



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658240 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201480043966. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 06. 04

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/830913 2013. 06. 04 US

61/919935 2013. 12. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/040931 2014. 06. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/197612 EN 2014. 12. 11

(71) 申请人 西托姆克斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A. W. 康拉迪 S. 辛格 H. B. 洛曼

L. R. 德斯诺耶斯 T. W. 梁

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 赵胜宝 黄希贵

权利要求书3页 说明书75页 附图16页

(54) 发明名称

用于缀合可活化抗体的组合物和方法

(57) 摘要

本发明主要涉及用于缀合抗体和可活化抗体的组合物和方法,和在与试剂(例如治疗剂和/或诊断剂)缀合(例如基于巯基的缀合)之前部分地还原抗体和/或可活化抗体的方法。

1. 一种部分地还原可活化抗体和将试剂与所述可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生所述试剂定位的选择性,所述方法包括用还原剂部分地还原所述可活化抗体中的至少1个二硫键,而不破坏所述可活化抗体中的任何链内二硫键,和将所述试剂与至少1个巯基缀合,其中所述可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)、和与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

2. 权利要求1的方法,其中所述至少1个二硫键是链间二硫键。

3. 权利要求1的方法,其中所述至少1个二硫键是所述可活化抗体和第二分子之间的二硫键。

4. 权利要求3的方法,其中所述第二分子是半胱氨酸或谷胱甘肽。

5. 权利要求1的方法,其中未裂解状态的所述可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

6. 权利要求1的方法,其中所述还原剂是TCEP。

7. 权利要求1的方法,其中所述试剂选自表4中所列的试剂。

8. 权利要求1的方法,其中所述试剂是毒素或其片段。

9. 权利要求8的方法,其中所述试剂是微管抑制剂。

10. 权利要求8的方法,其中所述试剂是核酸破坏剂。

11. 权利要求8的方法,其中所述试剂是多拉司他汀、阿里他汀或其衍生物、类美登素或其衍生物、倍癌霉素或其衍生物、或卡奇霉素或其衍生物。

12. 权利要求4的方法,其中所述试剂阿里他汀E或其衍生物。

13. 权利要求4的方法,其中所述试剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)或单甲基阿里他汀D (MMAD)。

14. 权利要求4的方法,其中所述试剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)。

15. 权利要求4的方法,其中所述试剂是单甲基阿里他汀D (MMAD)。

16. 权利要求4的方法,其中所述试剂是DM1或DM4。

17. 权利要求4的方法,其中所述试剂经过接头与AB缀合。

18. 权利要求17的方法,其中所述接头是可裂解接头。

19. 权利要求1的方法,其中所述试剂是可检测部分。

20. 权利要求19的方法,其中所述可检测部分是诊断剂。

21. 权利要求1的方法,其中所述靶标选自表1所列的靶标。

22. 权利要求1的方法,其中AB是或源自选自表2所列的抗体的抗体。

23. 权利要求1的方法,其中所述其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

24. 权利要求1的方法,其中MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对所述靶标的平衡解离常数。

25. 权利要求1的方法,其中当所述可活化抗体呈裂解状态时,MM不干扰AB结合所述靶标,或不与AB竞争结合所述靶标。

26. 权利要求1的方法,其中MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。

27. 权利要求1的方法,其中MM多肽序列不同于所述靶标的序列,和其中MM多肽序列与

AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。

28. 权利要求1的方法,其中MM与所述靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。

29. 权利要求1的方法,其中MM与所述靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。

30. 权利要求1的方法,其中CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

31. 权利要求1的方法,其中所述蛋白酶与所述靶标在组织中共定位,和其中当所述可活化抗体暴露于所述蛋白酶时,所述蛋白酶裂解所述可活化抗体中的CM。

32. 权利要求1的方法,其中所述可活化抗体包含在MM和CM之间的连接肽。

33. 权利要求1的方法,其中所述可活化抗体包含在CM和AB之间的连接肽。

34. 权利要求1的方法,其中所述可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和其中呈未裂解状态的所述可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。

35. 权利要求34的方法,其中所述两个连接肽不需要彼此相同。

36. 权利要求34的方法,其中LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。

37. 权利要求34的方法,其中LP1或LP2的至少1个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGS)_n (SEQ ID NO: 22)、GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28),其中n是至少1的整数。

38. 权利要求1的方法,其中CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。

39. 权利要求1的方法,其中呈未裂解状态的所述可活化抗体包含间隔区,其中所述间隔区与MM直接连接,并具有以下从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

40. 一种缀合的可活化抗体,其在活化状态时结合靶标,所述缀合的可活化抗体包含:特异性结合所述靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中AB与单甲基阿里他汀D(MMAD)缀合;

当所述可活化抗体呈未裂解状态时抑制AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM);和与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

41. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对所述靶标的平衡解离常数。

42. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中当所述可活化抗体呈裂解状态时,MM不干扰AB结合所述靶标,或不与AB竞争结合所述靶标。

43. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中所述蛋白酶与所述靶标在组织中共定位,和其中当所述可活化抗体暴露于所述蛋白酶时,所述蛋白酶裂解所述可活化抗体中的CM。

44. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

45. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中所述可活化抗体包含在MM和CM之间的连接肽。

46. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中所述可活化抗体包含在CM和AB之间的连接肽。

47. 权利要求40的缀合的可活化抗体,其中所述可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和其中呈未裂解状态的所述可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排

列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。

48.权利要求47的缀合的可活化抗体,其中所述两个连接肽不需要彼此相同。

49.权利要求47的缀合的可活化抗体,其中LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。

50.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中MM是长度约不超过40个氨基酸的多肽。

51.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中MM多肽序列不同于所述靶标的序列,和其中MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。

52.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

53.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。

54.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中所述其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

55.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中AB的靶标选自表1中所列的靶标。

56.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中AB是或源自表2中所列的抗体。

57.权利要求40的缀合的可活化抗体,其中MMAD经过接头与AB缀合。

58.权利要求56的缀合的可活化抗体,其中所述接头是可裂解接头。

用于缀合可活化抗体的组合物和方法

[0001] 相关申请

本申请要求2013年6月4日提交的美国临时申请号61/830,913和2013年12月23日提交的美国临时申请号61/919,935的权益。其各自的内容通过引用以其整体结合到本文中。

发明领域

[0002] 本发明主要涉及用于缀合抗体和可活化抗体的组合物和方法,和在与试剂(例如治疗剂和/或诊断剂)缀合(例如基于巯基的缀合)之前部分地还原抗体和/或可活化抗体的方法。

[0003] 发明背景

基于抗体的疗法已证明有效治疗一些疾病,但在一些情况下,由于广泛的靶标表达导致的毒性限制了其治疗功效。此外,基于抗体的疗法已显示其它局限性,例如在给予后从循环中快速清除。抗体的缀合剂已用于进一步增进基于抗体的疗法的应用。分子例如毒素、放射性核素和药物,包括抗-癌症药物,已与某些抗体缀合,以产生免疫毒素、放射免疫缀合物和/或抗体-药物缀合物(ADC)。

[0004] 在小分子治疗领域,已发展提供活性化学实体的前药的策略。这样的前药以相对无活性(或显著较少活性)的形式给予。一旦给予,前药在体内代谢成活性化合物。对于其预期靶标和对于减少副作用,这样的前药策略可提供增加的药物选择性。

[0005] 因此,在基于抗体的疗法的领域中,对模拟小分子前药需要特性的抗体存在持续的需要,以及对将试剂与这些抗体缀合而未负面影响其模拟小分子前药需要的特性的能力的改进方法存在需要。

[0006] 发明简述

本发明提供包含可活化抗体的缀合物和制备这些可活化抗体缀合物的方法。还提供具有接受药物或标签的缀合点的可活化抗体。所述缀合物可在治疗上使用,在诊断上使用(例如,体外或体内),用于体内成像,和用于各种其它治疗、诊断和/或预防应用的任一种。

[0007] 通常,本文提供的组合物和方法包括可活化抗体,其包括特异性结合靶标的抗体或抗体片段(AB),其中AB与降低AB结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)偶联。在一些实施方案中,可活化抗体进一步包括作为蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)。本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种试剂与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不损害可活化抗体的活性(例如,掩蔽、激活或结合活性)。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种试剂与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不还原或以其它方式破坏在MM内的一个或多个二硫键。本文提供的组合物和方法产生与一种或多种试剂(例如各种治疗、诊断和/或预防剂的任一种)缀合的可活化抗体,和在一些实施方案中,没有任何试剂与可活化抗体的MM缀合。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化抗体,其中MM保留有效地和高效地掩蔽在未裂解状态中的可活化抗体的AB的能力。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化抗体,其中可活化抗体在可裂解CM的蛋白酶存在的情况下仍被活化,即裂解。

[0008] 可活化抗体具有至少一个试剂的缀合点,但在本文提供的方法和组合中并非所有可能的缀合点可用于试剂的缀合。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与链间二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与链间硫键的硫原子,而不是参与链内二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是半胱氨酸或含有硫原子的其它氨基酸残基的硫原子。这样的残基可天然存在于抗体结构中或可通过定点诱变、化学变换或错误掺入非天然氨基酸而掺入至抗体。

[0009] 还提供制备在AB中具有一个或多个链间二硫键和在MM中具有一个或多个链内二硫键的可活化抗体的缀合物的方法,和提供了对游离巯基有反应性的药物。所述方法通常包括用还原剂,例如TCEP,部分地还原可活化抗体中的链间二硫键;和将对游离巯基有反应性的药物与所述部分还原的可活化抗体缀合。如本文所用,术语部分还原是指其中可活化抗体与还原剂接触和并非所有二硫键,例如并非所有可能的缀合位点被还原的情况。在一些实施方案中,少于99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或少于5%的所有可能的缀合位点被还原。

[0010] 在一些实施方案中,提供还原可活化抗体和将试剂例如药物与所述可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生定位所述试剂的选择性。所述方法通常包括用还原剂部分地还原可活化抗体,使得在可活化抗体的掩蔽部分或其它非-AB部分中的任何缀合位点不被还原,和将所述试剂与AB中的链间巯基缀合。选择缀合位点,以允许试剂的所需定位,以允许缀合在所需位点上发生。还原剂例如TCEP。还原反应条件,例如还原剂与可活化抗体的比率、孵育期限、孵育期间的温度、还原反应溶液的pH等,通过鉴定产生缀合的可活化抗体的条件来确定,其中MM保留有效地和高效地掩蔽未裂解状态的可活化抗体的AB的能力。还原剂与可活化抗体的比率将取决于可活化抗体而改变。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率的范围为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约2.5:1至1:1。

[0011] 在一些实施方案中,提供还原可活化抗体的AB中的链间二硫键和将试剂例如含巯基试剂例如药物与得到的链间巯基缀合以选择性定位试剂到AB上的方法。所述方法通常包括用还原剂部分地还原AB以形成至少2个链间巯基,而在可活化抗体中不形成所有可能的链间巯基;和将试剂与部分还原的AB的链间巯基缀合。例如,将可活化抗体的AB在约37℃以所需比率的还原剂:可活化抗体部分地还原约1小时。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率范围为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5。在一些实施方案

中,所述比率范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约2.5:1至1:1。

[0012] 含巯基的试剂可以是例如,半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸。还原剂可以是例如,TCEP。在一些实施方案中,还原的可活化抗体可在缀合之前使用例如柱色谱、透析或渗滤纯化。在一些实施方案中,还原的抗体在部分还原之后和在缀合之前不经纯化。

[0013] 在一些实施方案中,可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中AB与掩蔽部分(MM)偶联,使得MM与AB的偶联降低抗体或其抗原结合片段结合靶标的能力。在一些实施方案中,MM经过可裂解部分(CM)与AB偶联,所述CM包括蛋白酶的底物,所述蛋白酶例如为与靶标在受试者的治疗部位上共定位的蛋白酶。本文提供的可活化抗体在循环中是稳定的,在预期的治疗和/或诊断部位上而不在正常例如健康的组织上激活,并且当激活时显示与相应的未修饰抗体至少相当的靶标结合。

[0014] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

[0015] 在一些实施方案中,可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其免疫活性片段是单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,这样的结合靶标的抗体或其免疫活性片段是小鼠、嵌合、人源化或全人单克隆抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段是Fab片段、F(ab')₂片段、scFv或scAb。

[0016] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段(AB)特异性结合选自表1中所示的那些的靶标。在一些实施方案中,AB特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)。在一些实施方案中,AB特异性结合Jagged 1和/或 Jagged 2。在一些实施方案中,AB特异性结合白介素6受体(IL-6R)。

[0017] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段(AB)是或源自选自表2中所示的那些的抗体。

[0018] 在一些实施方案中,AB具有约100 nM或更低的结合靶标的平衡解离常数。

[0019] 在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。

[0020] 在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数不超过AB对靶标的平衡解离常数。

[0021] 在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。

[0022] 在一些实施方案中,MM是长度约2至40个氨基酸的多肽,例如不超过40个氨基酸长。

[0023] 在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。

[0024] 在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过25%的同一性。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过10%的同一性。

[0025] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的解离常数(K_d)为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少20倍。在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的解离常数(K_d)为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少40倍。在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的解离常数(K_d)为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少50倍。在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的 K_d 为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少100倍。在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的 K_d 为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少1000倍。在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB结合靶标的能力,使得当与MM偶联时AB对靶标的 K_d 为当不与MM偶联时AB对靶标的 K_d 的至少10,000倍。

[0026] 在一些实施方案中,当使用靶标置换测定法例如,描述于PCT公布号W0 2009/025846和W0 2010/081173中的测定法体外测定时,在存在靶标的情况下,与当CM裂解时相比,当CM未裂解时MM降低AB结合靶标的能力达至少90%。

[0027] 在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,在不显著表达靶标的组织中蛋白酶无活性,或具有显著较低活性。在一些实施方案中,在健康例如无疾病组织中,蛋白酶无活性,或具有显著较低活性。

[0028] 在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0029] 在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是选自uPA (尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂)、豆荚蛋白(Legumain)和MT-SP1 (蛋白裂解酶(matriptase))的蛋白酶的底物。在一些实施方案中,蛋白酶包括uPA。在一些实施方案中,蛋白酶包括豆荚蛋白。在一些实施方案中,蛋白酶包括MT-SP1。

[0030] 在一些实施方案中,CM是至少两种蛋白酶的底物。在一些实施方案中,各蛋白酶选自表3中所示的那些。在一些实施方案中,CM是至少两种蛋白酶的底物,和蛋白酶之一选自uPA、豆荚蛋白和MT-SP1,和另一蛋白酶选自表3中所示的那些。在一些实施方案中,CM是选自uPA、豆荚蛋白和MT-SP1的至少两种蛋白酶的底物。

[0031] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得在未裂解状态时,减少可活化抗体与靶标的结合以致其平衡解离常数为未修饰的AB与靶标结合的平衡解离常数的至少20倍,而呈裂解状态的可活化抗体的AB结合所述靶标。

[0032] 在一些实施方案中,CM 位于可活化抗体中,使得在未裂解状态时,减少可活化抗体与靶标的结合以致其平衡解离常数为未修饰的AB与靶标结合的平衡解离常数的至少40倍,而呈裂解状态的可活化抗体的AB结合所述靶标。

[0033] 在一些实施方案中,CM 位于可活化抗体中,使得在未裂解状态时,减少可活化抗体与靶标的结合以致其平衡解离常数为未修饰的AB与靶标结合的平衡解离常数的至少50倍,而呈裂解状态的可活化抗体的AB结合所述靶标。

[0034] 在一些实施方案中,CM 位于可活化抗体中,使得在未裂解状态时,减少可活化抗体与靶标的结合以致其平衡解离常数为未修饰的AB与靶标结合的平衡解离常数的至少100倍,而呈裂解状态的可活化抗体的AB结合所述靶标。

[0035] 在一些实施方案中,CM 位于可活化抗体中,使得在未裂解状态时,减少可活化抗

体与靶标的结合以致其平衡解离常数为未修饰的AB与靶标结合的平衡解离常数的至少200倍,而呈裂解状态的可活化抗体的AB结合所述靶标。

[0036] 在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。

[0037] 在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。

[0038] 在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。

[0039] 在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。

[0040] 在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。

[0041] 在一些实施方案中,可活化抗体暴露于蛋白酶和被蛋白酶裂解,使得在蛋白酶裂解CM后在活化或裂解状态时,活化的抗体包括轻链氨基酸序列,其包括至少一部分的LP2和/或CM序列。

[0042] 在一些实施方案中,可活化抗体还包括信号肽。在一些实施方案中,信号肽经过间隔区与可活化抗体缀合。在一些实施方案中,在信号肽不存在的情况下间隔区与可活化抗体缀合。在一些实施方案中,间隔区与可活化抗体的MM直接连接。

[0043] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包含与MM直接连接的间隔区,并具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQSGQ (SEQ ID NO:11)。

[0044] 在一些实施方案中,可活化抗体的AB天然包含一个或多个二硫键。在一些实施方案中,AB可经工程改造以包括一个或多个二硫键。

[0045] 在一些实施方案中,与可活化抗体缀合的所述试剂是治疗剂。在一些实施方案中,与可活化抗体缀合的所述试剂是诊断剂。在一些实施方案中,与可活化抗体缀合的所述试剂是预防剂。

[0046] 在一些实施方案中,所述试剂是抗癌剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。如本文所用,毒素的片段是保留毒素活性的片段。在一些实施方案中,所述试剂是选自表4所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。

[0047] 在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是含巯基的接头。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述接头选自表5和6中所示的接头。

[0048] 在一些实施方案中,可活化抗体还包括可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。在一些实施方案中,可检测的部分是可缀合的检测试剂。在一些实施方案中,可检测的部分是例如荧光团,例如荧光素衍生物,例如异硫氰酸荧光素(FITC)。

[0049] 在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体是单特异性的。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体是多特异性的,例如以非限制性实例的方式,双特异性的或三功能性的。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为前-双特异性T细胞衔接物(BITE)分子的一部分。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为前-嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞或其它工程改造的受体的一部分。

[0050] 在一些实施方案中,可活化抗体的血清半寿期长于相应的抗体的血清半寿期;例如,可活化抗体的 pK 长于相应的抗体的 pK 。在一些实施方案中,可活化抗体的血清半寿期类似于相应的抗体的血清半寿期。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少15天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少12天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少11天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少10天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少9天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少8天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少7天。在一些实施方案中,当给予至生物时,可活化抗体的血清半寿期为至少6天。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少5天。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少4天。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少3天。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少2天。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少24小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少20小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少18小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少16小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少14小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少12小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少10小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少8小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少6小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少4小时。在一些实施方案中,当给予至生物时,缀合的可活化抗体的血清半寿期为至少3小时。

[0051] 本发明提供部分还原的可活化抗体,其中可活化抗体中的至少一个链间二硫键已被还原剂还原,而不破坏可活化抗体中的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不被还原剂破坏。在一些实施方案中,可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键不被还原剂破坏。在一些实施方案中,呈未裂解

状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0052] 本发明还提供部分还原的可活化抗体,其中可活化抗体中的至少一个链间二硫键已被还原剂还原,而不破坏或以其它方式损害可活化抗体的活性和/或效力,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性的实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力为掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不被还原剂破坏。在一些实施方案中,可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键不被还原剂破坏。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0053] 在一些实施方案中,部分还原的可活化抗体与试剂通过至少一个链间巯基缀合。在一些实施方案中,所述试剂选自表4中所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。

[0054] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、

(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GSGG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和所述间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0055] 本发明还提供部分还原的可活化抗体,其中可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键已被还原剂还原,而不破坏可活化抗体的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0056] 本发明还提供部分还原的可活化抗体,其中可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键已被还原剂还原,而不破坏或以其它方式损坏可活化抗体的活性和/或效力,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力为掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0057] 在一些实施方案中,部分还原方法不破坏可活化抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。

[0058] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0059] 在一些实施方案中,部分还原的可活化抗体与试剂通过至少一个巯基缀合。在一些实施方案中,所述试剂选自表4中所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D (MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。

[0060] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方

案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和所述间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0061] 本发明提供将试剂与可活化抗体选择性缀合的方法。例如,本发明提供部分地还原可活化抗体和将试剂与可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生定位所述试剂的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,而不破坏可活化抗体中的任何链内二硫键,和将所述试剂与至少一个链间巯基缀合,其中所述可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

[0062] 本发明还提供部分地还原可活化抗体和将试剂与可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生定位所述试剂的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,而不破坏或以其它方式损害可活化抗体的活性和/或效力,其中所述可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力是掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,所述方法不破坏在可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。

[0064] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。在一些实施方案中,所述试剂选自表4中所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是

单甲基阿里他汀D (MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。

[0065] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0066] 本发明提供部分地还原可活化抗体和将试剂与可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生定位所述试剂的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原在可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键,而不破坏可活化抗体中的任何链内二硫键,和将所述试剂与至少一个巯基缀合,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0067] 本发明还提供部分地还原可活化抗体和将试剂与可活化抗体缀合的方法,所述可活化抗体产生定位所述试剂的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原在可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键,而不破坏或以其它方式损害可活化抗体的活性和/或效

力,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力是掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0068] 在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。

[0069] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。在一些实施方案中,所述试剂选自表4中所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。

[0070] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GG)_n、(GSGG)_n(SEQ ID NO: 21)和(GGGG)_n(SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO: 23)、GGSGG(SEQ ID NO: 24)、GSGSG(SEQ ID NO: 25)、GSGGG(SEQ ID NO: 26)、GGGSG(SEQ

ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0071] 本发明还提供部分地还原可活化抗体的方法,所述可活化抗体产生定位可活化抗体中的一个或多个可能的缀合位点的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,而不破坏可活化抗体中的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

[0072] 本发明还提供部分地还原可活化抗体的方法,所述可活化抗体产生定位可活化抗体中的一个或多个可能的缀合位点的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,而不破坏或以其它方式损害可活化抗体的活性和/或效力,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力是掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。

[0073] 在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。

[0074] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0075] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、

GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0076] 本发明还提供部分地还原可活化抗体的方法,所述可活化抗体产生定位可活化抗体中的一个或多个可能的缀合位点的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原在可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键,而不破坏可活化抗体中的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0077] 本发明还提供部分地还原可活化抗体的方法,所述可活化抗体产生定位可活化抗体中的一个或多个可能的缀合位点的选择性,所述方法通过用还原剂部分地还原在可活化抗体和第二分子之间的至少一个二硫键,而不破坏或以其它方式损害可活化抗体的活性和/或效力,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或效力是掩蔽活性、可活化抗体的激活和/或激活的可活化抗体的结合活性。在一些实施方案中,第二分子是半胱氨酸。在一些实施方案中,第二分子是谷胱甘肽。

[0078] 在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,所述方法不破坏可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。

[0079] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。在一些实施方案中,所述试剂选自表4中所列的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D (MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分。在一些实施方案中,可检测的部分是诊断剂。

[0080] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方

案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGG)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGG)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0081] 本发明还提供缀合的可活化抗体,其包括与单甲基阿里他汀D (MMAD)有效负载连接的可活化抗体,其中可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制呈未裂解状态的所述可活化抗体的AB与所述靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可裂解部分(CM),和CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

[0082] 在一些实施方案中,MMAD-缀合的可活化抗体可使用用于连接试剂与AB的数种方法的任一种来缀合:(a) 与AB的碳水化合物部分连接,或(b) 与AB的巯基连接,或(c) 与AB的氨基连接,或(d) 与AB的羧酸酯基团连接。

[0083] 在一些实施方案中,MMAD有效负载经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,MMAD有效负载经过接头与AB的半胱氨酸缀合。在一些实施方案中,MMAD有效负载经过接头与AB的赖氨酸缀合。在一些实施方案中,MMAD有效负载经过接头与AB的另一残基缀合,例如本文公开的那些残基。在一些实施方案中,接头是含巯基的接头。在一些实施方案中,接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,接头是不可裂解的接头。在一些实施方案中,接头选自表5和6中所示的接头。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头连接。在一些实施方案中,MMAD有效负载使用本文公开的部分还原和缀合技术与AB缀合。

[0084] 在一些实施方案中,所述靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,靶标是EGFR。在一些实施方案中,靶标是Jagged蛋白,例如Jagged 1和/或Jagged 2。在一些实施方案中,靶标是白介素6受体(IL-6R)。在一些实施方案中,AB是或源自选自表2中所列的抗体的抗体。在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、

单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的结合靶标的平衡解离常数为约100 nM或更低。在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰呈裂解状态的可活化抗体的AB结合靶标,或不与呈裂解状态的可活化抗体的AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列,和MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过25%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM与靶标不包括超过10%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,可活化抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 21)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 22),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO: 23)、GGSGG (SEQ ID NO: 24)、GSGSG (SEQ ID NO: 25)、GSGGG (SEQ ID NO: 26)、GGGSG (SEQ ID NO: 27)和GSSSG (SEQ ID NO: 28)。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体包括间隔区,和间隔区与MM直接连接,和具有从N-端至C-端的结构排列:间隔区-MM-CM-AB。

[0085] 本发明提供使用在活化状态时结合靶标的缀合的可活化抗体,特别是结合和中和或以其它方式抑制靶标的至少一种生物活性的缀合的可活化抗体,治疗、预防和/或延迟与受试者中的靶标的表达和/或活性有关的适应症(例如疾病或病症)的发作或进展或减轻所述适应症的症状的方法。用于本发明的任何方法和试剂盒的合适的缀合可活化抗体包括本文所述的任何缀合的可活化抗体,包括本文所述的任何部分缀合的可活化抗体和/或部分还原的可活化抗体。

[0086] 在一些实施方案中,本发明提供使用在活化状态时结合靶标的缀合的可活化抗体,特别是结合和中和或以其它方式抑制靶标的至少一种生物活性的缀合的可活化抗体,治疗、预防和/或延迟与受试者中的靶标的可检测水平的表达和/或活性有关的适应症(例如疾病或病症)的发作或进展或减轻所述适应症的症状的方法。在一些实施方案中,呈活化状态的缀合的可活化抗体结合靶标和内在化。在一些实施方案中,靶标的可检测水平的表达和/或活性存在于治疗和/或诊断的至少一个预期位点。在一些实施方案中,靶标的可检测水平的表达和/或活性存在于正常(例如健康)的组织,和缀合的可活化抗体在正常(例如健康)的组织中激活,但不在正常(例如健康)的组织中激活。缀合的可活化抗体例如通过与靶标在治疗和/或诊断的预期位点上共定位的蛋白酶激活。在一些实施方案中,靶标的可检测水平的表达和/或活性存在于治疗和/或诊断的至少一个预期位点上和在正常(例如健康)的组织中,和缀合的可活化抗体在正常(例如健康)的组织中激活,但不在正常(例如健康)的组织中激活。缀合的可活化抗体例如通过与靶标在治疗和/或诊断的预期位点上

共定位的蛋白酶激活。

[0087] 在一些实施方案中,与靶标的表达和/或活性有关的适应症(例如疾病或病症)是癌症。在一些实施方案中,与靶标的表达和/或活性有关的适应症(例如疾病或病症)是炎症病症和/或自身免疫疾病。

[0088] 本发明还提供通过给予有需要的受试者治疗有效量的本文所述的缀合的可活化抗体在受试者中抑制血管发生的方法。

[0089] 缀合的可活化抗体可在疾病的任何阶段给予。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体可给予至患有任何阶段(从早期至转移)的癌症的患者。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体可给予至患有任何阶段(从早期发作到晚期阶段)的炎症病症和/或自身免疫疾病的患者。应理解,术语受试者和患者在本文可互换使用。

[0090] 缀合的可活化抗体还用于其它治疗的适应症和治疗方案。例如,本文提供的实施方案的缀合的可活化抗体可用于包括新辅助疗法的治疗方案。

[0091] 在一些实施方案中,缀合的可活化抗体与一种或多种另外的药剂组合给予,以非限制性实例的方式,例如化学治疗剂,例如烷化剂、抗-代谢物、抗-微管剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性抗生素和任何其它核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述另外的药剂是紫杉烷,例如紫杉醇(例如Abraxane®)。在一些实施方案中,所述另外的药剂是抗-代谢物,例如吉西他滨。在一些实施方案中,所述另外的药剂是烷化剂,例如基于铂的化学疗法,例如卡铂或顺铂。在一些实施方案中,所述另外的药剂是靶向剂,例如激酶抑制剂,例如索拉非尼或厄洛替尼。在一些实施方案中,所述另外的药剂是靶向剂,例如另一抗体,例如单克隆抗体(例如贝伐单抗)、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,所述另外的药剂是蛋白酶抑制剂,例如硼替佐米或卡非佐米(carfilzomib)。在一些实施方案中,所述另外的药剂是免疫调节剂,例如来那度胺或IL-2。在一些实施方案中,所述另外的药剂是辐射。在一些实施方案中,所述另外的药剂是本领域技术人员认为是护理标准的药剂。在一些实施方案中,所述另外的药剂是本领域技术人员众所周知的化学治疗剂。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体和另外的药剂配制在单一组合物中。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体和另外的药剂作为两个或更多个单独的组合物给予。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体和另外的药剂同时给予。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体和另外的药剂序贯给予。

[0092] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是非人哺乳动物,例如非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、劳作动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是啮齿动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是伴侣动物。在一些实施方案中,受试者是兽医护理的动物。

[0093] 缀合的可活化抗体和其治疗制剂给予患有与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症或对与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症敏感的受试者。患有与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症或对与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症敏感的受试者使用本领域已知的各种方法的任何一种鉴定。例如,患有癌症或其它肿瘤病况的受试者使用各种临床和/或实验室检验的任何一种鉴定,例如身体检查和血液、尿液和粪便分析,以评价健康状态。

[0094] 如果实现各种实验室或临床目标的任何一种,则给予患有与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症的患者缀合的可活化抗体被认为是成功的。例如,如果与疾病或病症有关的一个或多个症状被减轻、减少、抑制或不进展至进一步的(即更坏的)状态,则给予患有与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症的患者缀合的可活化抗体被认为是成功的。如果疾病进入缓和或不进展至进一步的(即更坏的)状态,则给予患有与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症的患者缀合的可活化抗体被认为是成功的。

[0095] 本发明还提供在各种诊断和/或预防适应症中使用结合靶标的缀合的可活化抗体的方法,以及用于这些方法的试剂盒。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,缀合的可活化抗体包括可检测的标记。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,可检测的标记包括成像剂、对比剂、酶、荧光标记、生色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,成像剂包含放射性同位素。在这些方法的一些实施方案中,放射性同位素是铟或镅。在这些方法的一些实施方案中,放射性同位素是或源自碘。在这些方法的一些实施方案中,放射性同位素是¹²⁵I或¹³³I。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,对比剂包括碘、钆或氧化铁。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、蓝绿色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2 (RFP tdimer2)、HCRED或铈衍生物。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,发光标记包括N-甲基吖啶(acrydium)衍生物。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,标记包括Alexa Fluor® 标记,例如Alex Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0096] 在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在这些方法和/或试剂盒的一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是非人哺乳动物,例如非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、劳作动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是啮齿动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是伴侣动物。在一些实施方案中,受试者是兽医护理的动物。

[0097] 本发明还提供在各种诊断和/或预防适应症中使用缀合的可活化抗体(即可活化的抗体缀合物)的方法。例如,本发明提供检测在受试者或样品中存在或不存在裂解剂和目的靶标的方法,通过(i) 使受试者或样品与缀合的可活化抗体接触和(ii) 测量在受试者或样品中的缀合的可活化抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的缀合的可活化抗体指示裂解剂和靶标存在于受试者或样品中,和其中受试者或样品中无可检测水平的激活的缀合的可活化抗体指示裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者不存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,对应于在缀合的可活化抗体中缀合的可活化抗体的未缀合的可活化抗体用于接触受试者或样品。

[0098] 本发明还提供检测在受试者或样品中存在或不存在裂解剂的方法,通过(i) 使受试者或样品与缀合的可活化抗体在存在靶标的情况下接触,和(ii) 测量受试者或样品中激活的缀合的可活化抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的缀合的可活化抗体指示裂解剂存在于受试者或样品中,和其中受试者或样品中无可检测水平的缀合的可活化抗体指示裂解剂不存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,对应于在缀合的可活

化抗体中缀合的可活化抗体的未缀合的可活化抗体用于接触受试者或样品。

[0099] 本发明还提供检测在受试者或样品中存在或不存在裂解剂的方法,通过(i) 使受试者或样品与缀合的可活化抗体接触;和(ii) 测量受试者或样品中可检测的标记的水平,其中受试者或样品中可检测水平的可检测标记指示裂解剂不存在于受试者或样品中,和其中受试者或样品中无可检测水平的可检测标记指示裂解剂存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,对应于在缀合的可活化抗体中缀合的可活化抗体的未缀合的可活化抗体用于接触受试者或样品。

[0100] 在这些方法的一些实施方案中,缀合的可活化抗体或对应的未缀合的可活化抗体包括可检测标记,其选自成像剂、对比剂、酶、荧光标记、生色团、染料、一种或多种金属离子和基于配体的标记。在这些方法的一些实施方案中,成像剂包含放射性同位素。在这些方法的一些实施方案中,放射性同位素是铟或钨。在这些方法的一些实施方案中,对比剂包括碘、钆或氧化铁。在这些方法的一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在这些方法的一些实施方案中,荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、蓝绿色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铈衍生物。在这些方法的一些实施方案中,发光标记包括N-甲基吡啶鎓衍生物。在这些方法的一些实施方案中,标记包括Alexa Fluor®标记,例如Alex Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在这些方法的一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0101] 在这些方法的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在这些方法的一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是非人哺乳动物,例如非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、劳作动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是啮齿动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是伴侣动物。在一些实施方案中,受试者是兽医护理的动物。

[0102] 在这些方法的一些实施方案中,所述方法是体内方法。在这些方法的一些实施方案中,所述方法是原位方法。在这些方法的一些实施方案中,所述方法是离体方法。在这些方法的一些实施方案中,所述方法是体外方法。

[0103] 在所述方法的一些实施方案中,所述方法用于鉴定或以其它方式精修适合用本公开内容的缀合的可活化抗体治疗的患者群。例如,对靶标和裂解在这些方法中测试的缀合的可活化抗体的可裂解部分(CM)中的底物的蛋白酶两者测试为阳性的患者鉴定为用包含这样的CM的这样的缀合的可活化抗体治疗的合适的候选者。同样,对靶标和裂解在使用这些方法测试的缀合的可活化抗体或对应的未缀合的可活化抗体的CM中的底物的蛋白酶的任一或两者测试为阴性的患者可鉴定为另一形式的疗法的合适的候选者。在一些实施方案中,这样的患者可用其它可活化抗体和/或缀合的可活化抗体测试,直至用于治疗的合适的缀合的可活化抗体被鉴定(例如,在疾病位点上被患者裂解的包含CM的缀合的可活化抗体)。

[0104] 在所述方法的一些实施方案中,所述方法用于鉴定或以其它方式精修适合用本公开内容的缀合的可活化抗体治疗的患者群,接着通过给予有需要的受试者缀合的可活化抗体进行治疗。例如,对靶标和裂解在使用这些方法测试的缀合的可活化抗体或对应的未缀合的可活化抗体的可裂解部分(CM)中的底物的蛋白酶两者测试为阳性的患者被鉴定为用

包含这样的CM的这样的缀合的可活化抗体治疗的合适的候选者,和然后所述患者给予治疗有效量的缀合的可活化抗体。同样,对靶标和裂解在使用这些方法测试的缀合的可活化抗体或对应的未缀合的可活化抗体的CM中的底物的蛋白酶的任一或两者测试为阴性的患者可被鉴定为另一形式的疗法的合适的候选者。在一些实施方案中,这样的患者可用其它可活化抗体和/或缀合的可活化抗体测试,直到用于治疗的可活化抗体得以鉴定(例如,包含在疾病部位上被患者裂解的CM的缀合的可活化抗体)。在一些实施方案中,然后给予患者治疗有效量的患者对其测试为阳性的缀合的可活化抗体。

[0105] 本发明还提供在活化状态时结合靶标的缀合的可活化抗体,其中缀合的可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中AB与单甲基阿里他汀D(MMAD)缀合;当可活化抗体呈未裂解状态时抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);和与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是起蛋白酶的底物作用的多肽。

[0106] 在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,可活化抗体包含在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),和其中呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,所述两个连接肽不需要彼此相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度约1至20个氨基酸的肽。

[0107] 在一些实施方案中,MM的结合AB的平衡解离常数大于AB对靶标的平衡解离常数。在一些实施方案中,当可活化抗体呈裂解状态时,MM不干扰AB结合靶标或不与AB竞争结合靶标。在一些实施方案中,MM是长度约不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM多肽序列不同于靶标的序列和其中MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体具有不超过50%的同一性。

[0108] 在一些实施方案中,蛋白酶与靶标在组织中共定位,和其中当可活化抗体暴露于蛋白酶时蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,CM是选自表3中所示的那些的酶的底物。

[0109] 在一些实施方案中,其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scab、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,AB的靶标选自表1中所列的靶标。在一些实施方案中,AB是或源自表2中所列的抗体。

[0110] 在一些实施方案中,MMAD经过接头与AB缀合。在一些实施方案中,接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,接头是非-可裂解的接头。在一些实施方案中,接头选自表5和6中所示的接头。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效负载经过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头连接。在一些实施方案中,MMAD有效负载与AB使用本文公开的部分还原和缀合技术缀合。

[0111] 本发明的药物组合物可包括本发明的缀合的抗体和载体。这些药物组合物可包括在试剂盒中,例如用于本文公开的方法的诊断试剂盒。

[0112] 附图简述

图1是表明使用三个不同的TCEP:可活化抗体比率(即1.5:1、2:1和4:1的比率)部分还原可活化抗-EGFR抗体,和使用本文提供的成功地将染料与可活化抗体缀合的方法随后将荧光染料(Alexa 680)与这样的具有可裂解部分(3954-1204-c225v5)的部分还原的可活化抗-EGFR抗体巯基缀合,同时保持可活化抗-EGFR抗体的掩蔽部分的掩蔽功效的图。如这些附图中所用的,“(1.5)”、“(2)”和“(4)”表明用于TCEP还原步骤的TCEP:可活化抗体的比率。

[0113] 图2是表明使用三个不同的TCEP:掩蔽的抗体的比率(即,1.5:1、2:1和4:1的比率)部分还原掩蔽的具有非可裂解部分的抗-EGFR抗体,和随后使用本文提供的成功将染料与非可裂解的掩蔽的抗体缀合的方法将Alexa 680与这样的部分还原的具有非可裂解部分(3954-NSUB-c225v5)的掩蔽的抗-EGFR抗体巯基缀合,同时保持掩蔽的抗-EGFR抗体的掩蔽部分的掩蔽功效的图。如这些附图中所用的,“(1.5)”、“(2)”和“(4)”表明用于TCEP还原步骤的TCEP:掩蔽的抗体的比率。

[0114] 图3A和3B是表明3954-1204-c225v5的TCEP还原的通过LabChip®的非还原分析、Alexa 680巯基-缀合和通过蛋白酶uPA的激活的说明和图。如这些图中所示,使用两个不同的TCEP:可活化抗体比率(即,比率1.5:1和4:1),部分还原,随后将Alexa 680与部分还原的可活化抗-EGFR抗体3954-1204-c225v5巯基缀合和通过uPA激活,不破坏或以其它方式负面影响可活化抗体的激活和/或掩蔽功效。如这些图中所用的,“1.5”和“4”表明在TCEP还原步骤中使用的TCEP:可活化抗体的比率;和“(U)”表明通过与uPA孵育,可活化抗体已被激活,即裂解。

[0115] 图4A和4B是表明3954-1204-c225v5的TCEP还原的通过LabChip®的还原分析、Alexa 680巯基-缀合和通过蛋白酶uPA激活的说明和图。如这些图中所示,使用两个不同的TCEP:可活化抗体比率(即,比率1.5:1和4:1),部分还原,随后将Alexa 680与部分还原的可活化抗-EGFR抗体3954-1204-c225v5巯基缀合和通过uPA激活,不破坏或以其它方式负面影响可活化抗体的激活和/或掩蔽功效。如这些图中所用的,“1.5”和“4”表明在TCEP还原步骤中使用的TCEP:可活化抗体的比率;“(U)”表明通过与uPA孵育,可活化抗体已被激活,即裂解;和“R”表明还原分析。

[0116] 图5A和5B是表明3954-NSUB-c225v5的TCEP还原的通过LabChip®的非还原分析、Alexa 680巯基-缀合和通过蛋白酶uPA激活的说明和图。如这些图中所示,使用两个不同的TCEP:掩蔽抗体比率(即,比率1.5:1和4:1),部分还原,随后将Alexa 680与部分还原的掩蔽抗-EGFR抗体3954-NSUB-c225v5巯基缀合和通过uPA激活,不破坏或以其它方式负面影响非可裂解的掩蔽抗体的激活和/或掩蔽功效。如这些图中所用的,“1.5”和“4”表明在TCEP还原步骤中使用的TCEP:掩蔽抗体的比率;和“(U)”表明通过与uPA孵育,非可裂解的掩蔽抗体未被激活,即未被裂解。

[0117] 图6A和6B是表明3954-NSUB-c225v5的TCEP还原的通过LabChip®的还原分析、Alexa 680巯基-缀合和通过蛋白酶uPA激活的说明和图。如这些图中所示,使用两个不同的TCEP:掩蔽抗体比率(即,比率1.5:1和4:1),部分还原,随后将Alexa 680与部分还原的掩蔽抗-EGFR抗体3954-NSUB-c225v5巯基缀合和通过uPA激活,不破坏或以其它方式负面影响非可裂解的掩蔽抗体的激活和/或掩蔽功效。如这些图中所用的,“1.5”和“4”表明在TCEP还原步骤中使用的TCEP:掩蔽抗体的比率;“(U)”表明通过与uPA孵育,非可裂解的掩蔽抗体未被

激活,即未被裂解;和“R”表明还原分析。

[0118] 图7是描述以等于4:1的TCEP:可活化抗体比率使用120-分钟还原时间还原可活化抗-Jagged抗体5342-1204-4D11的表和照片。对于所示数据,还原之后为与荧光染料Alexa 680缀合。

[0119] 图8是描述使用巯基可缀合的Alexa 680作为巯基可缀合毒素的代替与抗-Jagged抗体4D11或抗-Jagged可活化抗体5342-1204-4D11的各种程度的Alexa 680缀合的图。该图还证明可完成这样的缀合以保持通过uPA的抗-Jagged可活化抗体的激活。

[0120] 图9A是表明抗-Jagged抗体4D11、抗体缀合物4D11-vc-MMAD、可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD、uPA-激活的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD和Synagis对胰腺癌细胞系BxPC3的结合活性的图。细胞与各个组合物一起孵育,和然后用AF-647-标记的抗人IgG染色。

[0121] 图9B是表明抗-Jagged抗体缀合物4D11-vc-MMAD、可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD、uPA-激活的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD和与接头有效负载vc-MMAD缀合的利妥昔单抗抗体对BxPC3细胞的细胞毒性活性的图。使用Cell Titer Glo试剂和针对剂量作图的相对发光单位测量成活力。

[0122] 图10A是表明抗-Jagged抗体4D11、抗体缀合物4D11-vc-MMAE、可活化抗体5342-1204-4D11、可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE、uPA-激活的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE和与接头有效负载vc-MMAE缀合的Synagis对胰腺癌细胞系BxPC3的结合活性的图。细胞与各个组合物一起孵育,和然后用AF-647-标记的抗人IgG染色。

[0123] 图10B是表明抗-Jagged抗体缀合物4D11-vc-MMAE、可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE、uPA-激活的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE和与接头有效负载vc-MMAE缀合的Synagis对BxPC3的细胞毒性活性的图。使用Cell Titer Glo试剂和针对剂量作图的相对发光单位测量成活力。

[0124] 发明详述

本发明提供包含可活化抗体的缀合物和制备这些可活化抗体缀合物的方法。还提供具有用于接受药物或标记的缀合点的可活化抗体。所述缀合物可在治疗上、在诊断上(例如体外或体内)使用,用于体内成像和用于各种其它治疗、诊断和/或预防用途的任一种。

[0125] 总的来说,本文提供的组合物和方法包括包含特异性结合靶标的抗体或抗体片段(AB)的可活化抗体,其中AB与降低AB结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)偶联。在一些实施方案中,可活化抗体进一步包括作为蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)。本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种试剂与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不损害可活化抗体的活性(例如,掩蔽、活化或结合活性)。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种试剂与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不还原或以其它方式破坏可活化抗体内的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种试剂与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不还原或以其它方式破坏MM内的一个或多个二硫键。

[0126] 本文提供的组合物和方法产生与一种或多种试剂,例如各种治疗剂、诊断剂和/或预防剂的任一种缀合的可活化抗体,而没有任何试剂缀合到可活化抗体的MM。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化抗体,其中MM保留有效地掩蔽可活化抗体的AB的能力。此

外,这样的缀合的可活化抗体保留被激活的能力,和激活的AB保留结合其靶标的能力。

[0127] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法不损害可活化抗体的MM的掩蔽活性和/或掩蔽功效。例如,在其中可能发现所述组合物和方法负面影响可活化抗体的MM的掩蔽活性和/或掩蔽功效的情况下,与在缀合之前或在缺少任何缀合的情况下可活化抗体的掩蔽活性和/或掩蔽功效的水平相比,所述组合物和方法降低或以其它方式破坏可活化抗体的掩蔽活性和/或掩蔽功效不超过50%、不超过40%、不超过30%、不超过25%、不超过20%、不超过15%、不超过10%、不超过9%、不超过8%、不超过7%、不超过6%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%或不超过1%。

[0128] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法不损害可活化抗体的激活活性和/或激活功效。例如,在其中可能发现所述组合物和方法负面影响激活活性和/或激活功效的情况下,与在缀合之前或在缺少任何缀合的情况下可活化抗体的激活活性和/或激活功效的水平相比,所述组合物和方法降低或以其它方式破坏可活化抗体的激活活性和/或激活功效不超过50%、不超过40%、不超过30%、不超过25%、不超过20%、不超过15%、不超过10%、不超过9%、不超过8%、不超过7%、不超过6%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%或不超过1%。

[0129] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法不损害可活化抗体的结合活性。例如,在其中可能发现所述组合物和方法负面影响结合活性的情况下,与在缀合之前或在缺乏任何缀合的情况下可活化抗体的结合活性的水平相比,所述组合物和方法降低或以其它方式破坏可活化抗体的结合活性不超过50%、不超过40%、不超过30%、不超过25%、不超过20%、不超过15%、不超过10%、不超过9%、不超过8%、不超过7%、不超过6%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%或不超过1%。

[0130] 本文提供的组合物和方法确定试剂和反应条件的组合以在缀合之后产生所需的部分还原。当还原和随后缀合未经适当控制时,可活化抗体将被完全还原,和可活化抗体的掩蔽功效受到损害或将受到损害。

[0131] 缀合的可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),和AB与掩蔽部分(MM)偶联,使得MM与AB偶联降低抗体或其抗原结合片段结合靶标的能力。在一些实施方案中,MM经过包括蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)与AB偶联,所述蛋白酶例如为与靶标共定位在受试者的治疗部位的蛋白酶。许多研究证实在实体瘤中异常蛋白酶水平的相关性,所述蛋白酶例如为uPA、豆荚蛋白、MT-SP1、基质金属蛋白酶(MMP)。(参见例如,Murthy RV等“Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer. (结肠直肠癌中关于临床病理和生物学变量的豆荚蛋白表达)” Clin Cancer Res. 11 (2005): 2293-2299; Nielsen BS等“Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer. (在导管型乳腺癌中尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂定位于间质细胞中)” Lab Invest 81 (2001): 1485-1501; Mook OR等“In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin. (大鼠肝脏中使用淬灭的荧光DQ-明胶,结肠癌转移的胞外基质中溶解明胶活性的原位定位)” J Histochem Cytochem. 51 (2003): 821-829)。

[0132] 本文提供的缀合的可活化抗体包括蛋白酶的底物,其用于影响肿瘤细胞中对在治疗和/或诊断部位上靶向的缀合的抗体激活的蛋白酶活性。底物选择方法用于鉴定具有许多所需特征的底物。例如,选择的底物是系统上稳定的(即,在受试者的系统循环中稳定),一般对通过循环蛋白酶(例如纤溶酶、凝血酶、组织纤溶酶原激活物(tPA)或激肽释放酶(KLK)例如KLK-5和/或KLK-7)的裂解不敏感,没有毒性,一般对通过蛋白酶例如ADAM 9、ADAM 10、ADAM 17和/或激肽释放酶例如KLK-5和KLK-7在潜在的毒性部位例如皮肤上裂解不敏感,和在预期的治疗和/或诊断部位上有活性。在一些实施方案中,为蛋白酶选择鉴定的底物,所述蛋白酶由于例如过表达或显示过度活性或在预期的治疗和/或诊断部位上对蛋白酶抑制较不敏感(例如由于相应抑制剂表达不足或抑制剂活性降低导致)导致失调,但通常在正常、健康或其它非疾病或损坏的组织处或在正常、健康或其它非疾病或损坏的组织中不表达,和然后选择的底物随后针对在正常组织例如非疾病组织中表达的蛋白酶反筛选。

[0133] 作为非限制性实例,AB是表1中所列的任何靶标的结合配偶体。

[0134] 表1:示例性靶标

I-92-LFA-3	CD52	DLA4	ICOS	LAG-3	TAPAI
α -4 整联蛋白	CD56	DLL4	IFN α	LIF-R	TGF β
α -V 整联蛋白	CD64	DPT-4	IFN β	LIGHT	TIGIT
α 4 β 1 整联蛋白	CD70	EGFR	IFN γ	MRP4	TIM-3
α 4 β 7 整联蛋白	CD74	内皮素 B 受体(ETBR)	IgE	MUC1	TLR2
ACR2	CD80	EpCAM	IgE 受体 (Fc ϵ R1)	粘蛋白-16	TLR4
抗-Lewis-Y	CD81	EPHA2	IGF	Na/K ATP 酶	TLR6
Apelin J 受体	CD86	ERBB3	IGF1R	中性粒细胞弹性蛋白酶	TLR7
APRII	CD95	RSV 的 F 蛋白	IL1B	NGF	TLR8
B7-4H4	CD117	FAP	IL1R	朊蛋白	TLR9
BAFF	CD125	FGF-2	IL2	Notch 受体	TMEM31
BTLA (IL-2RG)	CD132	FGF8	IL11	Notch 1	TNF α
C5 补体	CD133	FGFR1	IL12	Notch 2	TNFR
C-242	CD137	FGFR2	IL12p40	Notch 3	TNFRSF12A
CD2	CD138	FGFR3	IL-12R α IL-12R β 1	Notch 4	TRAIL-R1

CD3	CD166	FGFR4	IL13	NOV	TRAIL-R2
CD6	CD172A	叶酸受体	IL13R	OSM-R	转铁蛋白
CD9	CD248	G-CSF	IL15	OX-40	转铁蛋白受体
CD11a	CEACAM5 (CEA)	G-CSFR	IL17	PAR2	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCA-90)	GD2	IL18	PDGF-AA	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	GHR	IL21	PDGF-BB	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	GLUT1	IL23	PDGFR α	VAP1
CD24	cMet	GLUT4	IL23R	PDGFR β	VCAM-1
CD25	微腺蛋白	GM-CSF	IL27/IL27R (wax1)	PD-1	VEGF
CD27	Cnsgo	GM-CSFR	IL29	PD-L1	VEGF-A
CD28	CSFR	GP1Ib/IIIa 受体	IL-31R	PD-L2	VEGF-B
CD30	CSFR-1	Gp130	IL31/IL31R	磷脂酰丝氨酸	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GPIIB/IIIA	IL2R	PlGF	VEGF-D
CD38	CTGF	GPNMB	IL4	PSCA	VEGFR1
CD40	CXCL10	GRP78	IL4R	PSMA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	HER2/neu	IL6, IL6R	RAAG12	VEGFR3
CD41	CXCR1	HGF	胰岛素受体	RAGE	VISTA
CD44	CXCR2	hGH	Jagged 配体	SLC44A4	WISP-1
CD47	CXCR4	HVEM	Jagged 1	糖基酶 1 磷酸酶	WISP-2
CD51	CYR61	透明质酸酶	Jagged 2	STEAP1	WISP-3

作为非限制性实例,AB是或源自表2中所列的抗体。

[0135] 表2:示例性的Ab来源

抗体商品名(抗体名)	靶标
Avastin™ (贝伐单抗)	VEGF
Lucentis™ (雷珠单抗)	VEGF
Erbix™ (西妥昔单抗)	EGFR
Vectibix™ (帕尼单抗)	EGFR
Remicade™ (英夫利昔单抗)	TNF α
Humira™ (阿达木单抗)	TNF α
Tysabri™ (那他珠单抗)	整联蛋白 $\alpha 4$

Simulect™ (巴利昔单抗)	IL2R
Soliris™ (艾库组单抗)	补体C5
Raptiva™ (伊伐珠单抗)	CD11a
Bexxar™ (托西莫单抗)	CD20
Zevalin™ (替伊莫单抗)	CD20
Rituxan™ (利妥昔单抗)	CD20
奥瑞珠单抗(Ocrelizumab)	CD20
Arzerra™ (奥法木单抗)	CD20
Obinutuzumab	CD20
Zenapax™ (达珠单抗)	CD25
Adcetris™ (brentuximab vedotin)	CD30
Myelotarg™ (吉姆单抗)	CD33
Mylotarg™ (吉姆单抗奥佐米星)	CD33
Campath™ (阿仑单抗)	CD52
ReoPro™ (阿昔单抗)	糖蛋白受体IIb/IIIa
Xolair™ (奥马珠单抗)	IgE
Herceptin™ (曲妥单抗)	Her2
Kadcyla™ (曲妥单抗 emtansine)	Her2
Synagis™ (帕利珠单抗)	RSV的F蛋白
(易普利姆玛)	CTLA-4
(替西木单抗(tremelimumab))	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(帕妥珠单抗)	Her2-neu
(ertumaxomab)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (阿巴西普)	CTLA-4
(他尼珠单抗(tanezumab))	NGF
(巴维昔单抗)	磷脂酰丝氨酸
(zalutumumab)	EGFR
(mapatumumab)	EGFR
(matuzumab)	EGFR
(尼妥珠单抗)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(依决洛单抗)	EpCAM

RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (依那西普)	TNF-R
Amevive™ (alefacept)	1-92-LFA-3
Amril™, Kineret™ (阿那白滞素)	IL-1Ra
GC1008	TGFβ
	Notch, 例如, Notch 1
	Jagged 1或Jagged 2
(阿德木单抗)	EpCAM
(figitumumab)	IGF1R
(tocilizumab)	IL-6受体
Stelara™ (ustekinumab)	IL-12/IL-23
Prolia™ (狄迪诺塞麦)	RANKL

在一些实施方案中,AB结合表皮生长因子受体(EGFR)。在一些实施方案中,结合EGFR的AB包括下文所示的重链和/或轻链序列中的一个或多个。

[0136] C225v5抗体重链核苷酸序列:

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGA
GCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
ATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAG
CCAGGTGTTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGGATTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATT
ATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCC
GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGTTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT
GAACTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 1)

C225v5抗体重链氨基酸序列

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFSTRLSINKDN
SKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID
NO: 2)

C225v5抗体轻链核苷酸序列:

CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCG
CGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATAT
GCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAA
CAGCGTGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCA
CCAACTGGAAGTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 10)

C225v5抗体轻链氨基酸序列:

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL
SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:
16)

C225v4抗体重链核苷酸序列:

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGA
GCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
ATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAG
CCAGGTGTTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAAGCAACGATACCGGATTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATT
ATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCC
GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGACACGAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAACTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 238)

C225v4抗体重链氨基酸序列:

QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTFPFTRLSINKDN

SKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID
NO: 239)

C225v6抗体重链核苷酸序列:

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGA
GCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
ATTTGGAGCGGCGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAG
CCAGGTGTTTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATT
ATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCC
GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCGGGAT
GAACTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA] (SEQ ID NO: 240)

C225v6抗体重链氨基酸序列

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDN
SKSQVFFKMNSLQSQDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID
NO: 241)

在一些实施方案中,AB结合白介素6受体(IL-6R)。在一些实施方案中,结合IL-6R的AB
包括下文所示的重链和/或轻链序列中的一个或多个。

[0137] Av1抗体重链氨基酸序列:

QVQLQESGPGLVRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRTVISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 242)

Av1抗体轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDATYYCQQGNTLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
243)

在一些实施方案中,AB结合Jagged靶标,例如Jagged 1、Jagged 2或Jagged 1和Jagged 2两者。在一些实施方案中,结合Jagged靶标的AB包括下文所示的重链和/或轻链序列中的一个或多个。

[0138] 4D11轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
244)

4D11重链序列:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 245)

4D11v2重链序列

EVHLLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 246)

4D11v2轻链序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
247)

在一些实施方案中,结合Jagged靶标的AB包括下文所示的可变重链和/或可变轻链序

列中的一个或多个。

[0139] 可变轻链氨基酸序列Lc4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 248)

可变重链氨基酸序列Hc4

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 249)

可变轻链氨基酸序列Lc5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 250)

可变重链氨基酸序列Hc5

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGFQFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 251)

可变轻链氨基酸序列Lc7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 252)

可变重链氨基酸序列Hc7

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGFQFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 253)

可变轻链氨基酸序列Lc8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 254)

可变重链氨基酸序列Hc8

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNPFQFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 255)

可变轻链氨基酸序列Lc13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 256)

可变重链氨基酸序列Hc13

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 257)

可变轻链氨基酸序列Lc16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 258)

可变重链氨基酸序列Hc16

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYGQFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 259)

可变轻链氨基酸序列Lc19

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL

TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 260)

可变重链氨基酸序列Hc19

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 261)

可变轻链氨基酸序列Lc21

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 262)

可变重链氨基酸序列Hc21

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 263)

可变轻链氨基酸序列Lc24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 264)

可变重链氨基酸序列Hc24

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 265)

可变轻链氨基酸序列Lc26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 266)

可变重链氨基酸序列Hc26

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 267)

可变轻链氨基酸序列Lc27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 268)

可变重链氨基酸序列Hc27

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFYGQFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 269)

可变轻链氨基酸序列Lc28

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 270)

可变重链氨基酸序列Hc28

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 271)

可变轻链氨基酸序列Lc30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 272)

可变重链氨基酸序列Hc30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYADSVKGRFTISRDN

NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 273)

可变轻链氨基酸序列Lc31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 274)

可变重链氨基酸序列Hc31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 275)

可变轻链氨基酸序列Lc32

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 276)

可变重链氨基酸序列Hc32

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 277)

可变轻链氨基酸序列Lc37

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 278)

可变重链氨基酸序列Hc37

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNGQFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 279)

可变轻链氨基酸序列Lc39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 280)

可变重链氨基酸序列Hc39

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 281)

可变轻链氨基酸序列Lc40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 282)

重链氨基酸序列Hc40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 283)

可变轻链氨基酸序列Lc47

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 284)

可变重链氨基酸序列Hc47

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTEYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 285)

可变4B2轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL

TISSLQPEDFATYYCQQTLDAPPQFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 286)

可变4B2重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 287)

可变4D11轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 288)

可变4D11重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 289)

可变4E7轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSLVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 290)

可变4E7重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTKYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 291)

可变4E11轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQALDAPLMFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 292)

可变4E11重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEPMGQLTEYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 293)

可变6B7轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 294)

可变6B7重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 295)

可变6F8轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 296)

可变6F8重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 297)

通过非限制性实例的方式,CM包括作为底物或源自底物的氨基酸序列,所述底物被表3中所列的以下酶或蛋白酶中的一种或多种裂解。

[0140] 表3 - 示例性的酶/蛋白酶

ADAM8, ADAMTS, 例如 ADAM8	半胱氨酸蛋白酶, 例如 Cruzipain	丝氨酸蛋白酶, 例如 激活的蛋白 C
ADAM9	豆蔻蛋白酶	组织蛋白酶 A
ADAM10	Onabain-2	组织蛋白酶 G
ADAM12		糜蛋白酶
ADAM15	KLK, 例如	凝固因子蛋白酶
ADAM17/TACE	KLK4	(例如, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1	KLK5	弹性酶
ADAMTS1	KLK6	组织蛋白酶 B
ADAMTS4	KLK7	氨基羧基酯酶
ADAMTS5	KLK8	HtrA1
	KLK10	人中性粒细胞弹性蛋白酶
天冬氨酸蛋白酶, 例如 BACE	KLK11	乳铁蛋白
血管紧张素酶	KLK13	Maraspin
	KLK14	NS3/4A
天冬氨酸组织蛋白酶, 例如 组织蛋白酶 D	金属蛋白酶, 例如 Mepm	PACE4
组织蛋白酶 E	组织蛋白酶	并溶酶
	PSMA	PSA
胰凝乳蛋白酶, 例如	BMP-1	uPA
胰凝乳蛋白酶 1		凝血酶
胰凝乳蛋白酶 2		并溶酶
胰凝乳蛋白酶 3	MMP, 例如	uPA
胰凝乳蛋白酶 4	MMP1	
胰凝乳蛋白酶 5	MMP2	II 型胶原
胰凝乳蛋白酶 6	MMP3	丝氨酸蛋白酶(TTSP), 例如
胰凝乳蛋白酶 7	MMP7	DESC1
胰凝乳蛋白酶 8	MMP8	DPP-4
胰凝乳蛋白酶 9	MMP9	FAP
胰凝乳蛋白酶 10	MMP10	Hepsin
胰凝乳蛋白酶 14	MMP11	蛋白裂解酶-2
	MMP12	MT-SPI/蛋白裂解酶
	MMP13	TMPS82
半胱氨酸组织蛋白酶, 例如	MMP14	TMPS83
组织蛋白酶 B	MMP15	TMPS84
组织蛋白酶 C	MMP16	
组织蛋白酶 K	MMP17	
组织蛋白酶 L	MMP19	
组织蛋白酶 S	MMP20	
组织蛋白酶 V/L2	MMP23	
组织蛋白酶 X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

本文提供的缀合的可活化抗体包括掩蔽部分。在一些实施方案中,掩蔽部分是与可活化抗体偶联或以其它方式连接的氨基酸序列,并位于可活化抗体结构内使得掩蔽部分降低抗体特异性结合靶标的能力。合适的掩蔽部分使用各种已知技术的任一种来鉴定。例如,肽掩蔽部分使用描述于Daugherty等的美国专利号8,293,685的方法来鉴定,所述专利的内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0141] 在一些实施方案中,选择掩蔽部分与特异性抗体或抗体片段一起使用。例如,与结合EGFR的抗体一起使用的合适的掩蔽部分包括包含序列CISPRG (SEQ ID NO: 29)的MM。通过非限制性实例的方式,MM可包括序列例如CISPRGCG (SEQ ID NO: 30);CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 31);CISPRGCPDGPYVM (SEQ ID NO: 32);CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO: 33)和CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO: 34)。其它合适的掩蔽部分包括公开于PCT公开号WO

2010/081173的任何EGFR-特异性掩蔽物,例如通过非限制性实例的方式,GSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 35);CISPRGCGSSASQSGQSGHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 36);CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 37);ADHVFWSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 38);CHHVYWGHCISPRGCPG (SEQ ID NO: 39);CPHFTTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 40);CNHHYHYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 41);CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 42);CPYYTLSYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 43);CNHVFYGTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 44);CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 45);CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 46);YNPCATPMCCISPRGCPG (SEQ ID NO: 47);CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 48);CNHHYHYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 49);CNHVFYGTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 50);CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 51);CPHFTTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 52);CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 53);CHHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 54);CPYYTLSYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 55);CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 56);ADHVFWSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 57);YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO: 58);CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 59);C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (SEQ ID NO: 60);CISPRGCGQPIPSVK (SEQ ID NO: 61);CISPRGCTQPYHVS (SEQ ID NO: 62);和/或CISPRGCNAVSGLGS (SEQ ID NO: 63)。

[0142] 以非限制性实例的方式,与结合Jagged靶标例如Jagged 1和/或Jagged 2的抗体一起使用的合适的掩蔽部分包括包含以下序列的掩蔽部分,例如QQSGGQCNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 232);QQSGGQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 64);PWCQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO: 65);QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO: 66);CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO: 67);SCSLWTS GSCLPHSP (SEQ ID NO: 68);YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO: 69);CFLYSCTDVS YWNNT (SEQ ID NO: 70);PWCQRQDYLRCPQP (SEQ ID NO: 71);CNLWISGGDCRGLAG (SEQ ID NO: 72);CNLWVSGGDCRGVQG (SEQ ID NO: 73);CNLWVSGGDCRGLRG (SEQ ID NO: 74);CNLWISGGDCRGLPG (SEQ ID NO: 75);CNLWVSGGDCRDAPW (SEQ ID NO: 76);CNLWVSGGDCRDLLG (SEQ ID NO: 77);CNLWVSGGDCRGLQG (SEQ ID NO: 78);CNLWLHGGDCRGWQG (SEQ ID NO: 79);CNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 80);CTTWFCGGDCGVMRG (SEQ ID NO: 81);CNIWGPSVDCGALLG (SEQ ID NO: 82);CNIWVNGGDCRSFEG (SEQ ID NO: 83);YCLNLPRYMQDMCWA (SEQ ID NO: 84);YCLALPHYMQADCAR (SEQ ID NO: 85);CFLYSCGDVSYWGS A (SEQ ID NO: 86);CYLYSCTDSAFWNNR (SEQ ID NO: 87);CYLYSCNDVSYWSNT (SEQ ID NO: 88);CFLYSCTDVS YW (SEQ ID NO: 89);CFLYSCTDVAYWNSA (SEQ ID NO: 90);CFLYSCTDVS YW GDT (SEQ ID NO: 91);CFLYSCTDVS YW GNS (SEQ ID NO: 92);CFLYSCTDVAYWNNT (SEQ ID NO: 93);CFLYSCGDVSYWGNPGLS (SEQ ID NO: 94);CFLYSCTDVAYWSGL (SEQ ID NO: 95);CYLYSCTDGS YWNST (SEQ ID NO: 96);CFLYSCSDVSYWGNI (SEQ ID NO: 97);CFLYSCTDVAYW (SEQ ID NO: 98);CFLYSCTDVS YW GST (SEQ ID NO: 99);CFLYSCTDVAYW GDT (SEQ ID NO: 100);GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (SEQ ID NO: 101);GCNIWLVGDCRGWIGDTNG (SEQ ID NO: 102);GCNIWLVGDCRGWIEDSNG (SEQ ID NO: 103);GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (SEQ ID NO: 104);GCNIWLVGDCRGWLGEAVG (SEQ ID NO: 105);GCNIWLVGDCRGWLEEAVG (SEQ ID NO: 106);GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (SEQ ID

NO: 107);GAPVFCNIWLNGGDCRGWMG (SEQ ID NO: 108);GQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 109);GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (SEQ ID NO: 110);GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (SEQ ID NO: 111);GASQYCNLWINGGDCRGWRG (SEQ ID NO: 112);GCNIWLVGDCRPPWVEGG (SEQ ID NO: 113);GCNIWAVGGDCRPFVDGG (SEQ ID NO: 114);GCNIWLNGGDCRAWVDTG (SEQ ID NO: 115);GCNIWIVGGDCRPFINDG (SEQ ID NO: 116);GCNIWLNGGDCRPPVFFGG (SEQ ID NO: 117);GCNIWLSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO: 118);GCNIWVNGGDCRSFVYSG (SEQ ID NO: 119);GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO: 120);GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 121);GCNIWLNGGDCRTEFVASG (SEQ ID NO: 122);GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 123);GFLENCNIWLNGGDCRTG (SEQ ID NO: 124);GIYENCNIWLNGGDCRMG (SEQ ID NO: 125);和/或GIPDNCNIWINGGDCRYG (SEQ ID NO: 126)。

[0143] 以非限制性实例的方式,与结合白介素6靶标例如白介素6受体(IL-6R)的抗体一起使用的合适的掩蔽部分包括包含以下序列的掩蔽部分,例如QQQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 127);QQQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 128);QQQSGQMGPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 129);YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 130);PGAFDIPFPAHWVPNT (SEQ ID NO: 131);ESSCVWNYVHIYMDC (SEQ ID NO: 132);YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 133);YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO: 134);YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 135);YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 136);YGSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 137);YTSCNWNYSVHIFMDC (SEQ ID NO: 138);YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 139);WRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 140);WSNCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 141);DRSCTWNYVRISYDC (SEQ ID NO: 142);SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 143);SRSCIWNYAHIFLDC (SEQ ID NO: 144);SMSCYWQYERIFLDC (SEQ ID NO: 145);YRSCNWNYSVIFLDC (SEQ ID NO: 146);YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 147);SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 148);YKSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 149);YGSCNWNYSVHIFMEC (SEQ ID NO: 150);FSSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 151);WRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 152);YGSCQWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 153);YRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 154);NMSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 155);FGPCTWNYARISWDC (SEQ ID NO: 156);XXsCXWXYvhIfXdC (SEQ ID NO: 157);MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 158);RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO: 159);AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 160);VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 161);DGGPAGCSWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 162);AVGPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 163);CTWNYVHIFMDCGEGEGP (SEQ ID NO: 164);GGVPEGCTWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 165);AEVPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 166);AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 167);SGASGGCKWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 168);MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 169);TPGCRWNYVHIFMECEAL (SEQ ID NO: 170);VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 171);PGAFDIPFPAHWVPNT (SEQ ID NO: 172);RGACDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 173);QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 174);XGafDIPFPAHWvPnT (SEQ ID NO: 175);RGDGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 176);SGVGRDRDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 177);WAGGNDSDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 178);WGDGMDVDIPFPAHWVPVT (SEQ ID NO: 179);AGSGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 180);

ESRSGYADIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 181);和/或RECGRCGDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 182)。

[0144] 在一些实施方案中,选择掩蔽部分以与任何抗体或抗体片段一起使用。例如,在一些实施方案中,掩蔽部分是非结合空间部分(NB)或非结合空间部分的结合配偶体(BP),其中BP募集或以其它方式吸引NB至可活化抗体。例如,在一些实施方案中,NB是可溶的球状蛋白。在一些实施方案中,NB是在血流中循环的蛋白。在一些实施方案中,NB选自白蛋白、纤维蛋白原、纤连蛋白、血红蛋白、转铁蛋白、免疫球蛋白结构域和其它血清蛋白。在一些实施方案中,BP选自白蛋白结合肽、纤维蛋白原结合肽、纤连蛋白结合肽、血红蛋白结合肽、转铁蛋白结合肽、免疫球蛋白结构域结合肽和其它血清蛋白结合肽。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:NB-CM-AB、AB-CM-NB、BP-CM-AB或AB-CM-BP。在其中可活化抗体包括BP和在相应NB存在的情况下可活化抗体为以下的可活化抗体的实施方案中:该可活化抗体呈未裂解状态时具有如下从N-端至C-端的结构排列:NB:BP-CM-AB或AB-CM-BP:NB,其中“:”表示在NB和BP之间的相互作用(例如结合)。在一些实施方案中,呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:NB-LP1-CM-LP2-AB、AB-LP2-CM-LP1-NB、BP-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-BP。在其中可活化抗体包括BP和在相应NB存在的情况下可活化抗体为以下可活化抗体的实施方案中,该可活化抗体呈未裂解状态时具有如下从N-端至C-端的结构排列:NB:BP-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-BP:NB,其中“:”表示在NB和BP之间的相互作用(例如结合)。

[0145] 本文提供的缀合的可活化抗体包括可裂解的部分。在一些实施方案中,可裂解部分包括作为蛋白酶的底物的氨基酸序列,所述蛋白酶通常为胞外蛋白酶。合适的底物使用多种已知技术的任一种来鉴定。例如,肽底物使用描述于Daugherty等的美国专利号7,666,817的方法来鉴定,所述专利的内容通过引用以其整体结合到本文中。(亦参见Boulware等“Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics.(显示快速水解动力学的蛋白酶的肽底物的进化优选)”*Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46)。

[0146] 在一些实施方案中,选择CM以与特定蛋白酶一起使用。在一些实施方案中,CM是至少一种蛋白酶的底物,所述蛋白酶选自ADAM 17、BMP-1、半胱氨酸蛋白酶例如组织蛋白酶、HtrA1、豆荚蛋白、蛋白裂解酶(MT-SP1)、基质金属蛋白酶(MMP)、中性白细胞弹性蛋白酶、TMPRSS例如TMPRSS3或TMPRSS4、凝血酶和u-型纤溶酶原激活物(uPA,亦称为尿激酶)。

[0147] 在一些实施方案中,CM是ADAM17的底物。在一些实施方案中,CM是BMP-1的底物。在一些实施方案中,CM是组织蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是半胱氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是HtrA1的底物。在一些实施方案中,CM是豆荚蛋白的底物。在一些实施方案中,CM是MT-SP1的底物。在一些实施方案中,CM是MMP的底物。在一些实施方案中,CM是中性白细胞弹性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是凝血酶的底物。在一些实施方案中,CM是TMPRSS的底物。在一些实施方案中,CM是TMPRSS3的底物。在一些实施方案中,CM是TMPRSS4的底物。在一些实施方案中,CM是uPA的底物。

[0148] 在一些实施方案中,选择可裂解部分以与特定蛋白酶一起使用,所述蛋白酶例如已知与可活化抗体的靶标共定位的蛋白酶。例如,用于本公开内容的可活化抗体的合适的可裂解的部分包括序列TGRGPSWV (SEQ ID NO: 183);SARGPSRW (SEQ ID NO: 184);

TARGPSFK (SEQ ID NO: 185);LSGRSDNH (SEQ ID NO: 186);GGWHTGRN (SEQ ID NO: 187);HTGRSGAL (SEQ ID NO: 188);PLTGRSGG (SEQ ID NO: 189);AARGPAIH (SEQ ID NO: 190);RGPAFNPM (SEQ ID NO: 191);SSRGPAYL (SEQ ID NO: 192);RGPATPIM (SEQ ID NO: 193);RGPA (SEQ ID NO: 194);GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 195);FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 196);VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 197);SPLTGRSG (SEQ ID NO: 198);SAGFSLPA (SEQ ID NO: 199);LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 200);SGGPLGVR (SEQ ID NO: 201);和/或PLGL (SEQ ID NO: 202)。

[0149] 在一些实施方案中,CM是至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物。MMP的实例包括MMP1;MMP2;MMP3;MMP7;MMP8;MMP9;MMP10;MMP11;MMP12;MMP13;MMP14;MMP15;MMP16;MMP17;MMP19;MMP20;MMP23;MMP24;MMP26;和MMP27。在一些实施方案中,CM是MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11和MMP19的底物。在一些实施方案中,CM是MMP7的底物。在一些实施方案中,CM是MMP9的底物。在一些实施方案中,CM是MMP14的底物。在一些实施方案中,CM是两个或更多个MMP的底物。在一些实施方案中,CM是至少MMP9和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM包含相同MMP的两个或更多个底物。在一些实施方案中,CM包含至少两个或更多个MMP9底物。在一些实施方案中,CM包含至少两个或更多个MMP14底物。

[0150] 在一些实施方案中,CM是MMP的底物和包括序列

ISSGLLSS (SEQ ID NO: 298); QNQALRMA (SEQ ID NO: 299); AQNLLGMV
(SEQ ID NO: 300); STFPFGMF (SEQ ID NO: 301); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 302);
DWLYWPGI (SEQ ID NO: 303); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 304); RPSPMWAY (SEQ ID
NO: 305); WATPRPMR (SEQ ID NO: 306); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 307); LKAAPRWA
(SEQ ID NO: 308); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 309); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 310);
MGLFSEAG (SEQ ID NO: 311); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 312); RMHLRSLG (SEQ ID NO:
313); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 314); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 315); LLAPSHRA (SEQ
ID NO: 316); PAGLWLDP (SEQ ID NO: 317); 和/或 ISSGLLSS (SEQ ID NO: 318)。

[0151] 在一些实施方案中,用于本公开内容的缀合的可活化抗体的可活化抗体可使用重组DNA技术和在真核或原核物种中表达经生物合成制备。编码掩蔽部分、接头序列(其可包括可裂解部分(CM)和抗体链(重或轻))的cDNA可以5'至3' (翻译产物的N-至C-端)顺序连接,以创建核酸构建体,按常规抗体表达方法将其表达为可活化抗体蛋白。在一些实施方案中,可活化抗体可通过表达CM-抗体和然后在蛋白的N-端上或其附近经化学偶联掩蔽物经半合成产生。在一些实施方案中,可活化抗体可通过表达抗体和然后在蛋白的N-端上或其附近经化学偶联掩蔽物和CM产生,使得呈未裂解状态的可活化抗体具有如下从N-端至C-端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

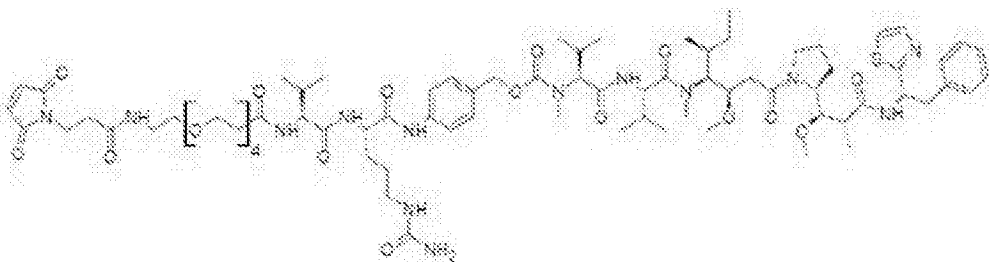
[0152] 本文描述的缀合的可活化抗体还包括与可活化抗体缀合的试剂。在一些实施方案中,缀合的试剂是治疗剂,例如抗癌剂。在一些实施方案中,所述试剂与可活化抗体的抗体或抗原结合片段的巯基缀合。在一些实施方案中,所述试剂是含巯基试剂。在一些实施方案中,所述试剂经工程改造以包括一个或多个巯基。

[0153] 在一些实施方案中,所述试剂是细胞毒性剂例如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。合适的细胞毒性剂包括例如表4中所列的任何细胞毒性剂。

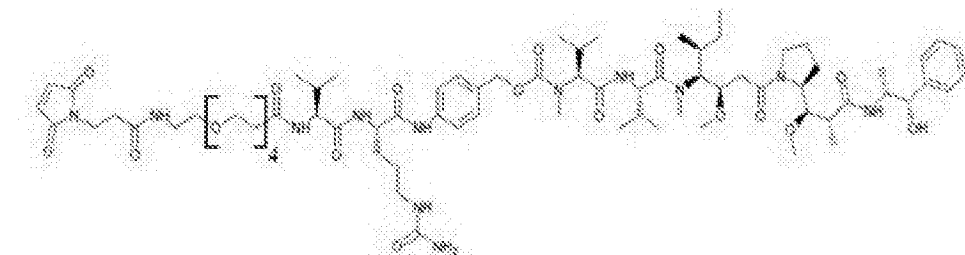
[0154] 在一些实施方案中,所述试剂是含巯基试剂。在一些实施方案中,所述试剂经工程改造以包括一个或多个巯基。在一些实施方案中,所述试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述试剂是多拉司他汀或其衍生物(例如阿里他汀E、AFP、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述试剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述试剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,所述试剂是核酸破坏剂。在一些实施方案中,所述试剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述试剂是卡奇霉素或其衍生物。

[0155] 在一些实施方案中,所述试剂使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头或马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头与AB连接。在一些实施方案中,所述试剂使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头与AB连接。在一些实施方案中,所述试剂使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头与AB连接。在一些实施方案中,所述试剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头与AB连接的单甲基阿里他汀D(MMAD),和该接头有效负载构建体在本文称为“vc-MMAD”。在一些实施方案中,所述试剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基接头与AB连接的单甲基阿里他汀E(MMAE),和该接头有效负载构建体在本文称为“vc-MMAE”。vc-MMAD和vc-MMAE的结构如下文所示:

vc-MMAD:



vc-MMAE:



在一些实施方案中,除了本文提供的组合物和方法之外,缀合的可活化抗体还可经修饰以通过插入或以其它方式包括在可活化抗体序列中的修饰的氨基酸序列进行位点特异性缀合。这些修饰的氨基酸序列经设计以允许控制在缀合的可活化抗体内缀合的试剂的放置和/或剂量。例如,可活化抗体可经工程改造以在轻链和重链的位置上包括半胱氨酸取代,提供反应性巯基,并且不负面影响蛋白折叠和组装,也不改变抗原结合。在一些实施方案中,可活化抗体可经工程改造以在可活化抗体内包括或以其它方式引入一个或多个非天然氨基酸残基,提供合适的缀合位点。在一些实施方案中,可活化抗体可经工程改造以在可活化抗体序列内包括或以其它方式引入酶可活化肽序列。

[0156] 在一些实施方案中,所述试剂是可检测的部分,例如标记或其它标志物。例如,试剂是或包括放射性标记的氨基酸、可被标记的亲核素(例如包含荧光标志物或酶活性的链

霉亲和素,其可被光学或量热方法检测)检测的一个或多个生物素基部分、一种或多种放射性同位素或放射性核素、一种或多种荧光标记、一种或多种酶标记和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中,可检测的部分通过间隔区分子连接。

[0157] 可使用的酶活性毒素和其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美国商陆(*Phytolacca Americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯类(tricothecenes)。各种放射性核素可用于制备放射性缀合的抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0158] 抗体和试剂的缀合物使用各种双官能蛋白-偶联剂制备,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基联硫基)丙酸盐(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(thiolane) (IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如二甲基己二酰亚胺酸酯HCL)、活性酯(例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛类(例如戊二醛)、双-叠氮基化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮盐衍生物(例如双-(对重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯类(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等, *Science* 238: 1098 (1987)中所述制备。碳-14-标记的1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)是将放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0159] 本领域普通技术人员将认识到,多种多样的可能的部分可与本发明得到的抗体偶联。(参见例如,“Conjugate Vaccines”, *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse和R. E. Lewis, Jr (编辑), Carger Press, New York, (1989),其完整内容通过引用结合到本文中)。

[0160] 表4列举了可用于本文所述的发明的一些示例性的药剂,但其绝不意指为详尽的列表。

[0161] 表4:用于缀合的示例性药剂

细胞毒素剂

阿里他汀

阿里他汀 E

单甲基阿里他汀 D (MMAD)

单甲基阿里他汀 E (MMAE)

脱甲基阿里他汀 E (DMAE)

阿里他汀 F

单甲基阿里他汀 F (MMAF)

脱甲基阿里他汀 F (DMAF)

阿里他汀衍生物,例如其酰胺

阿里他汀酰胺

阿里他汀噻唑

涡轮他汀(Turbostatin)

Phenstatins

羟基 phenstatin

Spongistatin 5

Spongistatin 7

Halistatin 1

Halistatin 2

Halistatin 3

修饰的萆薢抑素

Halocomstatins

吡咯并苯并咪唑类(PBI)

多拉司他汀
多拉司他汀衍生物
多拉司他汀 16 DmJ
多拉司他汀 16 Dpv
类美登素, 例如 DM-1; DM-4
类美登素衍生物
倍癌霉素
倍癌霉素衍生物
 α -鹅膏蕈素
葱环类抗生素
多柔比星

柔红霉素
苦藜抑素
喜树碱
喜树碱衍生物
7-取代的喜树碱
10, 11-二氟亚甲基二氧基喜树碱
考布他汀
脱溴海兔毒素
Kahalalide-F
Discodermolide
Ecteinascidins

抗病毒剂

阿昔洛韦
Vira A
Symmetrel

抗真菌剂

制霉菌素

其它抗-肿瘤剂

阿霉素
柔红霉素
博来霉素
左旋溶肉瘤素
硫酸长春碱制剂

Cibrostatin6
Doxaliform
Anthracyclins 类似物
Anthracyclins 类似物

西马多丁类似物(CemCH₂-SH)
假单胞菌毒素 A (PE38)变体
假单胞菌毒素 A (ZZ-PE38)变体
ZJ-101
OSW-1
O6-苄基鸟嘌呤的 4-硝基苄氧羰基衍生物
拓朴异构酶抑制剂
哈米特林(Hemiasterlin)
三尖杉碱
高三尖杉酯碱
吡咯并苯并二氮杂萘二聚体(PBD)
官能化的吡咯并苯并二氮杂环庚烯
卡奇霉素
鬼臼毒素
紫杉烷
长春花生物碱类

可缀合的检测试剂

荧光素和其衍生物
异硫氰酸荧光素(FITC)

放射性同位素

¹²⁵I
¹³¹I
⁸⁹Zr
¹¹¹In
¹²³I
¹³¹I
^{99m}Tc
²⁰¹Tl
¹³³Xe
¹¹C

长春新碱	^{62}Cu
氟尿嘧啶	^{18}F
甲氨蝶呤	^{68}Ga
奈替派	^{13}N
比生群	^{15}O
诺消灵	^{38}K
硫鸟嘌呤	^{82}Rb
丙卡巴腓	^{99m}Tc (锝)
阿糖胞苷	

抗-细菌剂

氨基糖苷类
链霉素
新霉素
卡那霉素
阿米卡星
庆大霉素
妥布霉素
链霉素 B
大观霉素
氟苯西林
磺胺
多粘菌素
氯霉素

重金属

钡
金
铂

抗-支原体剂

泰乐菌素(Tylosine)
大观霉素

在一些实施方案中,除了本文提供的组合物和方法外,缀合的可活化抗体还可使用结合两个分子的任何化学反应偶联,只要抗体和其它部分保持它们各自的活性。该连键可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、嵌入、配位结合和络合。在一些实施方案中,结合是共价结合。共价结合可通过现有侧链的直接缩合或通过掺入外部的桥接分子实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白分子,例如本发明的可活化抗体,与其它分子偶联。例如,代表性的偶联剂可包括有机化合物,例如硫代酸酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。该列表不意欲穷尽本领域已知的各种类别的偶联剂,而是较常见偶联剂的实例。(参见Killen和Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen等, Immunological Reviews 62:185-216 (1982);和Vitetta等, Science 238:1098 (1987)。

[0162] 合适的接头描述于文献中(参见例如Ramakrishnan, S.等, Cancer Res. 44: 201-208 (1984),描述使用MBS (M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)。亦参见美国专利号5,030,719,描述使用通过寡肽接头与抗体偶联的卤代乙酰基酰肼衍生物。合适的接头包括:(i) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-联硫基)-甲苯 (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G));(ii) SPDP (琥珀酰亚胺基-6 [3-(2-吡啶基联硫基)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem. Co., Cat #21651G);和(iii) 磺基-LC-SPDP (磺基

琥珀酰亚胺基6 [3-(2-吡啶基联硫基)-丙酰胺]己酸酯(Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G)。另外的接头包括但不限于SMCC、磺基-SMCC、SPDB或磺基-SPDB。

[0163] 上述接头包含具有不同属性的元件,因此产生具有不同物理化学性质的缀合物。例如,接头SMPT包含空间阻碍的二硫键,和可形成具有增加的稳定性的缀合物。二硫键通常比其它连键更不稳定,因为二硫键被体外裂解,导致可获得较少的缀合物。

[0164] 以羧酸和伯胺或仲胺开始,试剂EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)可用于产生羧酰胺。因此,EDC可用于连接抗体中的赖氨酸残基与接头或毒素中的羧酸,或连接抗体中的天冬氨酸或谷氨酸残基与接头或毒素中的胺。这样的利用EDC的缀合反应可通过加入NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)或磺基-NHS (N-羟基-3-氧基磺酰基琥珀酰亚胺)而增强。加入NHS或磺基-NHS至这样的缀合反应中可增强缀合反应的速率、完全性、选择性和/或再现性。

[0165] 在一些实施方案中,接头是可裂解的。在一些实施方案中,接头是不可裂解的。在一些实施方案中,存在两个或更多个接头。所述两个或更多个接头全都相同,例如是可裂解的或不可裂解的,或所述两个或更多个接头是不同的,例如至少一个可裂解和至少一个不可裂解。

[0166] 在一些实施方案中,除了本文提供的组合物和方法之外,缀合的可活化抗体还可进一步使用用于连接试剂至AB的数种方法的任一种缀合:(a) 连接至AB的碳水化合物部分,或(b) 连接至AB的巯基,或(c) 连接至AB的氨基,或(d) 连接至AB的羧酸酯基。根据本发明,AB可通过具有至少两个反应性基团的中间接头共价连接至试剂,一个基团与AB反应和一个基团与所述试剂反应。可包括任何相容的有机化合物的接头,可选择使得与AB(或试剂)的反应没有不利地影响AB的反应性和选择性。此外,连接接头至试剂,可能不破坏试剂的活性。对于与氧化的抗体或氧化的抗体片段反应,合适的接头包括包含胺的那些,所述胺选自伯胺、仲胺、胍、酰胍、羟胺、苯胍、氨基脒和氨基硫脒基团。这样的反应性官能团可作为接头结构的部分存在,或可通过不包含这样的基团的接头的合适化学修饰引入。

[0167] 根据本发明,用于连接至还原的AB的合适的接头包括具有能够与还原抗体或片段的巯基反应的某些反应性基团的那些。这样的反应性基团包括但不限于:反应性卤代烷基(包括例如,卤代乙酰基)、p-汞基苯甲酸酯基团和能够Michael-型加成反应的基团(包括例如,马来酰亚胺和Mitra和Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110描述的类型基团)。

[0168] 根据本发明,用于连接至非氧化也非还原的AB的合适的接头包括具有能够与存在于AB的未经修饰的赖氨酸残基中的伯氨基反应的某些官能团的那些。这样的反应性基团包括但不限于NHS羧酸或碳酸酯、磺基-NHS羧酸或碳酸酯、4-硝基苯基羧酸或碳酸酯、五氟苯基羧酸或碳酸酯、酰基咪唑、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0169] 根据本发明,用于连接至非氧化也非还原的AB的合适的接头包括具有能够与存在于AB的天冬氨酸或谷氨酸残基中的羧基反应的某些官能团的那些,其已被合适的试剂活化。合适的活化试剂包括EDC (具有或不具有加入的NHS或磺基-NHS)和用于羧酰胺形成的其它脱水剂。这些实例中,存在于合适的接头中的官能团包括伯胺和仲胺、胍、羟胺和酰胍。

[0170] 所述试剂可在接头与AB连接之前或之后与接头连接。在某些应用中,首先产生AB-

接头中间体可能是需要的,其中接头不包含缔合的试剂。根据具体的应用,特定的试剂可然后与接头共价连接。在一些实施方案中,AB首先与MM、CM和缔合的接头连接,和然后与用于缀合目的的接头连接。

[0171] 分支接头:在特定的实施方案中,利用具有多个试剂连接位点的分支接头。对于多位点接头,与AB的单一共价连接将产生能够在多个位点上结合试剂的AB-接头中间体。所述位点可以是醛基团或巯基或试剂可连接的任何化学位点。

[0172] 在一些实施方案中,通过在AB的多个位点上连接单一位点接头,可获得较高的特异活性(或较高的试剂:AB比)。通过两种方法的任一种,该多个位点可引入至AB中。第一,可在同一AB上产生多个醛基团和/或巯基。第二,可连接AB的醛或巯基与具有用于随后连接接头的多个功能位点的“分支接头”。分支接头或多位点接头的功能位点可以是醛基团或巯基,或可以是接头可连接的任何化学位点。还更高的特异活性可通过组合这两种方法获得,即在AB的数个位点上连接多位点接头。

[0173] 可裂解的接头:在本发明的一个实施方案中,可使用易于被补体系统的酶(例如但不限于尿激酶、组织纤溶酶原激活物、胰蛋白酶、纤溶酶或具有蛋白水解活性的其它酶)裂解的肽接头。根据本发明的一种方法,试剂经过对补体裂解易感的接头连接。抗体选自可激活补体的类别。因此,抗体-试剂缀合物激活补体级联和在靶标位点上释放试剂。根据本发明的其它方法,试剂经过易于被具有蛋白水解活性的酶(例如尿激酶、组织纤溶酶原激活物、纤溶酶或胰蛋白酶)裂解的接头连接。这些可裂解的接头可用于缀合的可活化抗体,其包括胞外毒素,以非限制性实例的方式,例如表4中所示的任何胞外毒素。

[0174] 可裂解的接头序列的非限制性实例提供于表5中。

[0175] 表5:用于缀合的示例性接头序列

可裂解的序列的类型	氨基酸序列
<u>纤溶酶可裂解的序列</u>	
尿激酶前体	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 203)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 204)
TGFB	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 205)
纤溶酶原	RKSSIIHRMRDVVL (SEQ ID NO: 206)
链激酶	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 207)
	SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 208)
<u>因子 Xa 可裂解的序列</u>	IEGR (SEQ ID NO: 209)
	IDGR (SEQ ID NO: 210)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 211)
<u>MMP 可裂解的序列</u>	
明胶酶 A	PLGLWA (SEQ ID NO: 212)
<u>胶原酶可裂解的序列</u>	
小牛皮肤胶原($\alpha 1(I)$ 链)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 213)
小牛皮肤胶原($\alpha 2(I)$ 链)	GPQGILLGA (SEQ ID NO: 214)
牛软骨胶原($\alpha 1(II)$ 链)	GIAGQ (SEQ ID NO: 215)
人肝胶原($\alpha 1(III)$ 链)	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 216)
人 α_2M	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 217)
人 PZP	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 218)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 219)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 220)
大鼠 α_1M	EPQALAMS (SEQ ID NO: 221)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 222)
大鼠 α_2M	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 223)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 224)
大鼠 $\alpha_1I_1(2J)$	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 225)
大鼠 $\alpha_1I_1(27J)$	SAPAVESE (SEQ ID NO: 226)
人或纤维细胞胶原酶	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 227)
(自溶裂解)	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 228)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 229)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 230)

此外,试剂可经过二硫键(例如半胱氨酸分子上的二硫键)与AB连接。因为许多肿瘤天然释放高水平的谷胱甘肽(还原剂),因此这可还原二硫键,随后在递送位点上释放试剂。在某些具体的实施方案中,修饰CM的还原剂也将修饰缀合的可活化抗体的接头。

[0176] 间隔区元件和可裂解的元件:在一些实施方案中,以优化试剂和可活化抗体的AB之间的间隔的方式构建接头可能是必需的。这可通过使用以下通式结构的接头实现:



其中

W是 $--NH--CH_2--$ 或 $--CH_2--$;

Q是氨基酸、肽;和

N是0-20的整数。

[0177] 在一些实施方案中,接头可包含间隔区元件和可裂解的元件。间隔区元件用于定位可裂解的元件远离AB的核心,使得可裂解的元件更易接近负责裂解的酶。上述的某些分

支接头可用作间隔区元件。

[0178] 在整个论述中,应理解接头与试剂(或间隔区元件与可裂解的元件、或可裂解的元件与试剂)的连接不需要通过特定的连接或反应模式来实现。提供具有合适的稳定性和生物相容性的产物的任何反应都是可接受的。

[0179] 血清补体和接头选择:根据本发明的一种方法,当需要试剂释放时,使用作为可激活补体的类型的抗体的AB。得到的缀合物同时保留结合抗原和激活补体级联的能力。因此,根据本发明的该实施方案,试剂连接可裂解的接头或可裂解的元件的一个末端,和接头基团的另一末端与AB上的特定位点连接。例如,如果试剂具有羟基或氨基,其可与肽、氨基酸或其它合适选择的接头的羧基末端分别经过酯或酰胺键连接。例如,这样的试剂可与接头肽经过碳二亚胺反应连接。如果试剂包含会干涉接头连接的官能团,这些干涉官能团可在连接之前被封闭和在产物缀合物或中间体制备后解封闭。接头的相对或氨基端然后直接或在进一步修饰后用于结合能够激活补体的AB。

[0180] 接头(或接头的间隔区元件)可具有任何需要的长度,其一个末端可与可活化抗体的AB的特定位点共价连接。接头或间隔区元件的另一末端可与氨基酸或肽接头连接。

[0181] 因此,当这些缀合物在补体的存在下结合抗原时,连接试剂与接头的酰胺或酯键将被裂解,导致释放呈其活性形式的试剂。这些缀合物当给予受试者时,将在靶标位点上实现试剂的递送和释放,和对于药剂、抗生素、抗代谢物、抗增殖药等(如在表4中(但不限于此)提供的那些)的体内递送特别有效。

[0182] 用于无补体激活释放的接头:在靶向递送的又一种应用中,无补体激活的试剂释放是需要的,因为补体级联的激活将最终溶解靶细胞。因此,当试剂的递送和释放应在不杀死靶细胞的情况下实现时该方法是有用的。这是当需要递送细胞介质例如激素、酶、皮质类固醇、神经递质、基因或酶至靶细胞时的目标。这些缀合物可通过将试剂与不能激活补体的AB经过接头连接制备,所述接头对通过血清蛋白酶的裂解轻度易感。当将该缀合物给予个体时,抗原-抗体复合物将快速形成,而试剂的裂解将缓慢发生,因此导致在靶标位点上释放化合物。

[0183] 生物化学交叉接头:在一些实施方案中,使用某些生物化学交叉接头,可活化抗体可与一种或多种治疗剂缀合。交叉连接试剂形成分子桥,其将两个不同分子的官能团系在一起。为了以逐步方式连接两个不同的蛋白,可使用杂化-双官能交叉-接头,其排除不需要的均聚物形成。

[0184] 还可使用通过溶酶体蛋白酶可裂解的肽基接头,例如Val-Cit、Val-Ala或其它二肽。此外,可使用在溶酶体的低pH环境中可裂解的酸敏感性接头,例如:双-唾液酸酯。其它合适的接头包括组织蛋白酶-敏感性底物,特别是在酸性pH下显示最佳功能的那些。

[0185] 示例性的杂化-双官能交叉-接头在表6中提供。

[0186] 表6:示例性的杂化-双官能交叉接头

杂化-双官能交叉-接头			
接头	对以下具有反应性	优点和应用	交叉连接后的间隔区臂长度(埃)
SMPT	伯胺	较大的稳定性	11.2 Å
SPDP	巯基	巯基化	6.8 Å
	伯胺	可裂解的交叉连接	
LC-SPDP	巯基	延长的间隔区臂	15.6 Å
	伯胺		
磺基-LC-SPDP	巯基	延长的间隔区臂	15.6 Å
	伯胺		
SMCC	巯基	水溶性	11.6 Å
	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应性基团	
磺基-SMCC	巯基	酶-抗体缀合	11.6 Å
	伯胺	半抗原-载体蛋白缀合	
MBS	巯基	稳定的马来酰亚胺反应性基团	9.9 Å
	伯胺	水溶性	
磺基-MBS	巯基	酶-抗体缀合	9.9 Å
	伯胺	酶-抗体缀合	
SIAB	巯基	半抗原-载体蛋白缀合	10.6 Å
	伯胺	水溶性	
磺基-SIAB	巯基	酶-抗体缀合	10.6 Å
	伯胺	水溶性	
SMPB	巯基	延长的间隔区臂	14.5 Å
	伯胺	酶-抗体缀合	
磺基-SMPB	巯基	延长的间隔区臂	14.5 Å
	伯胺	水溶性	
EDE/磺基-NHS	巯基	半抗原-载体缀合	0
	伯胺	水溶性	
ABH	羧基	与糖基团反应	11.9 Å
	碳水化合物		
	无选择性		

非-可裂解的接头或直接连接:在本发明的一些实施方案中,缀合物可经设计,使得所述试剂被递送至靶标而不释放。这可通过将试剂与AB直接或经过非-可裂解的接头连接实现。

[0187] 这些非-可裂解的接头可包括氨基酸、肽、D-氨基酸或可经修饰以包括可随后用于通过本文所述的方法连接AB的官能团的其它有机化合物。这样的有机接头的通式可以是



其中

W是 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-$;

Q是氨基酸、肽;和

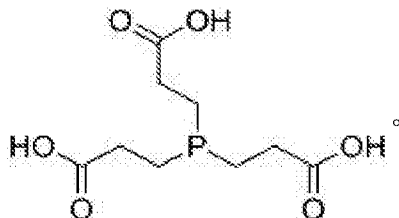
n是0-20的整数。

[0188] 非-可裂解的缀合物:在一些实施方案中,化合物可与不激活补体的AB连接。当使用不能补体激活的AB时,该连接可使用对通过激活的补体的裂解易感的接头或使用对通过激活的补体的裂解不易感的接头来实现。

[0189] 还原剂

还原剂:以非限制性实例的方式,合适用于本公开内容的组合物和方法的还原剂的实例包括BMS (双(2-巯基乙基)砷)、巯乙胺、半胱氨酸、DMH (二甲基-双-巯基乙酰基胍)、DTBA (二硫代丁胺)、DTT (二硫苏糖醇)、GILT (γ 干扰素可诱导的溶酶体硫醇还原酶;用于酶促还原)、谷胱甘肽、 β -巯基乙醇、MEA (2-巯基乙胺)、吡啶-2-硫酮、硼氢化钠、硫代磷酸钠、TCEP ((三(2-羧基乙基)膦))和硫代丙基-琼脂糖。在一些实施方案中,还原剂是DTT、 β -巯基乙醇或TCEP。

[0190] 本文提供的研究使用还原剂TCEP (三(2-羧基乙基)膦),其具有以下结构:



[0191] TCEP经常用作还原剂来裂解在蛋白内和蛋白之间的二硫键。TCEP极具选择性,和对蛋白内存在的其它官能团不反应。TCEP与埋藏的二硫化物不反应。

[0192] 与用于该目的其它两种最常见的试剂相比(DTT和 β -巯基乙醇),TCEP具有无臭、更有力的还原剂、不可逆的还原剂、更亲水和对空气氧化更有抗性的优点。不像DTT,TCEP在碱性和酸性条件下都有活性。当用马来酰亚胺标记半胱氨酸残基时TCEP特别有用。TCEP可保持半胱氨酸免于形成二-硫键,和不像DTT和 β -巯基乙醇,其不容易与马来酰亚胺反应。

[0193] 还原剂与可活化抗体的比率将根据可活化抗体而改变。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率范围为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约2.5:1至1:1。

[0194] 定义:

除非另外定义,否则与本发明结合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,和复数术语应包括单数。一般而言,与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学和蛋白和寡核苷酸或多核苷

酸化学和杂交结合使用的命名法和其技术为本领域众所周知和通常使用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术按照制造商的说明书或按本领域通常实施的或按本文所述的进行。前述技术和程序通常按照本领域众所周知的常规方法和按本说明书全文中引用和论述的各种普通和较特定的参考文献中所述的进行。参见例如Sambrook等Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。与本文所述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学结合使用的命名法和其实验室程序和技术为本领域众所周知和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者治疗。

[0195] 如按照本公开内容所使用的,除非另外说明,否则以下术语应理解为具有以下含义:

如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即包含特异性结合抗原(与抗原有免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与……有免疫反应”或“免疫特异性结合”意指抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应并与其它多肽不反应或以低得多的亲和力($K_d > 10^{-6}$)结合。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、结构域抗体、单链、Fab和F(ab')₂片段、scFv和Fab表达文库。

[0196] 基本抗体结构单元已知包括四聚体。各四聚体包括两对相同的多肽链,每一对具有一条“轻”链(约25 kDa)和一条“重”链(约50-70 kDa)。各链的氨基-末端部分包括约100-110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。各链的羧基-末端部分定义了恒定区,其主要负责效应器功能。一般而言,自人获得的抗体分子涉及类型IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任一种,其在分子中存在的重链性质上彼此不同。某些类型还具有亚类,例如IgG₁、IgG₂和其它。此外,在人中轻链可以是κ链或λ链。

[0197] 如本文所用,术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指一群抗体分子,其仅包含由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成的一个分子种类的抗体分子。具体而言,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在该群体的所有分子中是相同的。mAb包含能够与抗原的特定表位进行免疫反应的抗原结合位点,特征在于对其有独特的结合亲和力。

[0198] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N-末端可变(“V”)区的氨基酸残基构成。在重链和轻链的V区内的三个高度发散的区段,其被称为“高度可变区”,间插在称为“框架区”或“FR”的较保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白的高度可变区之间和其邻近的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高度可变区和重链的三个高度可变区在三维空间上相对于彼此排列以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补,和各重链和轻链的三个高度可变区被称为“互补决定区”或“CDR”。各结构域的氨基酸的指定按照免疫目的的蛋白的Kabat序列的定义进行(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987和1991))或Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia等 Nature 342:878-883 (1989)。

[0199] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白、scFv或T-细胞受体的任何蛋白决定簇。术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或T-细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子例如氨基酸或糖侧链的化学活性表面簇组成,和通常具有特

定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,抗体可针对多肽的N-末端或C-末端肽产生。当解离常数 $\leq 1\ \mu\text{M}$ 时,抗体被认为特异性结合抗原;在一些实施方案中,解离常数 $\leq 100\ \text{nM}$;在一些实施方案中,解离常数 $\leq 10\ \text{nM}$ 。

[0200] 如本文所用,术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指存在于免疫球蛋白分子和免疫球蛋白对其有特异性的抗原之间的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可用相互作用的解离常数(K_d)表示,其中越小的 K_d 表示越大的亲和力。选择的多肽的免疫结合性质可使用本领域众所周知的方法量化。一种这样的方法包括测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中所述速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力和在两个方向上同等影响速率的几何参数。因此,“结合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})两者可通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率测定。(参见Nature 361:186-87 (1993))。 K_{off}/K_{on} 比率能够消除与亲和力不相关的所有参数和等于解离常数 K_d 。(通常,参见Davies等(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。当解离结合常数(K_d) $\leq 1\ \mu\text{M}$ 时,本发明的抗体被认为特异性结合靶标,如通过测定法例如放射性配体结合测定法或本领域技术人员已知的类似的测定法测量。在一些实施方案中, $K_d \leq 100\ \text{nM}$ 。在一些实施方案中, $K_d \leq 10\ \text{nM}$ 。在一些实施方案中, $K_d \leq 1\ \text{nM}$ 。在一些实施方案中, $K_d \leq 100\ \text{pM}$ 至约 $1\ \text{pM}$ 。

[0201] 本文提供的组合物和方法能够将一种或多种试剂与AB的一个或多个半胱氨酸残基连接,而不损害可活化抗体的活性(例如掩蔽、激活或结合活性)。

[0202] 如本文所用,术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成来源的多核苷酸或其一些组合,根据其来源,“分离的多核苷酸”(1)与其中“分离的多核苷酸”天然存在的多核苷酸的全部或部分不相关,(2)与天然不与其连接的多核苷酸可操作连接,或(3)不作为较大序列的一部分天然存在。按照本发明的多核苷酸包括编码本文所示的重链免疫球蛋白分子的核酸分子和编码本文所示的轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0203] 本文中术语“分离的蛋白”是指自cDNA或重组RNA表达的蛋白,或合成来源的蛋白或其一些组合,根据其来源或衍生来源,“分离的蛋白”(1)与天然存在的蛋白不相关,(2)不含来自同一来源的其它蛋白,(3)通过来自不同物种的细胞表达,或(4)不天然存在。

[0204] 本文作为上位术语使用的术语“多肽”是指多肽序列的天然蛋白、片段或类似物。因此,天然蛋白片段和类似物为上位多肽的下位类型。根据本发明的多肽包括本文所示的重链免疫球蛋白分子和本文所示的轻链免疫球蛋白分子以及通过包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子例如 κ 轻链免疫球蛋白分子的组合(和反之亦然)形成的抗体分子,以及其片段和类似物。

[0205] 应用于对象时,如本文所用的术语“天然存在的”是指对象可天然存在的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列,其可自天然来源分离和并未在实验室中有人工修饰,或以其它方式天然存在。

[0206] 如本文所用的术语“可操作连接”是指如此描述的元件的位置处于允许其以其预期的方式起作用的关系中。与编码序列“可操作连接”的控制序列以在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达的方式连接。

[0207] 如本文所用的术语“控制序列”是指多核苷酸序列,其为实现它们所连接的编码序列的表达和加工所必需的。这样的控制序列的性质取决于宿主生物而不同:在原核生物和

真核生物中,这样的控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。术语“控制序列”意欲最少包括其存在为表达和加工所必需的所有元件,和还可包括其存在是有利的另外的元件,例如前导序列和融合配偶体序列。本文提及的术语“多核苷酸”意指至少10个碱基长度的核苷酸,其为核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0208] 本文提及的术语寡核苷酸包括通过天然存在的和非天然存在的寡核苷酸连键连接在一起的天然存在的和经修饰的核苷酸。寡核苷酸为通常包含长度为200个碱基或更少的多核苷酸子集。在一些实施方案中,寡核苷酸为10-60个碱基长度。在一些实施方案中,寡核苷酸为12、13、14、15、16、17、18、19或20-40个碱基长度。寡核苷酸通常为单链的,例如对于探针而言,尽管寡核苷酸可以是双链的,例如用于构建基因突变体。本发明的寡核苷酸为有义或反义寡核苷酸。

[0209] 本文提及的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文提及的术语“经修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基团等的核苷酸。本文提及的术语“寡核苷酸连键”包括寡核苷酸连键,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。参见例如LaPlanche等Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec等 J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein等 Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon等 Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon等 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach,第87-108页(F. Eckstein编辑, Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec等美国专利号5,151,510; Uhlmann和Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)。如果需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0210] 如本文所用,二十种常规氨基酸和其缩写按常规使用。参见Immunology - A Synthesis (第2版, E.S. Golub和D.R. Gren编辑, Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991))。二十种常规氨基酸的立体异构体(例如D-氨基酸)、非天然氨基酸例如 α -, α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸和其它非常规氨基酸也可以是本发明的多肽的合适组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸和其它类似的氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟基脯氨酸)。在本文使用的多肽表示法中,按照标准用法和惯例,左手方向是氨基端方向和右手方向是羧基端方向。

[0211] 类似地,除非另外说明,否则单链多核苷酸序列的左手末端是5'末端,双链多核苷酸序列的左手方向被称为5'方向。5'至3'添加新生RNA转录物的方向被称为转录方向。具有与RNA相同的序列和为5'至RNA转录物的5'末端的DNA链上的序列区被称为“上游序列”。具有与RNA相同的序列和为3'至RNA转录物的3'末端的DNA链上的序列区被称为“下游序列”。

[0212] 应用于多肽时,术语“基本同一性”意指两个肽序列,当最佳比对时,例如通过程序GAP或BESTFIT使用默认的空位加权,共有至少百分之80的序列同一性。在一些实施方案中,两个肽序列共有至少百分之90的序列同一性。在一些实施方案中,两个肽序列共有至少百分之95的序列同一性。在一些实施方案中,两个肽序列共有至少百分之99的序列同一性。

[0213] 在一些实施方案中,不相同的残基位置因为保守氨基酸置换而不同。

[0214] 如本文所论述的,抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的较少变化考虑包括在本发明中,只要氨基酸序列中的变化保持与参比序列(例如野生型序列)至少75%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,氨基酸序列中的变化保持与参比序列至少80%、90%、95%或99%的氨基酸同一性。具体而言,考虑保守氨基酸置换。保守置换为在其侧链上相关的氨基酸家族内发生的那些。遗传编码的氨基酸通常分成以下家族:(1) 酸性氨基酸为天冬氨酸、谷氨酸;(2) 碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3) 非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;和(4) 不带电荷的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。氨基酸的其它家族包括(i) 丝氨酸和苏氨酸,其为脂肪族-羟基家族;(ii) 天冬酰胺和谷氨酰胺,其为含酰胺家族;(iii) 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,其为脂肪族家族;和(iv) 苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其为芳香族家族。例如,可合理预期分离的用异亮氨酸或缬氨酸置换亮氨酸、用谷氨酸置换天冬氨酸、用丝氨酸置换苏氨酸或用结构相关的氨基酸类似的置换氨基酸,将对得到的分子的结合或其它性质不具有主要影响,例如在其中所述置换不包括在互补决定区(CDR)或其它可变区内的氨基酸的情况下。氨基酸改变是否产生功能肽可通过测定多肽衍生物的特异性活性容易地确定。本文详细描述了测定法。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可通过本领域普通技术人员容易地制备。在一些实施方案中,片段或类似物的氨基-和羧基-末端出现在功能结构域的边界附近。结构和功能结构域可通过比较核苷酸和/或氨基酸序列数据与公开的或专有的序列数据库来鉴定。在一些实施方案中,计算机化的比较方法用于鉴定在具有已知结构和/或功能的其它蛋白中出现的序列基序或预测的蛋白构象结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白序列的方法是已知的。Bowie等Science 253:164 (1991)。因此,前述实例证实,本领域技术人员可识别可用于定义本发明的结构和功能结构域的序列基序和结构构象。

[0215] 在一些实施方案中,氨基酸置换为以下的那些置换:(1) 降低对蛋白水解的易感性;(2) 降低对氧化的易感性;(3) 改变形成蛋白复合物的结合亲和力;(4) 改变结合亲和力;和(4) 赋予或改变这样的类似物的其它物理化学或功能性质。类似物可包括非天然存在的肽序列的序列的各种突变型蛋白。例如,可在天然存在的序列中(在一些实施方案中,在形成分子间接触的结构域之外的多肽的部分中)进行单个或多个氨基酸置换(在一些实施方案中,保守氨基酸置换)。保守氨基酸置换应基本上不改变原始序列的结构特征(例如,置换氨基酸不应易于破坏在原始序列中出现的螺旋,或破坏表示原始序列特征的其它类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton编辑, W. H. Freeman和Company, New York (1984));Introduction to Protein Structure (C. Branden和J. Tooze编辑, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991));和Thornton等Nature 354:105 (1991)。

[0216] 如本文所用的术语“多肽片段”是指具有氨基末端和/或羧基-末端缺失和/或一个或多个内部缺失的多肽,但其中剩余氨基酸序列与从例如全长cDNA序列中推论的天然存在的序列的相应位置相同。片段通常为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸长。在一些实施方案中,片段是至少14个氨基酸长的抗体片段。在一些实施方案中,片段是至少20个氨基酸长

的AB的片段。在一些实施方案中,片段是至少50个氨基酸长的AB的片段。在一些实施方案中,片段是至少70个氨基酸长的AB的片段。如本文所用的术语“类似物”是指包含至少25个氨基酸的区段的多肽,其与推论的氨基酸序列的部分基本相同并在合适的结合条件下具有与靶标的特异性结合。通常,相对于天然存在的序列,多肽类似物包含保守氨基酸置换(或添加或缺失)。类似物通常至少20个氨基酸长,在一些实施方案中,至少50个氨基酸长或更长,和可经常与全长天然存在的多肽一样长。

[0217] 术语“试剂”在本文用于表示化合物、化合物的混合物、生物大分子或自生物材料制备的提取物。

[0218] 如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指掺入可检测的标志物,例如通过掺入放射性标记的氨基酸或连接生物素基部分的多肽,所述多肽可被标记的亲合素(例如包含荧光标志物或酶活性的链霉亲和素,其可通过光学或量热方法检出)检出。在某些情况下,标记或标志物还可以是治疗性的。本领域已知和可使用标记多肽和糖蛋白的多种方法。用于多肽的标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如FITC、若丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(例如辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光物质、生物素基基团、被第二报告分子识别的预定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔区臂连接以降低可能的空间位阻。如本文所用的术语“药剂或药物”是指当适当给予患者时能够诱导所需治疗效果的化合物或组合物。

[0219] 如本文所用的术语“药物”意指元素、化合物、试剂或分子实体,包括例如药学、治疗学或药理学化合物。药物可以是天然的或合成的,或其组合。“治疗药物”是单独或与另一试剂组合(例如与前药组合的前药转化酶)对癌细胞或免疫细胞(例如激活的免疫细胞)发挥治疗(例如有益)效果的试剂。通常,用于本文所述的方法和组合物的治疗性药物为发挥细胞毒素、细胞生长抑制或免疫抑制效果的那些。在某些实施方案中,药物不是放射性元素。药物可以是含巯基试剂和/或药物可以经工程改造以包括一个或多个巯基。

[0220] 根据试剂对细胞的作用,“细胞毒素剂”意指杀死细胞。“细胞生长抑制剂”意指细胞增殖的抑制。

[0221] 在抗体的背景下,术语“链间二硫键”是指在两条重链之间或在重链和轻链之间的二硫键。

[0222] 术语“链间巯基”是指可参与链间二硫键形成的抗体重链或轻链的巯基。

[0223] 当特定类型和/或类似反应性的所有缀合点与药物缀合,产生蛋白-药物缀合物的同质群时,蛋白被称为“满载的”。当仅一些可能的特定类型和/或类似反应性的缀合点与药物缀合,导致形成蛋白-药物缀合物的某一种或多种异构体时,蛋白被称为“部分负载的”。

[0224] 本文的其它化学术语按照本领域的常规用法使用,如The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S.编辑, McGraw-Hill, San Francisco (1985))中所举例说明的。

[0225] 如本文所用的“基本上纯的”意指一个物体种类是存在的主要种类(即在摩尔基础上,其比组合物中的任何其它个体种类更加丰富),和在一些实施方案中,基本上纯化的部分是其中所述物体种类包含存在的所有大分子种类的至少约50% (在摩尔基础上)的组合

物。

[0226] 一般而言,基本上纯的组合物将包含组合物中存在的所有大分子种类的超过约80%,在一些实施方案中,超过约85%、90%、95%和99%。在一些实施方案中,物体种类纯化至基本同质(通过常规检测方法,在组合物中不能检出污染物种类),其中组合物基本上由单一的大分子种类组成。

[0227] 术语患者包括人和兽医受试者。

[0228] 缀合的可活化抗体的用途

应理解,给予本发明的缀合的可活化抗体将与合适的载体、赋形剂和掺入至制剂中以提供改进的传递、递送、耐受性等的其它试剂一起给予。大多数合适的制剂可见于所有制药化学家已知的药典:Remington's Pharmaceutical Sciences (第15版, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)),特别是其中Blaug, Seymour的第87章。这些制剂包括例如,粉剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(例如Lipofectin™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和包含聚乙二醇的半固体混合物。任何前述的混合物可适合于本发明的治疗和疗法,只要制剂中的活性成分未被制剂失活和制剂与给予途径在生理学上是相容和耐受的。对于与制药化学家众所周知的制剂、赋形剂和载体有关的其它信息,还参见Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance (药学赋形剂开发:临床前指导的需要)" Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2): 210-8 (2000);Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals (固体蛋白药物的冻干和开发)" Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000);Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts (脂质、亲脂药物和口服药物递送——一些新出现的概念)" J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000);Powell等 "Compendium of excipients for parenteral formulations (胃肠外制剂的赋形剂概要)" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)和其中的引文。

[0229] 本发明的治疗制剂,其包括缀合的可活化抗体,用于预防、治疗或以其它方式改善与靶标的表达和/或活性有关的疾病或病症。例如,本发明的治疗制剂用于治疗或以其它方式改善癌症或其它肿瘤病况。在一些实施方案中,癌症是其中靶标表达的实体瘤或血液学恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是其中靶标表达的实体瘤。在一些实施方案中,癌症是其中靶标表达的血液学恶性肿瘤。在一些实施方案中,靶标在实质上表达(例如在癌症中为经常执行器官或组织的功能的器官或组织的部分)。在一些实施方案中,靶标在细胞、组织或器官上表达。在一些实施方案中,靶标在间质上表达(即,细胞、组织或器官的结缔支持性结构)。在一些实施方案中,靶标在成骨细胞上表达。在一些实施方案中,靶标在内皮组织(脉管系统)上表达。在一些实施方案中,靶标在癌症干细胞上表达。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是核酸破坏剂。

[0230] 使用本发明的缀合的可活化抗-EGFR抗体,所治疗和/或所预防和/或进展被延迟和/或症状被改善的病理包括例如,与EGFR的表达和/或活性有关的疾病或病症。在一些实施方案中,与EGFR的表达和/或活性有关的疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,癌症是

乳腺癌,以非限制性实例的方式,例如乳腺癌是三重阴性乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是三重阴性乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是成胶质细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是头颈癌,以非限制性实例的方式,例如食管癌。在一些实施方案中,癌症是食管癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌,以非限制性实例的方式,例如非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢/子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,癌症是肾癌。在一些实施方案中,癌症是肉瘤,以非限制性实例的方式,例如骨肉瘤。在一些实施方案中,癌症是骨肉瘤。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌,以非限制性实例的方式,例如鳞状细胞癌、基质细胞癌和/或黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是食管鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肺鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是基质细胞癌。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是核酸破坏剂。

[0231] 在一些实施方案中,与EGFR的表达和/或活性有关的适应症(例如疾病或病症)是炎性病症和/或自身免疫疾病。在一些实施方案中,炎性和/或自身免疫疾病是银屑病。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是核酸破坏剂。

[0232] 使用本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体,所治疗和/或所预防和/或进展被延迟和/或症状被改善的病理包括例如,癌症。在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如白血病,包括T-细胞急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL);成淋巴细胞性疾病,包括多发性骨髓瘤;和实体瘤,包括肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和乳腺癌,包括三重阴性乳腺癌。此外,因为notch信号转导对于癌症干细胞的存活和生长是重要的,因此Jagged依赖性notch信号转导的抑制将影响干细胞生长和存活。

[0233] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如骨疾病或癌症转移,不管原发肿瘤来源如何。

[0234] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如乳腺癌,以非限制性实例的方式包括ER/PR+乳腺癌、Her2+乳腺癌、三重阴性乳腺癌。

[0235] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如结肠直肠癌。

[0236] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如胃癌。

[0237] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如成胶质细胞瘤。

[0238] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病

理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如头颈癌。

[0239] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如肺癌,以非限制性实例的方式,例如非小细胞肺癌。

[0240] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如多发性骨髓瘤。

[0241] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如卵巢癌。

[0242] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如胰腺癌。

[0243] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如前列腺癌。

[0244] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如肉瘤。

[0245] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如肾癌,以非限制性实例的方式,例如肾细胞癌。

[0246] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如甲状腺癌。

[0247] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如泌尿生殖道癌,例如膀胱癌、肾癌或子宫癌。在一些实施方案中,病理是膀胱癌。在一些实施方案中,病理是肾癌。在一些实施方案中,病理是子宫癌。

[0248] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如皮肤癌,以非限制性实例的方式,例如皮肤鳞状细胞癌,例如食管鳞状细胞癌(亦称为食管的鳞状细胞癌)、头颈鳞状细胞癌(亦称为头颈的鳞状细胞癌)或肺鳞状细胞癌(亦称为肺的鳞状细胞癌)、基质细胞癌或黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是食管鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肺鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是基质细胞癌。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。

[0249] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)或骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,病理是ALL。在一些实施方案中,病理是AML。在一些实施方案中,病理是CLL。在一些实施方案中,病理是MDS。

[0250] 除了癌症之外,Jagged-依赖性notch信号转导对于上皮细胞和成纤维细胞分化成成肌纤维细胞(在纤维化疾病发生中具有重要作用的细胞)是关键的。Jagged依赖性notch信号转导的抑制和因此成肌纤维细胞的出现的抑制,将有效治疗肾、肝、肺和皮肤的纤维化

疾病。在一些实施方案中,缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗纤维化病症,例如特发性肺纤维化(IPF)。

[0251] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如纤维化疾病。

[0252] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如特发性肺纤维化、肾纤维化疾病、肝纤维化疾病、腹膜透析引起的纤维化、硬皮病。

[0253] 在一些实施方案中,本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体用于治疗病理、预防病理、延迟病理进展和/或改善病理症状,所述病理例如为听力损失。

[0254] 在一些实施方案中,用于治疗所述病理、预防所述病理、延迟所述病理进展和/或改善所述病理症状的本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体与微管抑制剂缀合。在一些实施方案中,用于治疗所述病理、预防所述病理、延迟所述病理进展和/或改善所述病理症状的本发明的缀合的可活化抗-Jagged抗体与核酸破坏剂缀合。

[0255] 使用本发明的缀合的可活化抗-白介素6受体(IL-6)抗体,所治疗和/或所预防和/或进展被延迟和/或症状被改善的病理包括例如,与IL-6R的表达和/或活性有关的疾病或病症。在一些实施方案中,与IL-6R的表达和/或活性有关的疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌,包括但不限于三重阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施方案中,癌症是卡斯尔曼氏病(Castleman's disease)。在一些实施方案中,癌症是肝细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌。在一些实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是核酸破坏剂。

[0256] 在一些实施方案中,疾病或病症是炎症和/或炎性病症。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫疾病。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可活化抗体与其缀合的试剂是核酸破坏剂。

[0257] 蛋白水解增加已知是癌症的标志。(参见例如Affara NI等,“Delineating protease functions during cancer development(描述在癌症发生期间的蛋白酶功能)”*Method Mol Biol.* 539 (2009): 1-32)。肿瘤的进展、侵入和转移由其中涉及到蛋白酶的数个互相独立的过程引起。

[0258] 结合用于诊断或治疗与靶标表达和/或活性有关的疾病或病症的任何已知的方法,确定预防、改善或治疗的有效性。延长受试者的存活或以其它方式在受试者中延迟与靶标表达和/或活性有关的疾病或病症的进展,表明可活化抗体赋予了临床益处。

[0259] 缀合的可活化抗体可以药物组合物的形式给予。提供了涉及制备这样的组合物的原理和考虑,以及组分选择的指导,例如在Remington: The Science and Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R. Gennaro等编辑) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends (药物吸收增强:概念、可能性、限制和趋势), Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994;和Peptide and Protein Drug Delivery (肽和蛋白药物递送)(*Advances In Parenteral Sciences*, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York。

[0260] 可活化抗体片段的一个实施方案是与靶标蛋白的结合结构域特异性结合的最小片段。例如,基于抗体的可变区序列,肽分子可被设计为保留结合靶标蛋白序列的能力。这样的肽可经化学合成和/或通过重组DNA技术产生。(参见例如Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993))。制剂还可包含正治疗的特定适应症所需要的超过一种活性化合物,和在一些实施方案中,为未彼此不利地影响的具有补充活性的那些。或者,或此外,组合物可包含提高其功能的试剂,例如细胞毒素剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。这样的分子适合以用于预期目的有效的量组合存在。

[0261] 活性成分也可包裹在制备的微囊中,例如在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米粒和纳米胶囊)中或在大乳剂中通过凝聚技术或通过界面聚合,例如分别为羟基甲基纤维素或明胶-微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊。

[0262] 用于体内给予的制剂必须是无菌的。这通过无菌过滤膜的过滤容易地实现。

[0263] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的实例包括包含所述抗体的固体疏水聚合物的半渗透性基质,其中基质呈成形物体的形式,例如膜或微囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯基醇))、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、非可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟乙酸共聚物例如LUPRON DEPOT™(包含乳酸-羟乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管聚合物例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟乙酸能够在100天内释放分子,但某些水凝胶在较短的时间内释放蛋白。

[0264] 在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测的标记。使用完整抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab)₂)。对于探针或抗体,术语“标记的”意欲包括通过偶联(即物理连接)可检测的物质与探针或抗体直接标记探针或抗体,以及通过与直接标记的另一试剂的反应性间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体,和用生物素末端标记DNA探针使得其可用荧光标记的链霉亲和素检测。术语“生物样品”意欲包括自受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及在受试者内存在的组织、细胞和流体。因此,血液和血液级分或组分(包括血清、血浆或淋巴)包括在术语“生物样品”的用法内。即,本发明的检测方法可用于体外以及体内检测生物样品中的蛋白、多肽或肽。例如,用于检测分析物蛋白的体外技术包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀、免疫化学染色和免疫荧光。用于进行免疫测定的程序描述于例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology (ELISA:理论和实践:分子生物学方法)”, Vol. 42, J. R. Crowther (编辑) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay (免疫测定法)”, E. Diamandis和T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996;和“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (酶免疫测定法的实践和理论)”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985。此外,用于检测分析物蛋白的体内技术包括将标记的抗-分析物蛋白抗体引入至受试者。例如,抗体可用放射性标志物进行标记,在受试者中所述标志物的存在和位置可通过标准成像技术检测。

[0265] 诊断性和预防性制剂

本发明的缀合的可活化抗体用于诊断和预防制剂。在一个实施方案中,将缀合的可活化抗体给予处于发展一种或多种前述的癌症或其它病症的风险的患者。患者或器官对一种或多种前述病症的患病倾向可使用基因型、血清学或生物化学标志物确定。

[0266] 在本发明的一些实施方案中,将缀合的可活化抗体给予至诊断患有与一种或多种前述病症有关的临床适应症的人类个体。在诊断时,给予缀合的可活化抗体以减轻或逆转临床适应症的效果。

[0267] 本发明的缀合的可活化抗体还可用于检测患者样品中的靶标,因此可用作诊断。例如,本发明的缀合的可活化抗体用于体外测定,例如ELISA,以检测在患者样品中的靶标水平。

[0268] 缀合的可活化抗体还可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,这样的方法为体外方法。在一些实施方案中,这样的方法为体内方法。在一些实施方案中,这样的方法为原位方法。在一些实施方案中,这样的方法为离体方法。例如,具有酶促可裂解的CM的缀合的可活化抗体可用于检测能够裂解CM的酶的存在或不存在。这样的缀合的可活化抗体可用于诊断,其可包括通过在给定宿主生物体的给定细胞或组织中测量的活化的缀合的可活化抗体(即,由缀合的可活化抗体的裂解所产生的抗体)的积聚,体内检测(例如定性或定量)酶活性(或者在一些实施方案中,还原电位增加的环境,例如其可提供二硫键的还原)。活化的缀合的抗体的这样的积聚不仅表明所述组织表达酶活性(或增加的还原电位,取决于CM的性质),而且表明所述组织表达活化的抗体结合的靶标。

[0269] 例如,可选择CM为在肿瘤部位处、在病毒或细菌感染部位处、在生物学限制的部位处(例如在脓肿中、在器官中等)等存在的蛋白酶的蛋白酶底物。AB可以是结合靶标抗原的AB。使用本文公开的方法,或者当合适时,本领域技术人员熟悉的方法,可检测的标记(例如荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)可与AB或可活化抗体的其它区域缀合。合适的可检测的标记在上述筛选方法的文中进行论述,和其它具体的实例在下文提供。使用对疾病状态的蛋白或肽以及在目标疾病组织中其活性升高的蛋白酶有特异性的AB,蛋白酶-激活的可活化抗体将显示相对于其中CM特异性的酶不以可检测的水平存在或在疾病组织中以较低水平存在或无活性(例如,呈酶原形式或与抑制剂复合)的组织,对疾病组织的结合率增加。因为小的蛋白和肽从血液中通过肾过滤系统快速清除,和因为对CM有特异性的酶不以可检测的水平存在(或在非疾病组织中以较低水平存在或以无活性构象存在),在疾病组织中活化抗体的积聚相对于非疾病组织而提高。

[0270] 在另一实例中,缀合的可活化抗体可用于检测样品中裂解剂的存在或不存在。例如,在缀合的可活化抗体包含对酶裂解易感的CM的情况下,缀合的可活化抗体可用于检测(定性地或定量地)样品中酶的存在。在另一实例中,在缀合的可活化抗体包含对还原剂裂解易感的CM的情况下,缀合的可活化抗体可用于检测(定性地或定量地)样品中还原条件的存在。为便于在这些方法中分析,缀合的可活化抗体可经可检测地标记,和可结合至支持物(例如,固体支持物,例如玻片或珠)。可检测的标记可置于在裂解后不释放的可活化抗体的部分上,例如可检测的标记可以是直到发生裂解时才可检测的淬灭的荧光标记或其它标记。测定法可如下进行,例如通过使固定的可检测标记的可活化抗体与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以发生裂解的一段时间,然后洗涤以除去过量的样品和污染物。然后通过在与样品接触之前可活化抗体的可检测信号的变化,例如由于通过样品中的裂解剂裂解可活化抗体导致的可检测信号的存在和/或增加,评价在样品中裂解剂(例如酶或还原剂)的存在或不存在。

[0271] 这样的检测方法可适合于还提供检测当裂解时能够结合缀合的可活化抗体的AB

的靶标的存在或不存在。因此,所述测定法可适合于评价裂解剂的存在或不存在和目标靶标的存在或不存在。裂解剂的存在或不存在可通过上述可活化抗体的可检测的标记的存在和/或增加来检测,和靶标的存在或不存在可通过检测靶标-AB复合物,例如通过使用可检测标记的抗-靶标抗体来检测。

[0272] 缀合的可活化抗体还可用于原位成像以验证可活化抗体激活,例如通过蛋白酶裂解和与特定靶标结合。原位成像是能够在生物样品例如细胞培养物或组织切片中定位蛋白水解活性和靶标的技术。使用该技术,有可能基于可检测的标记(例如荧光标记)的存在证实与给定靶标的结合和蛋白水解活性。

[0273] 这些技术可用于源自疾病部位(例如肿瘤组织)或健康组织的任何冷冻细胞或组织。这些技术还可用于新鲜细胞或组织样品。

[0274] 在这些技术中,可活化抗体用可检测的标记进行标记。可检测的标记可以是荧光染料(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸若丹明(TRITC)、Alexa Fluor® 标记例如 Alexa Fluor® 680或Alexa Fluor® 750)、近红外(NIR)染料(例如Qdot® 纳米晶体)、胶体金属、半抗原、放射性标志物、生物素和放大试剂例如链霉亲和素或酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0275] 与标记的可活化抗体孵育的样品中标记的检测指示,样品包含靶标和包含对可活化抗体的CM有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶的存在可使用广谱蛋白酶抑制剂和/或使用对蛋白酶有特异性的试剂(例如抗体例如A11,其对蛋白酶蛋白裂解酶(matriptase)(MT-SP1)有特异性并抑制MT-SP1的蛋白水解活性)来证实;参见例如,公开于2010年11月11日的国际公开号WO 2010/129609。使用广谱蛋白酶抑制剂和/或通过使用更有选择性的抑制剂的相同方法可用于鉴定对可活化抗体的CM有特异性的一种蛋白酶或一类蛋白酶。在一些实施方案中,靶标的存在可使用对靶标有特异性的试剂(例如另一种抗体)来证实,或可检测的标记可与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中,未标记的可活化抗体可用于通过标记的第二抗体或更复杂的检测系统的检测。

[0276] 类似的技术也可用于体内成像,其中在受试者(例如哺乳动物,包括人类)中荧光信号的检测指示疾病部位包含靶标和包含对可活化抗体的CM有特异性的蛋白酶。

[0277] 这些技术还可用于试剂盒和/或用作试剂以基于可活化抗体中的蛋白酶-特异性CM在各种细胞、组织和生物体中检测、鉴定或表征蛋白酶活性。

[0278] 在一些实施方案中,原位成像和/或体内成像可用于鉴定待治疗的患者的方法。例如,在原位成像中,可活化抗体用于筛选患者样品以鉴定在合适位点上例如在肿瘤部位上具有合适的蛋白酶和靶标的那些患者。

[0279] 在一些实施方案中,原位成像用于鉴定或以其它方式精修合适于用本公开内容的缀合的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对靶标和裂解所测试的可活化抗体的可裂解部分(CM)中的底物的蛋白酶两者测试阳性(例如,在疾病部位上积聚活化抗体)的患者被鉴定为用包含这样的CM的这样的可活化抗体治疗的合适的候选者。同样,使用这些方法,对靶标和裂解所测试的可活化抗体的CM中的底物的蛋白酶任一或两者测试阴性的患者可被鉴定为对于其它形式的疗法的合适的候选者。在一些实施方案中,对于第一可活化抗体测试阴性的这样的患者可用包含不同的CM的其它可活化抗体测试,直到用于治疗的可活化抗体被鉴定(例如,包含CM的可活化抗体,其被患者在疾病部位上裂解)。在一些实施方案

中,然后给予患者治疗有效量的患者对其测试阳性的缀合的可活化抗体。

[0280] 在一些实施方案中,体内成像用于鉴定或以其它方式精修合适于用本公开内容的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对靶标和裂解所测试的可活化抗体的可裂解部分(CM)中的底物的蛋白酶两者测试阳性(例如,在疾病部位上积聚活化抗体)的患者被鉴定为用包含这样的CM的这样的可活化抗体治疗的合适的候选者。同样,测试阴性的患者可鉴定为对其它形式的疗法的合适的候选者。在一些实施方案中,对于第一可活化抗体测试阴性的这样的患者可用包含不同的CM的其它可活化抗体测试,直到用于治疗的可活化抗体被鉴定(例如,包含CM的可活化抗体,其被患者在疾病部位上裂解)。在一些实施方案中,然后给予患者治疗有效量的患者对其测试阳性的缀合的可活化抗体。

[0281] 药物组合物

本发明的缀合的可活化抗体(本文亦称为“活性化合物”)和其衍生物、片段、类似物 and 同系物,可掺入至适合于给药的药物组合物中。这样的组合物通常包含缀合的可活化抗体和药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”意图包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣料、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等,其与药物给予相容。合适的载体描述于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences,其为本领域的标准参考教科书,其通过引用结合到本文中。这样的载体或稀释剂的实例包括但不限于水、盐水、林格溶液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。脂质体和非水溶媒例如固定油亦可使用。这样的介质和试剂对药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,考虑其在组合物中的用途。补充的活性化合物也可掺入至组合物中。

[0282] 本发明的药物组合物经配制以与其预期给予途径相容。给予途径的实例包括胃肠外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部)、经粘膜和直肠给予。用于胃肠外、皮内或皮下施用的溶液或混悬液可包括以下组分:无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂、抗细菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,和用于调节张力的试剂例如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱调节pH,例如盐酸或氢氧化钠。可将胃肠外制剂包封在用玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0283] 合适于注射使用的药物组合物包括无菌水性溶液(在水溶性的情况下)或分散液和用于临时配制无菌注射溶液或分散液的无菌粉剂。对于静脉内给予,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的,和应该是流动的至存在容易可注射性的程度。在制备和贮存的条件下其必须是稳定的,和必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用而防腐。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适的混合物。可保持合适的流动性,例如通过使用包衣料例如卵磷脂,在分散剂的情况下通过保持所需的粒度和通过使用表面活性剂。预防微生物作用可通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现。在许多情况下,合适的是在组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延长吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶产生。

[0284] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物掺入含上文列举的一种成分或成

分的组合(按需要)的合适的溶剂中,接着无菌过滤制备。通常,分散液通过将活性化合物掺入包含基础分散介质和来自上文列举的那些的所需的其它成分的无菌溶媒制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法为自其之前无菌过滤的溶液真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加任何其它所需成分的粉末。

[0285] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可包封在明胶胶囊中或压制成片剂。为口服治疗给予的目的,活性化合物可掺有赋形剂和以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。口服组合物还可使用液体载体制备,用作漱口剂,其中液体载体中的化合物经口施用,并漱口和吐出或咽下。药学上相容的粘合剂和/或辅助材料可作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可包含任何以下成分或具有类似性质的化合物:粘合剂例如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶;赋形剂例如淀粉或乳糖;崩解剂例如藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂例如胶态二氧化硅;甜味剂例如蔗糖或糖精;或矫味剂例如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调料。

[0286] 对于通过吸入给予,化合物以气溶胶喷雾剂的形式从包含合适的抛射剂例如气体例如二氧化碳的加压容器或分配器,或喷雾器递送。

[0287] 系统给予还可通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮给予,适合于待渗透屏障的渗透剂用于制剂中。这样的渗透剂通常是本领域已知的,和对于经粘膜给予,包括例如,去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给予可通过使用经鼻喷雾剂或栓剂实现。对于经皮给予,按本领域通常已知的,将活性化合物配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂或霜剂。

[0288] 化合物还可以用于直肠递送的栓剂(例如,用常规栓剂基料例如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式制备。

[0289] 在一个实施方案中,活性化合物用将保护化合物免于快速从身体清除的载体制备,例如控制释放制剂,包括埋植剂和微囊递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的方法对本领域技术人员而言是显而易见的。所述材料还可市售获自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc.脂质体混悬液(包括靶向感染细胞的脂质体与病毒抗原的单克隆抗体)也可用作药学上可接受的载体。这些可按照本领域技术人员已知的方法,例如按美国专利号4,522,811中所述制备。

[0290] 为易于给予和剂量均匀,特别有利的是以剂量单位形式配制口服或胃肠外组合物。如本文所用的剂量单位形式是指作为单位剂量适合于待治疗的受试者的物理分离单位;各单位包含预定量的活性化合物,其经计算以产生与所需药用载体有关的所需治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格通过和直接依赖于活性化合物的独特性质和待实现的特定治疗效果以及本领域固有的对于配制用于治疗个体的这样的活性化合物的局限性来规定。

[0291] 所述药物组合物以及用于给予的说明书可包括在容器、包或分配器中。

[0292] 本发明将在以下实施例中进一步描述,所述实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

实施例

[0293] 实施例1. 材料和方法

本文提供的实施例使用本文称为可活化抗体3954-1204-C225v5 (本文亦称为3954-1204-C225v5可活化抗体或3954-1204-C225v5)的抗-EGFR可活化抗体,其包括EGFR-结合序列、掩蔽部分(MM)和作为蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)。这些实施例还使用本文称为掩蔽抗体3954-NSUB-C225v5 (本文亦称为3954-NSUB-C225v5掩蔽抗体或3954-NSUB-C225v5)的可活化抗-EGFR抗体构建体,其包括位于MM和EGFR-结合序列之间的非-可裂解部分。应理解,尽管本文提供的实施例使用这些抗-EGFR可活化抗体构建体,但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体,其中可活化抗体中半胱氨酸残基的总数量的仅一部分在缀合之前被还原是合乎需要的。在本文中这被称为“部分还原”。

[0294] 还应理解,本文提供的实施例使用荧光剂Alexa-680 Fluor® (本文亦称为Alexa 680®)作为与可活化抗体缀合的试剂。选择该特定染料是因为其具有类似于已知的细胞毒素剂MMAE的分子量。然而,该荧光剂仅用作实例,和本文使用的组合物和方法可用于任何数量的缀合的试剂,以非限制性实例的方式包括毒素和其它有效负载剂。所述组合物和方法不限于具有任何特定分子量、大小或其它这样的特性的试剂。

[0295] 抗-EGFR可活化抗体构建体:3954-1204-C225v5可活化抗-EGFR抗体构建体包括以下重链和轻链序列:

3954-1204-C225v5可活化抗体重链核苷酸序列:

[C225v5 (SEQ ID NO: 1)]

[caggtgcagctgaaacagagcggccccggcgctggtgcagccgagccagagcctgagcattacctgcaccgtgagcggttttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagccccgggcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttgagcggcggaacaccgattataacaccccgtttaccagccgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaaaatgaacagcctgcaaagccaggataccgcgatttattattgcgcgcgcgcgcgtgacctattatgattatgaatttgctattggggccagggcacccctgggtgaccgtgagcgcggctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgttggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattctgtgacaaaactcacacatgcccacggtgccccagcacctgaactcctggggggacccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgattccccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggctcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccccgggataactgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaactacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaatga] (SEQ ID NO: 1)

3954-1204-C225v5可活化抗体重链氨基酸序列:

[C225v5 (SEQ ID NO: 2)]

[QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*] (SEQ
ID NO: 2)

3954-1204-C225v5可活化抗体轻链核苷酸序列:

[间隔区(SEQ ID NO: 5)][掩蔽(SEQ ID NO: 6)][接头1 (SEQ ID NO: 7)][1204底物
(SEQ ID NO: 8)][接头2 (SEQ ID NO: 9)][C225 (SEQ ID NO: 10)]

[caaggccagctctggccag][tgcattctcacctcgttggtgtcgcggacggcccatacgtcatgtac]
[ggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatccggt][ctgagcgggcgttccgataatcat]
[ggcagtagcggtacc][cagattcttgctgaccagagccccggtgattctgagcgtgagccccggcgaaacgtgtgag
cttttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcatttggtatcagcagcgcaccaacggcagccccgcgc
tgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggtattccgagcgcttttagcggcagcggcagcggcaccgatttt
accctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattgccagcagaacaacaactggccgaccac
ctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgg
aaggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag
cctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagg
gcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag] (SEQ ID NO: 3)

粗体:间隔区

下划线:掩蔽

斜体和下划线:接头1

粗体和下划线:1204底物

粗体、斜体和下划线: 接头2

正常字体:抗-EGFR抗体衍生的序列

3954-1204-C225v5可活化抗体轻链氨基酸序列:

[间隔区(SEQ ID NO: 11)][掩蔽(SEQ ID NO: 12)][接头1 (SEQ ID NO: 13)][1204
底物(SEQ ID NO: 14)][接头2 (SEQ ID NO: 15)][C225 (SEQ ID NO: 16)]

[QQQSGQ][CISPRGCPDGPYVMY][GSSGGSGGSGSG][LSGRSDNH][GSSGT]
[QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN
SVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*] (SEQ ID NO:
4)

粗体:间隔区

下划线:掩蔽

斜体和下划线:接头1

粗体和下划线:1204底物

粗体、斜体和下划线: 接头2

正常字体:抗-EGFR抗体衍生的序列

在一些实施方案中,对于轻链3954-1204-C225v5可活化抗体,间隔区序列可包括N-末端变体,例如选自GQSGQ (SEQ ID NO: 235)、QSGQ (SEQ ID NO: 236)、SGQ (SEQ ID NO: 237)、GQ和Q的间隔区。在这些实施方案中,3954-1204-C225v5可活化抗体的所有其它元件,例如重链序列、轻链序列、3954掩蔽、接头1、1204底物和接头2,都保持与上述SEQ ID NO: 4所示相同。

[0296] 3954-NSUB-C225v5掩蔽的抗-EGFR抗体构建体包括与上文所示的3954-1204-C225v5可活化抗-EGFR抗体相同的重链。3954-NSUB-C225v5掩蔽的抗-EGFR抗体构建体包括以下轻链序列:

3954-NSUB-C225v5掩蔽的抗体轻链核苷酸序列:

[间隔区 (SEQ ID NO: 5)][掩蔽 (SEQ ID NO: 6)][接头1-非可裂解的底物-接头2 (SEQ ID NO: 19)][C225 (SEQ ID NO: 10)]

[caaggccagctctggccag][tgcattctcacctcgttggttggtcggacggcccatagctcatgtac]
[ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggttggtcaggtggaggctcgggcggtgggagcggcggttct]
[cagatcttgcctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagccgggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgcga
gccagagcattggcaccacacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgccgctgctgattaaatatgag
agcgaaagcatttagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacag
cgtggaaagcgaagatatattgctgattattattgccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcacc
aactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctgga
actgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtgataacgcct
ccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctga
cgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtc
acaagagcttcaacaggggagagtggttag] (SEQ ID NO: 17)

粗体:间隔区

下划线:掩蔽

斜体和下划线:接头1-非可裂解的底物-接头2

正常字体:抗-EGFR抗体衍生的序列

3954-NSUB-C225v5掩蔽的抗体轻链氨基酸序列:

[间隔区 (SEQ ID NO: 11)][掩蔽 (SEQ ID NO: 12)][接头1-非可裂解的底物-接头2 (SEQ ID NO: 20)][C225 (SEQ ID NO: 16)]

[QGQSGQ][CISPRGCPDGPYVMY][GSSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS]
[QILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL
SIN
SVESEDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*] (SEQ ID NO:
18)

粗体:间隔区

下划线:掩蔽

斜体和下划线:接头1-非可裂解的底物-接头2

正常字体:抗-EGFR抗体衍生的序列

还原剂:本文提供的研究使用还原剂TCEP (三(2-羧基乙基)膦)。

[0297] 用于抗-EGFR可活化抗体的TCEP部分还原和随后与马来酰亚胺Alexa-680缀合的方案: Bond-Breaker® TCEP溶液(中性pH溶液, Thermo Scientific)以各种摩尔比率的TCEP:在裂解状态下(即活化状态)结合表皮生长因子受体的可活化抗体使用, 和所述抗-EGFR可活化抗体在PBS中配制。例如, 还原剂例如TCEP:待测试的可活化抗体的比率可包括范围为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5的比率。在一些实施方案中, 所述比率范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中, 所述比率范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中, 所述比率范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中, 所述比率范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中, 所述比率范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中, 所述比率范围为约2.5:1至1:1。应理解, 尽管本文提供的实施例使用本文称为3954-1204-C225v5的抗-EGFR可活化抗体, 但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体, 其中可活化抗体中半胱氨酸残基的总数量的仅一部分在缀合之前被还原是合乎需要的。在本文中这被称为“部分还原”。

[0298] 简言之, 将两倍最终浓度的TCEP溶液与3954-1204-C225v5按1:1 (体积:体积)混合, 产生所需的最终TCEP:(3954-1204-C225v5)比率。然后将最终溶液在37℃下孵育指定的一段时间以进行还原反应。在还原反应结束时, 将溶液冷却至室温并将马来酰亚胺Alexa-680 (Invitrogen)加入至溶液中(在还原反应期间, 马来酰亚胺Alexa-680以还原体积的一半和以等于TCEP的摩尔浓度的10倍的浓度使用;例如, 如果原始还原反应包含50微升(u1)的13.2uM 3954-1204-C225v5和50u1的52.8uM TCEP, 则使用50u1 264uM马来酰亚胺Alexa-680)以开始Alexa-680缀合。在避光容器中, 缀合反应在室温下进行2小时。在2小时反应后, 将溶液离心和使用制造商的说明书, 使用PD-10柱(GE Healthcare)或等同柱将缓冲液交换成PBS。最终缀合产物使用UV分光光度计进行分析, 以测定最终蛋白浓度和Alexa-680染料的标记程度。

[0299] 使用LabChip GXII用于分析马来酰亚胺Alexa-680缀合的抗-EGFR可活化抗体的方案: HT Protein Express LabChip (Perkin Elmer)按照制造商的说明书使用Pico Protein Express方案或HT Protein Express方案制备: Pico Protein Express方案用于分析TCEP还原的3954-1204-C225v5的Alexa-680缀合的部分; HT Protein Express方案用于分析TCEP还原的Alexa-680缀合的3954-1204-C225v5中的总蛋白。使用Perkin Elmer的说明书制备TCEP还原的Alexa-680缀合的3954-1204-C225v5用于GXII分析。使用200系列的LabChip GXII分析方案(对于HT方案的高灵敏度和对于Pico方案的Pico)分析样品。使用LabChip GXII软件分析得到的数据。

[0300] 用于EGFR结合ELISA的方案: 在室温下将NUNC Maxisorp平底96孔板用50u1/孔的2ug/ml人EGFR-Fc融合蛋白(R&D系统)在汉克氏平衡盐溶液(HBSS, Teknova)中包被2小时。在2小时包被结束时, 吸出板中的液体内容物和加入250u1/孔的含1% BSA的HBSS和允许在室温下封闭板30分钟。在封闭期结束时, 除去96-孔板的液体内容物, 并将连续稀释的样品(即, 3954-1204-C225v5、Alexa-680缀合的3954-1204-C225v5、uPA-活化的3954-1204-C225v5、uPA-活化的Alexa-680缀合的3954-1204-C225v5和C225 (西妥昔单抗抗体), 以

100ug/ml的浓度开始和通过因数3/稀释步距进行稀释)以50ul/孔加入。将板在室温下孵育1小时。在该小时结束时,板用含0.05%吐温-20的HBSS使用BioTek ELx450 Select CW洗板器洗涤(300ul/孔洗涤体积,6个循环的抽吸和洗涤)。将洗涤的板拍打干燥,和加入50ul/孔的400ng/ml 辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-人IgG Fab'2特异性抗体(Jackson ImmunoResearch)和在室温下孵育30分钟。按前述将板洗涤和加入100ul/孔的1-步TMB底物(Thermo Scientific)。观察颜色变化和通过加入100ul/孔的1M HCl (Fisher Scientific)终止反应。使用BioTek EL800读板器在O.D. 450分析反应的板。使用Excel (Microsoft)计算数据和使用Prism 6 (GraphPad)将结果作图。

[0301] 实施例2. TCEP-介导的可活化抗体的还原

本文提供的组合物和方法确定产生所需部分还原接着缀合的试剂和反应条件的组合。当还原和随后缀合未被正确控制时,可活化抗体将被完全还原,和可活化抗体的掩蔽功效受到损害。例如,当还原剂以20:1 (还原剂:可活化抗体)的比率使用时,可活化抗体被完全还原成游离重链和游离轻链。产生较温和的还原(即,低于完全还原)的尝试,例如通过固定还原剂,过于温和和不足以还原可活化抗体以允许随后缀合。在这些研究中,在所有还原条件下观察到对应于主要完整IgG的条带(高分子量条带> 150 kDa)。

[0302] 进行研究以确定还原剂:可活化抗体的范围。在较低比率下,例如在0.5:1至2:1 (还原剂:可活化抗体)的范围内,获得一定的还原和保持可活化抗体完整性和掩蔽功效。在1.5:1至5:1 (还原剂:可活化抗体)的比率下,还原时间30分钟-2小时,存在增加量的还原可活化抗体种类,对应于一条重链和一条轻链可活化抗体的分子量。部分地还原的可活化抗体保持原始非还原和掩蔽的可活化抗体的EGFR结合特性,表明在这些条件下部分地还原的可活化抗体能够保持原始掩蔽功效。在经确定的还原剂:可活化抗体比率和还原时间下,可产生经链间二硫键还原的可活化抗体以允许随后通过游离半胱氨酸的最大缀合,同时保持原始的非还原可活化抗体的掩蔽功效。

[0303] 在2小时的还原时间下,高于5:1的还原剂:可活化抗体的比率太具还原性,而不能保持测试的可活化抗体的原始的掩蔽功效。掩蔽功效丢失的各种改变和部分地还原的可活化抗体子类的各种量表明,测试的可活化抗体对还原剂-介导的还原例如TCEP-介导的还原具有不同的耐受。抗体、接头、可裂解部分(CM)和掩蔽部分(MM)的改变的组合产生可活化抗体对还原剂-介导的还原例如TCEP-介导的还原的耐受谱。

[0304] 在本文所述的一组研究中,称为3954-1204-C225v5的可活化抗-EGFR抗体以各种比率的TCEP:可活化抗体(例如约1.5:1至约4:1)使用90分钟还原时间被还原。在一些情况下,还原之后为与荧光染料Alexa 680缀合。这些研究的结果(以1.5:1、2:1和4:1的TCEP:可活化抗体比率)显示在图1中。

[0305] 在本文所述的另一组研究中,包括特异性结合EGFR的抗原结合部分、掩蔽部分和非-可裂解的接头(称为3954-NSUB-C225v5)的抗-EGFR抗体构建体以各种比率的TCEP:可活化抗体(例如约1.5:1至约4:1)使用90分钟还原时间被还原。在一些情况下,还原之后是与Alexa 680缀合。这些研究的结果(以1.5:1、2:1和4:1的TCEP:可活化抗体比率)显示在图2中。

[0306] 使用巯基可缀合的Alexa 680作为巯基可缀合的毒素的代替品,这些研究证实,各种程度的Alexa 680缀合依赖于TCEP:可活化抗体比率和还原时间两者。巯基可缀合的

Alexa 680与TCEP-部分地还原的3954-1204-C225v5或3954-NSUB-C225v5的缀合不显著改变3954-1204-C225v5或3954-NSUB-C225v5对EGFR的滴定特征。因此,部分还原和随后Alexa 680的巯基缀合可以保持可活化抗体的掩蔽功效的方式进行。图3-6证实,部分还原和随后Alexa 680 Fluor®的巯基缀合可以还保持3954-1204-C225v5被uPA激活和不导致3954-NSUB-C225v5激活的方式进行。

[0307] 进一步的研究表明,对于3954-1204-C225v5,实现标记程度(Alexa 680 Fluor®:可活化抗体的摩尔比)为3.8,和对于3954-NSUB-C225v5,实现标记程度为3.5。

[0308] 实施例3. 缀合的可活化抗体的质谱分析

通过MALDI质谱(MALDI MS)的分子量测定:在MALDI MS中,将溶解的样品置于金属靶上,和肽和蛋白与光吸收基质共结晶。将激光束指向干燥的基质样品,样品分子解吸附和电离,和在飞行时间(TOF)质量分析仪中测量质量。观察到在质谱中(质量:电荷谱 m/z)蛋白作为单电荷离子(m/z MH⁺)以及多电荷离子。

[0309] 在本分析中,部分地还原和缀合的可活化抗体(完整的和DTT-还原的)使用来自Millipore的C4 ziptips纯化。将各纯化的样品与2,5-二羟基苯乙酮/柠檬酸氢二铵(DHAP/DAHC)基质混合和点到来自Bruker的Big Anchor靶上。在Autoflex Speed MALDI TOF/TOF质谱仪上以线性模式使用Compas 1.4控制和处理软件获得质谱。通过外部二次校准使用Bruker蛋白校准标准1或2校准质谱。在质谱的校准范围内自最小荷电离子计算样品质量。

[0310] 各Alexa-680分子加入大约1000道尔顿(~1 kDa)的质量至可活化抗体。未缀合的3954-1204-C225v5与缀合的3954-1204-C225v5的分子量比较能够评价已缀合到3954-1204-C225v5上的Alexa-680®分子的数量。

[0311] MALDI-MW数据表明,至多四个1-kDa分子连接至可活化抗-EGFR抗体3954-1204-C225v5。从还原的样品确定,该修饰最可能是异质的,因为观察到轻链具有0和1个修饰,和观察到重链具有0、1或2个修饰。

[0312] 从消化的样品的MALDI-MS数据确定,包含半胱氨酸残基的所有肽仍在缀合的样品中观察到(Cyt04-680高)。MALDI-MW数据还证实,抗体未被Alexa-680®完全标记。

[0313] 实施例4. 材料和方法

本文提供的实施例使用本文称为可活化抗体5342-1204-4D11(本文亦称为5342-1204-4D11可活化抗体或5342-1204-4D11)的抗-Jagged可活化抗体,其包括Jagged-结合序列、掩蔽部分(MM)和作为蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)。应理解,尽管本文提供的实施例使用这些抗-Jagged可活化抗体构建体,但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体,其中合乎需要的是在可活化抗体中半胱氨酸残基的总数量的仅一部分在缀合之前被还原。在本文中这被称为“部分还原”。

[0314] 还应理解,本文提供的实施例使用荧光剂Alexa-680 Fluor®(本文亦称为Alexa 680®)作为与可活化抗体缀合的试剂。选择该特定染料是因为它具有类似于已知的细胞毒素剂MMAE的分子量。然而,该荧光剂仅用作实例,和本文使用的组合物和方法可用于任何数量的缀合剂,以非限制性实例的方式包括毒素和其它有效负载剂。组合物和方法不限于具有任何特定分子量、大小或其它这样的性质的试剂。

[0315] 抗-Jagged可活化抗体构建体:5342-1204-4D11可活化抗-Jagged抗体构建体包括以下重链和轻链序列:

5342-1204-4D11可活化抗体重链核苷酸序列:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGT
ATTGACCCGGAAGGTCGGCAGACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA
GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCG
GCAGGTCGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC
GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGGACACCCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 231)

5342-1204-4D11可活化抗体重链氨基酸序列:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 245)

5342-1204-4D11可活化抗体轻链核苷酸序列:

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCAATATTTGGCTCGTAGGTGGTGATTGCAGGGGCTGGCAGGGGGGCTCGAGCG
GTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCGATAATCATGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAG
TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTA
TTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG
TCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT
GCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTAC
GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT (SEQ ID NO: 233)

5342-1204-4D11可活化抗体轻链氨基酸序列:

QGQSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSI
SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 234)

在一些实施方案中,对于轻链5342-1204-4D11可活化抗体的间隔区序列可包括N-末端变体,例如选自QGQSG (SEQ ID NO: 235)、QSGQ (SEQ ID NO: 236)、SGQ (SEQ ID NO: 237)、GQ和Q的间隔区。在这些实施方案中,5342-1204-4D11可活化抗体的所有其它元件,例如重链序列、轻链序列、5342掩蔽、接头1、1204底物和接头2,都保持与上文SEQ ID NO: 234中所示相同。

[0316] 还原剂:本文提供的研究使用还原剂TCEP (三(2-羧基乙基)膦)。

[0317] 用于抗-Jagged可活化抗体的TCEP部分还原和随后与马来酰亚胺Alexa-680缀合的方案:Bond-Breaker® TCEP溶液(中性pH溶液, Thermo Scientific)以各种摩尔比率的TCEP:在裂解状态(即活化状态)下结合表皮生长因子受体的可活化抗体使用,和抗-Jagged可活化抗体在PBS中配制。例如,还原剂例如TCEP:所测试的可活化抗体的比率可包括范围为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5的比率。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,所述比率范围为约2.5:1至1:1。应理解,尽管本文提供的实施例使用本文称为5342-1204-4D11的抗-Jagged可活化抗体,但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体,其中合乎需要的是在可活化抗体中半胱氨酸残基的总数的仅一部分在缀合之前被还原。在本文中这被称为“部分还原”。

[0318] 简言之,将两倍最终浓度的TCEP溶液与5342-1204-4D11按1:1 (体积:体积)混合,产生所需的最终TCEP:(5342-1204-4D11)比率。然后将最终溶液在37℃下孵育指定的一段时间以进行还原反应。在还原反应结束时,将溶液冷却至室温和将马来酰亚胺Alexa-680 (Invitrogen)加入至溶液中(在还原反应期间,马来酰亚胺Alexa-680以还原体积的一半和以等于TCEP的摩尔浓度的10倍的浓度使用;例如,如果原始还原反应包含50微升(u1)的13.2uM 5342-1204-4D11和50u1的52.8uM TCEP,则使用50u1 264uM马来酰亚胺Alexa-680)以开始Alexa-680缀合。在避光容器中,缀合反应在室温下进行2小时。在2小时反应后,将溶液离心和使用制造商的说明书,使用PD-10柱(GE Healthcare)或等同柱将缓冲液交换成PBS。最终缀合产物使用UV分光光度计进行分析,以测定最终蛋白浓度和Alexa-680染料的标记程度。

[0319] 使用LabChip GXII用于分析马来酰亚胺Alexa-680缀合的抗-Jagged可活化抗体的方案:HT Protein Express LabChip (Perkin Elmer)按照制造商的说明书使用Pico Protein Express方案或HT Protein Express方案制备:Pico Protein Express方案用于

分析TCEP还原的5342-1204-4D11的Alexa-680缀合的部分;HT Protein Express方案用于分析TCEP还原的Alexa-680缀合的5342-1204-4D11中的总蛋白。使用Perkin Elmer的说明书制备TCEP还原的Alexa-680缀合的5342-1204-4D11用于GXII分析。使用200系列的LabChip GXII分析方案(对于HT方案的高灵敏度和对于Pico方案的Pico)分析样品。使用LabChip GXII软件分析得到的数据。

[0320] 用于Jagged结合ELISA的方案:在室温下将NUNC Maxisorp平底96孔板用50ul/孔的2ug/ml人Jagged-Fc融合蛋白(R&D Systems)在汉克氏平衡盐溶液(HBSS, Teknova)中包被2小时。在2小时包被结束时,吸出板中的液体内容物和加入250ul/孔的含1% BSA的HBSS和允许在室温下封闭板30分钟。在封闭期结束时,除去96-孔板的液体内容物,并将连续稀释的样品(即,5342-1204-4D11、Alexa-680缀合的5342-1204-4D11、uPA-活化的5342-1204-4D11、uPA-活化的Alexa-680缀合的5342-1204-4D11和4D11 (抗-Jagged抗体),以100ug/ml的浓度开始和通过因数3/稀释步距进行稀释)以50ul/孔加入。将板在室温下孵育1小时。在该小时结束时,板用含0.05%吐温-20的HBSS使用BioTek ELx450 Select CW洗板器洗涤(300ul/孔洗涤体积,6个循环的抽吸和洗涤)。将洗涤的板拍打干燥,和加入50ul/孔的400ng/ml 辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-人IgG Fab'₂特异性抗体(Jackson ImmunoResearch)和在室温下孵育30分钟。按前述将板洗涤和加入100ul/孔的1-步TMB底物(Thermo Scientific)。观察颜色变化和通过加入100ul/孔的1M HCl (Fisher Scientific)终止反应。使用BioTek EL800读板器在O.D. 450分析反应的板。使用Excel (Microsoft)计算数据和使用Prism 6 (GraphPad)将结果作图。

[0321] 实施例5. TCEP-介导的可活化抗体的还原

本文提供的组合物和方法确定产生所需的部分还原接着缀合的试剂和反应条件的组合。当还原和随后缀合未正确控制时,可活化抗体将被完全还原,和可活化抗体的掩蔽功效受到损害。

[0322] 进行研究以确定还原剂:可活化抗体的范围。在较低的比率下,例如,在0.5:1至2:1 (还原剂:可活化抗体)的范围中,实现一定的还原,和保持可活化抗体完整性和掩蔽功效。在1.5:1至5:1 (还原剂:可活化抗体)的比率下,还原时间30分钟-2小时,存在增加量的还原的可活化抗体种类,其对应于一条重链和一条轻链可活化抗体的分子量。部分地还原的可活化抗体保持原始非还原和掩蔽的可活化抗体的Jagged结合特性,表明在这些条件下部分地还原的可活化抗体能够保持原始的掩蔽功效。以确定的还原剂:可活化抗体比率和还原时间,可产生经链间二硫键还原的可活化抗体,以允许随后通过游离半胱氨酸的最大缀合,同时保持原始的非还原可活化抗体的掩蔽功效。

[0323] 在本文所述的一组研究中,称为5342-1204-4D11的可活化抗-Jagged抗体以等于4:1的TCEP:可活化抗体比率使用120分钟还原时间被还原。在一些情况下,还原之后是与荧光染料Alexa 680缀合。这些研究的结果(以TCEP:可活化抗体比率4:1)显示在图7中。

[0324] 使用巯基可缀合的Alexa 680作为巯基可缀合的毒素的代替品,这些研究证实,各种程度的Alexa 680缀合依赖于TCEP:可活化抗体比率和还原时间两者。巯基可缀合的Alexa 680与TCEP-部分地还原的5342-1204-4D11的缀合不显著改变5342-1204-4D11对Jagged的滴定特征。因此,部分还原和随后Alexa 680的巯基缀合可以保持可活化抗体的掩蔽功效的方式进行。图8证实,部分还原和随后Alexa 680 Fluor®的巯基缀合可以还保持

5342-1204-4D11被uPA激活的方式进行。

[0325] 实施例6. 材料和方法

抗体和可活化抗体：本文提供的实施例使用本文描述的本文称为可活化抗体5342-1204-4D11的抗-Jagged可活化抗体。应理解，尽管本文提供的实施例使用这些抗-Jagged可活化抗体构建体，但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体，其中合乎需要的是在可活化抗体中的半胱氨酸残基的总数量的仅一部分在缀合之前被还原。在本文中这被称为“部分还原”。

[0326] 本文提供的实施例还使用本文称为抗-Jagged抗体4D11（亦称为抗体4D11和4D11抗体）的抗-Jagged抗体。抗体4D11包括以下重链和轻链序列：

4D11抗体重链核苷酸序列：

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGTATTGACCCGGAAGGTCGGCAGACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCG GCAGGTGGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTACAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTC CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA (SEQ ID NO: 231)

4D11抗体重链氨基酸序列：

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 245)

4D11抗体轻链核苷酸序列：

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCG

GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCGGCCAAGGGA
CCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 233的核苷酸133-774)

4D11抗体轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
244)

本文使用的其它抗体包括Synagis® (帕利珠单抗)和利妥昔单抗,这两者购自Drgu Products Service Labs (UCSF)和用作人IgG1同种型对照。

[0327] SDS凝胶:将5-10微克(ug)样品稀释于7.5微升(ul)水(终体积)中。加入2.5 ul的4x上样缓冲液(Invitrogen),含或不含1 ul的10x还原剂(Invitrogen),并将样品在加热块上在约90℃加热约10分钟。将样品负载至10% Bis-Tris (Novex)凝胶上和在MOPS缓冲液中以200 mV运行约40分钟。凝胶在Instant Blue (Expedion)中染色约1小时,接着用多次水洗脱染色。在Imagequant上捕获凝胶图像。

[0328] 细胞系:将BxPC3细胞(ATCC CRL 1687)维持在CM中(RPMI 1640,补充有10%热灭活的胎牛血清(FBS)。在FACS结合之前,使用细胞离解缓冲液(Sigma #C5914)离解粘附细胞。

[0329] 用于 FACS细胞结合的方案:抗体、可活化抗体或它们的免疫缀合物衍生物在BxPC3细胞上的结合通过间接免疫荧光测定法评价。将离解的细胞(50,000-100,000/孔)沉淀在96-孔v-底板中和在4℃用连续稀释的测试物在50-100 ul的FACS缓冲液(FB; 补充有2% FBS的HBSS)孵育45分钟。对照孔包括人IgG1同种型对照(Synagis或利妥昔单抗)和不含IgG的孔。将细胞在冷的FB中洗涤两次和在4℃下用Alexa 647缀合的山羊抗-人IgG (AF-647缀合的亲纯F(ab')₂片段山羊抗人IgG Fc gamma (γ)片段特异的, Jackson labs, #1909-606-170)染色30分钟。将细胞按前述洗涤,在1%多聚甲醛/FB中固定和使用FACS Aria流式细胞仪(BD Biosciences)进行分析。FCS文件在FCS Express (DeNovo)中进行分析,和针对剂量滴定的平均荧光强度(MFI)在GraphPad PRISM中作图。

[0330] 用于体外细胞毒性测定的方案:将细胞(4,000/孔)在50 ul CM中接种于白色壁的96-孔板中。细胞用等体积的连续稀释的测试物处理3-5天。按照制造商的说明书,向各孔加入等体积(100 ul)的Cell Titer Glo试剂(Promega),和在Tecan Infinite M200 Pro上测量相对发光单位(RLU)。将针对剂量滴定的RLU作图和在GraphPad PRISM中产生曲线拟合。

[0331] 实施例7. 通过TCEP-介导的部分还原和缀合产生可活化抗体缀合物

本实施例描述使用本发明的部分还原和缀合方法以产生本发明的抗体缀合物和可活化抗体缀合物。应理解,尽管本文提供的实施例使用抗-Jagged可活化抗体构建体,但这些方法可适用于具有两个或更多个半胱氨酸残基的任何可活化抗体,其中合乎需要的是,在可活化抗体中的半胱氨酸残基的总数量的仅一部分在缀合之前被还原。在本文中这被称为

“部分还原”。此外,这些方法可适用于任何可裂解的或非-可裂解的接头和试剂组合。

[0332] 本实施例提供显示本文称为“vc-MMAD”的马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基-单甲基阿里他汀D接头有效负载或本文称为“vc-MMAE”的马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基-单甲基阿里他汀E接头有效负载的缀合物。

[0333] 包含马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸单甲基阿里他汀D接头有效负载(vc-MMAD)或马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸单甲基阿里他汀E接头有效负载(vc-MMAE)的抗-Jagged可活化抗体5342-1204-4D11的缀合物,在本文中分别称为可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD和可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE,按下制备。

[0334] 在Bayside Chemicals (Burlingame, CA)中制备vc-MMAD和vc-MMAE试剂。N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、三(2-羧基乙基)膦(TCEP; cat #646547)和1N NaOH购自Sigma。在进行缀合之前,制备以下储液:含5.0 mg/mL抗体或可活化抗体的PBS(总磷酸盐= 4.25 mM)、含5.0 mg/mL vc-MMAD或vc-MMAE的DMA、含1.0 mM TCEP的水和含10 mM NaOH的水。以TCEP:抗体或可活化抗体为1:1至8:1比率的范围,通常以2.5:1等摩尔比率,使用TCEP。

[0335] 如下进行典型的部分还原和缀合,其中当量(eq)相对于抗体或可活化抗体报告。在管中向200 μ L含抗体或可活化抗体的PBS中加入2.5 eq TCEP。将管关闭和涡旋,以产生均质溶液,使其在室温下静置90分钟。将管打开,和加入13 eq NaOH和6.0 eq vc-MMAD或vc-MMAE。将管关闭和涡旋,以产生均质溶液,使其在室温下静置120分钟。将管打开,和将反应混合物通过Zeba脱盐柱(Thermo Scientific)。滤出液中的蛋白浓度通过UV分光光度法进行分析,和通过SDS凝胶和HIC-HPLC分析产物,然后测试细胞结合和细胞杀伤活性。对于细胞结合和细胞杀伤测定,通过在重组人uPA蛋白酶的10%溶液(R和D系统MN-207-16)中在37°C下孵育0.5-mg的可活化抗体缀合物样品16小时活化可活化抗体缀合物。通过使样品运行通过预洗涤的MabSelect (GE Healthcare)柱和用0.1M甘氨酸洗脱,接着使用Tris-HCl中和,从由此活化的可活化抗体缀合物中除去蛋白酶。在其它缀合中,TCEP eq从1.0至8.0改变,和/或NaOH eq从0至13改变,和/或加入TCEP或加入NaOH和vc-MMAD或vc-MMAE后的反应时间从60分钟至16小时改变。

[0336] 实施例8. 使用包含微管抑制剂单甲基阿里他汀D (MMAD)的可活化抗体缀合物

本实施例证实,包含微管抑制剂MMAD的可活化抗体缀合物显示有效的体外杀伤活性。本实施例还证实,加入接头有效负载至可活化抗体不干扰掩蔽部分阻断包含这样的掩蔽部分的可活化抗体与其靶标结合的能力。

[0337] 图9A证实,抗-Jagged可活化抗体5342-1204-4D11或抗-Jagged抗体4D11的部分还原和随后与vc-MMAD接头有效负载的巯基缀合不影响生成的缀合物与BxPC3细胞的结合行为:与抗体缀合物4D11-vc-MMAD (0.7 nM)相比,可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD (27 nM)的结合IC₅₀存在38倍降低。在用uPA激活时,激活的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD的结合与抗体缀合物4D11-vc-MMAD相当。该图还证实,Synagis (人类IgG1同种型对照)不与BxPC3细胞结合。

[0338] 在还原条件下通过SDS分析,通过HC和LC的MW的改变增加,观察到可活化抗体5342-1204-4D11和抗体4D11的缀合。HIC-HPLC分析证实毒素-缀合的物质的40-75%收率。

[0339] 图9B证实,可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD (在用uPA激活时)和抗体缀合物4D11-vc-MMAD的有效杀伤活性。与抗体缀合物4D11-vc-MMAD (IC₅₀ = 0.4 nM)相

比,未活化的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAD以17倍降低的效力($IC_{50} = 7$ nM)杀死BxPC3细胞。还显示了与vc-MMAD接头缀合的利妥昔单抗抗体(不相关的IgG1同种型抗体)的细胞杀伤活性的缺乏。单独的抗体4D11 (即,未缀合的)不显示对BxPC3的任何细胞毒性活性。

[0340] 实施例9. 使用包含微管抑制剂单甲基阿里他汀E (MMAE)的可活化抗体缀合物

本实施例证实,包含微管抑制剂MMAE的可活化抗体缀合物显示有效的体外杀伤活性。本实施例还证实,加入接头有效负载至可活化抗体不干扰掩蔽部分阻断包含这样的掩蔽部分的可活化抗体与其靶标结合的能力。

[0341] 图10A证实,抗-Jagged可活化抗体5342-1204-4D11或抗-Jagged抗体4D11的部分还原和随后与vc-MMAE接头有效负载的巯基缀合不影响生成的缀合物对BxPC3细胞的结合行为:与抗体缀合物4D11-vc-MMAE (0.9 nM)相比,可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE的结合 IC_{50} (约30 nM) (其类似于未-缀合的可活化抗体5342-1404-4D11的结合活性)存在33倍降低。在用uPA激活时,活化的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE的结合与抗体缀合物4D11-vc-MMAE相当。该图还证实,与vc-MMAE缀合的Synagis不与BxPC3细胞结合。

[0342] 图10B证实可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE (在用uPA激活时)和抗体缀合物4D11-vc-MMAE的有效杀伤活性。与抗体缀合物4D11-vc-MMAE ($IC_{50} = 0.4$ nM)相比,未活化的可活化抗体缀合物5342-1204-4D11-vc-MMAE以12倍降低的效力($IC_{50} = 5$ nM)杀死BxPC3细胞。还显示了与vc-MMAE接头缀合的Synagis的细胞杀伤活性的缺乏。

[0343] 其它实施方案

尽管本发明已经结合其详细描述进行了描述,但前面的描述意欲说明而非限制由随附权利要求书的范围限定的本发明的范围。其它方面、优点和改变在以下权利要求书的范围内。

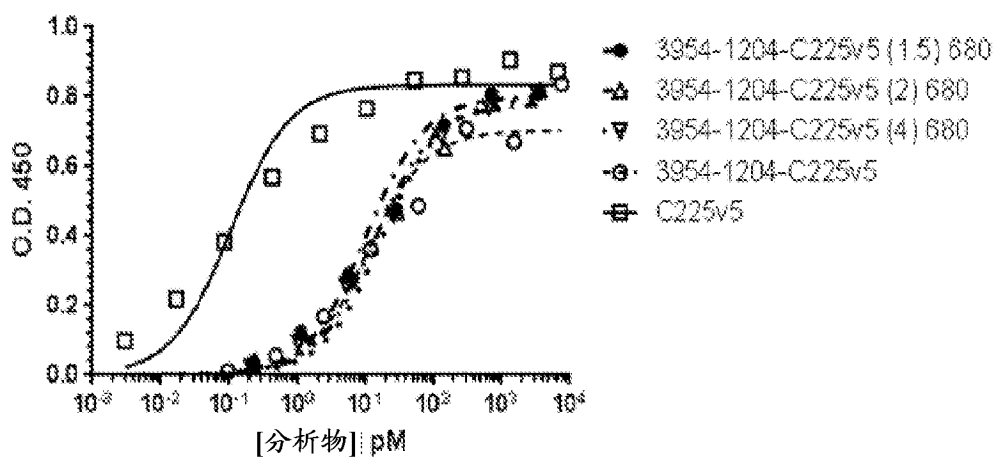


图 1

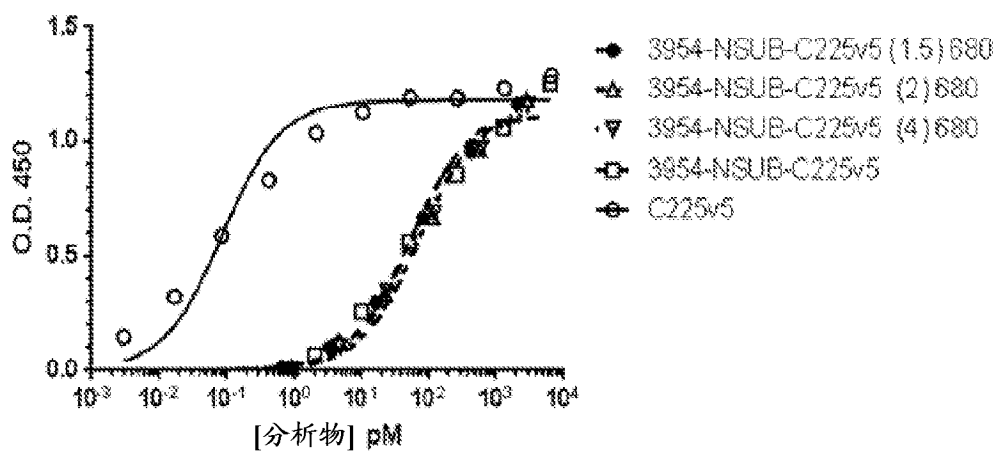


图 2

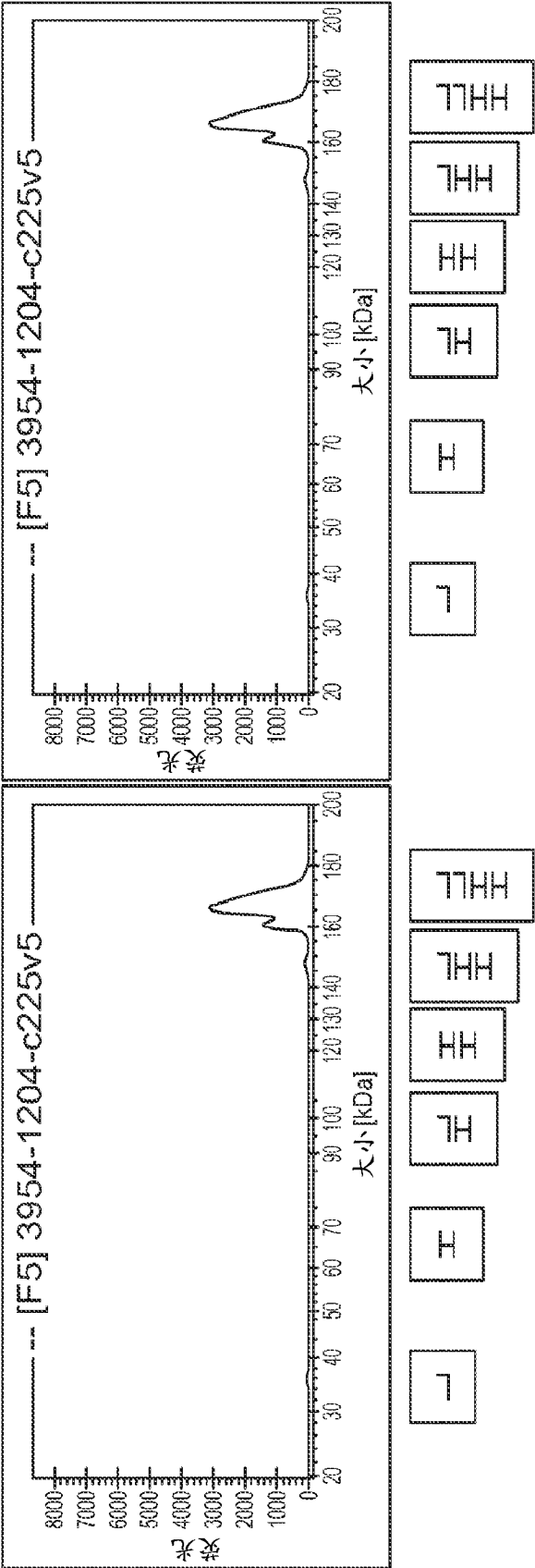


图 3A

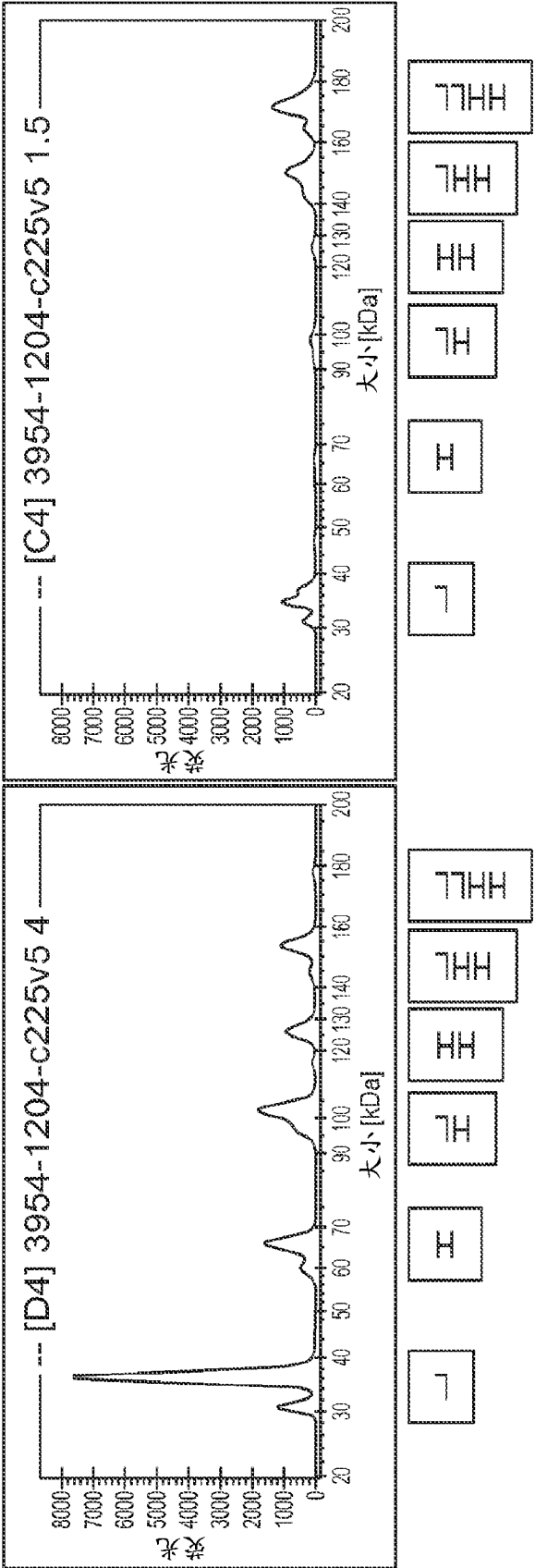


图 3A(续)

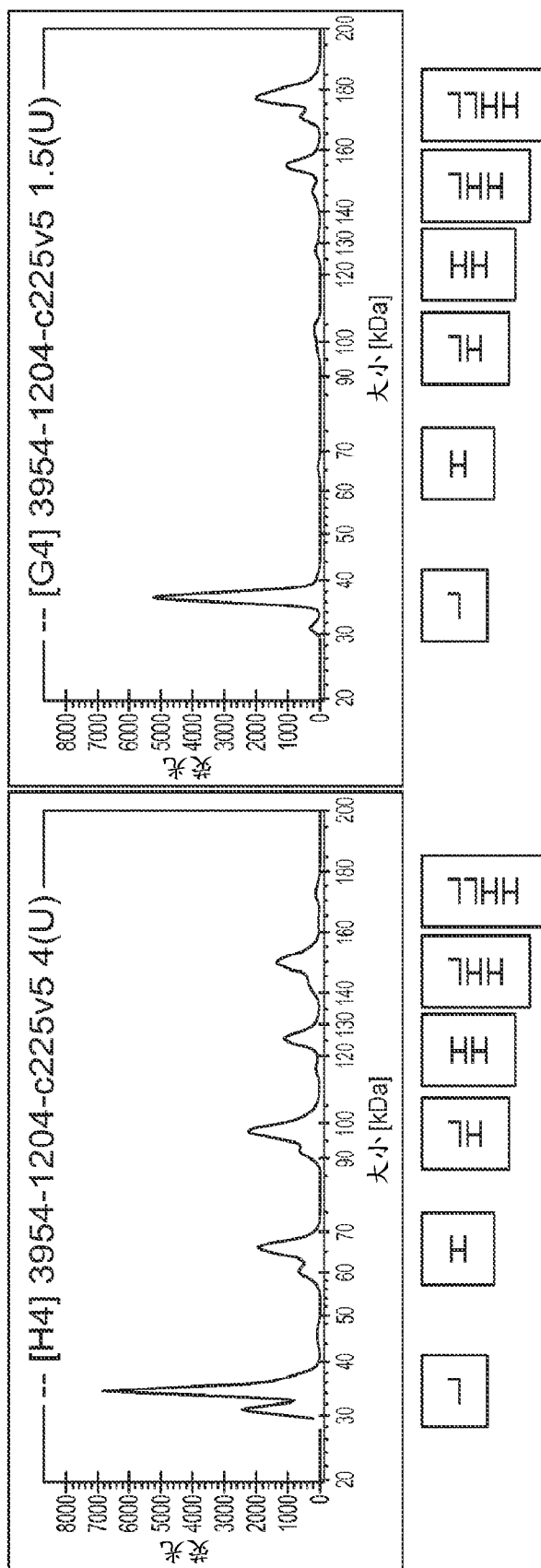


图 3A(续)

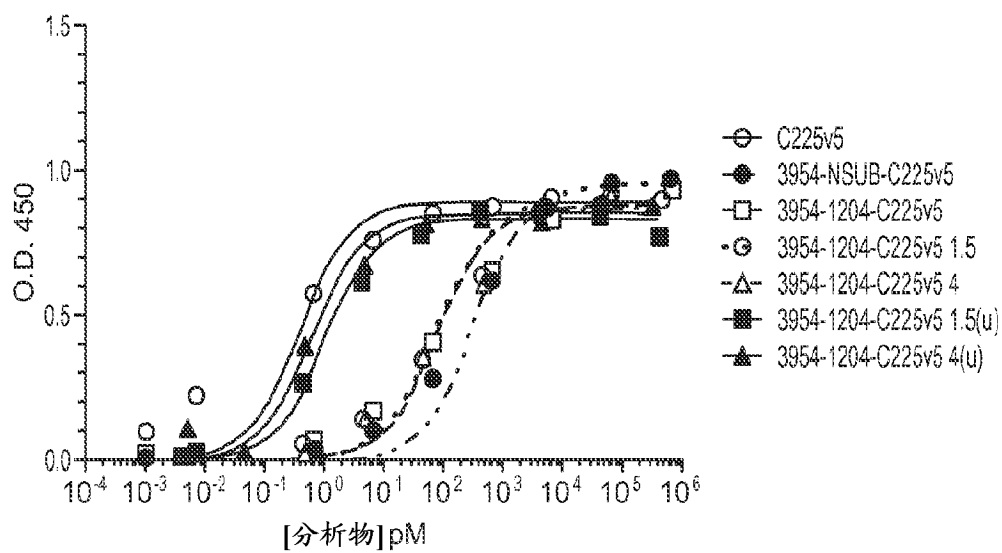


图 3B

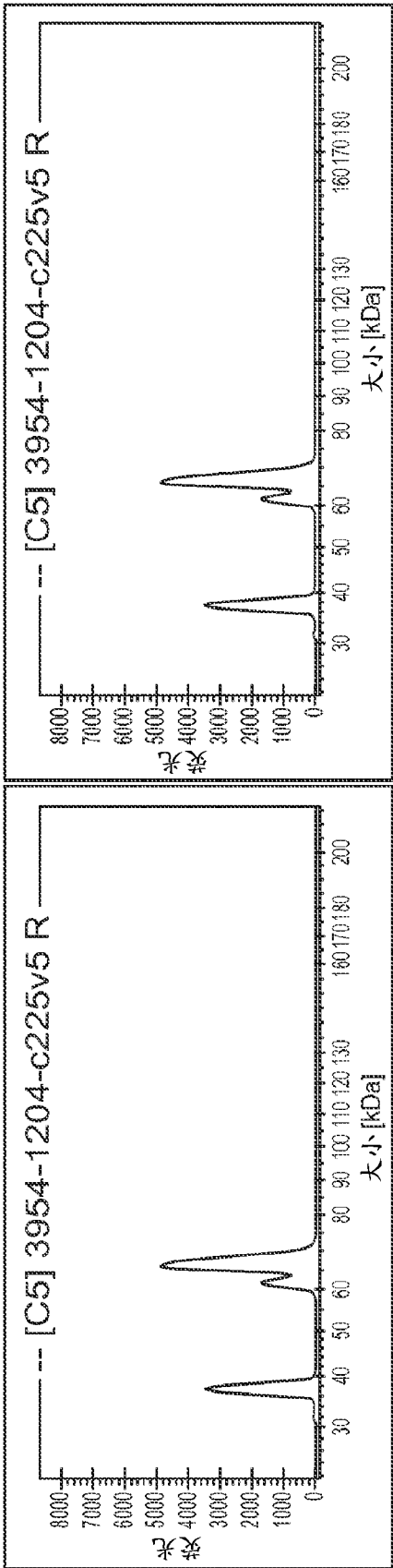


图 4A

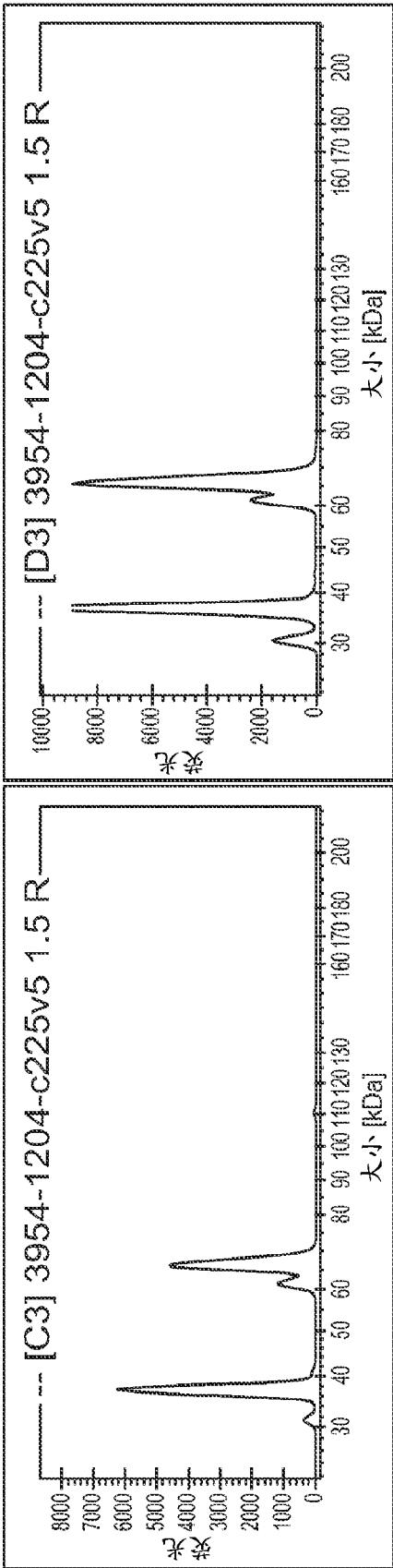


图 4A(续)

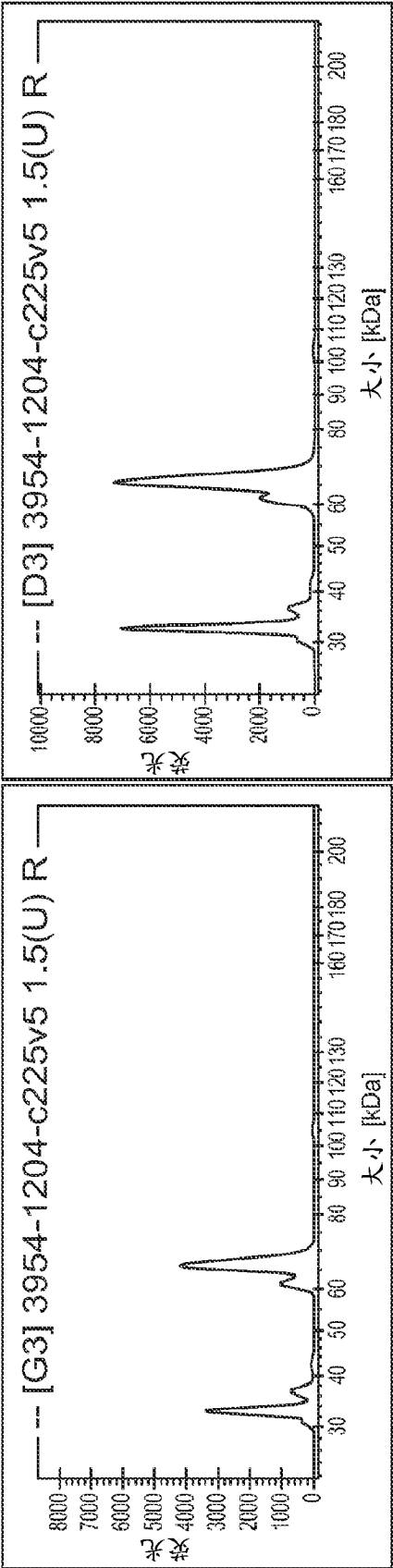


图 4A(续)

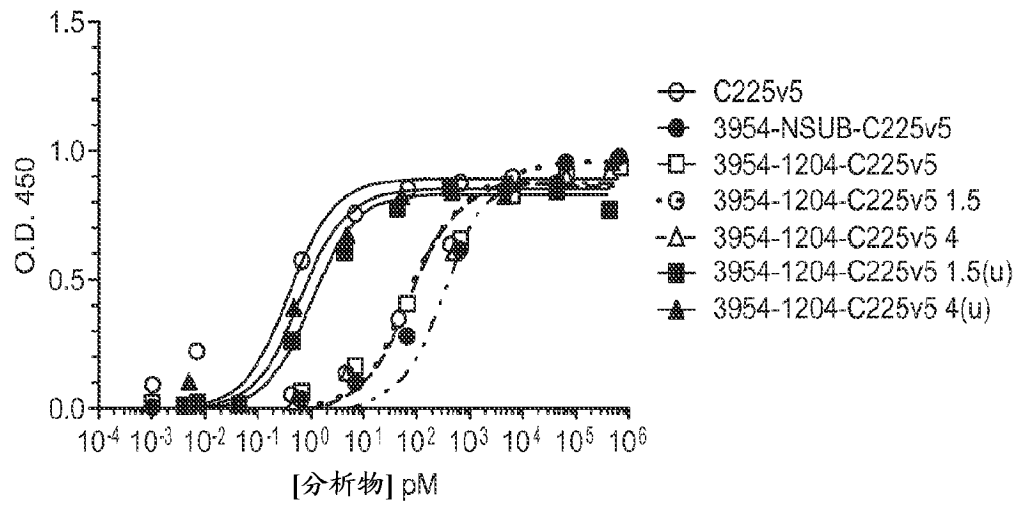


图 4B

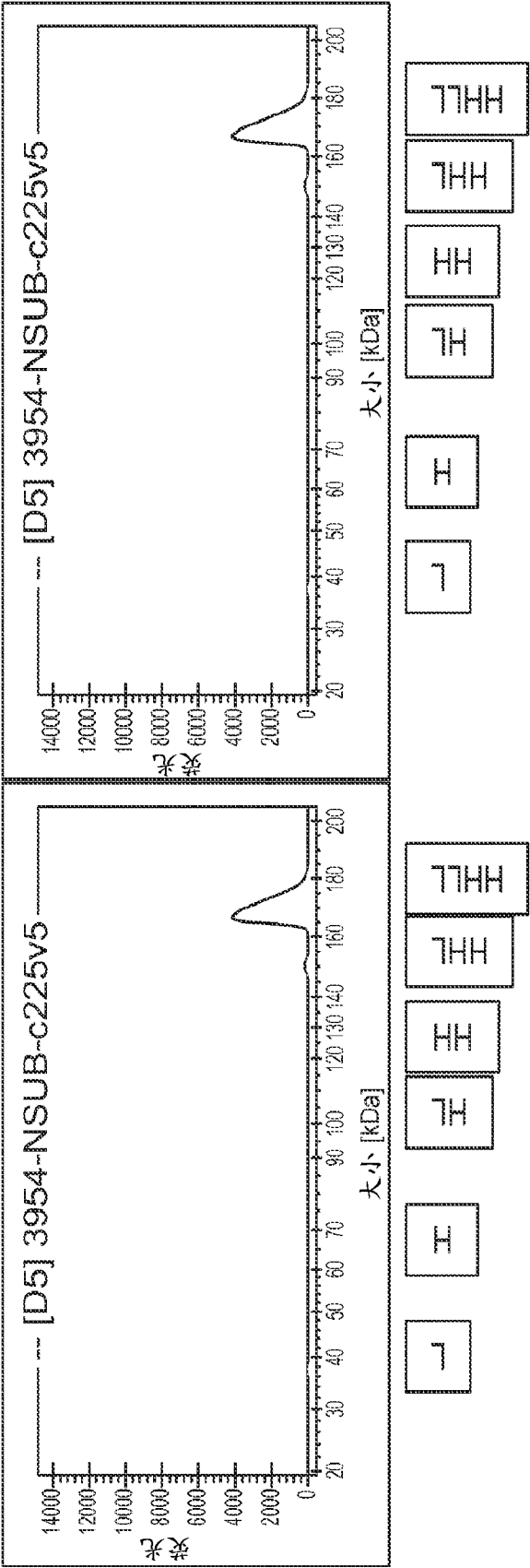


图 5A

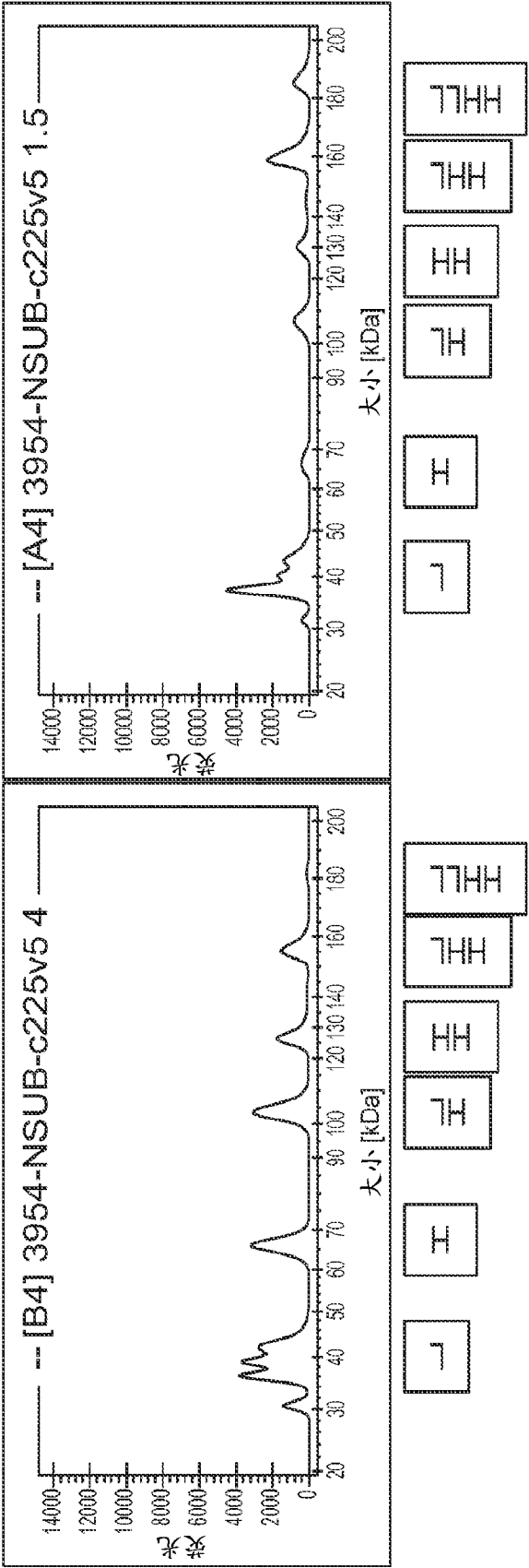


图 5A(续)

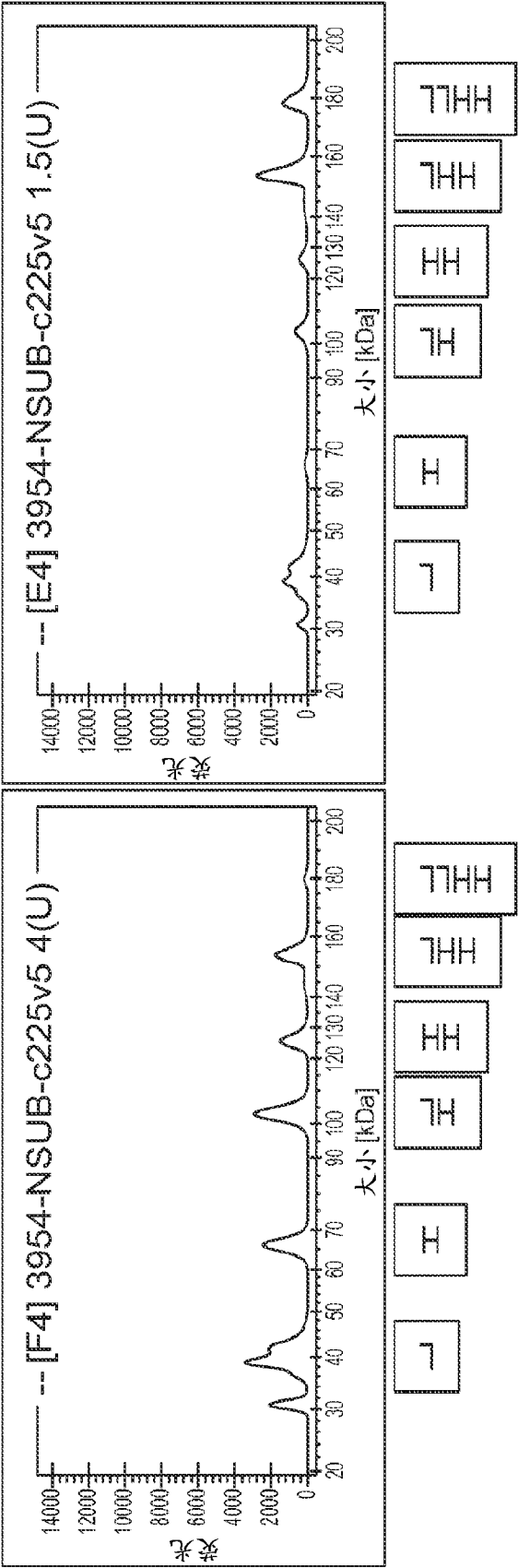


图 5A(续)

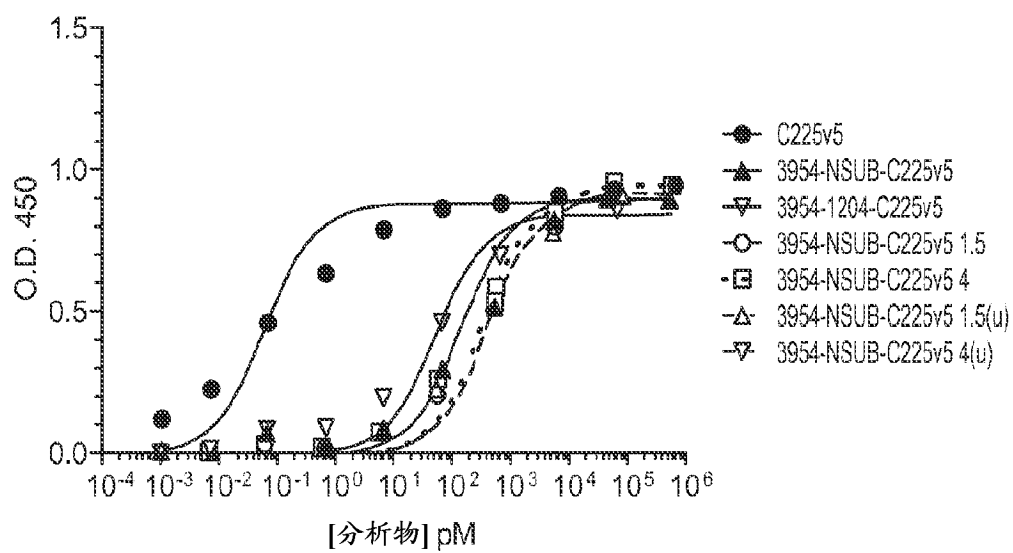


图 5B

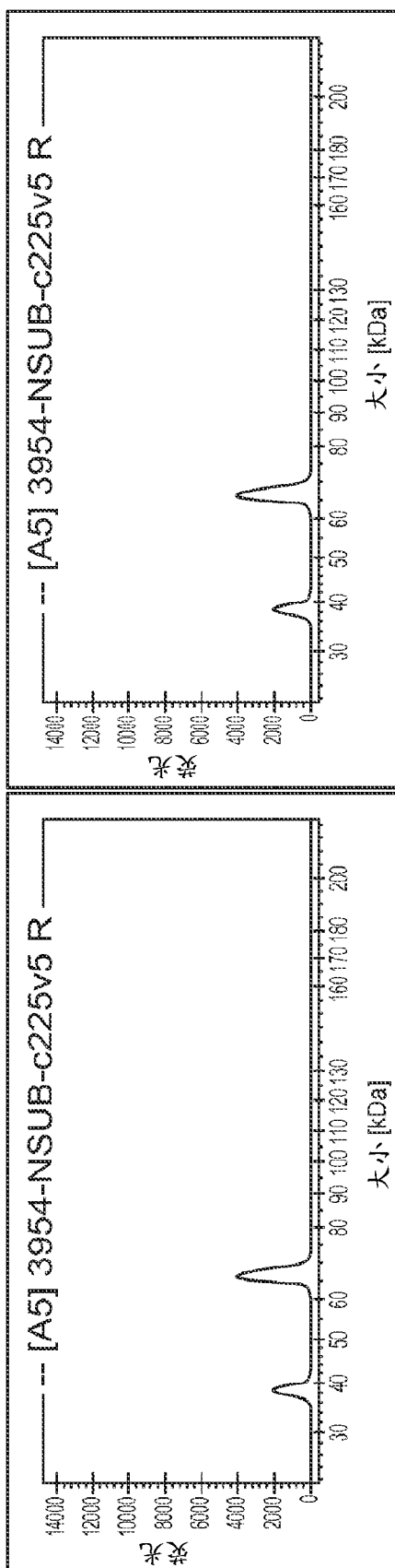


图 6A

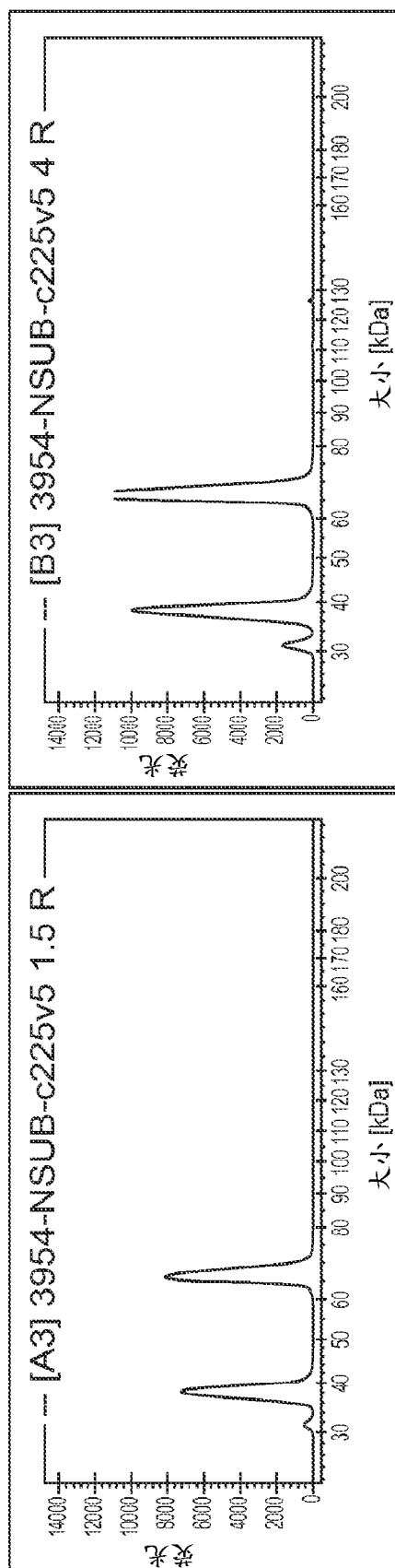


图 6A(续)

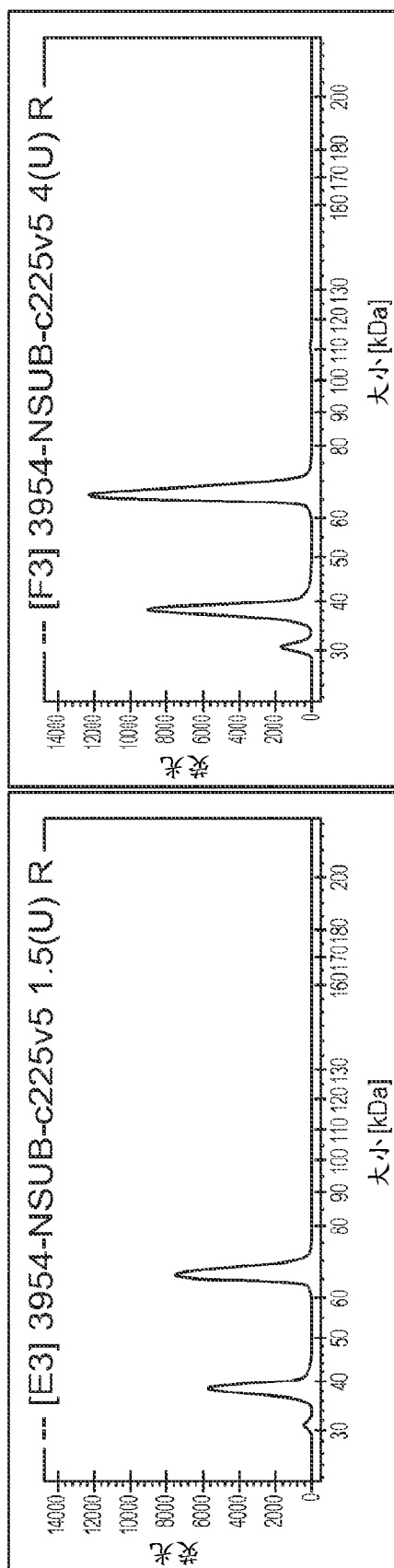


图 6A(续)

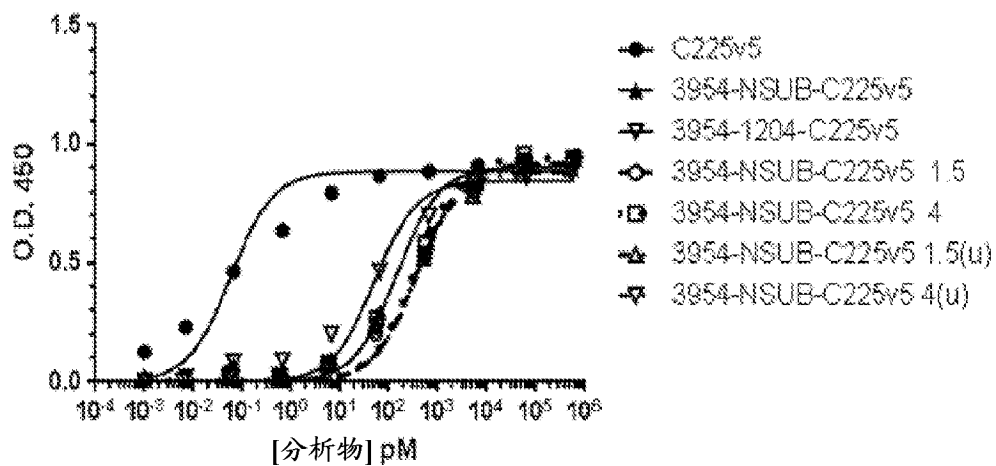


图 6B

	4D11		5342-1204-4D11	
uPA	-	+	-	+
Alexa680	+	+	+	+

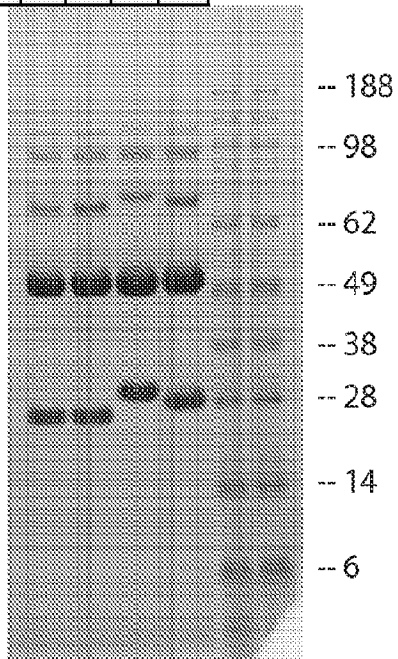


图 7

TCEP 部分还原
 试剂: TCEP 比率=1:4
 Alexa 680 巯基缀合的
 uPA 活化对比未活化的

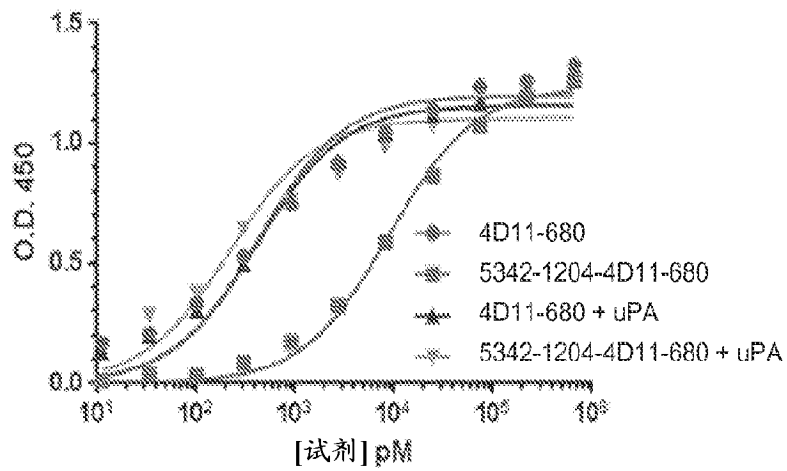


图 8

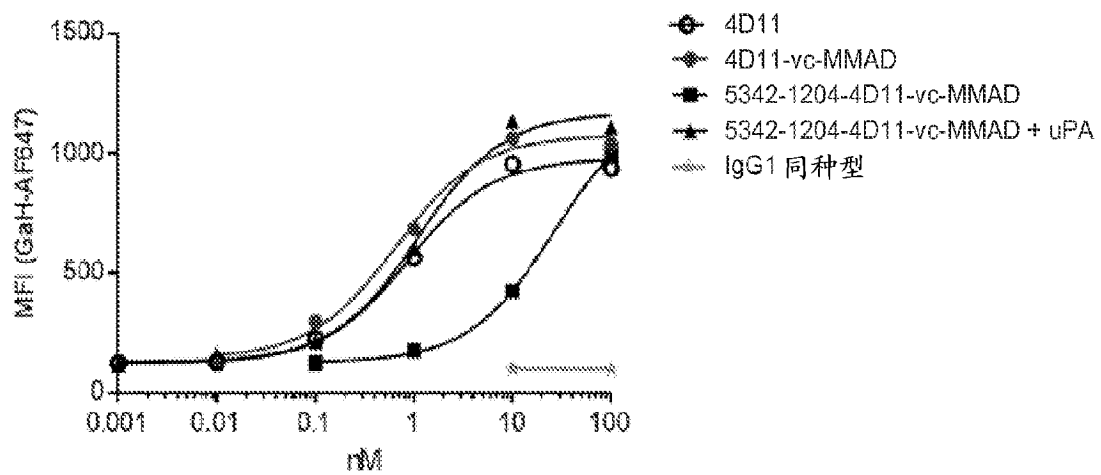


图 9A

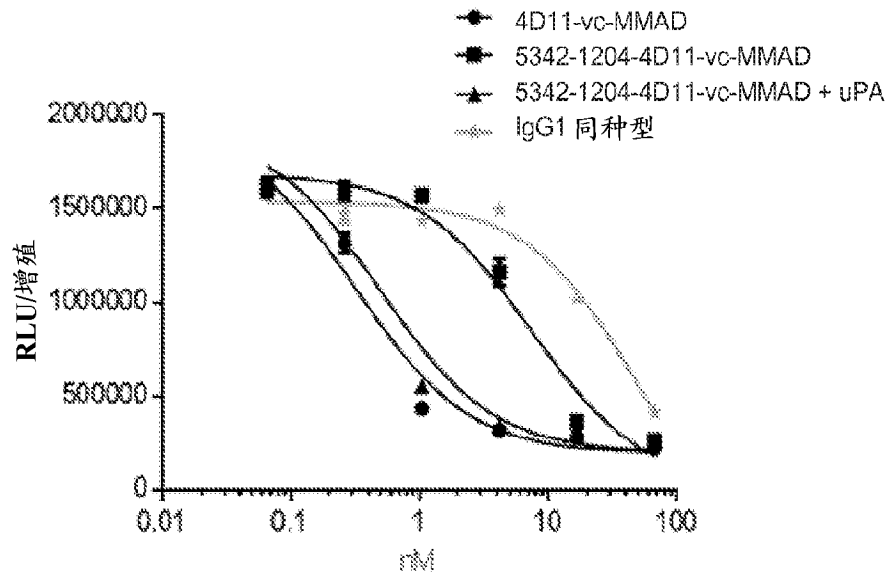


图 9B

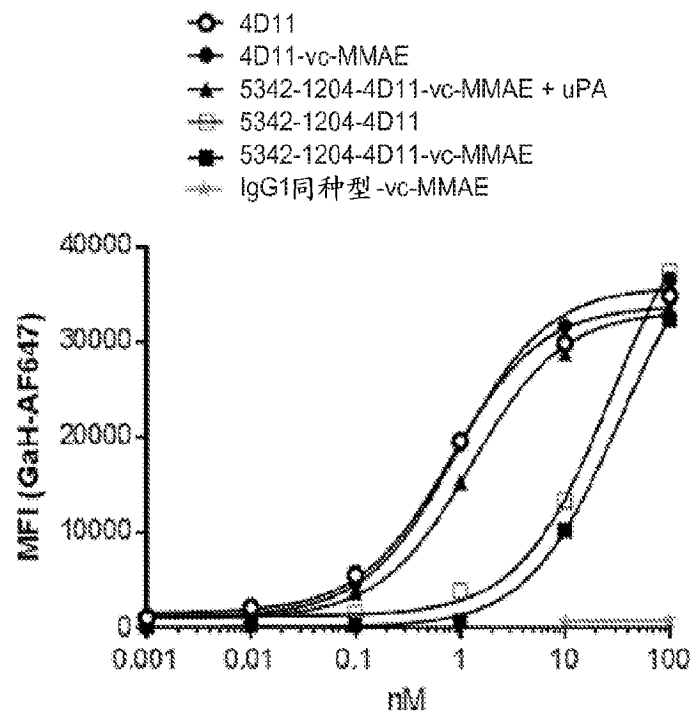


图 10A

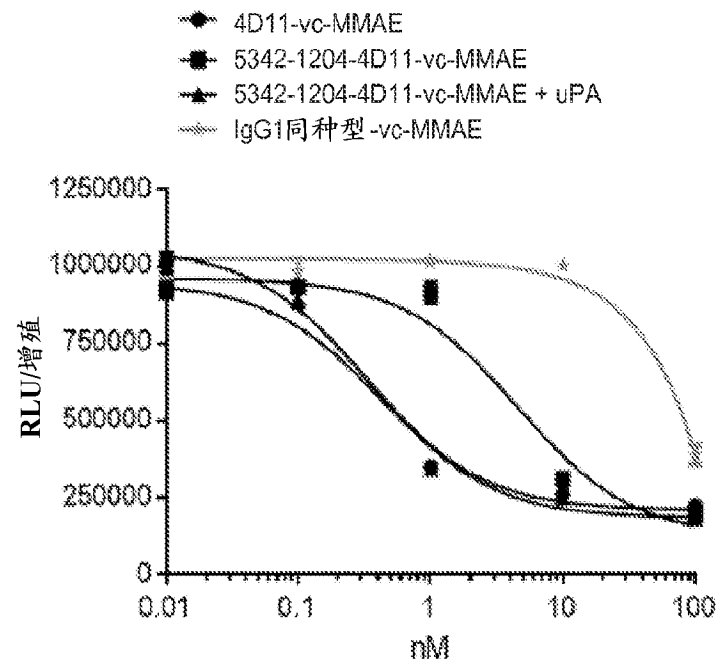


图 10B