有工程化半胱氨酸(S239C)。S239C恒定区突变体的名称包括名称ec。序列表中提供了抗体序列。

抗体的荧光标记

[0111] 使用Alexa Fluor488或647NHS Ester(Life Technologies,A20000,A20006),按照供应商的说明书对抗体进行荧光标记。简而言之,将抗体(1eq)与荧光团(4eq)在pH8和室温(RT)下培养1小时。使用Nap5柱(GE Healthcare Life Sciences,17-0853-02)纯化荧光抗体,并使用UV-Vis(安捷伦)测量荧光团载量。典型的荧光团负载量为每个抗体3-5个荧光团。

竞争性结合试验

[0112] 为了评估掩蔽抗体的细胞结合,将 2×10^5 个指示的细胞(indicated cells)(Raji,Ramos,PC3,Daudi)与荧光标记的亲本抗体混合;所述荧光标记的亲本抗体与染色缓冲液(PBS,2%FBS,0.2%NaN₃)中的竞争物(掩蔽抗体)的连续稀释液混合。将样品在冰上培养1小时,并用冰冷的染色缓冲液洗涤两次。通过流式细胞术在BD LSRII上检查标记的细胞,门控(gated)排除非存活细胞,并使用Flowing Software(图尔库大学生物技术中心(Turku Center for Biotechnology))进行分析。使用GraphPad Prism 6计算IC₅₀。

[0113] 使用卷曲螺旋阻断结构域(blocking domain)测试四种抗体(针对CD19的hBU12、针对抗原1的抗抗原1抗体(cAg-1)、针对EphA2的1C1和针对CD74的HuMab CD74-011)。抗体CD74包含轻链(SEQ ID NO:1)和重链(SEQ ID NO:2)。A3B3、A4B4、CvE1、antiP0和dHLX的序列在N末端与抗体的轻链和重链融合。为了测试结合,使用基于FAC的竞争测定来说明取代

亲本抗体所需的高浓度竞争剂,结果列于表2~5中。可以与卷曲螺旋肽偶联的其他抗体是SEQ ID NO:3~19。SEQ ID NO:3是hBU12重链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:4是hBU12轻链可变区的氨基酸序列。SEQ ID NO:5是2H12LG轻链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:6是2H12H1重链可变区的氨基酸序列。SEQ ID NO:7是轻链恒定区的氨基酸序列;PRT/1;智人。SEQ ID NO:8是CH1-CH3的氨基酸序列;PRT/1;智人。SEQ ID NO:9是重链CH1-CH3的氨基酸序列(无c-term K);PRT/1;智人。SEQ ID NO:10是S239C重链CH1-CH3的氨基酸序列;PRT/1;智人。SEQ ID NO:11是S239C重链CH1-CH3的氨基酸序列(无c-term K);PRT/1;智人。SEQ ID NO:12是h7G3、CD123Ab的重链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:13是h7G3、CD123Ab的轻链可变区的氨基酸序列。SEQ ID NO:14是H1F6轻链可变区CD70Ab的氨基酸序列,SEQ ID NO:15是H1F6重链可变区CD70 Ab。SEQ ID NO:16是人源化20F3LD、CD352Ab的成熟轻链可变区的氨基酸序列,并且SEQ ID NO:17是人源化20F3HD、CD352Ab的成熟重链可变区的氨基酸序列。SEQ ID NO:18是hLiv1 mAb2 HG的氨基酸序列;PRT/1;人工,SEQ ID NO:19是hLiv1 mAb2 LG的氨基酸序列;PRT/1;人工。

表2:与Raji细胞结合的各种掩蔽抗体的IC₅₀值

MAb	IC ₅₀ (nM)	倍数变化
hBU12ec	3.6	--
A3B3 hBU12ec	298	83
A4B4 hBU12ec	>1000	>300
Cve1 hBU12ec	>1000	>300
Antip0 hBU12ec	138	38
dHLX hBU12ec	>1000	>300
铰链hBU12ec	971	269
铰链不可裂解hBU12ec	602	167

表3:与Ramos细胞(抗原-1mAb)结合的各种掩蔽抗体的IC₅₀值

mAb	IC ₅₀ (nM)	倍数变化
cAg-1ec	1.3	--
铰链cAg-1ec	60	46
A3B3 cAg-1ec	45	34
A4B4 cAg-1ec	1205	927
Cve1 cAg-1ec	1389	1068
antip0 cAg-1ec	34	26
dHLX cAg-1ec	302	233

[0114] 在CD19阳性Raji细胞上评估掩蔽的hBU12抗体的结合。测试了各种卷曲螺旋(例如A3B3、A4B4、antip0和dHLX)以及铰链阻断剂(hinge blocker);参见,例如,表1和W02014/193973。对于平行同源二聚体阻断结构域,卷曲螺旋亲和力和阻断能力之间存在明显的区别。A3B3(微摩尔亲和螺旋)使抗体结合降低83倍,而较高亲和力的飞摩尔和共价螺旋(A4B4和Cve1)使结合降低超过300倍。反平行螺旋(antip0)没有阻断,结合降低38倍。螺旋-转角-螺旋阻断结构域(dHLX)显示出降低超过300倍的结合,并且铰链阻断剂降低269倍。在hBu12示例中,与其他螺旋和铰链相比,A3B3和antip0螺旋阻断较少,但难以解析剩余域的阻断能

力。

[0115] 掩蔽的cAg-1抗体提供了对卷曲螺旋的阻断能力的更清晰的观察。较链、A3B3和anti0阻断的cAg-1抗体阻断结合20至50倍。dHLX阻断的cAg-1能够将结合降低233倍。两个亲和力最高的卷曲螺旋,A4B4和CVe1,显示出最高的倍数变化:结合减少约1000倍。根据这些数据,具有高亲和力的平行螺旋显示出最佳的阻断能力,并且已将其向前推进,以进一步测试其它抗体。

[0116] 针对EphA2测试1C1的实验以及针对CD74测试HuMab-CD74-011的实验均显示抗体难以阻断。CVe1掩蔽结构域将1C1的结合降低43倍,将HuMab-CD774-01的结合降低26倍。dHLX掩蔽结构域使1C1与EphA2的结合降低16倍,并且较链阻断剂使HuMab-CD74-011与CD74的结合降低14倍。所测试的剩余的掩蔽结构域不能改变抗体的结合(变化为0.6至6)。为了改进阻断组(blocking panel),设计了第二代卷曲螺旋掩蔽域。

[0117] 第二代阻断结构域全部是平行的卷曲螺旋,其两个肽之间具有纳摩尔级别或更高的亲和力。另外,为了测试N末端二硫化物对阻断能力的贡献,每个卷曲螺旋设计有N末端半胱氨酸。将四个新的卷曲螺旋对(具有和不具有N末端半胱氨酸)和Ve1(无半胱氨酸的CVe1)附加至针对抗原1的抗体并测试阻断。全部的五个卷曲螺旋对(具有和不具有N末端半胱氨酸)能够使抗体的结合降低>200倍。这些结合实验表明,在螺旋平行并具有纳摩尔级别或更高的亲和力的情况下,基于卷曲螺旋的掩蔽域通常是成功的。

饱和度结合实验(Saturation Binding Experiments)

[0118] 将 2×10^5 个指示的细胞(Raji, SW780, HT1080)与指示的抗体的连续稀释液在染色缓冲液(PBS, 5%FBS, 0.2%NaN₃)中混合。将样品在冰上培养1小时,并用冰冷的染色缓冲液洗涤两次。将细胞用抗人IgG-AF647(Jacksonimmuno,在染色缓冲液中以1:200稀释)在冰上重悬浮1小时。用冰冷的染色缓冲液洗涤细胞两次,并重悬于染色缓冲液中。通过流式细胞术在BD LSRII上检查标记的细胞,门控排除非存活细胞,并使用Flowing Software(图尔库大学生物技术中心)进行分析。使用GraphPad Prism 6计算Kd。

[0119] 还使用基于FAC的饱和结合测定法测定第二代掩蔽的cAg-1抗体与抗原1阳性Raji细胞测试的结合。如表4和图4所示,根据所用的卷曲螺旋对,cAg-1的阻断是可变化的。A2B1cAg-1将结合降低101倍,M15降低201倍,Ve1降低279倍。M11和Fos/Jun分别将结合降低了520倍和472倍。对于M11和M15而言,添加N末端二硫化物没有明显的优势,其导致结合的较低倍数的差异。对于A2B1,添加N末端连接使结合的减少加倍。

[0120] 还在HT1080细胞和SW780细胞中进行了类似的研究。在表6和7中总结了Kd值。在一些情况下,观察到可能是由于卷曲螺旋结构域与细胞表面相互作用而导致的非特异性结合。因此,不能准确地确定Kd,并且这些情况表示为*N/A。如表5中的HT1080细胞所示,A2B1cAg-1使结合减少514倍,M15cAg-1减少549倍,M11cAg-1减少1336倍。添加N末端二硫化物对A2B1和M15而言没有明显的优势。如表6中的SW780细胞所示,A2B1cAg-1使结合减少101倍,M15cAg-1减少153倍,M11cAg-1减少216倍,Ve1减少252倍。

[0121] 还通过流式细胞术在HT1080、HCT116和SW780细胞系上评估未掩蔽的和卷曲螺旋掩蔽的抗人Ag2抗体的结合。将增加浓度的每种掩蔽抗体加入抗原阳性细胞中,并在冰上培养30分钟。使用荧光团标记的抗人Fc抗体检测结合的抗体,并使用GraphPad Prism绘制数据。Kd值总结在表8~10中。如表7中的HT1080细胞所示,A2B1cAg-2、M15cAg-2、M11cAg-2和

VelcAg-2使结合减少至少95倍。通过比较在三种不同细胞系中使用CVel或Vel卷曲螺旋掩蔽抗Ag2的效果,数据显示Vel卷曲螺旋抑制结合的程度大于CVel(图7A-C)。

表4:与Raji细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
cAg-1ec	0.3	1
A2B1 cAg-1ec	33.0	101
M15 cAg-1ec	65.5	201
M11 cAg-1ec	169.5	520
Fos/Jun cAg-1ec	153.9	472
Vel cAg-1ec	90.9	279
CA2B1 cAg-1ec	73.2	224
CM11 cAg-1ec	33.0	101
CM15 cAg-1ec	104.1	319

表5:与HT1080细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
抗Ag1	1.1	--
A2B1-抗-Ag1	531	483
CA2B1-抗-Ag1	566	514
M15-抗-Ag1	469	426
CM15-抗-Ag1	604	549
M11-抗-Ag1	1470	1336
CM11-抗-Ag1	939	853
Vel-抗-Ag1	1040	946
Fos-Jun-抗-Ag1	*N/A	--

表6:与SW780细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
抗Ag1	1.15	--
A2B1-抗-Ag1	134	116
CA2B1-抗-Ag1	116	101
M15-抗-Ag1	*N/A	--
CM15-抗-Ag1	177	153
M11-抗-Ag1	533	463
CM11-抗-Ag1	249	216
Vel-抗-Ag1	290	252
CVel-抗-Ag1	292	252
Fos-Jun-抗-Ag1	*N/A	--

表7:与HT1080细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
抗Ag2	21.0	--

A2B1-抗-Ag2	*N/A	--
CA2B1-抗-Ag2	>2000	>95
M15-抗-Ag2	>2000	>95
CM15-抗-Ag2	>2000	>95
M11-抗-Ag2	2000	95
CM11-抗-Ag2	>2000	>95
Ve1-抗-Ag2	>2000	>95
CVe1-抗-Ag2	2000	95
A4B4-抗-Ag2	*N/A	--

表8:与HCT116细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
抗Ag2	7.8	--
A2B1-抗-Ag2	*N/A	--
CA2B1-抗-Ag2	>2000	>256
M15-抗-Ag2	>2000	>256
CM15-抗-Ag2	>2000	>256
M11-抗-Ag2	>2000	>256
CM11-抗-Ag2	2000	256
Ve1-抗-Ag2	>2000	>256
CVe1-抗-Ag2	>2000	>256
A4B4-抗-Ag2	*N/A	--

表9:与SW780细胞结合的掩蔽抗体的Kd值

抗体	Kd (nM)	倍数变化
抗Ag2	9.6	--
A2B1-抗-Ag2	*N/A	--
CA2B1-抗-Ag2	800	83
M15-抗-Ag2	>2000	>208
CM15-抗-Ag2	>2000	>208
M11-抗-Ag2	>2000	>208
CM11-抗-Ag2	>2000	>208
Ve1-抗-Ag2	>2000	>208
CVe1-抗-Ag2	>2000	>208
A4B4-抗-Ag2	*N/A	--

实施例2:不同卷曲螺旋肽的掩蔽活性

[0122] 表10示出了并入不同抗体并在不同细胞系上测试的不同卷曲螺旋形成肽对的结合倍数的降低。使用hBU12抗体、cAg-1、1C1、HuMab-CD74-011和抗抗原2的抗体(称为hAg-2)测试活性。在Raji上的hBU12ec、Ramos上的cAg-1ec和Raji上的hAg-2上观察到大于100倍的掩蔽。

表10:不同卷曲螺旋肽的掩蔽活性

螺旋名称	hBU12ec (Raji)	cAg-1 ec (Ramos)	1C1ec (抗 EphA2) (PC3)	hAg-2 (Raji)	HuMab-CD74-011 (Daudi)
铰链(Hinge)	269	45	0.6	28	14
A3B3	83	34	2		
A4B4	>300	927	2.2	>190	6.1
CVel	>300	1068	43	>190	26
antipO	38	26	0.9		
dHLX	>300	233	16		

Vel		740		>125	
A2B1		221		>125	
M15		496		>125	
M11		390		>125	
Fos/Jun		218			
Cys-A2B1		225		>125	
Cys-M15		499		>125	
Cys-M11		691		>125	
Cys-Fos/Jun		1027*			

实施例3:不同蛋白酶对不同蛋白酶位点的裂解活性

[0123] MMP通过在1.25mM的4-氨基苯基乙酸汞(APMA)、37°C中培养1至24小时进行活化。通过在37°C、50mM乙酸钠、100mM NaCl、pH4.0中培养2小时以活化豆荚蛋白。

[0124] 为了评估裂解序列的裂解谱(cleavage profile),根据制造商所指示的值,将抗体(10µg)在37°C下与400pmol/min标准化蛋白酶一起培养过夜。使用Waters Acquity/Xevo UPLC评估裂解,并使用过量的DTT还原裂解和未裂解的片段,使用PLRP-MS 3µm柱(安捷伦)分离,并使用UNIFI(沃特世)分析。如图5所示,使用PLRP-MS确定肽序列的裂解。CVel抗原1轻链的计算质量为29639.9Da,观察到的质量为29640.2Da。裂解的抗原1轻链的计算质量为24623.3Da,观察到的质量为24623.8Da。

[0125] 针对一组肿瘤相关蛋白酶(例如人类和鼠/大鼠MMP、ADAMs家族、uPA、细胞表面丝氨酸蛋白酶(matriptase)和豆荚蛋白),测试三种蛋白酶裂解位点(MMP#1、MMP#2和CytomX)的蛋白酶裂解谱。还测试了细胞外蛋白酶tPA和因子Xa对序列的裂解。表11示出了这三个蛋白酶裂解位点的蛋白酶裂解谱。

[0126] 将肽(N末端与hBU12抗体骨架融合)在37°C下与400pmol/min标准化蛋白酶一起培养过夜,并评估裂解。MMP#1被大多数MMP以及uPA和细胞表面丝氨酸蛋白酶裂解。除了MMP13之外,MMP#2被几乎所有的MMP裂解,并且未受到其它类别的蛋白酶的影响。CytomX序列仅被uPA、细胞表面丝氨酸蛋白酶和豆荚蛋白裂解。这些数据共同表明,与其它两个蛋白酶裂解位点相比,MMP#1在蛋白酶类别中更为杂乱。

[0127] 对于用于结合或细胞毒性测定的所有裂解的抗体,将掩蔽的抗体(50-250μg)与活化的人类MMP2(1μg)一起在37°C下培养过夜。

表11:三个蛋白酶裂解位点处的蛋白酶裂解谱

酶	裂解序列:		
	MMP#1	MMP#2	CytomX
	GPLG*VR	IPVS*LR	LSGR*SDNH
人类 MMP2	完全	完全	无
人类 MMP7	完全	完全	无
人类 MMP9	完全	完全	无
人类 MMP13	完全	最小	无
鼠 MMP2	完全	部分	无
鼠 MMP7	部分	完全	无
大鼠 MMP9	部分	完全	无
Upa	部分	无	完全
细胞表面丝氨酸蛋白酶	完全	最小	完全
豆荚蛋白	无	最小	完全
tPA	--	无	无
因子 Xa	最小	无	无
ADAMs (hu, mu)	无	无	无

实施例4:掩蔽抗体上pI的变化

[0128] 将抗体缓冲液交换到pH6.5的10mM磷酸钠中并稀释至2mg/mL的工作浓度。将样品稀释到含有尿素、载体两性电解质、甲基纤维素和两种pI为6.14和9.5的pI标记物的溶液中。使用iCE3毛细管IEF系统(Protein Simple)分析样品,并使用两种标准计算等电点。测量等电点(pI)以评估对另外的掩蔽域的潜在扰动。表12示出了与对照hBU12ec抗体相比,掩蔽的hBU12ec(抗cd19)抗体的计算的和测量的pI。通过添加较链阻断剂(8.7-8.8)以及A4B4和dHLX卷曲螺旋(9.1)来增加测量的亲本抗体的pI(8.3)。Cve1螺旋将pI降低至7.2。通常,掩蔽的hBU12抗体的pI在亲本抗体的1个单位内。抗Ag-1掩蔽抗体的pI值均在7.7和8.8之

间,其中N末端连接的卷曲螺旋通常具有比未连接的对对应物更低的pI,如表13所示。

表12:用不同的卷曲螺旋形成肽改变掩蔽抗体的pI

样本	主峰的pI	计算的pI
hBU12ec (对照)	8.3	
HgM2 hBU12ec V6	8.8	8.2
HgNC hBU12ec	8.7	8.2
A4B4 hBU12ec	9.1	8.5
CVel hBU12ec	7.2	7.1
dHLX hBU12ec	9.1	8.5

表13:与cAg-1 ec连接的卷曲螺旋形成肽的pI变化

样本	主峰的pI
A2B1 cAg-1 ec	8.3
M11 cAg-1 ec	8.8
M15 cAg-1 ec	8.2
FJ cAg-1 ec	8.6
Vel cAg-1 ec	N/A*
CA2B1 cAg-1 ec	7.7
CM11 cAg-1 ec	8.2
CM15 cAg-1 ec	7.7
CFJ cAg-1 ec	7.9
CVel cAg-1 ec	7.1
CA4B4 cAg-1 ec	8.5

实施例5:掩蔽抗体的药代动力学(PK)值

[0129] 使用放射性标记的抗体进行药代动力学(PK)实验。将抗体(1mg)与55 μ Ci的N10琥珀酰亚胺丙酸酯,[丙酸酯-2,3-³H]-(Moravek Biochemicals,布雷亚,加利福尼亚州,80Ci/mmol,1mCi/ml,9:1的己烷:乙酸乙酯溶液)一起在室温和pH8.0下培养2小时。将混合物以4,000xg离心5分钟,移动下层水层。将水层稀释并使用Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore,商品号:UFC903024,30kDa MWCO)浓缩四次以除去过量的放射性物质。放射性标记的抗体通过无菌的0.22 μ m Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units (Millipore,Billerica,马萨诸塞州)过滤,并通过分光光度法测量最终的抗体或ADC浓度。通过液体闪烁计数测定每种产物的比活性(μ Ci/mg)。放射性标记的抗体通过尾静脉以0.5mg/kg注射到Balb/C小鼠中(每个剂量组6只动物,随机分配)。在不同时间点通过隐静脉将血液吸入K2 EDTA管中并加工成血浆。将血浆样品加入到Ecoscint-A液体闪烁混合物(National Diagnostics)中,并通过液体闪烁计数测量总放射性。放射性标记样品的比活性用于计算每个时间点的抗体浓度。

[0130] 在Balb/C小鼠中评估各种铰链和卷曲螺旋掩蔽的hBU12抗体的PK。以0.5mg/kg注射抗体并测量血浆中发现的总抗体。除dHLX hBU12外,掩蔽的hBU12抗体显示与亲本抗体相似的PK。

[0131] 图2显示与hBU12ec对照相比,在血浆中培养的各种卷曲螺旋掩蔽抗体的抗体浓度

对时间的关系。大多数卷曲螺旋掩蔽的抗体显示出与对照相似的药代动力学表现。

实施例6:掩蔽的抗体药物偶联物(ADC)和细胞毒性测定的制备

[0132] 用过量的TCEP(2当量,pH8,37°C,90分钟)还原抗体、抗体链间二硫化物,并将其通过与Amicon旋转过滤器(EMD Millipore UFC503096)的缓冲液交换除去。使用脱氢抗坏血酸(西格玛奥德里奇261556)(20当量,pH7.4,室温,45分钟,2次添加)将二硫化物再氧化(除工程化硫醇外)。在Amicon旋转过滤器中通过三轮稀释和浓缩除去过量的脱氢抗坏血酸。将丙二醇加入到反应混合物中至终浓度为50%。用丙二醇稀释PBD-接头(3当量)的溶液,并将其加入到位置239处含有两个游离硫醇的再氧化抗体(1当量)中。令反应进行30分钟,然后用含活性炭和水的浆液对其进行30分钟的处理。通过过滤除去活性炭,并使用Nap5柱(GE Healthcare Life Sciences,17-0853-02)进一步纯化反应。对于混合的4载荷mc-MMAF ADC,使用2.1当量的TCEP在pH 8下对抗体链间二硫化物进行60分钟的部分还原。然后通过两轮稀释和浓缩除去过量的TCEP。此时,将4.4摩尔当量的药物-接头加入到部分还原的抗体中。偶联后,使用quadrasil MP硫醇树脂除对过量的药物-接头进行15分钟的去除,然后使用PD-10凝胶过滤柱脱盐至pH 7.4的PBS中。对于所有ADC,通过PLRP-MS测定药物负载,并通过尺寸排阻色谱法测定聚集程度。

[0133] 使用RealTime-Glo(普洛麦格(Promega))进行细胞活力测定。根据供应商的说明书,将Ramos细胞(700个细胞/孔)接种到具有透明底部的96孔培养板的培养基中。向每个孔中加入稀释的PBD-偶联的ADC(1000ng/mL至0ng/mL),并将样品在37°C下培养138小时。使用读板器(Envision 4605)测量发光。使用GraphPad Prism6拟合数据并计算IC₅₀。IC₅₀值用于比较亲本ADC对掩蔽ADC的细胞毒性的变化。

[0134] 表14示出了与对照的ADC相比的掩蔽的ADC的结合和细胞毒性数据。卷曲螺旋掩蔽的抗体的细胞毒性降低至与Raji或Ramos细胞结合的程度相似。在去除掩蔽时,细胞毒性恢复到实验误差内与对照抗体相同的水平。

[0135] 将掩蔽的hBU12抗体(铰链、A4B4)、Cve1与吡咯并苯并二氮杂(PBD)偶联以制备掩蔽的ADC。使用竞争FAC(competition FACs)评估掩蔽的ADC的结合。数据显示添加PBD不影响阻断能力。与亲本抗体相比,掩蔽的抗体的结合降低>100。当掩蔽结构域被裂解时,结合恢复至亲本抗体的约2倍。

[0136] 细胞毒性测定显示了铰链阻断的和两个卷曲螺旋阻断的ADC之间的区别。与结合数据中的>100倍相比,铰链hBU12的细胞毒性降低156倍。与降低>60的结合相比,A4B4 hBU12 ADC的细胞毒性降低了490倍,并且与>160的结合变化相比,Cve1 hBU12 ADC的细胞毒性降低了1317倍。裂解Cve1掩蔽结构域后,细胞毒性恢复至亲本ADC的1.2倍。对于hBU12 ADC,结合的减少与细胞毒性的降低密切相关。

表14:对掩蔽的抗体的细胞毒性测定

Raji (NHL) – 100k 拷贝/细胞		Ramos (NHL) – 43k 拷贝/细胞	
结合数据		细胞毒性数据	
ADC		IC ₅₀ (ng/mL)	倍数变化
hBU12ec-1910(2)		0.1	
铰链_v2-1910(2)	>300	>100	156

A4B4-1910(2)	>600	>160	37	490
Cvel-191100(2)	>600	>160	100.4	1317
重新激活 Cvel-1910(2)			0.12	1.2

实施例7:掩蔽抗体的离体酶谱

[0137] 图3示出了与掩蔽抗体接触的肿瘤组织样品。抗体在表达能有效暴露 (unmask) 抗体的蛋白酶的肿瘤细胞附近未被掩蔽。未掩蔽的抗体导致肿瘤特异性染色。

[0138] 将收获自异种移植小鼠的肿瘤在OCT冷冻包埋培养基中冷冻并冷冻切片 (5 μ m)。用热灭活的人血清封闭切片,洗涤,并与AF647标记的抗体一起培养。将肿瘤切片用蛋白酶混合物预处理1小时 (1:100PCIII和50 μ m的Galardin) 作为蛋白酶活性的对照或用PBS预处理。将抗体在室温下培养1小时,用TBST洗涤三次,并用含有DAPI (赛默飞世尔 (ThermoFisher), P36962) 的封固剂密封。然后使用荧光显微镜 (奥林巴斯) 观察肿瘤切片并评估AF647标记的抗体的结合。

[0139] 为了评估掩蔽的抗体的肿瘤相关蛋白酶裂解,使用离体方法以评估MMP活性。将荧光标记的hAg-2和Cvel hAg-2在HT1080肿瘤切片上培养。培养后,通过荧光信号观察切片的结合。Cvel hAg-2与肿瘤切片结合至与亲本抗体相似的程度。用蛋白酶抑制剂预处理肿瘤切片消除了Cvel hAg-2的结合。该数据表明掩蔽的抗体的结合是蛋白酶依赖性的。

[0140] 以5mg/kg每种抗体 (hAg-2、CvelAg-2、VelAg-2) 对用HT1080异种移植物植入的小鼠进行给药。在给药后1、3和5天收获肿瘤。在给定的时间点 (1、3、4天),处死小鼠并收集组织和血浆。将组织匀浆,并使用IgSelect树脂从生物样品中纯化人类抗体。将捕获的抗体还原并通过SDS-PAGE分离,然后使用HRP偶联的抗人Fc抗体通过蛋白质印迹进行探测。通过对应于掩蔽和未掩蔽的重链的条带的光密度测定来评估裂解的抗体百分比,所述掩蔽和未掩蔽的重链的大小相差约5kDa。在测试的任何时间点在血浆或肝脏中检测到非常少的未掩蔽的抗体 (<5%)。图6A和6B显示了指示的组织中Cvel和Vel阻断的hAg-2抗体的裂解。对于每个时间点,将裂解的抗体分子于三个独立的小鼠中。第四只小鼠不含肿瘤。在第3天,与CvelhAg-2构建体 (construct) 相比,VelhAg-2显示出更多的裂解。另外,与正常组织相比,肿瘤中存在裂解程度更高的产物 (higher cleaved product)。在第4天,与在CvelhAg-2处观察到的掩蔽的构建体更多变化的裂解相比,VelhAg-2显示出掩蔽的构建体的一致、稳健 (robust) 的裂解。

实施例8:对Vel掩蔽的抗CD19抗体-药物偶联物 (ADC) 的研究

[0141] 使用CD19阳性Ramos细胞通过流式细胞术测试未掩蔽的和Vel掩蔽的抗CD19ADC与不同裂解序列的结合。如图8A所示,使用荧光团标记的抗人二抗检测结合的抗体。

[0142] 在CD19阳性Ramos细胞上评估抗CD19ADC的抗增殖活性。将Ramos细胞与ADC一起培养96小时,并使用Cell Titer Glo (Promega) 评估对细胞增殖的影响,如图8B所示。

[0143] 在NSG小鼠的Ramos异种移植模型中测试未掩蔽的和Vel掩蔽的抗CD19抗体-药物偶联物的抗肿瘤活性。所有ADC均以6mg/kg的剂量通过腹膜内注射施用。结果如图8C所示。

实施例9:对掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的研究

[0144] 使用Vel-IPV序列实现抗小鼠CD3抗体145-2C11的掩蔽。通过流式细胞术使用CD3 (+) HT-2细胞评估结合。荧光团标记的抗小鼠Fc抗体用于检测结合的抗体。如图9A所示,当

用Ve1-IPV掩蔽抗小鼠CD3抗体时,观察到最小的抗体结合。

[0145] 用VEL-IPV掩蔽改善了BALB/c小鼠中靶向介导的145-2C11的药物处置。通过赖氨酸偶联,用³H-丙酸盐标记抗体,并以1mg/kg的IV剂量给予BALB/c小鼠。通过在不同时间点绘制的血浆的闪烁计数来确定抗体浓度。血浆中145-2C11的浓度在给药后2天内低于可检测测量,而Ve1-IPV-145-2C11浓度可在给药后长达14天中测量,如图9B所示。

[0146] 通过在BALB/小鼠中IV注射,评估抗CD3抗体145-2C11(具有mIgG2a骨架)的细胞因子释放的减轻。给小鼠注射25微克抗体,并在给药后<24小时的一系列时间点测定血清细胞因子水平。如图9C-D所示,与未掩蔽的145-2C11相比,检测到掩蔽的抗CD3抗体的IFN- γ 和IL-2的显著降低。

实施例10:对掩蔽的抗人和抗小鼠Ag2抗体的研究

[0147] 使用对BALB/c小鼠的静脉给药来评估带有不同卷曲螺旋结构域的掩蔽的抗人Ag2抗体的稳定性。抗体以5mg/kg给药。在给定的时间点(3天),从给药的小鼠处收集血浆。使用IgSelect树脂从血浆中纯化人抗体。将捕获的抗体还原并通过SDS-PAGE分离,然后使用HRP偶联的抗人Fc抗体通过蛋白质印迹进行探测。通过对应于掩蔽和未掩蔽的重链的条带的光密度测定来评估裂解的抗体百分比,所述重链的大小相差约5kDa。如图10所示,与CM15相比,M15不稳定。A2B1和CA2B1之间没有显著差异。Ve1和CVe1之间的区别并不明显。

[0148] 可以使用与在人Ag2抗体上所使用的相同的Ve1和IPV序列掩蔽小鼠反应性抗Ag2抗体。如图11A所示,用这些构建体掩蔽阻断抗体与鼠Ag2阳性细胞的结合。

[0149] 当以10mg/kg的单次IV剂量给药时,抗小鼠Ag2抗体驱动BALB/c小鼠中血小板的消耗。相反,当向小鼠以10mg/kg的IV剂量施用Ve1-IPV-抗-Ag2时未观察到这种消耗。结果如图11B所示。

[0150] 与未掩蔽的抗Ag2相比,掩蔽的抗小鼠Ve1-IPV-Ag2抗体改善了BALB/c小鼠血浆中的药代动力学,证明了掩蔽的抗体能够避免靶标介导的药物处置。通过赖氨酸偶联,用³H-丙酸盐标记Ve1-IPV-抗-Ag2和抗Ag2抗体,并以1mg/kg的IV剂量给药至BALB/c小鼠。通过在不同时间点绘制的血浆的闪烁计数来确定抗体浓度。血浆中抗Ag2的浓度在15分钟内低于可检测测量,而Ve1-IPV-抗-Ag2浓度在给药后7天内是可测量的。结果如图11C所示。

[0151] 抗小鼠Ag2抗体在A20淋巴瘤模型中驱动抗肿瘤活性,但同时导致外周Ag2(+)细胞的枯竭(depletion)。掩蔽的Ve1-IPV-抗-Ag2抗体赋予类似的活性,但没有对细胞枯竭的影响。Ve1-IPV-抗-Ag2抗体避免了外周抗原吸收(peripheral antigen sink)但保持了肿瘤结合。结果如图12A-D所示。

[0152] 为了测试掩蔽改善抗Ag2IgG1抗体变体的药代动力学和耐受性的能力,在食蟹猴(cynomolgus macaques)中进行了一系列IV单剂量研究。测试的抗Ag2IgG1抗体与人和食蟹猴Ag2交叉反应,其在这些物种中的表达和序列中高度保守。通过一组食蟹猴和人组织的原位凝胶酶谱法评估蛋白酶活性,表明蛋白酶活性水平在这些物种中也是高度保守的。因此,食蟹猴代表用于评估掩蔽对抗Ag2抗体药代动力学和耐受性的影响的相关物种。

[0153] 使用通用总抗体(TAb)ELISA评估抗Ag2和Ve1-IPV-抗-Ag2的药代动力学。通用TAELISA使用涂有抗人轻链 κ -mAb的96孔微量滴定板,其结合抗Ag2和Ve1-IPV-抗-Ag2的人轻链 κ 。它不与食蟹猴轻链 κ 交叉反应。使用简单汇集(naive pooled)的食蟹猴K₂EDTA血浆,将研究样品稀释到测定的动态范围内,即在抗Ag2(10(LLOQ)的情况下至1280ng/mL(ULOQ))或

在Ve1-IPV-Anti-Ag2 (20 (LLOQ) 的情况下至2560ng/mL (ULOQ) 。在加入封闭的和经洗涤的板之前,将稀释的样品与QC和校准物一起用测定缓冲液进行1:20的最低要求稀释度(MRD) 。在室温下培养1小时后,对板进行洗涤,并用生物素化的抗人轻链κBmAb (相同的克隆作为捕获试剂) 检测结合的分析物,然后加入与链霉抗生物素蛋白 (poly-HRP-SA) 偶联的聚辣根过氧化物酶 (polymer horseradish peroxidase) 。培养和洗涤后,将HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 加入板中,显色10分钟。用1N HCl终止反应,并在Spectromax M5读板机上在450nm-630nm下读板。将净吸光度值 (net absorbance values) 导入Watson LIMS v.7.4.2, 并进行5-PL非线性回归以将吸光度转换为ng/mL样品中存在的总抗体。结果如图13A所示。

[0154] 抗Ag2抗体导致在食蟹猴的外周 (periphery) 的表达Ag2的细胞的枯竭。通过细胞计数,比较这些外周Ag2 (+) 细胞的枯竭来评估使用Ve1-IPV掩蔽抗Ag2的影响。在1mg/kg的剂量下,抗Ag2引起外周Ag2 (+) 细胞的显著减少,而施用Ve1-IPV-抗-Ag2导致相同细胞群的最小变化。10mg/kg剂量的Ve1-IPV-抗-Ag2提供与1mg/kg剂量的抗Ag2类似的药效学效果;结果如图13B所示。

[0155] 抗Ag2抗体还介导细胞因子的产生,例如IL10。通过在不同时间点用Luminex多细胞因子组 (Luminex multi-cytokine panel) 分析来自食蟹猴的血清,评估掩蔽对细胞因子的生产的影响。与未掩蔽的抗体相比,观察到Ve1-IPV-抗-Ag2的IL10产生显著减少;结果如图13C所示。

[0156] 当每4天通过1mg/kg的静脉注射给药4次时,抗Ag2抗体驱动L428异种移植物中的抗肿瘤活性。在L428异种移植模型中比较具有不同蛋白酶可裂解接头序列的Ve1-抗-Ag2抗体的抗肿瘤活性。含有预期的MMP-可裂解序列-PLGLAG-的Ve1-抗-Ag2提供与未掩蔽的抗体相似的抗肿瘤作用。同时,含有乱序序列-LALGPG-的Ve1-抗-Ag2抗体提供减弱的抗肿瘤活性。值得注意的是,两种Ve1掩蔽的抗Ag2抗体在体外与L428细胞结合,表明体内活性的差异不是由于两种不同的掩蔽抗体的结合差异。结果如图14A和14B所示。

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Thr Leu Val Arg Gly Ala Met Tyr Gly Thr Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

				85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				100					105									
<210>	6																	
<211>	117																	
<212>	PRT																	
<213>	人工序列																	
<220>																		
<223>	合成																	
<400>	6																	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala			
1				5					10					15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr			
				20					25					30				
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile			
				35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe			
				50					55					60				
Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr			
65					70									75				80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
					85									90				95
Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr			
					100									105				110
Val	Thr	Val	Ser	Ser														
					115													
<210>	7																	
<211>	106																	
<212>	PRT																	
<213>	人(Homo sapiens)																	
<400>	7																	
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln			
1				5					10					15				
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr			
				20					25					30				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser			
				35					40					45				
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr			
				50					55					60				

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 11
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 11
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20				25						30		
Tyr	Met	Lys	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Asp	Ile	Ile	Pro	Ser	Asn	Gly	Ala	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	His	Leu	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Ser	His	Leu	Leu	Arg	Ala	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 13

Asp	Phe	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35				40						45			
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
		50				55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 16

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Thr Pro Arg Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 17

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Lys Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Asp Asp Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Lys Ser Val Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Tyr Gly Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 18			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 18			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Glu Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Gly Pro Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 19			

<211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 19
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 20
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 20
 Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn Thr Ala Leu Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Glu
 20 25 30
 Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
 35 40 45
 Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 21
 <211> 40
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 21

Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn Thr Ala Leu Arg

1 5 10 15

Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Glu

 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr

 35 40

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 22

Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 23

Pro Leu Gly Val Arg

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 25

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 25

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Ala Arg Asn Arg
 20 25 30
 Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
 35 40 45
 Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 26

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 26

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Ala Arg Asn Arg
 20 25 30
 Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr
 35 40

<210> 27

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 27

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Ile
 20 25 30
 Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
 35 40 45

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 28

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr Ala Leu Glu
1 5 10 15

Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Ile
20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40

<210> 29

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 29

Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn Thr Ala Leu Arg
1 5 10 15

Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu Arg Asn Ile
20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
35 40 45

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 30

Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn Thr Ala Leu Arg
1 5 10 15

Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu Arg Asn Ile
 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
 35 40

<210> 31

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 31

Gln Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

Glu Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

<210> 32

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> N末端Gln是可选的

<400> 32

Gln Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

Glu Gln Val Ala Gln Leu
 35

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 33

Ile Pro Val Ser Leu Arg

1 5

<210> 34

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 34

Gln Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Gln

1 5 10 15

Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg

 20 25 30

Lys Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly

 35 40 45

<210> 35

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> N末端Gln是可选的

<400> 35

Gln Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Gln

1 5 10 15

Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg

 20 25 30

Lys Lys Val Glu Lys Leu

 35

<210> 36

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 36

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Leu Arg Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln
 20 25 30
 Arg Leu Glu Asn Glu Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Ser Gly Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 37

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 37

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Leu Arg Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln
 20 25 30
 Arg Leu Glu Asn Glu Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
 35 40 45

<210> 38

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 38

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Leu Glu Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln
 20 25 30
 Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Ser Gly Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 39

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 39

Glu	Ala	Cys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Glu
1			5					10					15		
Asn	Thr	Ala	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Val	Gln
			20					25					30		
Arg	Ala	Arg	Asn	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Arg	Thr	Arg	Tyr			
			35				40					45			

<210> 40

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 40

Glu	Ala	Cys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Gln	Glu
1			5					10					15		
Asn	Thr	Ala	Leu	Glu	Thr	Glu	Val	Ala	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Val	Gln
			20					25					30		
Arg	Leu	Glu	Asn	Ile	Val	Ser	Gln	Tyr	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Gly
			35				40					45			
Gly	Gly	Gly	Pro	Leu	Gly	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser			
			50				55					60			

<210> 41

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 41

Glu	Ala	Cys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Gln	Glu
1			5					10					15		
Asn	Thr	Ala	Leu	Glu	Thr	Glu	Val	Ala	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Val	Gln
			20					25					30		
Arg	Leu	Glu	Asn	Ile	Val	Ser	Gln	Tyr	Glu	Thr	Arg	Tyr			

	35	40	45
<210> 42			
<211> 61			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 42			
Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg			
1	5	10	15
Asn Thr Ala Leu Arg Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln			
	20	25	30
Arg Leu Arg Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Ser Gly Gly			
	35	40	45
Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser			
	50	55	60
<210> 43			
<211> 45			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 43			
Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg			
1	5	10	15
Asn Thr Ala Leu Arg Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln			
	20	25	30
Arg Leu Arg Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr			
	35	40	45
<210> 44			
<211> 50			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 44			
Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Glu Glu Lys Val			
1	5	10	15
Lys Thr Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg			

20 25 30
 Leu Glu Glu Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg
 35 40 45

Ser Gly
 50

<210> 45

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 45

Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Glu Glu Lys Val
 1 5 10 15
 Lys Thr Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg
 20 25 30

Leu Glu Glu Gln Val Ala Gln Leu
 35 40

<210> 46

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 46

Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val
 1 5 10 15
 Asp Gln Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
 20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg
 35 40 45

Ser Gly
 50

<210> 47

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 47

Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val
 1 5 10 15
 Asp Gln Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
 20 25 30
 Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu
 35 40

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 48

Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 1 5 10

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 49

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 50

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 51

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 52

Gly Gly Ala Ala

1

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 53

Leu Ala Ala Ala Ala

1

5

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 54

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 55

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5
 <210> 56
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 56
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 57
 Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 58
 Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 59
 Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5
 <210> 60
 <211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (6)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 60
Pro Leu Gly Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 61
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
1 5
<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 62
Gly Pro Leu Gly Val Arg
1 5
<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 63
Gly Phe Leu Gly
1
<210> 64

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 64

Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg Lys
 20 25 30
 Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

<210> 65

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 65

Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu Glu
 20 25 30
 Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

<210> 66

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 66

Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 Gln Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg Lys
 20 25 30
 Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu
 35

<210> 67

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 67

Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Arg Glu Arg Val Lys Thr Leu

1 5 10 15

Arg Ala Gln Asn Tyr Glu Leu Glu Ser Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu

 20 25 30

Gln Val Ala Gln Leu Ala

 35

<210> 68

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 68

Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Ser Val Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val

1 5 10 15

Asp Gln Leu Gln Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln

 20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu

 35 40

<210> 69

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 69

Glu Ala Cys Gly Ala Ser Thr Thr Val Ala Gln Leu Arg Glu Arg Val

1 5 10 15

Lys Thr Leu Arg Ala Gln Asn Tyr Glu Leu Glu Ser Glu Val Gln Arg

 20 25 30

Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Ala

 35 40

<210> 70

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 70

Ala Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp
 1 5 10 15
 Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys
 20 25 30
 Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His
 35 40

<210> 71

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 71

Ala Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala
 1 5 10 15
 Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val
 20 25 30
 Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr
 35 40

<210> 72

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 72

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp
 1 5 10 15
 Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu
 20 25 30
 Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His
 35 40 45

<210> 73

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 73

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys

1 5 10 15

Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu

20 25 30

Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr

35 40 45

<210> 74

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 74

Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala Ala Leu Lys Tyr Lys

1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln

20 25

<210> 75

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 75

Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu

1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln

20 25

<210> 76

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 76

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Tyr Lys Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu
 20 25 30

Lys Gln

<210> 77

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 77

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Glu Lys Glu Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu
 20 25 30

Glu Gln

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 78

Val Pro Met Ser Met Arg Gly Gly

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 79

Arg Pro Phe Ser Met Ile Met Gly

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 80
Ile Pro Glu Ser Leu Arg Ala Gly
1 5
<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 81
Val Pro Leu Ser Leu Thr Met Gly
1 5
<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 82
Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5
<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 83
Leu Ala Leu Gly Pro Gly
1 5
<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成

<400> 84

Tyr Gly Arg Ala Ala

1

5

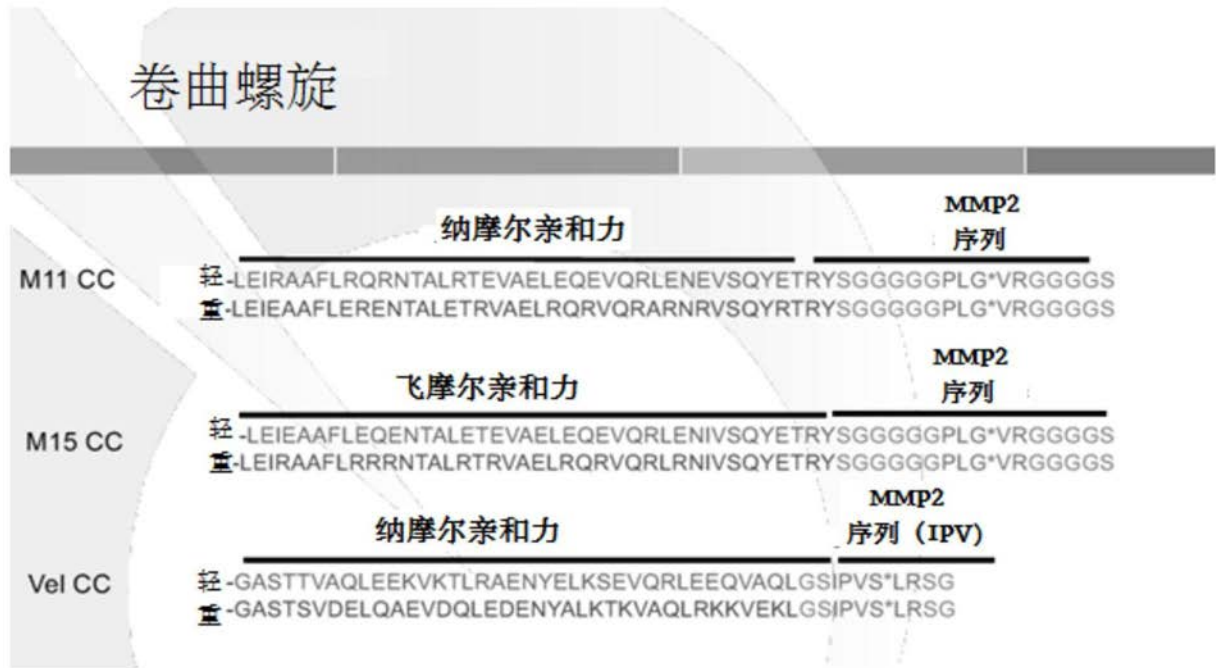
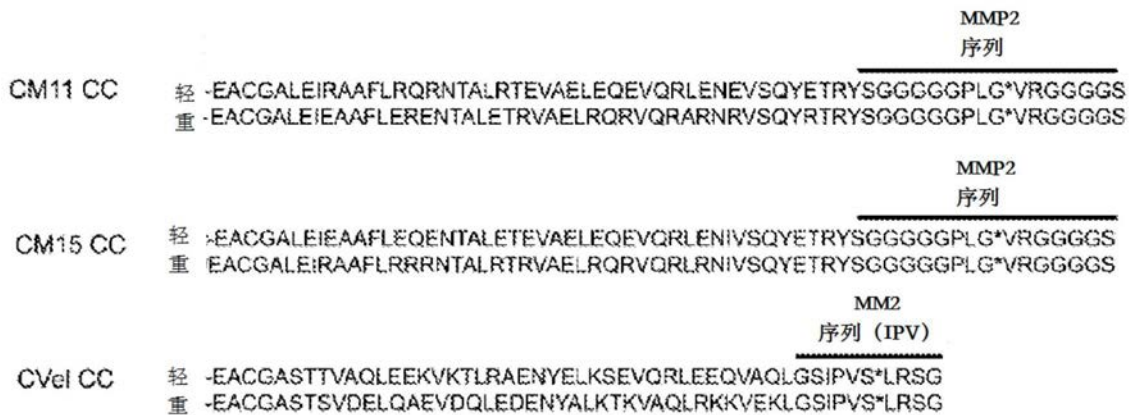


图1A

图1B: 具有N末端半胱氨酸的卷曲螺旋



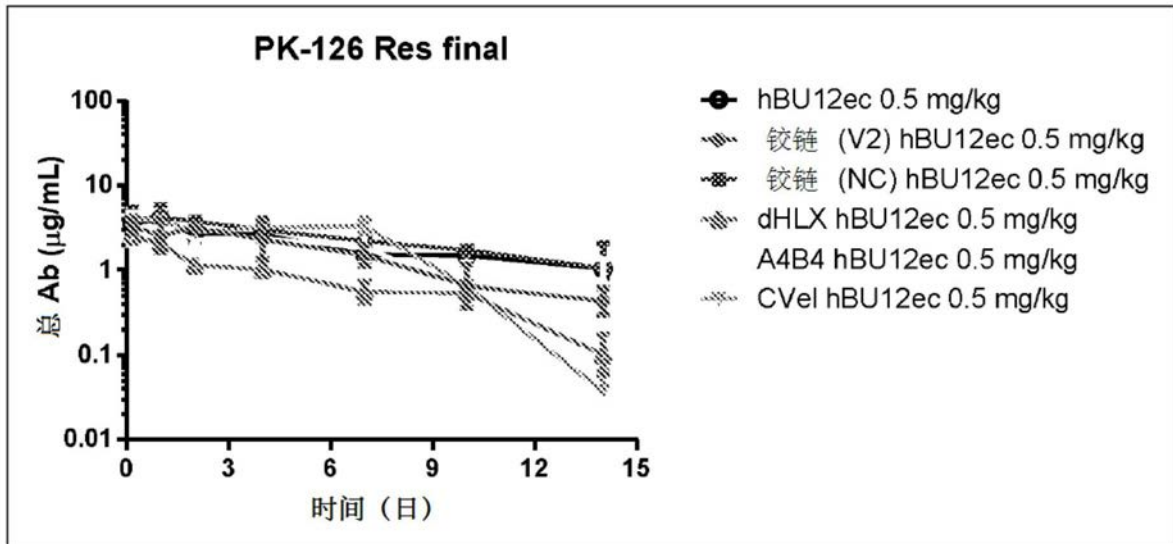


图2: 与hBU12ec对照相比, 在血浆中培养的各种卷曲螺旋掩蔽抗体的抗体浓度对时间的关系

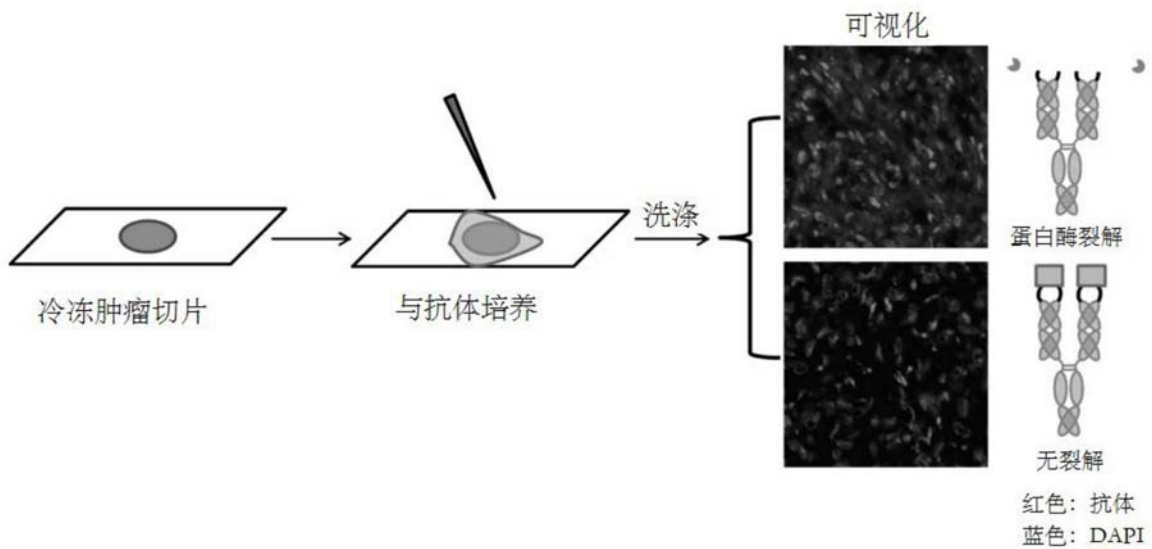


图3: 体内酶谱 (zymography)

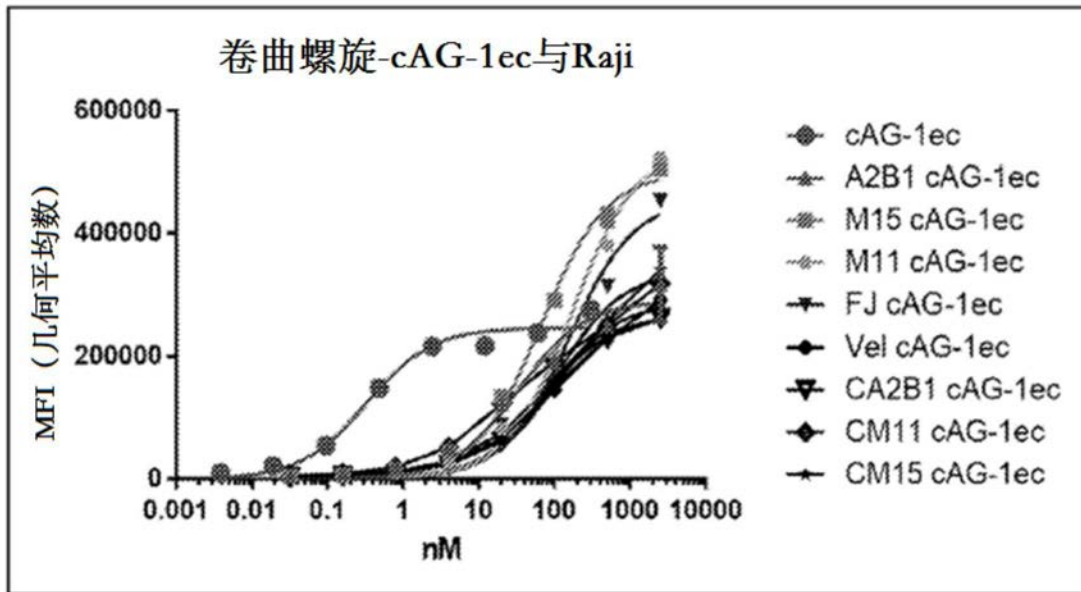


图4

	MM2裂解
CVel 卷曲螺旋	序列

轻	-EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVS*LRSG
重	-EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSI PVS*LRSG

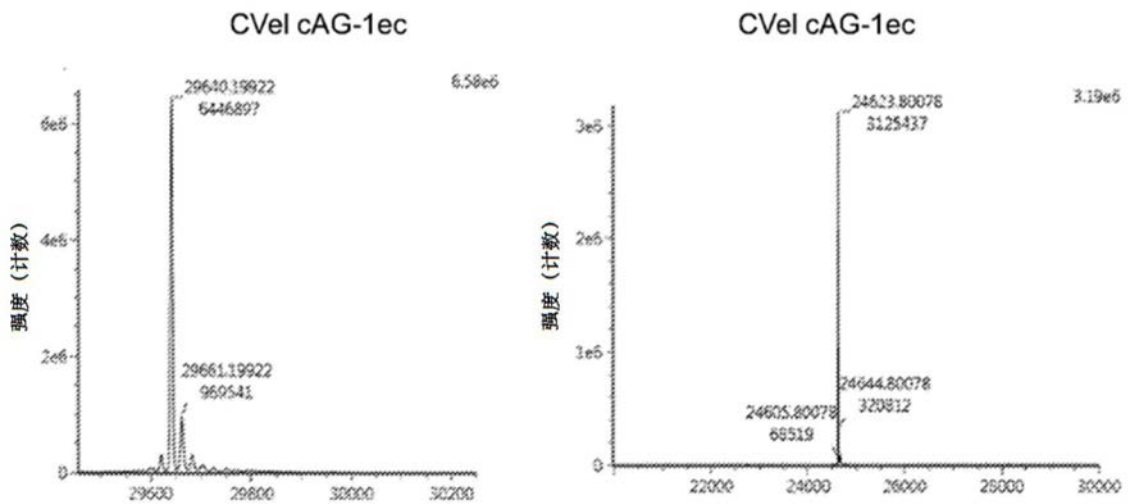
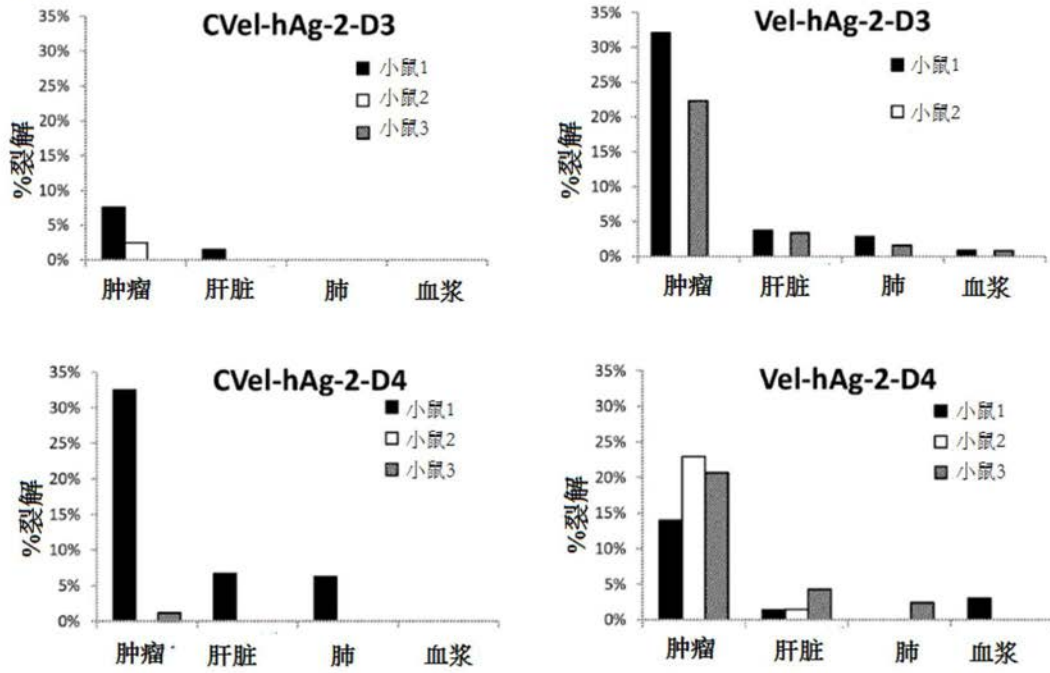


图5

A



B

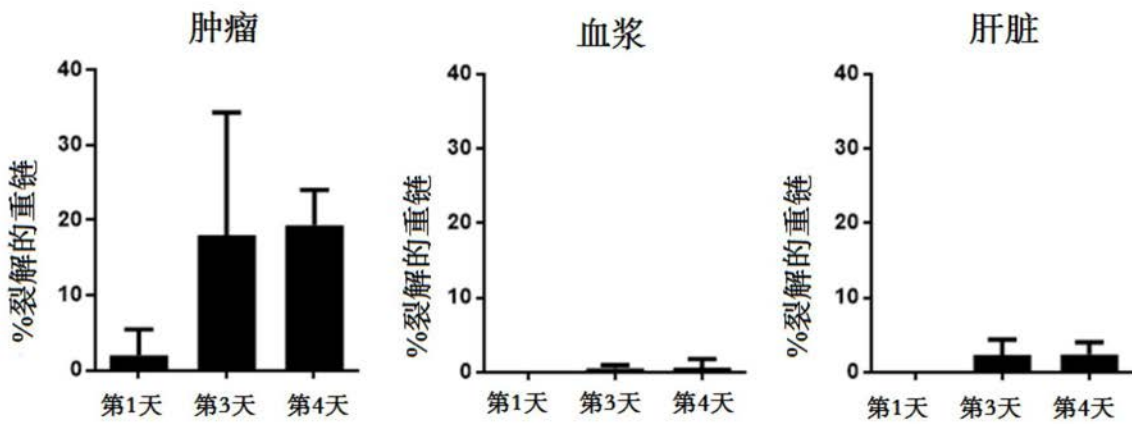


图6A-B

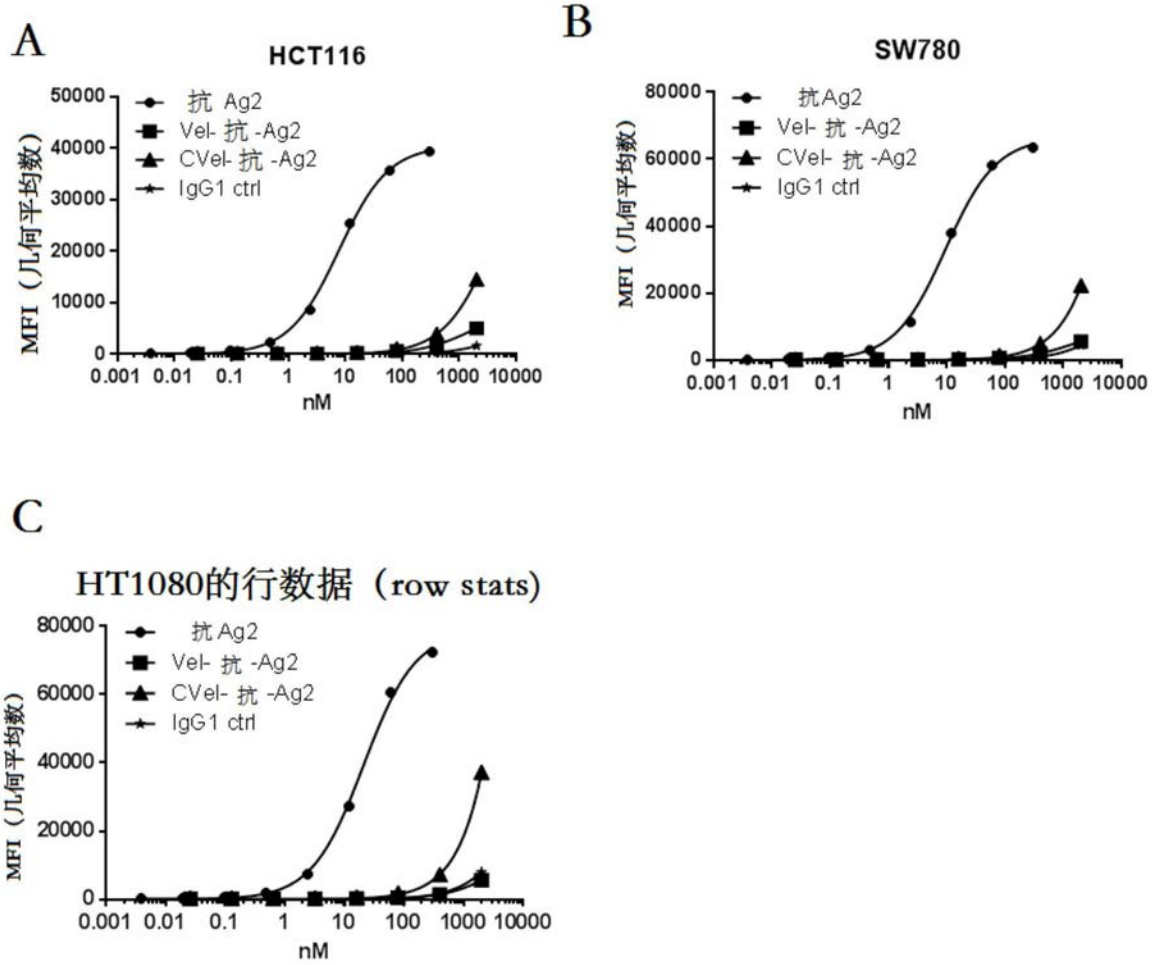


图7A-C:CVe1和Ve1掩蔽抗Ag2抗体的比较

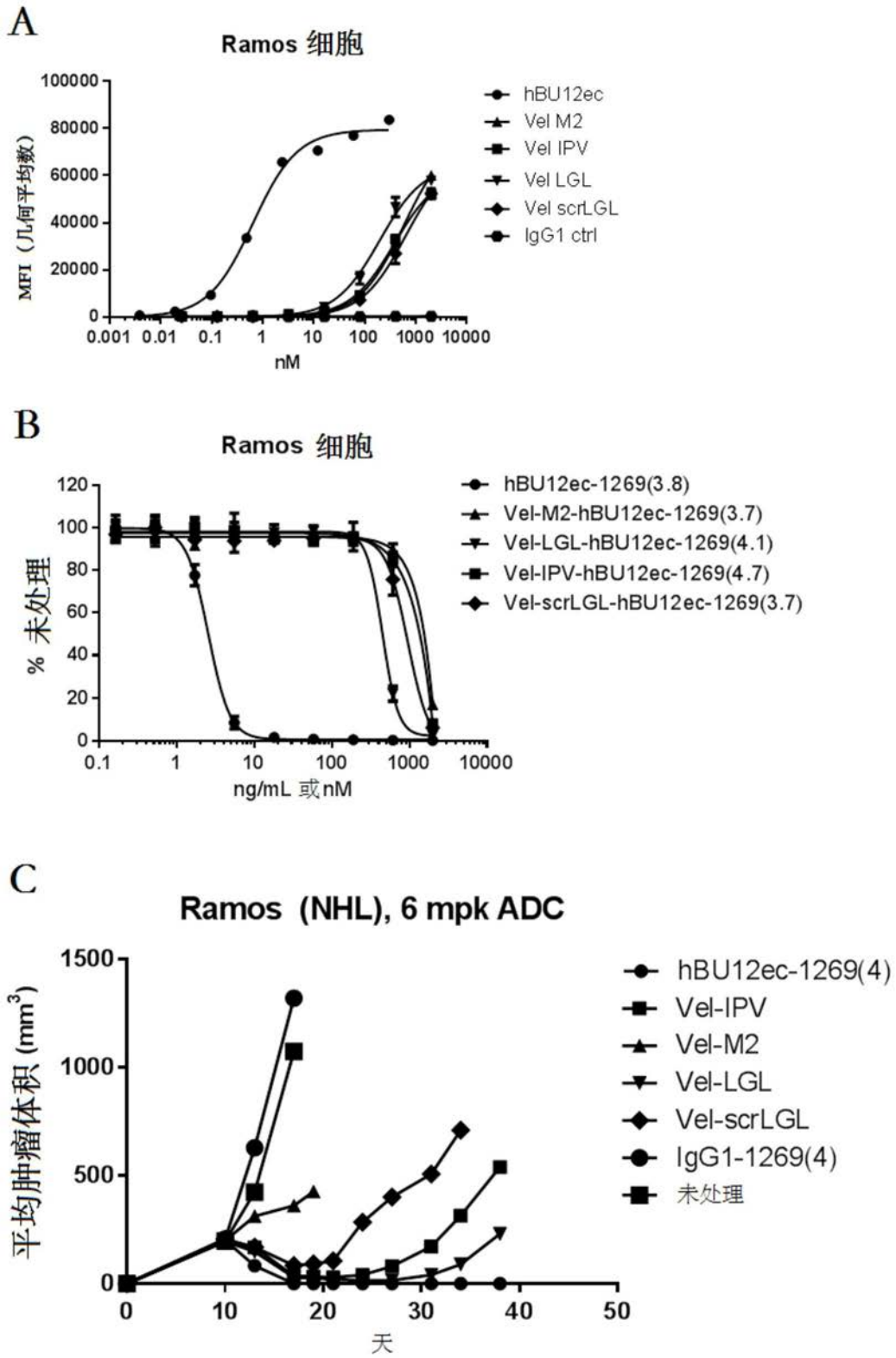


图8A-C:具有不同裂解序列的未掩蔽和Vel1掩蔽的抗CD19 ADC的比较

图9A-D: 未掩蔽和掩蔽的抗小鼠CD3抗体145-2C11的比较

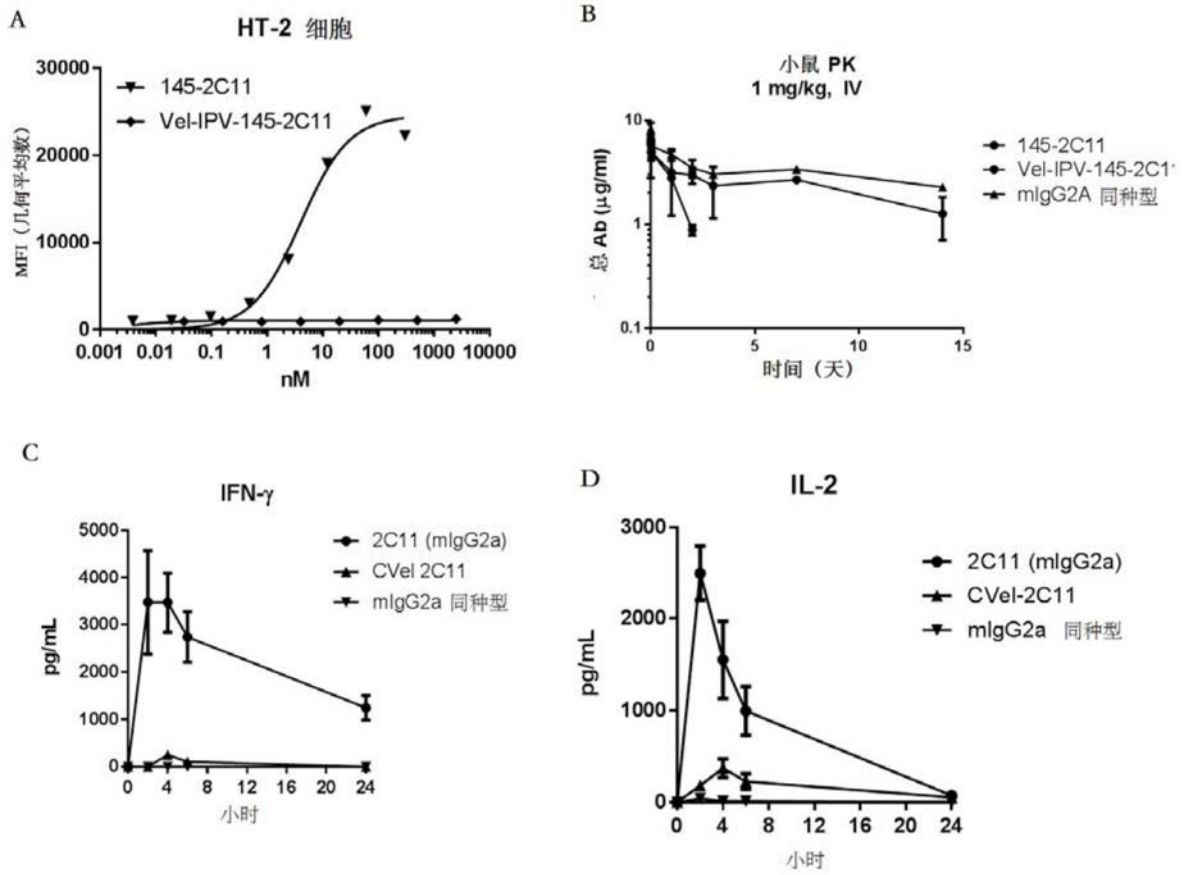


图9A-D

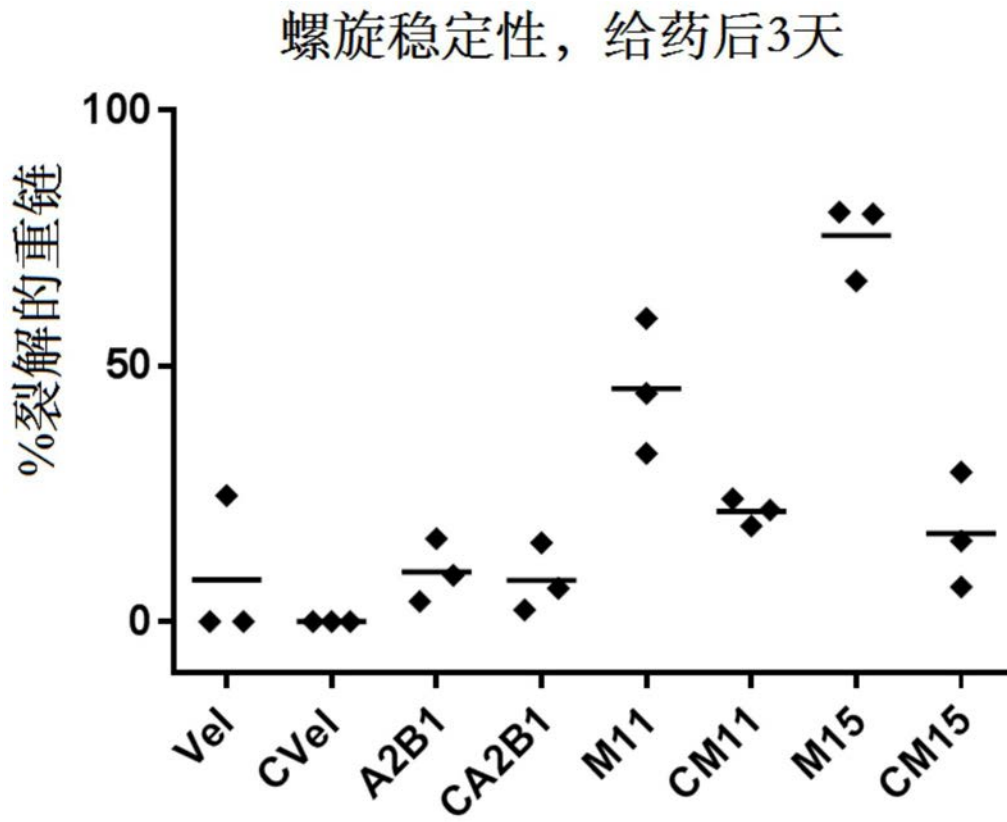


图10:具有不同卷曲螺旋结构域的掩蔽的抗人Ag2抗体的稳定性研究

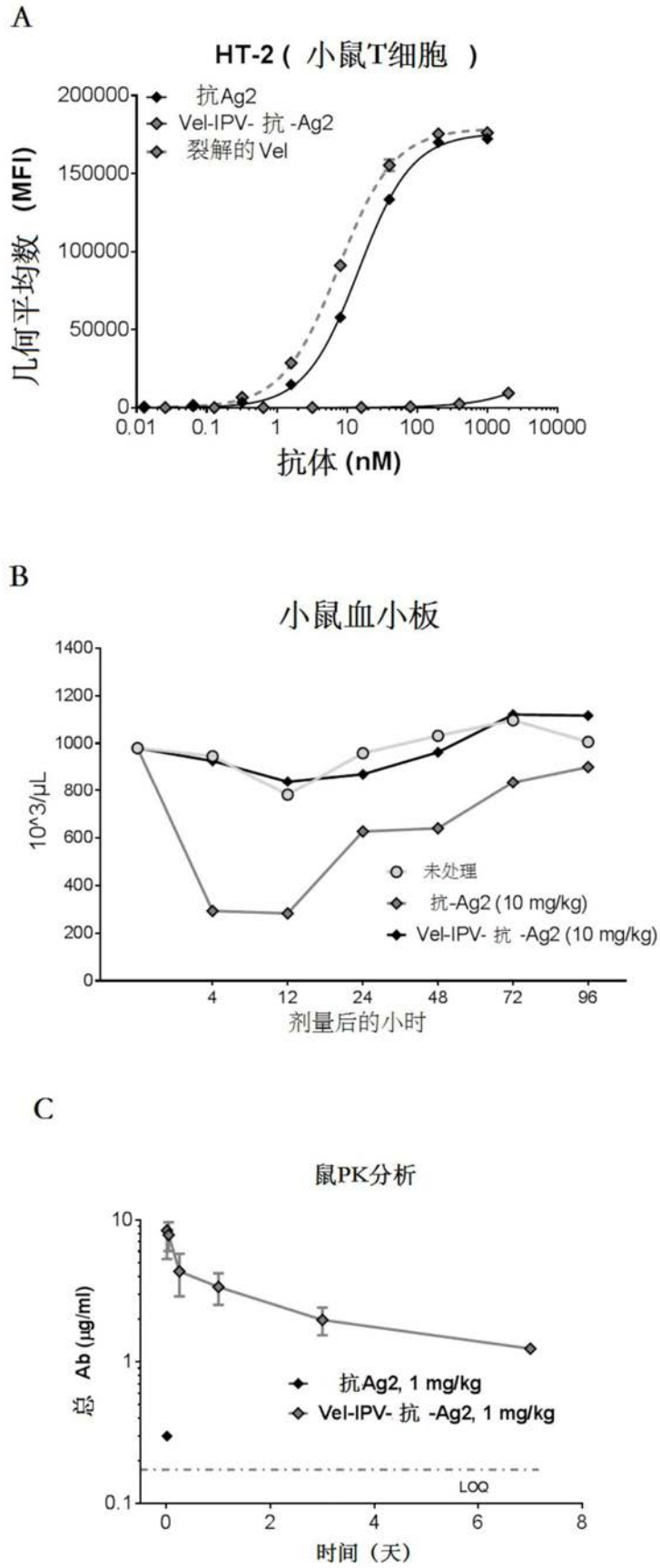


图11A-C

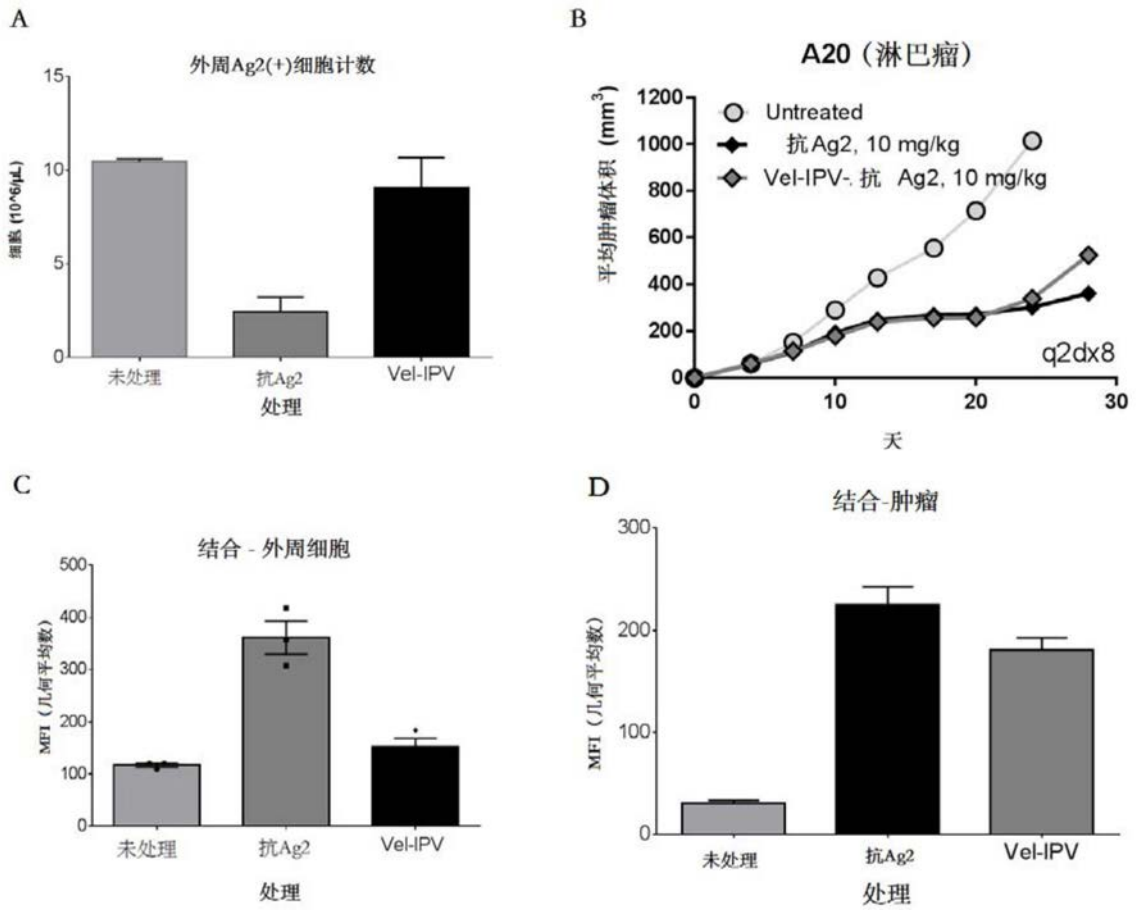
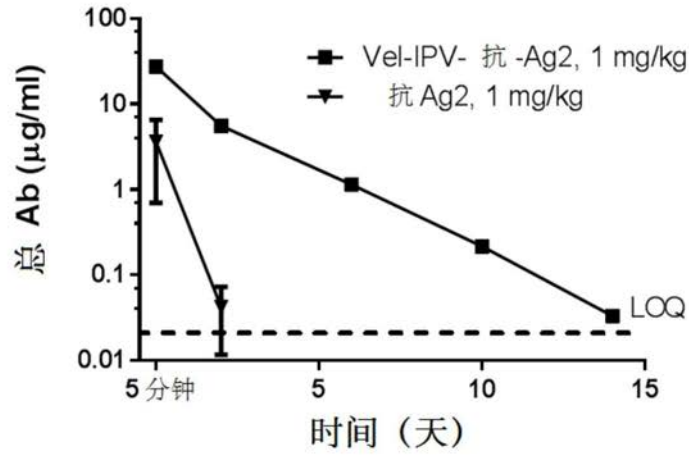
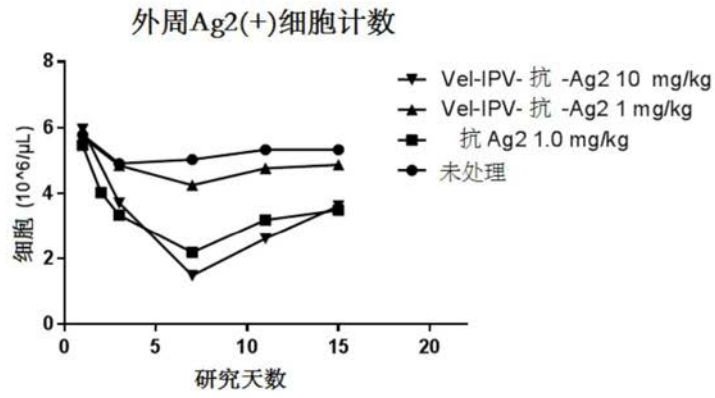


图12A-D

A



B



C

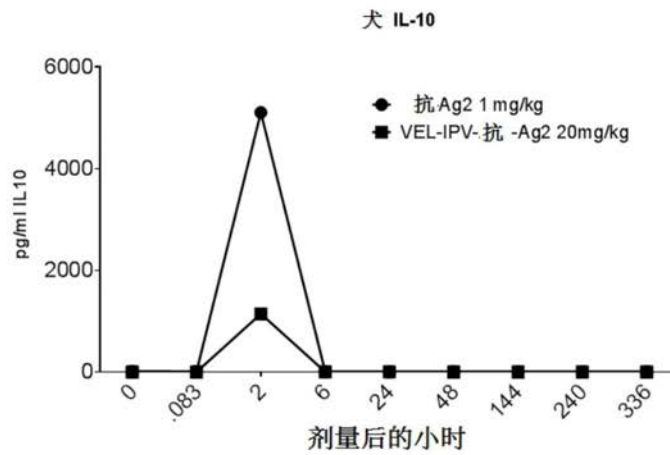
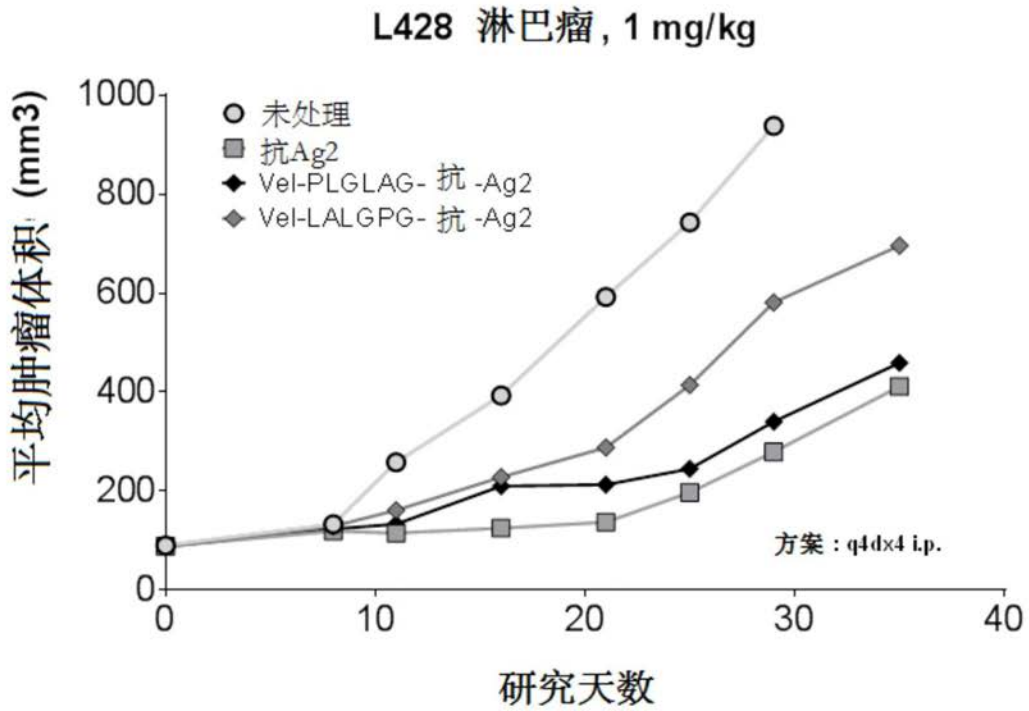


图13A-C

A



B

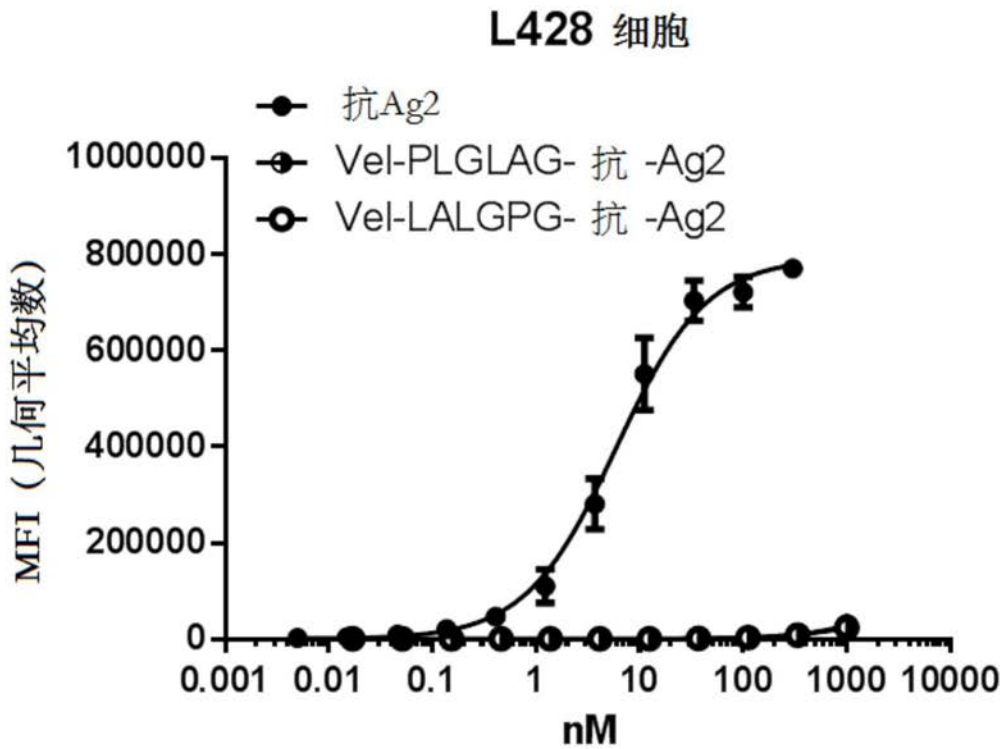


图14A-B