

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118165076 A

(43) 申请公布日 2024.06.11

(21) 申请号 202410265535.5

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2014.09.25

C07K 7/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

61/882377 2013.09.25 US

C07K 16/44 (2006.01)

61/971332 2014.03.27 US

C07K 19/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201480064185.0 2014.09.25

(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 S.J.摩尔 M.T.L.阮

D.R.霍斯特特 O.瓦西尔杰瓦

J.G.弗兰德斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 彭昶

权利要求书2页 说明书135页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

基质金属蛋白酶底物和其它可切割部分及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及基质金属蛋白酶底物和其它可切割部分及其使用方法。本发明一般涉及包括至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的可切割部分的多肽、包括至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分的可激活抗体和其它较大分子，以及涉及制备和在各种治疗、诊断和预防适应症中使用包括至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分的这些多肽的方法。

1. 一种多肽，其含有包含选自 SEQ ID NO:15和379-393的氨基酸序列的可切割部分 (CM)。
2. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含选自SEQ ID NO:15、379、380、382和391-393的氨基酸序列。
3. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
4. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列。
5. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。
6. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。
7. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列。
8. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:392的氨基酸序列。
9. 权利要求1的多肽，其中所述CM包含SEQ ID NO:393的氨基酸序列。
10. 权利要求1-9中任一项的多肽，其中所述CM被至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 切割。
11. 权利要求10的多肽，其中所述CM被MMP9或MMP14的至少一种切割。
12. 权利要求10的多肽，其中所述CM被至少MMP14切割。
13. 权利要求10的多肽，其中所述CM被至少MMP9切割。
14. 一种可激活抗体，其包含
 - (a) 权利要求1-13中任一项的多肽；
 - (b) 结合靶标的抗体或其抗原结合片段 (AB)；
 - (c) 抑制AB与其靶标结合的掩蔽部分 (MM)，
其中所述可激活抗体具有MM-CM-AB或AB-CM-MM的从N端到C端的结构排列。
15. 一种可激活抗体，其包含
 - (a) 结合靶标的抗体或其抗原结合片段 (AB)；
 - (b) 包含选自SEQ ID NO:15和379-393的氨基酸序列的可切割部分 (CM)；
 - (c) 抑制AB与AB的靶标结合的掩蔽部分 (MM)，
其中所述可激活抗体具有MM-CM-AB或AB-CM-MM的从N端到C端的结构排列。
16. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含选自SEQ ID NO:15、379、380、382和391-393的氨基酸序列。
17. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
18. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列。
19. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。
20. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。
21. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列。
22. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:392的氨基酸序列。
23. 权利要求15的可激活抗体，其中所述CM包含SEQ ID NO:393的氨基酸序列。
24. 权利要求15-23中任一项的多肽，其中所述CM被至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 切割。
25. 权利要求24的可激活抗体，其中所述CM被MMP9或MMP14的至少一种切割。

26. 权利要求24的可激活抗体,其中所述CM被至少MMP14切割。
27. 权利要求24的可激活抗体,其中所述CM被至少MMP9切割。
28. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述CM是与AB的靶标共定位于组织中的蛋白酶的底物。
29. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中其抗原结合片段是选自Fab片段、F_{(ab')₂}片段、scFv、scab和dAb的抗体片段。
30. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述AB与CM直接连接。
31. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述AB通过连接肽与CM连接。
32. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述MM对于与AB结合的平衡解离常数大于AB对于与AB的靶标结合的平衡解离常数。
33. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。
34. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,其中所述MM的氨基酸序列不同于AB的靶标的氨基酸序列,且与AB的天然结合配偶体的氨基酸序列有不超过50%同一性。
35. 权利要求15-23中任一项可激活抗体,其中所述可激活抗体包含在MM和CM之间的连接肽。
36. 权利要求15-23中任一项的可激活抗体,所述可激活抗体还包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),其中所述可激活抗体具有MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM的从N端到C端的结构排列。
37. 权利要求36的可激活抗体,其中两个连接肽彼此不相同。
38. 权利要求36的可激活抗体,其中LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。

基质金属蛋白酶底物和其它可切割部分及其使用方法

本申请是分案申请，原申请的申请日为2014年09月25日，申请号为201480064185.0，发明名称为“基质金属蛋白酶底物和其它可切割部分及其使用方法”。

[0001] 相关申请

本申请要求2013年9月25日提交的美国临时申请号61/882,377和2014年3月27日提交的美国临时申请号61/971,332的权益，其每一个的内容通过引用以其整体结合到本文中。

发明领域

[0002] 总的来讲，本发明涉及包括是至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的可切割部分的多肽、包括是至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分的可激活抗体和其它较大分子，及制备包括是至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分的这些多肽的方法和在各种治疗、诊断和预防适应症中使用所述多肽的方法。

[0003] 发明背景

蛋白酶是通过切割氨基酸残基间的肽键而使蛋白质降解的酶。蛋白酶天然存在于所有生物中，并参与从简单降解到高度调节的途径的各种生理反应。已知一些蛋白酶根据蛋白质内存在的特殊氨基酸序列使特定的肽键断裂。

[0004] 因此，存在鉴定蛋白酶的新的底物和在各种治疗、诊断和预防适应症中使用这些底物的需要。

[0005] 发明概述

本公开内容提供包括是至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的可切割部分(CM)的氨基酸序列。这些CM可用于各种治疗、诊断和预防适应症中。

[0006] 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是两种或更多种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的两种或更多种底物。在一些实施方案中，CM包含至少两种或更多种MMP9底物。在一些实施方案中，CM包含至少两种或更多种MMP14底物。

[0007] 在一些实施方案中，CM是MMP的底物并包括序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)、QNQALRMA (SEQ ID NO:15)、AQNLGMV (SEQ ID NO:16)、STFPFGMF (SEQ ID NO:17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)、RPSPMWAY (SEQ ID NO:21)、WATPRPMR (SEQ ID NO:22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)、LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)、LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)、RMHLRSLG (SEQ ID NO:29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)、AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)、LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)、PAGLWLDP (SEQ ID NO:33) 和/或ISSGLSS (SEQ ID NO:

159)。

[0008] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列QNQALRMA (SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AQNLLGMV (SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列STFPFGMF (SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RPSPMWAY (SEQ ID NO:21)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列WATPRPMR (SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RMHLRSLG (SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PAGLWLDP (SEQ ID NO:33)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLSS (SEQ ID NO:159)。

[0009] 在一些实施方案中,使CM与抗体连接或以别的方式相连。例如,使用CM将一种或多种作用剂与结合指定靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)连接,使得当暴露于MMP时CM被切割,作用剂从AB中释放。示例性靶标包括但不限于表1所示靶标。示例性AB包括但不限于表2所示靶标。在一些实施方案中,未切割状态下的抗体具有如下从N端到C端的结构排列:作用剂-CM-AB或AB-CM-作用剂。在一些实施方案中,抗体包含AB和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,抗体包含CM和缀合的作用剂之间的连接肽。

[0010] 在一些实施方案中,抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的抗体具有如下从N端到C端的结构排列:作用剂-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-作用剂。在一些实施方案中,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。

[0011] 在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。

[0012] 在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO:3)、GGSGG (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:5)、GSGGG (SEQ ID NO:6)、GGGSG (SEQ ID NO:7)和GSSSG (SEQ ID NO:8)。

[0013] 在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO:155)、GSSGGSGCGSG (SEQ ID NO:156)或GSSGGSGCGSGS (SEQ ID NO:157)。

[0014] 在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:158)、GSSGT (SEQ ID NO:12)或GSSG (SEQ ID NO:13)。

[0015] 在一些实施方案中,对于与靶标结合,AB具有约100nM或更小的平衡解离常数。

[0016] 在一些实施方案中,抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段。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、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,结合靶标的所述抗体或其免疫活性片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0017] 在一些实施方案中,MMP蛋白酶与靶标共定位于组织中,当抗体暴露于蛋白酶时,MMP蛋白酶切割抗体中的CM。

[0018] 在一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0019] 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是两种或更多种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的两种或更多种底物。在一些实施方案中,CM包含至少两种或更多种MMP9底物。在一些实施方案中,CM包含至少两种或更多种MMP14底物。

[0020] 在一些实施方案中,CM是MMP的底物并包括序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)、QNQALRMA (SEQ ID NO:15)、AQNLGMV (SEQ ID NO:16)、STFPFGMF (SEQ ID NO:17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)、RPSPMWY (SEQ ID NO:21)、WATPRPMR (SEQ ID NO:22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)、LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)、LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)、RMHRLRSLG (SEQ ID NO:29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)、AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)、LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)、PAGLWLDP (SEQ ID NO:33) 和/或ISSGLSS (SEQ ID NO:159)。

[0021] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列QNQALRMA (SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AQNLGMV (SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列STFPFGMF (SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RPSPMWY (SEQ ID NO:21)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列WATPRPMR (SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RMHRLRSLG (SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PAGLWLDP (SEQ ID NO:33)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLSS (SEQ ID NO:159)。

[0022] 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,并包括被MMP9识别的基序序列。在一些实施方案中,CM是至少一种MMP的底物,并包括被MMP14识别的基序序列。

[0023] 在一些实施方案中,CM是至少一种MMP的底物,且CM多肽和/或包含CM的任何多肽的CM部分包含长度为以下的多肽:小于50个氨基酸、小于40个氨基酸、小于30个氨基酸、小于25个氨基酸、小于20个氨基酸、小于19个氨基酸、小于18个氨基酸、小于17个氨基酸、小于16个氨基酸、小于15个氨基酸长、小于14个氨基酸、小于13个氨基酸、小于12个氨基酸、小于11个氨基酸或小于10个氨基酸长。

[0024] 在一些实施方案中,CM是至少一种MMP的底物,并包含与被同一MMP蛋白酶天然切割的任何人多肽序列基本上不同的多肽序列。在一些实施方案中,CM是至少一种MMP的底物,并包含与被同一MMP蛋白酶天然切割的任何人多肽序列有不超过90%或更多的同一性的多肽序列。

[0025] 在一些实施方案中,基序序列是至少MMP的底物,并包括下表8A-8M所示核心CM共有序列。在一些实施方案中,基序序列包括下表8A-8M所示核心CM共有序列的亚属(subgenus),即亚类。

[0026] 在一些实施方案中,基序序列是至少MMP9的底物,并包括表8A-8D所示核心CM共有序列。在一些实施方案中,基序序列是至少MMP9的底物,并包括下表8A-8D所示核心CM共有序列的亚属,即亚类。

[0027] 在一些实施方案中,基序序列是至少MMP14的底物,并包括表8E-8M所示核心CM共有序列。在一些实施方案中,基序序列是至少MMP14的底物,并包括下表8E-8M所示核心CM共有序列的亚属,即亚类。

[0028] 表8A.MMP9可切割核心CM共有序列1

核心 CM 共有序列 1	核心 CM 共有序列 1 的亚属
X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 317), 其中 X ₂₂ 为 A、C、D、G、H、L、P、R 或 S; X ₂₃ 为 L、M、P、S 或 T; X ₂₄ 为 A、D、F、G、L、M、N、P、R、S、T 或 V; X ₂₅ 为 A、D、E、G、H、I、M、P、S 或 V; X ₂₆ 为 A、C、D、G、L、M、N、R、V、W 或 Y; X ₂₇ 为 C、F、G、H、P、Q、R、T、V 或 W; X ₂₈ 为 A、D、G、L、M、S、T、V 或 Y; 和 X ₂₉ 为 C、H、L、R、S、V、W 或 Y。	亚属 1.1: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 318), 其中 X ₂₂ 为 G、P、R 或 S; X ₂₃ 为 P 或 S; X ₂₄ 为 L、M、P 或 S; X ₂₅ 为 A、G、P 或 S; X ₂₆ 为 L、M 或 R; X ₂₇ 为 G 或 W; X ₂₈ 为 A、G、S 或 Y; 和 X ₂₉ 为 L、R、V 或 Y。 亚属 1.2: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 319), 其中 X ₂₂ 为 G、P 或 R; X ₂₃ 为 P; X ₂₄ 为 L、M 或 S; X ₂₅ 为 G、P 或 S; X ₂₆ 为 L、M 或 R; X ₂₇ 为 W; X ₂₈ 为 A、G 或 S; 和 X ₂₉ 为 R、V 或 Y。 亚属 1.3: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 320), 其中 X ₂₂ 为 P 或 R; X ₂₃ 为 P; X ₂₄ 为 M 或 S; X ₂₅ 为 G 或 P; X ₂₆ 为 L、M 或 R; X ₂₇ 为 W; X ₂₈ 为 A、G 或 S; 和 X ₂₉ 为 R、V 或 Y。 亚属 1.4: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 321), 其中 X ₂₂ 为 P 或 R; X ₂₃ 为 P; X ₂₄ 为 S; X ₂₅ 为 G 或 P; X ₂₆ 为 M 或 R; X ₂₇ 为 W; X ₂₈ 为 A、G 或 S; 和 X ₂₉ 为 V 或 Y。 亚属 1.5: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 322), 其中 X ₂₂ 为 P 或 R; X ₂₃ 为 P; X ₂₄ 为 S; X ₂₅ 为 G 或 P; X ₂₆ 为 M 或 R; X ₂₇ 为 W; X ₂₈ 为 A 或 S; 和 X ₂₉ 为 Y。 亚属 1.6: X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (SEQ ID NO: 323), 其中 X ₂₂ 为 C、G、H、L 或 R; X ₂₃ 为 P、S 或 T; X ₂₄ 为 N、R、S 或 T; X ₂₅ 为 P 或 S; X ₂₆ 为 C、M、R、V 或 W; X ₂₇ 为 C、P、R 或 W; X ₂₈ 为 A、D 或 G; 和 X ₂₉ 为 C 或 Y。

表8B.MMP9可切割核心CM共有序列2

核心 CM 共有序列 2	核心 CM 共有序列 2 的亚属
$X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ (SEQ ID NO: 324), 其中 X_{32} 为 F、G、V 或 W; X_{33} 为 A、D、L、M、P、R、T 或 V;	亚属 2.1: $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ (SEQ ID NO: 325), 其中 X_{32} 为 W; X_{33} 为 D、P 或 T; X_{34} 为 H、Q 或 W; X_{35} 为 D 或 P; X_{36} 为 I 或 R; X_{37} 为 S; X_{38} 为 L、M 或 V; 和 X_{39} 为 G、L 或 S。
X_{34} 为 C、G、H、L、Q、S、T、W; X_{35} 为 D、G、L、P; X_{36} 为 E、G、I、L、N、P、R 或 V;	亚属 2.2: $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ (SEQ ID NO: 326), 其中 X_{32} 为 W; X_{33} 为 D; X_{34} 为 H、Q 或 W; X_{35} 为 D 或 P; X_{36} 为 I 或 R; X_{37} 为 G、S 或 V; X_{38} 为 L、M 或 V; 和 X_{39} 为 G、L 或 S。
X_{37} 为 G、L、P、R、S 或 V; X_{38} 为 A、I、L、M、T 或 V; 和 X_{39} 为 A、G、L、P、Q、R、S 或 V。	亚属 2.3: $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ (SEQ ID NO: 327), 其中 X_{32} 为 W; X_{33} 为 D; X_{34} 为 H、Q 或 W; X_{35} 为 P; X_{36} 为 I 或 R; X_{37} 为 S; X_{38} 为 L、M 或 V; 和 X_{39} 为 L。

表8C. MMP9可切割核心CM共有序列3

核心 CM 共有序列 3	核心 CM 共有序列 3 的亚属
X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 329), 其中 X ₄₂ 为 G、I、L、M、P、R、S、T 或 V; X ₄₃ 为 A、D、H、I、L、P、S 或 T; X ₄₄ 为 F、L、S 或 V; X ₄₅ 为 H、L、M、P、Q、R、S 或 T; X ₄₆ 为 A、D、F、G、L、M、R、S、T 或 V; X ₄₇ 为 A、C、G、H、Q、T 或 Y; X ₄₈ 为 C、G、I、M、R、S、T、V 或 W; 和 X ₄₉ 为 F、L、S 或 Y。	亚属 3.1: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 330), 其中 X ₄₂ 为 I、L、M 或 S; X ₄₃ 为 D、P、S 或 T; X ₄₄ 为 F、L、S 或 V; X ₄₅ 为 L、P 或 S; X ₄₆ 为 A、F、R、S 或 T; X ₄₇ 为 G、H、T 或 Y; X ₄₈ 为 G、I、M、V 或 W; 和 X ₄₉ 为 F、L 或 S。 亚属 3.2: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 331), 其中 X ₄₂ 为 L、M 或 S; X ₄₃ 为 S 或 T; X ₄₄ 为 F 或 L; X ₄₅ 为 P; X ₄₆ 为 A、F 或 T; X ₄₇ 为 G、H、T 或 Y; X ₄₈ 为 I、M 或 W; 和 X ₄₉ 为 F。 亚属 3.3: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 332), 其中 X ₄₂ 为 L、M 或 S; X ₄₃ 为 S 或 T; X ₄₄ 为 F; X ₄₅ 为 P; X ₄₆ 为 A、F 或 T; X ₄₇ 为 G、H 或 Y; X ₄₈ 为 I、M 或 W; 和 X ₄₉ 为 F。 亚属 3.4: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 333), 其中 X ₄₂ 为 L 或 M; X ₄₃ 为 S 或 T; X ₄₄ 为 F; X ₄₅ 为 P; X ₄₆ 为 A 或 T; X ₄₇ 为 H 或 Y; X ₄₈ 为 I 或 W; 和 X ₄₉ 为 F。 亚属 3.5: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 334), 其中 X ₄₂ 为 G、I、R 或 S; X ₄₃ 为 H 或 T; X ₄₄ 为 F、L、S 或 V; X ₄₅ 为 L、P 或 R; X ₄₆ 为 F、L 或 S; X ₄₇ 为 A、C 或 G; X ₄₈ 为 I、M 或 V; 和 X ₄₉ 为 F 或 L。 亚属 3.6: X ₄₂ X ₄₃ X ₄₄ X ₄₅ X ₄₆ X ₄₇ X ₄₈ X ₄₉ (SEQ ID NO: 335), 其中 X ₄₂ 为 S; X ₄₃ 为 T; X ₄₄ 为 F 或 V; X ₄₅ 为 L 或 P; X ₄₆ 为 F 或 L; X ₄₇ 为 G; X ₄₈ 为 I 或 M; 和 X ₄₉ 为 F。

表8D.MMP9可切割核心CM共有序列4

核心 CM 共有序列 4	核心 CM 共有序列 4 的亚属
X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 340), 其中 X ₅₂ 为 D、G、H、L、P、Q、S 或 Y; X ₅₃ 为 D、W 或 Y; X ₅₄ 为 H、L 或 R; X ₅₅ 为 H、L、M、P 或 Y; X ₅₆ 为 E、F、G、M、R 或 W; X ₅₇ 为 A、L、M、N、P 或 R; X ₅₈ 为 G、L、P、R 或 S; 和 X ₅₉ 为 G、I、P、S、T 或 Y。	亚属 4.1: X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 341), 其中 X ₅₂ 为 D、G、H、L、P、Q、S 或 Y; X ₅₃ 为 D、W 或 Y; X ₅₄ 为 H、L 或 R; X ₅₅ 为 H、L、M、P 或 Y; X ₅₆ 为 E、F、G、M、R 或 W; X ₅₇ 为 A、L、M、N、P 或 R; X ₅₈ 为 G、L、P、R 或 S; 和 X ₅₉ 为 G、I、P、S、T 或 Y。
X ₅₂ 为 D、G、H、L、N、P、Q、R、S、W 或 Y; X ₅₃ 为 A、C、D、G、L、R、V、W 或 Y; X ₅₄ 为 D、H、L、P、Q、R、S 或 Y; X ₅₅ 为 D、F、H、I、L、M、P、S 或 Y;	亚属 4.2: X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 342), 其中 X ₅₂ 为 D 或 H; X ₅₃ 为 W 或 Y; X ₅₄ 为 H 或 L; X ₅₅ 为 H、L 或 Y; X ₅₆ 为 G 或 W; X ₅₇ 为 P 或 R; X ₅₈ 为 G、L 或 P; 和 X ₅₉ 为 G、I、S 或 T。
X ₅₆ 为 A、C、E、F、G、K、M、R、S、V 或 W; X ₅₇ 为 A、G、K、L、M、N、P、R、S 或 T; X ₅₈ 为 A、F、G、H、L、P、R、S 或 T; 和 X ₅₉ 为 A、G、H、I、N、P、S、T 或 Y。	亚属 4.3: X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 343), 其中 X ₅₂ 为 H; X ₅₃ 为 W; X ₅₄ 为 H 或 L; X ₅₅ 为 H、L 或 Y; X ₅₆ 为 G 或 W; X ₅₇ 为 P; X ₅₈ 为 L 或 P; 和 X ₅₉ 为 G、I、S 或 T。
	亚属 4.4: X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 344), 其中 X ₅₂ 为 H; X ₅₃ 为 W; X ₅₄ 为 H 或 L; X ₅₅ 为 L 或 Y; X ₅₆ 为 G; X ₅₇ 为 P; X ₅₈ 为 L 或 P; 和 X ₅₉ 为 G、I、S 或 T。
	亚属 4.5: X ₅₂ X ₅₃ X ₅₄ X ₅₅ X ₅₆ X ₅₇ X ₅₈ X ₅₉ (SEQ ID NO: 345), 其中 X ₅₂ 为 H; X ₅₃ 为 W; X ₅₄ 为 H 或 L; X ₅₅ 为 L 或 Y; X ₅₆ 为 G; X ₅₇ 为 P; X ₅₈ 为 P; 和 X ₅₉ 为 T。

核心 CM 共有序列 4	核心 CM 共有序列 4 的亚属
	亚属 4.6: $X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}X_{57}X_{58}X_{59}$ (SEQ ID NO: 346), 其中 X_{52} 为 D、G、S 或 Y; X_{53} 为 W; X_{54} 为 L 或 P; X_{55} 为 D 或 Y; X_{56} 为 C、E、G 或 W; X_{57} 为 M 或 P; X_{58} 为 G、R 或 S; 和 X_{59} 为 H、I 或 Y。
	亚属 4.7: $X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}X_{57}X_{58}X_{59}$ (SEQ ID NO: 347), 其中 X_{52} 为 D、G 或 S; X_{53} 为 W; X_{54} 为 L; X_{55} 为 Y; X_{56} 为 E 或 W; X_{57} 为 M 或 P; X_{58} 为 G 或 S; 和 X_{59} 为 I 或 Y。

表8E.MMP14可切割核心CM共有序列5

核心 CM 共有序列 5	核心 CM 共有序列 5 的亚属
$X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}$ (SEQ ID NO: 352), 其中 X_{62} 为 A、I、G、L、M、P、Q、S、T 或 V; X_{63} 为 A、D、L、P、Q、S、T、V 或 Y; X_{64} 为 A、C、E、F、G、H、K、L、P、Q、R、S 或 V; X_{65} 为 D、E、G、S 或 V; X_{66} 为 A、I、L、M 或 V; X_{67} 为 C、E、G、I、K、L、M、N、Q、R 或 Y; X_{68} 为 A、F、H、I、L、M、N、P、R、S 或 T;	亚属 5.1: $X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}$ (SEQ ID NO: 353), 其中 X_{62} 为 A、G、I、P、Q、S、T 或 V; X_{63} 为 A、L、Q、S 或 V; X_{64} 为 A、E、L、R 或 S; X_{65} 为 D 或 G; X_{66} 为 I 或 L; X_{67} 为 E、I、L、M、Q、R 或 Y; X_{68} 为 F、H、L、M、R 或 S; 和 X_{69} 为 A、G、H、L、N、P、Q 或 S。 亚属 5.2: $X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}$ (SEQ ID NO: 354), 其中 X_{62} 为 A、I、S 或 T; X_{63} 为 L、Q、S 或 V; X_{64} 为 A、L、R 或 S; X_{65} 为 G; X_{66} 为 I 或 L; X_{67} 为 E、L、R 或 Y; X_{68} 为 F、H、L、R 或 S; 和 X_{69} 为 H、L、P 或 S。 亚属 5.3: $X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}$ (SEQ ID NO: 355), 其中 X_{62} 为 A、I、S 或 T; X_{63} 为 L、S 或 V; X_{64} 为 A、R 或 S; X_{65} 为 G; X_{66} 为 L; X_{67} 为 E、L 或 R; X_{68} 为 F、H 或 S; 和 X_{69} 为 L、P 或 S。

核心 CM 共有序列 5	核心 CM 共有序列 5 的亚属
和 X ₆₉ 为A、C、G、H、I、 L、N、P、Q、R、S、T、 V或W。	亚属 5.4: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 356), 其中 X ₆₂ 为A、I、S或T; X ₆₃ 为L、S或 V; X ₆₄ 为R或S; X ₆₅ 为G; X ₆₆ 为L; X ₆₇ 为L 或R; X ₆₈ 为F、H或S; 和 X ₆₉ 为P或S。
	亚属 5.5: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 357), 其中 X ₆₂ 为A、I、S或T; X ₆₃ 为L、S或 V; X ₆₄ 为R或S; X ₆₅ 为G; X ₆₆ 为L; X ₆₇ 为L 或R; X ₆₈ 为S; 和 X ₆₉ 为P或S。
	亚属 5.6: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 358), 其中 X ₆₂ 为T; X ₆₃ 为L、S或V; X ₆₄ 为S; X ₆₅ 为G; X ₆₆ 为L; X ₆₇ 为R; X ₆₈ 为S; 和 X ₆₉ 为P。
	亚属 5.7: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 359), 其中 X ₆₂ 为A、G、I、M、P、S、T或V; X ₆₃ 为L、Q、S或V; X ₆₄ 为A、C、F、K、L、 Q、R或S; X ₆₅ 为D、G、S或V; X ₆₆ 为L或M; X ₆₇ 为G、I、L、M、N、Q或R; X ₆₈ 为I、N、P 或S; 和 X ₆₉ 为A、H、I、N、Q或S。
	亚属 5.8: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 360), 其中 X ₆₂ 为A、I或S; X ₆₃ 为L、Q、S或 V; X ₆₄ 为L、R或S; X ₆₅ 为G; X ₆₆ 为L; X ₆₇ 为 L、M或R; X ₆₈ 为S; 和 X ₆₉ 为A、H、N、Q或 S。

核心 CM 共有序列 5	核心 CM 共有序列 5 的亚属
	亚属 5.9: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 361), 其中 X ₆₂ 为 A、I 或 S; X ₆₃ 为 L、Q、S 或 V; X ₆₄ 为 L、R 或 S; X ₆₅ 为 G; X ₆₆ 为 L; X ₆₇ 为 L、M 或 R; X ₆₈ 为 S; 和 X ₆₉ 为 A、H、N、Q 或 S。
	亚属 5.10: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 362), 其中 X ₆₂ 为 A 或 S; X ₆₃ 为 L 或 V; X ₆₄ 为 L 或 S; X ₆₅ 为 G; X ₆₆ 为 L; X ₆₇ 为 L 或 R; X ₆₈ 为 S; 和 X ₆₉ 为 H 或 S。
	亚属 5.11: X ₆₂ X ₆₃ X ₆₄ X ₆₅ X ₆₆ X ₆₇ X ₆₈ X ₆₉ (SEQ ID NO: 363), 其中 X ₆₂ 为 A 或 S; X ₆₃ 为 L 或 V; X ₆₄ 为 S; X ₆₅ 为 G; X ₆₆ 为 L; X ₆₇ 为 L 或 R; X ₆₈ 为 S; 和 X ₆₉ 为 H 或 S。

表8F-1.MMP14可切割核心CM共有序列6

核心 CM 共有序列 6	核心 CM 共有序列 6 的亚属
X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (SEQ ID NO: 371), 其中 X ₇₂ 为 A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S 或 V; X ₇₃ 为 A、C、E、F、H、L、N、R、S 或 V; X ₇₄ 为 A、D、E、K、N、P、Q、S、T 或 Y; X ₇₅ 为 A、E、G、H、K、L、N、P、R、S 或 T; X ₇₆ 为 I、K、L、M、N、R、	亚属 6.1: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (SEQ ID NO: 372), 其中 X ₇₂ 为 A、F、G、H、I、L、M、Q、R 或 S; X ₇₃ 为 A、F、H、L 或 N; X ₇₄ 为 A、E、N、Q 或 S; X ₇₅ 为 A、E、K、N、S 或 T; X ₇₆ 为 L 或 M; X ₇₇ 为 A、I、K、L、P、R 或 V; X ₇₈ 为 A、D、I、L、M、R、T 或 V; 和 X ₇₉ 为 A、F、G、H、I、L、P、Q、R 或 S。
	亚属 6.2: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (SEQ ID NO: 373), 其中 X ₇₂ 为 G、L 或 R 或 S; X ₇₃ 为 A 或 L; X ₇₄ 为 A、E、N、Q 或 S; X ₇₅ 为 A、E、N、S 或 T; X ₇₆ 为 L 或 M; X ₇₇ 为 L 或 R; X ₇₈ 为 A、L 或 T; 和 X ₇₉ 为 F、G、L、R 或 S。

核心 CM 共有序列 6	核心 CM 共有序列 6 的亚属
T、V 或 Y; X ₇₇ 为 A、D、E、I、K、L、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X ₇₈ 为 A、C、D、E、G、I、L、M、Q、R、S、T 或 V; 和 X ₇₉ 为 A、F、G、H、I、L、P、Q、R、S、T 或 Y。	亚属 6.3: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (SEQ ID NO: 374), 其中 X ₇₂ 为 L; X ₇₃ 为 A 或 L; X ₇₄ 为 E、N、Q 或 S; X ₇₅ 为 A 或 S; X ₇₆ 为 L 或 M; X ₇₇ 为 R; X ₇₈ 为 A 或 T; 和 X ₇₉ 为 F、L 或 R。 亚属 6.4: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (SEQ ID NO: 375), 其中 X ₇₂ 为 L; X ₇₃ 为 A 或 L; X ₇₄ 为 E、N、Q 或 S; X ₇₅ 为 A 或 S; X ₇₆ 为 L 或 M; X ₇₇ 为 R; X ₇₈ 为 A; 和 X ₇₉ 为 L 或 R。

表8F-2.MMP14可切割核心CM共有序列6A

核心 CM 共有序列 6A	核心 CM 共有序列 6A 的亚属
X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ (SEQ ID NO: 485), 其中 X ₇₂ 为 A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S 或 V; X ₇₃ 为 A、C、E、F、H、L、N、R、S 或 V; X ₇₄ 为 A、D、E、K、N、P Q、S、T 或 Y; X ₇₅ 为 A、E、G、H、K、L、N、P、R、S 或 T; X ₇₆ 为 I、K、L、M、N、R、T、V 或 Y; X ₇₇ 为 A、D、E、I、K、L、P、Q、R、S、T、V 或 Y; 和 X ₇₈ 为 A、C、D、E、G、I、L、M、Q、R、S、T 或 V。	亚属 6A.1: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ (SEQ ID NO: 376), 其中 X ₇₂ 为 A、E、L、N、P 或 Q; X ₇₃ 为 F、H、L、N 或 S; X ₇₄ 为 Q 或 Y; X ₇₅ 为 A; X ₇₆ 为 L、T、V 或 Y; X ₇₇ 为 D、E、P、Q 或 R; 和 X ₇₈ 为 A、C、G、I、M、R、S 或 T。 亚属 6A.2: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ (SEQ ID NO: 377), 其中 X ₇₂ 为 A、E、L 或 Q; X ₇₃ 为 F、H 或 N; X ₇₄ 为 Q; X ₇₅ 为 A; X ₇₆ 为 L 或 T; X ₇₇ 为 Q 或 R; 和 X ₇₈ 为 I 或 M。
	亚属 6A.3: X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ (SEQ ID NO: 378), 其中 X ₇₂ 为 A; X ₇₃ 为 F、H 或 N; X ₇₄ 为 Q; X ₇₅ 为 A; X ₇₆ 为 L; X ₇₇ 为 R; 和 X ₇₈ 为 M。

表8G.MMP14可切割核心CM共有序列7

核心 CM 共有序列 7	核心 CM 共有序列 7 的亚属
X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 394), 其中 X ₈₂ 为 A、F、L、Q、S、T 或 V; X ₈₃ 为 A、E、G、H、K、Q、R、V 或 Y;	亚属 7.1: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 395), 其中 X ₈₂ 为 L; X ₈₃ 为 H、K、Q、R 或 Y; X ₈₄ 为 A、L、M、S、T 或 V; X ₈₅ 为 A、I、L、S 或 V; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 A、G、R、S、V 或 W; X ₈₈ 为 I、R、T 或 W; 和 X ₈₉ 为 A、F、G、L、S 或 V。
X ₈₄ 为 A、G、I、K、L、M、N、S、T 或 V; X ₈₅ 为 A、D、F、G、I、L、N、P、R、S、T 或 V; X ₈₆ 为 A、P 或 R;	亚属 7.2: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 396), 其中 X ₈₂ 为 L; X ₈₃ 为 H、K、R 或 Y; X ₈₄ 为 A、L 或 V; X ₈₅ 为 A、I 或 L; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 G、R 或 V; X ₈₈ 为 T 或 W; 和 X ₈₉ 为 A、F、L 或 S。
X ₈₇ 为 A、D、G、L、M、P、R、S、T、V、W 或 Y; X ₈₈ 为 A、C、E、F、H、I、L、N、R、S、T、W 或 Y; 和 X ₈₉ 为 A、F、G、I、L、M、R、S、T 或 V。	亚属 7.3: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 397), 其中 X ₈₂ 为 L; X ₈₃ 为 K、R 或 Y; X ₈₄ 为 A; X ₈₅ 为 A 或 L; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 G、R 或 V; X ₈₈ 为 W; 和 X ₈₉ 为 A 或 L。
	亚属 7.4: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 398), 其中 X ₈₂ 为 A、F、L、Q 或 S; X ₈₃ 为 A、E、G、H、K、Q 或 Y; X ₈₄ 为 A、G、K、S 或 V; X ₈₅ 为 A、I、L、P 或 T; X ₈₆ 为 A、P 或 R; X ₈₇ 为 A、L、M、R、V 或 Y; X ₈₈ 为 C、H、R、T 或 W; 和 X ₈₉ 为 A、F、L、R、S 或 T。
	亚属 7.5: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 399), 其中 X ₈₂ 为 F 或 L; X ₈₃ 为 G、K、Q 或 Y; X ₈₄ 为 A、G、S 或 V; X ₈₅ 为 A、I 或 L; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 A、R 或 V; X ₈₈ 为 R 或 W; 和 X ₈₉ 为 A、F、L 或 R。

核心 CM 共有序列 7	核心 CM 共有序列 7 的亚属
	亚属 7.6: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 400), 其中 X ₈₂ 为 L; X ₈₃ 为 K 或 Y; X ₈₄ 为 A 或 S; X ₈₅ 为 A、I 或 L; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 A、R 或 V; X ₈₈ 为 W; 和 X ₈₉ 为 A 或 F。
	亚属 7.7: X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (SEQ ID NO: 401), 其中 X ₈₂ 为 L; X ₈₃ 为 K 或 Y; X ₈₄ 为 A; X ₈₅ 为 A 或 I; X ₈₆ 为 P; X ₈₇ 为 R 或 V; X ₈₈ 为 W; 和 X ₈₉ 为 A 或 F。

表8H-1.MMP14可切割核心CM共有序列8

核心 CM 共有序列 8	核心 CM 共有序列 8 的亚属
X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 410), 其中 X ₉₂ 为 A、D、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 W; X ₉₃ 为 A、P、R 或 T; X ₉₄ 为 A、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、D、E、G、H、K、M、N、P、R、S 或 T; X ₉₆ 为 C、F、H、I、L、M、P、R、S、V、W 或 Y;	亚属 8.1: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 411), 其中 X ₉₂ 为 A、F、G、I、L、M、N、S、T、V 或 W; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、E、F、H、I、K、N、P、Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、D、E、G、H、N、P 或 S; X ₉₆ 为 C、F、I、L、M、R、S 或 V; X ₉₇ 为 C、F、G、I、L、R、S、T、V 或 Y; 和 X ₉₈ 为 A、F、L、M、P、Q、R、S、T、V 或 Y。
	亚属 8.2: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 412), 其中 X ₉₂ 为 F、G、L、S、T 或 V; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、E、H、K、N、Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、G、H、N、P 或 S; X ₉₆ 为 I、L、M 或 V; X ₉₇ 为 F、I、L、R、S、T、V 或 Y; 和 X ₉₈ 为 A、F、L、R、T、V 或 Y。
	亚属 8.3: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 413), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、K、Q、R 或 S; X ₉₅ 为 A、G、H 或 S; X ₉₆ 为 I、L、M 或 V; X ₉₇ 为 F、L、R、S、T、V 或 Y; 和 X ₉₈ 为 F、L、T 或 V。

核心 CM 共有序列 8	核心 CM 共有序列 8 的亚属
X ₉₇ 为 A、C、F、G、H、I、K、L、M、R、S、T、V、W 或 Y；和 X ₉₈ 为 A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y。	亚属 8.4: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 414), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、Q 或 S; X ₉₅ 为 G 或 S; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L、S 或 V; 和 X ₉₈ 为 F、L 或 T。 亚属 8.5: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 415), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、Q 或 S; X ₉₅ 为 G; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L 或 V; 和 X ₉₈ 为 L。 亚属 8.6: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 416), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A 或 S; X ₉₅ 为 G; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L 或 V; 和 X ₉₈ 为 L。 亚属 8.7: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 417), 其中 X ₉₂ 为 F、G、L、M、P、S、V 或 W; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、N、Q 或 S; X ₉₅ 为 A、D、G、H、M、N、P 或 S; X ₉₆ 为 F、I、L、M 或 V; X ₉₇ 为 A、I、L、M、S 或 V; 和 X ₉₈ 为 A、G、I、L、M、N、P、Q、R、S、T 或 Y。 亚属 8.8: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 418), 其中 X ₉₂ 为 L、S 或 V; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、N、Q 或 S; X ₉₅ 为 H、N、P 或 S; X ₉₆ 为 F、I、L 或 M; X ₉₇ 为 I、L、S 或 V; 和 X ₉₈ 为 A、L 或 Q。 亚属 8.9: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (SEQ ID NO: 419), 其中 X ₉₂ 为 L; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、N、Q 或 S; X ₉₅ 为 H; X ₉₆ 为 I 或 L; X ₉₇ 为 V; 和 X ₉₈ 为 L。

表8H-2.MMP14可切割延长的核心CM共有序列8

延长的核心 CM 共有 序列 8A	延长的核心 CM 共有序列 8A 的亚属
$X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}X_{97}X_{98}$ X ₉₉ (SEQ ID NO: 486), 其中 X ₉₂ 为 A、D、F、G、 H、I、L、M、N、P、 Q、R、S、T、V 或 W; X ₉₃ 为 A、P、R 或 T; X ₉₄ 为 A、E、F、G、 H、I、K、L、N、P、 Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、D、E、G、 H、K、M、N、P、R、 S 或 T; X ₉₆ 为 C、F、H、I、L、 M、P、R、S、V、W 或 Y;	亚属 8A.1: $X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}X_{97}X_{98}X_{99}$ (SEQ ID NO: 487), 其中 X ₉₂ 为 A、F、G、I、L、M、N、S、T、 V 或 W; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、E、F、H、I、K、N、 P、Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、D、E、G、H、N、 P 或 S; X ₉₆ 为 C、F、I、L、M、R、S 或 V; X ₉₇ 为 C、F、G、I、L、R、S、T、V 或 Y; X ₉₈ 为 A、 F、L、M、P、Q、R、S、T、V 或 Y; 和 X ₉₉ 为 A、 D、E、G、H、I、L、N、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y。
X ₉₇ 为 A、C、F、G、 H、I、K、L、M、R、 S、T、V、W 或 Y; X ₉₈ 为 A、D、E、F、 G、H、I、K、L、M、 N、P、Q、R、S、T、 V 或 Y; 和 X ₉₉ 为 A、D、E、F、 G、H、I、K、L、N、	亚属 8A.2: $X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}X_{97}X_{98}X_{99}$ (SEQ ID NO: 488), 其中 X ₉₂ 为 F、G、L、S、T 或 V; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、E、H、K、N、Q、R、S、T 或 V; X ₉₅ 为 A、G、H、N、P 或 S; X ₉₆ 为 I、L、M 或 V; X ₉₇ 为 F、I、L、R、S、T、V 或 Y; X ₉₈ 为 A、F、 L、R、T、V 或 Y; 和 X ₉₉ 为 A、D、G、L、P、R、 S、T、V 或 Y。
X ₉₇ 为 A、C、F、G、 H、I、K、L、M、R、 S、T、V、W 或 Y; X ₉₈ 为 A、D、E、F、 G、H、I、K、L、M、 N、P、Q、R、S、T、 V 或 Y; 和 X ₉₉ 为 A、D、E、F、 G、H、I、K、L、N、	亚属 8A.3: $X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}X_{97}X_{98}X_{99}$ (SEQ ID NO: 489), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、 K、Q、R 或 S; X ₉₅ 为 A、G、H 或 S; X ₉₆ 为 I、L、 M 或 V; X ₉₇ 为 F、L、R、S、T、V 或 Y; X ₉₈ 为 F、 L、T 或 V; 和 X ₉₉ 为 A、D、G、L、R、T 或 V。
	亚属 8A.4: $X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}X_{97}X_{98}X_{99}$ (SEQ ID NO: 490), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、 Q 或 S; X ₉₅ 为 G 或 S; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L、 S 或 V; X ₉₈ 为 F、L 或 T; 和 X ₉₉ 为 A、R 或 T。

延长的核心 CM 共有 序列 8A	延长的核心 CM 共有序列 8A 的亚属
P、Q、R、S、T、V、 W 或 Y。	亚属 8A.5: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ X ₉₉ (SEQ ID NO: 491), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、 Q 或 S; X ₉₅ 为 G; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L 或 V; X ₉₈ 为 L; 和 X ₉₉ 为 R。
	亚属 8A.6: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ X ₉₉ (SEQ ID NO: 492), 其中 X ₉₂ 为 F、L 或 S; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A 或 S; X ₉₅ 为 G; X ₉₆ 为 I、L 或 M; X ₉₇ 为 L 或 V; X ₉₈ 为 L; 和 X ₉₉ 为 R。
	亚属 8A.7: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ X ₉₉ (SEQ ID NO: 493), 其中 X ₉₂ 为 F、G、L、M、P、S、V 或 W; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、N、Q 或 S; X ₉₅ 为 A、D、G、 H、M、N、P 或 S; X ₉₆ 为 F、I、L、M 或 V; X ₉₇ 为 A、I、L、M、S 或 V; X ₉₈ 为 A、G、I、L、M、 N、P、Q、R、S、T 或 Y; 和 X ₉₉ 为 A、F、H、I、 L、Q、R、T、V、W 或 Y。
	亚属 8A.8: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ X ₉₉ (SEQ ID NO: 494), 其中 X ₉₂ 为 L、S 或 V; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、 N、Q 或 S; X ₉₅ 为 H、N、P 或 S; X ₉₆ 为 F、I、L 或 M; X ₉₇ 为 I、L、S 或 V; X ₉₈ 为 A、L 或 Q; 和 X ₉₉ 为 L、T、V 或 Y。
	亚属 8A.9: X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ X ₉₉ (SEQ ID NO: 495), 其中 X ₉₂ 为 L; X ₉₃ 为 P; X ₉₄ 为 A、N、Q 或 S; X ₉₅ 为 H; X ₉₆ 为 I 或 L; X ₉₇ 为 V; X ₉₈ 为 L; 和 X ₉₉ 为 L 或 V。

表8I.MMP14可切割核心CM共有序列9

核心 CM 共有序列 9	核心 CM 共有序列 9 的亚属
$X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 425), 其中 X_{102} 为 A、D、F、G、I、R 或 S; X_{103} 为 D、E、L、M、P、R、S、T、V 或 Y; X_{104} 为 A、H、P 或 S; X_{105} 为 A、D、E、H、L、M、N、R、T 或 V; X_{106} 为 A、G 或 R; X_{107} 为 F、L、M、S、V 或 W; X_{108} 为 A、E、H、L、M、R、S 或 V; 和 X_{109} 为 A、G、L、P、R、S 或 V。	亚属 9.1: $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 426), 其中 X_{102} 为 A、D、F、G、I、R 或 S; X_{103} 为 D、E、L、M、P、R、S、T、V 或 Y; X_{104} 为 A、H、P 或 S; X_{105} 为 A、D、E、H、L、M、N、R、T 或 V; X_{106} 为 A、G 或 R; X_{107} 为 F、L、M、S、V 或 W; X_{108} 为 A、E、H、L、M、R、S 或 V; 和 X_{109} 为 A、G、L、P、R、S 或 V。
X_{105} 为 A、D、E、H、L、M、N、P、Q、R、S、T 或 V; X_{106} 为 A、G、R、S 或 T; X_{107} 为 C、F、L、M、S、V、W 或 Y; X_{108} 为 A、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、V、W 或 Y; 和 X_{109} 为 A、E、G、L、P、R、S 或 V。	亚属 9.2: $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 427), 其中 X_{102} 为 F、G、I、R 或 S; X_{103} 为 L、P、R 或 V; X_{104} 为 A 或 H; X_{105} 为 A、D 或 R; X_{106} 为 A 或 G; X_{107} 为 L 或 V; X_{108} 为 H、L、M、R、S 或 V; 和 X_{109} 为 A、L、S 或 V。
	亚属 9.3: $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 428), 其中 X_{102} 为 G、R 或 S; X_{103} 为 R 或 V; X_{104} 为 A 或 H; X_{105} 为 A、D 或 R; X_{106} 为 A 或 G; X_{107} 为 L 或 V; X_{108} 为 H 或 R; 和 X_{109} 为 A、L、S 或 V。
	亚属 9.4: $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 429), 其中 X_{102} 为 R; X_{103} 为 R; X_{104} 为 A 或 H; X_{105} 为 A 或 D; X_{106} 为 G; X_{107} 为 L 或 V; X_{108} 为 R; 和 X_{109} 为 A、S 或 V。

核心 CM 共有序列 9	核心 CM 共有序列 9 的亚属
	亚属 9.5 : $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 430), 其中 X_{102} 为 D、F、G、I、L、R、S 或 T; X_{103} 为 E、L、M、R、S、T 或 V; X_{104} 为 H 或 N; X_{105} 为 A、D、L、M、R 或 T; X_{106} 为 A、G、R 或 T; X_{107} 为 C、L、M、S、V 或 W; X_{108} 为 A、E、F、G、L、R、S 或 W; 和 X_{109} 为 A、G、L、P、R、S 或 V。
	亚属 9.6 : $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 431), 其中 X_{102} 为 F、I、R 或 S; X_{103} 为 E、L、R 或 V; X_{104} 为 H; X_{105} 为 D、M、R 或 T; X_{106} 为 A 或 G; X_{107} 为 L、M、S 或 V; X_{108} 为 E、R 或 S; 和 X_{109} 为 A、P、S 或 V。
	亚属 9.7 : $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 432), 其中 X_{102} 为 I 或 R; X_{103} 为 E、R 或 V; X_{104} 为 H; X_{105} 为 D、M、R 或 T; X_{106} 为 A 或 G; X_{107} 为 L 或 V; X_{108} 为 R 或 S; 和 X_{109} 为 A、P、S 或 V。
	亚属 9.8 : $X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}$ (SEQ ID NO: 433), 其中 X_{102} 为 I 或 R; X_{103} 为 R; X_{104} 为 H; X_{105} 为 D; ; X_{106} 为 A 或 G; X_{107} 为 L 或 V; X_{108} 为 R 或 S; 和 X_{109} 为 A 或 S。

表8J.MMP14可切割核心CM共有序列10

核心 CM 共有序列 10	核心 CM 共有序列 10 的亚属
$X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 436), 其中 X_{112} 为 A、D、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、W 或 Y; X_{113} 为 A、D、G、H、L、M、N、P、Q、R、S、V 或 Y; X_{114} 为 A、H、K、L、N、P、Q、R、S、T 或 V;	亚属 10.1: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 437), 其中 X_{112} 为 A、I、P、S、T、V 或 Y; X_{113} 为 A、D、G、L、M、Q、R、S、V 或 Y; X_{114} 为 A、H、K、L、N、S 或 T; X_{115} 为 G、H、I、L、S 或 V; X_{116} 为 I、L 或 V; X_{117} 为 A、F、G、K、R、S 或 W; X_{118} 为 D、H、L、M、N、Q、R 或 V; 和 X_{119} 为 A、I、L 或 V。
X_{115} 为 A、D、F、G、H、I、L、P、R、S、V 或 Y; X_{116} 为 C、F、I、L、P、V 或 Y; X_{117} 为 A、D、E、F、G、I、K、M、N、R、S、T、V 或 W; X_{118} 为 A、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、V 或 Y; 和 X_{119} 为 A、F、I、L、M 或 V。	亚属 10.2: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 438), 其中 X_{112} 为 A、I、T 或 V; X_{113} 为 A、L、M、Q、R、V 或 Y; X_{114} 为 A、N、S 或 T; X_{115} 为 G、L、S 或 V; X_{116} 为 L 或 V; X_{117} 为 A、F、G、K 或 S; X_{118} 为 M、N、Q、R 或 V; 和 X_{119} 为 I、L 或 V。
	亚属 10.3: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 439), 其中 X_{112} 为 A、I、T 或 V; X_{113} 为 M、Q 或 Y; X_{114} 为 A、N 或 S; X_{115} 为 G、L、S 或 V; X_{116} 为 L 或 V; X_{117} 为 A、F、G 或 S; X_{118} 为 M、N、Q 或 R; 和 X_{119} 为 I、L 或 V。
	亚属 10.4: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 440), 其中 X_{112} 为 A、I 或 V; X_{113} 为 Y; X_{114} 为 N 或 S; X_{115} 为 G、L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 A、G 或 S; X_{118} 为 M、Q 或 R; 和 X_{119} 为 L 或 V。

核心 CM 共有序列 10	核心 CM 共有序列 10 的亚属
	亚属 10.5： $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 441)，其中 X_{112} 为 A、I 或 V； X_{113} 为 Y； X_{114} 为 N 或 S； X_{115} 为 G、L 或 V； X_{116} 为 L； X_{117} 为 G 或 S； X_{118} 为 M 或 R；和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.6： $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 442)，其中 X_{112} 为 A、I 或 V； X_{113} 为 Y； X_{114} 为 N 或 S； X_{115} 为 G、L 或 V； X_{116} 为 L； X_{117} 为 S； X_{118} 为 M 或 R；和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.7： $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 443)，其中 X_{112} 为 A； X_{113} 为 Y； X_{114} 为 N 或 S； X_{115} 为 G 或 L； X_{116} 为 L； X_{117} 为 S； X_{118} 为 R；和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.8： $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 444)，其中 X_{112} 为 A、D、G、I、L、N、P、S、T、V、W 或 Y； X_{113} 为 A、D、G、L、M、Q、S 或 V； X_{114} 为 H、K、N、P、Q、R、S 或 T； X_{115} 为 H、I、L、R 或 V； X_{116} 为 I、L、P 或 V； X_{117} 为 A、D、E、G、I、K、M、N、S 或 T； X_{118} 为 D、F、L、M、Q、R 或 V；和 X_{119} 为 A、F、I、L 或 V。

核心 CM 共有序列 10	核心 CM 共有序列 10 的亚属
	亚属 10.9: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 445), 其中 X_{112} 为 A、I、T 或 V; X_{113} 为 A、D、G、L、M、Q、S 或 V; X_{114} 为 H、K、N、S 或 T; X_{115} 为 H、I、L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 A、G、K 或 S; X_{118} 为 L、M、Q、R 或 V; 和 X_{119} 为 A、L 或 V。
	亚属 10.10: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 446), 其中 X_{112} 为 A 或 I; X_{113} 为 A、L 或 Q; X_{114} 为 N、S 或 T; X_{115} 为 L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 A、G、K 或 S; X_{118} 为 M、R 或 V; 和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.11: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 447), 其中 X_{112} 为 A 或 I; X_{113} 为 A、L 或 Q; X_{114} 为 N 或 S; X_{115} 为 L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 A 或 S; X_{118} 为 M 或 R; 和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.12: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 448), 其中 X_{112} 为 I; X_{113} 为 A、L 或 Q; X_{114} 为 N; X_{115} 为 L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 A 或 S; X_{118} 为 M 或 R; 和 X_{119} 为 L 或 V。
	亚属 10.13: $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (SEQ ID NO: 449), 其中 X_{112} 为 I; X_{113} 为 A、L 或 Q; X_{114} 为 N; X_{115} 为 L 或 V; X_{116} 为 L; X_{117} 为 S; X_{118} 为 M; 和 X_{119} 为 L 或 V。

表8K. MMP14可切割核心CM共有序列11

核心 CM 共有序列 11	核心 CM 共有序列 11 的亚属
X ₁₂₂ X ₁₂₃ X ₁₂₄ X ₁₂₅ X ₁₂₆ X ₁₂₇ X ₁₂₈ X ₁₂₉ (SEQ ID NO: 453), 其 中 X ₁₂₂ 为 A、G、H、L、P、R、 S 或 V; X ₁₂₃ 为 A、G、R、S、T 或 V; X ₁₂₄ 为 A、G、P、R、S 或 T; X ₁₂₅ 为 H、I、L、P、R 或 V; X ₁₂₆ 为 L 或 W; X ₁₂₇ 为 F、H、L、M、Q、S、 V 或 Y; X ₁₂₈ 为 A、D、E、I、K、P、 R、S、T 或 V; 和 X ₁₂₉ 为 A、E、F、G、H、I、 L、N、P、Q、R 或 V。	亚属 11.1 : X ₁₂₂ X ₁₂₃ X ₁₂₄ X ₁₂₅ X ₁₂₆ X ₁₂₇ X ₁₂₈ X ₁₂₉ (SEQ ID NO: 454), 其中 X ₁₂₂ 为 A、G、P、R 或 S; X ₁₂₃ 为 A、R 或 S; X ₁₂₄ 为 G、P、S 或 T; X ₁₂₅ 为 L 或 V; X ₁₂₆ 为 W; X ₁₂₇ 为 L、S、V 或 Y; X ₁₂₈ 为 D、E、P 或 T; 和 X ₁₂₉ 为 Q、Q 或 V。 亚属 11.2 : X ₁₂₂ X ₁₂₃ X ₁₂₄ X ₁₂₅ X ₁₂₆ X ₁₂₇ X ₁₂₈ X ₁₂₉ (SEQ ID NO: 455), 其中 X ₁₂₂ 为 G、P、R 或 S; X ₁₂₃ 为 A 或 R; X ₁₂₄ 为 G、P 或 S; X ₁₂₅ 为 L 或 V; X ₁₂₆ 为 W; X ₁₂₇ 为 L 或 Y; X ₁₂₈ 为 E 或 T; 和 X ₁₂₉ 为 Q。 亚属 11.3 : X ₁₂₂ X ₁₂₃ X ₁₂₄ X ₁₂₅ X ₁₂₆ X ₁₂₇ X ₁₂₈ X ₁₂₉ (SEQ ID NO: 456), 其中 X ₁₂₂ 为 P; X ₁₂₃ 为 A; X ₁₂₄ 为 P 或 S; X ₁₂₅ 为 L 或 V; X ₁₂₆ 为 W; X ₁₂₇ 为 Y; X ₁₂₈ 为 T; 和 X ₁₂₉ 为 Q。

表8L.MMP14可切割核心CM共有序列12

核心 CM 共有序列 12	核心 CM 共有序列 12 的亚属
X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 458), 其中 X ₂ 为 A、D、E、F、 G、H、I、L、M、N、 P、Q、R、S、T、V	亚属 12.1: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 459), 其 中 X ₂ 为 A、G、L、P 或 S; X ₃ 为 A、E、G、H、L、 P、Q、S、T 或 V; X ₄ 为 G、N、R 或 S; X ₅ 为 L、P 或 S; X ₆ 为 I 或 L; X ₇ 为 A、G、N、Q、R 或 S; X ₈ 为 D、F、G、I、L、M、P、S 或 V; 和 X ₉ 为 F、G、 L、P、Q、R 或 S。

核心 CM 共有序列 12	核心 CM 共有序列 12 的亚属
或 Y; X ₃ 为A、E、F、G、 H、I、K、L、M、P、 Q、R、S、T、V、W	亚属 12.2: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 460), 其 中 X ₂ 为A、P或S; X ₃ 为L、S或V; X ₄ 为G、N、 R或S; X ₅ 为L、P或S; X ₆ 为L; X ₇ 为A、G、R 或S; X ₈ 为L、P或V; 和 X ₉ 为F、L、P或S。
或 Y; X ₄ 为A、E、G、H、 K、N、P、R、S、T、 V或Y;	亚属 12.3: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 461), 其 中 X ₂ 为A、P或S; X ₃ 为L、S或V; X ₄ 为G、N、 R或S; X ₅ 为L、P或S; X ₆ 为L; X ₇ 为A、G、R 或S; X ₈ 为L或P; 和 X ₉ 为F、P或S。
X ₅ 为A、G、H、I、 L、N、P、R、S、T 或V; X ₆ 为I、L、M、Q、 T、V、W或Y;	亚属 12.4: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 462), 其 中 X ₂ 为A、P或S; X ₃ 为L或V; X ₄ 为G、N或S; X ₅ 为L或S; X ₆ 为L; X ₇ 为A、G、R或S; X ₈ 为L 或P; 和 X ₉ 为P或S。
X ₇ 为A、D、G、H、 K、L、N、P、Q、R、 S、T或V; X ₈ 为A、D、E、F、 G、I、K、L、M、P、 Q、R、S、V、W或 Y; 和 X ₉ 为A、F、G、I、L、 M、N、P、Q、R、S、 T、V或Y。	亚属 12.5: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 463), 其 中 X ₂ 为A或S; X ₃ 为L; X ₄ 为G、N或S; X ₅ 为L 或S; X ₆ 为L; X ₇ 为R或S; X ₈ 为L; 和 X ₉ 为P。
	亚属 12.6: X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ (SEQ ID NO: 464), 其 中 X ₂ 为A、E、G、H、I、L、M、P或S; X ₃ 为A、 E、G、H、I、K、L、P、Q、R、S、T、V、W或Y; X ₄ 为A、G、N、R、S、T或V; X ₅ 为A、G、H、L、 N、P、R、S、T或V; X ₆ 为I、L、M或Q; X ₇ 为A、 D、G、K、L、N、Q、R、S或V; X ₈ 为A、D、E、 F、G、I、K、L、M、P、R、V、W或Y; 和 X ₉ 为 A、F、G、M、P、Q、R、S、V或Y。

核心 CM 共有序列 12	核心 CM 共有序列 12 的亚属
	亚属 12.7: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 465), 其中 X_2 为 A、P 或 S; X_3 为 A、H、Q、S 或 V; X_4 为 G、N 或 S; X_5 为 L、P 或 S; X_6 为 L; X_7 为 A、D、G、R 或 S; X_8 为 F、I、L、M 或 P; 和 X_9 为 F、P、Q 或 R。
	亚属 12.8: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 466), 其中 X_2 为 A、P 或 S; X_3 为 H、S 或 V; X_4 为 G、N 或 S; X_5 为 L、P 或 S; X_6 为 L; X_7 为 A、G、R 或 S; X_8 为 F、I、M 或 P; 和 X_9 为 P 或 R。
	亚属 12.9: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 467), 其中 X_2 为 A、P 或 S; X_3 为 S 或 V; X_4 为 G、N 或 S; X_5 为 L; X_6 为 L; X_7 为 A、G 或 R; X_8 为 F、I 或 P; 和 X_9 为 P。
	亚属 12.10: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 468), 其中 X_2 为 A、P 或 S; X_3 为 S 或 V; X_4 为 G、N 或 S; X_5 为 L; X_6 为 L; X_7 为 A 或 R; X_8 为 F 或 P; 和 X_9 为 P。
	亚属 12.11: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 469), 其中 X_2 为 A 或 P; X_3 为 S; X_4 为 G 或 N; X_5 为 L; X_6 为 L; X_7 为 R; X_8 为 F; 和 X_9 为 P。

表8M.MMP14可切割核心CM共有序列13

核心 CM 共有序列 13	核心 CM 共有序列 13 的亚属
$X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 473), 其中 X_{12} 为 F、I、L、M、S 或 V; X_{13} 为 A、E、H、K、L、M、N、Q、S、T、V 或 Y; X_{14} 为 A、F、H、L、M、Q、S、T 或 V; X_{15} 为 A、G 或 P; X_{16} 为 A、F、G、H、I、L、M、N、R、S、V 或 Y; X_{17} 为 A、E、G、H、L、M、P、Q、R、S、T 或 V; X_{18} 为 A、D、E、F、G、H、I、M、N、R、S、V 或 Y; 和 X_{19} 为 A、F、G、I、L、M、P、Q、R、S、W 或 Y。	亚属 13.1: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 475), 其中 X_{12} 为 F、I、L、M、S 或 V; X_{13} 为 A、E、H、K、L、M、N、Q、S、T、V 或 Y; X_{14} 为 A、F、H、L、M、Q、S、T 或 V; X_{15} 为 A、G 或 P; X_{16} 为 A、F、G、H、I、L、M、N、R、S、V 或 Y; X_{17} 为 A、E、G、H、L、M、P、Q、R、S、T 或 V; X_{18} 为 A、D、E、F、G、H、L、M、N、R、S、V 或 Y; 和 X_{19} 为 A、F、G、I、L、M、P、Q、R、S、W 或 Y。
$X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 473), X_{12} 为 F、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X_{13} 为 A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X_{14} 为 A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X_{15} 为 A、E、G、N、P、Q、S、T、V 或 W; X_{16} 为 A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X_{17} 为 A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; X_{18} 为 A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y; 和 X_{19} 为 A、D、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V 或 Y。	亚属 13.2: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 476), 其中 X_{12} 为 L、M 或 V; X_{13} 为 A、H、L、N、Q、S 或 V; X_{14} 为 A、L、M、Q、S、T 或 V; X_{15} 为 P; X_{16} 为 A、F、G、I、L、R、S、V 或 Y; X_{17} 为 H、L、M、Q 或 S; X_{18} 为 A、D、G、H、R 或 S; 和 X_{19} 为 A、F、G、L、R 或 S。
	亚属 13.3: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 477), 其中 X_{12} 为 L、M 或 V; X_{13} 为 A 或 L; X_{14} 为 A、L 或 S; X_{15} 为 P; X_{16} 为 L 或 V; X_{17} 为 H、L 或 Q; X_{18} 为 G 或 S; 和 X_{19} 为 G、R 或 S。
	亚属 13.4: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 478), 其中 X_{12} 为 L 或 V; X_{13} 为 A 或 L; X_{14} 为 L 或 S; X_{15} 为 P; X_{16} 为 L 或 V; X_{17} 为 H 或 L; X_{18} 为 G 或 S; 和 X_{19} 为 R 或 S。
	亚属 13.5: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 479), 其中 X_{12} 为 L 或 V; X_{13} 为 A 或 L; X_{14} 为 L 或 S; X_{15} 为 P; X_{16} 为 L; X_{17} 为 H 或 L; X_{18} 为 G; 和 X_{19} 为 S。

核心 CM 共有序列 13	核心 CM 共有序列 13 的亚属
	亚属 13.6: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 480), 其中 X_{12} 为 F、I、L、M、S、T 或 V; X_{13} 为 A、E、G、H、L、M、S、V、W 或 Y; X_{14} 为 A、D、E、G、K、L、M、N、Q、R、S、T 或 V; X_{15} 为 E、G、N、P、S、T 或 V; X_{16} 为 A、F、G、L、N、P、Q、R、S、V 或 Y; X_{17} 为 A、E、H、P、Q 或 R; X_{18} 为 D、E、G、N、R、S 或 T; 和 X_{19} 为 A、D、G、Q、S、T 或 V。
	亚属 13.7.: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO:481), 其中 X_{12} 为 L、M 或 V; X_{13} 为 A 或 L; X_{14} 为 A、L、Q 或 S; X_{15} 为 G、P 或 T; X_{16} 为 A、S 或 Y; X_{17} 为 H 或 P; X_{18} 为 D 或 G; 和 X_{19} 为 A、G 或 S。
	亚属 13.7: $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}$ (SEQ ID NO: 482), 其中 X_{12} 为 L 或 M; X_{13} 为 A 或 L; X_{14} 为 L; X_{15} 为 G 或 P; X_{16} 为 A 或 S; X_{17} 为 H; X_{18} 为 G; 和 X_{19} 为 A 或 G。

在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:352、371、394、410、425、436、453、458、473、485和486的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:353-363、372-375、376-378、395-401、411-419、426-433、437-449、454-456、459-469、475-482和487-495的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:353-363的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自372-375的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自376-378的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自395-401的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自411-419的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自426-433的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自437-449的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自454-456的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选459-469的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自475-482的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自487-495的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:317、324、329和340的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:318-323、325-327、330-335和341-347的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:318-323的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:325-327的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:330-335的氨基酸序列。在一些实施方案中,CM包含选自SEQ ID NO:341-347的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列RPSPMWAY (SEQ ID NO:21)的核心CM共

有序列1序列。

[0031] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列WDHPISLL (SEQ ID NO:328) 的核心CM共有序列2序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列WATPRPMR (SEQ ID NO:22) 的核心CM共有序列2序列。

[0032] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LTFPTYIF (SEQ ID NO:336) 的核心CM共有序列3序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列MTFPTYIF (SEQ ID NO:337) 的核心CM共有序列3序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LTFPTYWF (SEQ ID NO:338) 的核心CM共有序列3序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列MTFPTYWF (SEQ ID NO:339) 的核心CM共有序列3序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列STFPFGMF (SEQ ID NO:17) 的核心CM共有序列3序列。

[0033] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列DWLYWMGI (SEQ ID NO:348) 的核心CM共有序列4序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列DWLYWPGI (SEQ ID NO:19) 的核心CM共有序列4序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列DWLYWMSI (SEQ ID NO:349) 的核心CM共有序列4序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列DWLYWPSI (SEQ ID NO:350) 的核心CM共有序列4序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列HWHLGPPT (SEQ ID NO:351) 的核心CM共有序列4序列。

[0034] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列SVSGLLSH (SEQ ID NO:364) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列SVSGLLSS (SEQ ID NO:365) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列SVSGLRSH (SEQ ID NO:366) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列SVSGLRSS (SEQ ID NO:367) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列TLSGLRSP (SEQ ID NO:368) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列TSSGLRSP (SEQ ID NO:369) 的核心CM共有序列5序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列TVSGLRSP (SEQ ID NO:370) 的核心CM共有序列5序列。

[0035] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列AFQALRM (SEQ ID NO:379) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列AHQALRM (SEQ ID NO:380) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ANQALRM (SEQ ID NO:381) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ANQALRMA (SEQ ID NO:382) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLEALRAL (SEQ ID NO:383) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLNALRAL (SEQ ID NO:384) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLQALRAL (SEQ ID NO:385) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLSALRAL (SEQ ID NO:386) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLESRLAL (SEQ ID NO:387) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLNSLRAL (SEQ ID NO:388) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLQSLRAL (SEQ ID NO:389) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLSSLRAL (SEQ ID NO:390) 的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列QFQALRM (SEQ ID NO:391) 的核心CM共有序列6序

列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列QHQALRM (SEQ ID NO:392)的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列QNQALRM (SEQ ID NO:393)的核心CM共有序列6序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列QNQALRMA (SEQ ID NO:15)的核心CM共有序列6序列。

[0036] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LKAAPVWA (SEQ ID NO:403)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LKAAPRWF (SEQ ID NO:404)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LYAAPVWF (SEQ ID NO:405)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LYAAPRWA (SEQ ID NO:406)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LYAAPVWA (SEQ ID NO:407)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LYAAPRWF (SEQ ID NO:408)的核心CM共有序列7序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LYAAPVWF (SEQ ID NO:409)的核心CM共有序列7序列。

[0037] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPAGLLL (SEQ ID NO:402)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPAGLLLR (SEQ ID NO:420)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPAHLVLL (SEQ ID NO:421)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPSHLVLL (SEQ ID NO:422)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPAHLVLV (SEQ ID NO:423)的核心CM共有序列8序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LPSHLVLV (SEQ ID NO:424)的核心CM共有序列8序列。

[0038] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列RMHLRSLG (SEQ ID NO:29)的核心CM共有序列9序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列RRHDGLRA (SEQ ID NO:434)的核心CM共有序列9序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列RRHDGLRS (SEQ ID NO:435)的核心CM共有序列9序列。

[0039] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列AQNLLGMV (SEQ ID NO:16)的核心CM共有序列10序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列IANLLSMV (SEQ ID NO:450)的核心CM共有序列10序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ILNLLSMV (SEQ ID NO:451)的核心CM共有序列10序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列IQNLLSMV (SEQ ID NO:452)的核心CM共有序列10序列。

[0040] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列PAGLWLDP (SEQ ID NO:33)的核心CM共有序列11序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列PASLWYTQ (SEQ ID NO:457)的核心CM共有序列11序列。

[0041] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ALGLLRLP (SEQ ID NO:470)的核心CM共有序列12序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ALGLLSLP (SEQ ID NO:471)的核心CM共有序列12序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列ASGLLRFP (SEQ ID NO:472)的核心CM共有序列12序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)的核心CM共有序列12序列。

[0042] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)的核心CM共

有序列13序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLAPSHRA(SEQ ID NO:32)的核心CM共有序列13序列。

[0043] 在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLLPAHGG(SEQ ID NO:474)的核心CM共有序列13序列。在一些实施方案中,CM含有包含氨基酸序列LLLPLLGS(SEQ ID NO:483)的核心CM共有序列13序列。

[0044] 在一些实施方案中,CM是至少2种蛋白酶的底物。在一些实施方案中,至少一种蛋白酶是MMP,且至少一种蛋白酶选自表7所示蛋白酶。

[0045] 表7:示例性蛋白酶和/或酶

ADAMS, ADAMTS, 例如 ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE	半胱氨酸蛋白酶, 例如, Cruzipain Legumain Otubain-2	丝氨酸蛋白酶, 例如, 激活性蛋白 C 组织蛋白酶 A 组织蛋白酶 G 类胰凝乳蛋白酶 凝固因子蛋白酶 (例如, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	KLKs, 例如, KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8	弹性蛋白酶 粒酶 B 胍基苯甲酸酶 (Guanidinobenzoatase)
天冬氨酸蛋白酶, 例如, BACE 肾素	KLK10 KLK11 KLK13 KLK14	HtrA1 人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 乳转铁蛋白 Marapsin NS3/4A
天冬氨酸组织蛋白酶, 例如, 组织蛋白酶 D 组织蛋白酶 E	金属蛋白酶, 例如, 跨膜肽酶 中性溶酶 PSMA BMP-1	PACE4 纤溶酶 PSA tPA 凝血酶 uPA
胱天蛋白酶, 例如, 胱天蛋白酶 1 胱天蛋白酶 2 胱天蛋白酶 3 胱天蛋白酶 4 胱天蛋白酶 5 胱天蛋白酶 6 胱天蛋白酶 7 胱天蛋白酶 8 胱天蛋白酶 9 胱天蛋白酶 10	MMPs, 例如, MMP1 MMP2 MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11	II型跨膜 丝氨酸蛋白酶(TTSP), 例如, DESC1 DPP-4 FAP Hepsin 基质蛋白酶-2

胱天蛋白酶 14	MMP12	MT-SP1/基质蛋白酶
半胱氨酸组织蛋白酶, 例如,	MMP13	TMPRSS2
组织蛋白酶 B	MMP14	TMPRSS3
组织蛋白酶 C	MMP15	TMPRSS4
组织蛋白酶 K	MMP16	
组织蛋白酶 L	MMP17	
组织蛋白酶	MMP19	
组织蛋白酶 V/L2	MMP20	
组织蛋白酶 X/Z/P	MMP23	
	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

在一些实施方案中,抗体包括至少第一CM和第二CM。在一些实施方案中,第一CM和第二CM各自为不超过15个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中,未切割状态下的抗体的第一CM和第二CM具有如下从N端到C端的结构排列:作用剂-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-作用剂、作用剂-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-作用剂。在一些实施方案中,可激活抗体包括在作用剂和CM1之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM1和CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在作用剂和CM1之间的连接肽和在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在作用剂和CM1之间的连接肽和在CM1和CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM1和CM2之间的连接肽和在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在作用剂和CM1之间的连接肽、在CM1和CM2之间的连接肽和在CM2和AB之间的连接肽。

[0046] 在一些实施方案中,可激活抗体包括包括至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一CM和包括底物序列的第二CM。第二CM(CM2)的示例性底物包括但不限于可被下表7所列的酶或蛋白酶的一种或多种切割的底物。

[0047] 在一些实施方案中,选择CM2与特定蛋白酶一起使用。在一些实施方案中,CM2是选自以下至少一种蛋白酶的底物:基质金属蛋白酶(MMP)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、u型纤溶酶原激活物(uPA、亦称为尿激酶)、legumain、基质蛋白酶(本文亦称为MT-SP1或MTSP1)、凝血酶、半胱氨酸蛋白酶例如组织蛋白酶、ADAM17、BMP-1、HtrA1和TMPRSS例如TMPRSS3或TMPRSS4。

[0048] 在一些实施方案中,CM2是嗜中性粒细胞弹性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是uPA的底物。在一些实施方案中,CM2是legumain的底物。在一些实施方案中,CM2是基质蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是凝血酶的底物。在一些实施方案中,CM2是半胱氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是组织蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是ADAM17的底物。在一些实施方案中,CM2是BMP-1的底物。在一些实施方案中,CM2是HtrA1的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS3的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS4的底物。

[0049] 例如,合适的CM2被至少一种蛋白酶切割并包括序列TGRGPSWV (SEQ ID NO:34)、

SARGPSRW (SEQ ID NO:35)、TARGPSFK (SEQ ID NO:36)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:37)、GGWHTGRN (SEQ ID NO:38)、HTGRSGAL (SEQ ID NO:39)、PLTGRSGG (SEQ ID NO:40)、AARGPAIH (SEQ ID NO:41)、RGPAFNPM (SEQ ID NO:42)、SSRGPAYL (SEQ ID NO:43)、RGPATPIM (SEQ ID NO:44)、RGPA (SEQ ID NO:45)、GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:46)、FPRPLGITGL (SEQ ID NO:47)、VHMPLGFLGP (SEQ ID NO:48)、SPLTGRSG (SEQ ID NO:49)、SAGFSLPA (SEQ ID NO:126)、LAPLGLQRR (SEQ ID NO:50)、SGGPLGV (SEQ ID NO:51)、PLGL (SEQ ID NO:52)、GPRSFG (SEQ ID NO:315) 和/或 GPRSFG (SEQ ID NO:316)。

[0050] 在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列TGRGPSWV (SEQ ID NO:34)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SARGPSRW (SEQ ID NO:35)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列TARGPSFK (SEQ ID NO:36)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列LSGRSDNH (SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GGWHTGRN (SEQ ID NO:38)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列HTGRSGAL (SEQ ID NO:39)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列PLTGRSGG (SEQ ID NO:40)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列AARGPAIH (SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPAFNPM (SEQ ID NO:42)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SSRGPAYL (SEQ ID NO:43)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPATPIM (SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPA (SEQ ID NO:45)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列FPRPLGITGL (SEQ ID NO:47)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列VHMPLGFLGP (SEQ ID NO:48)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SPLTGRSG (SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列LAPLGLQRR (SEQ ID NO:50)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SGGPLGV (SEQ ID NO:51)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列PLGL (SEQ ID NO:52)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GPRSFG (SEQ ID NO:315)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GPRSFG (SEQ ID NO:316)。

[0051] 在一些实施方案中,CM2是至少一种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是表7所列的至少一种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是MMP9的底物。在一些实施方案中,CM2是MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1是第一MMP的底物,CM2是第二MMP的底物,其中第一MMP和第二MMP是不同的MMP。在一些实施方案中,CM1是MMP的第一底物序列,CM2是相同MMP的第二底物序列,其中CM1和CM2具有不同的底物序列。在一些实施方案中,CM2是两种或更多种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是至少MMP9或MMP14的底物。在一些实施方案中,CM2是两种或更多种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是至少MMP9和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1和CM2是MMP9的两种底物。在一些实施方案中,CM1和CM2是MMP14的两种底物。在一些实施方案中,CM1是MMP9的底物,CM2是MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1是MMP14的底物,CM2是MMP9的底物。

[0052] 在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一种是MMP的底物并包括序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)、QNQALRMA (SEQ ID NO:15)、AQNLGMV (SEQ ID NO:16)、STFPFGMF (SEQ ID NO:17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)、RPSPMWY (SEQ ID NO:21)、WATPRPMR (SEQ ID NO:22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)、LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)、LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)、RMHLRSLG (SEQ ID NO:29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)、

AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)、LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)、PAGLWLDP (SEQ ID NO:33) 和/或 ISSGLSS (SEQ ID NO:159)。

[0053] 在一些实施方案中,第一切割剂 (cleaving agent) 和第二切割剂是相同的蛋白酶,第一CM和第二CM是该酶的不同底物。在一些实施方案中,第一切割剂和第二切割剂是不同的蛋白酶。在一些实施方案中,第一切割剂和第二切割剂共定位于靶组织中。在一些实施方案中,第一CM和第二CM被靶组织中的至少一种切割剂切割。

[0054] 在一些实施方案中,与AB缀合的作用剂是治疗剂。在一些实施方案中,作用剂是抗肿瘤剂。在一些实施方案中,作用剂是毒素或其片段。如本文所用,毒素的片段是保持毒素活性的片段。在一些实施方案中,作用剂通过可切割接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂通过包括至少一种MMP可切割底物序列的接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂通过不可切割接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,作用剂是核酸损伤剂,例如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,作用剂是选自表3所列的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀E (MMAE)。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀D (MMAD)。在一些实施方案中,作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是吡咯并苯并二氮杂草 (pyrrolobenzodiazepine)。

[0055] 在一些实施方案中,作用剂是抗炎药。

[0056] 在一些实施方案中,抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0057] 在一些实施方案中,缀合抗体和/或缀合的可激活抗体包括可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记包括成像剂、造影剂、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。在一些实施方案中,成像剂包含放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素是铟或锝。在一些实施方案中,造影剂包含碘、钆或氧化铁。在一些实施方案中,酶包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在一些实施方案中,荧光标记包含黄色荧光蛋白 (YFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、绿色荧光蛋白 (GFP)、改进的红色荧光蛋白 (mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2 (RFPtdimer2)、HCRED或铕衍生物。在一些实施方案中,发光标记包含N-methylacrydium衍生物。在一些实施方案中,标记包含AlexaFluor®标记,例如 AlexaFluor®680或AlexaFluor®750。在一些实施方案中,基于配体的标记包含生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或一种或多种半抗原。

[0058] 在一些实施方案中,抗体的AB天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,可对AB进行改造以包括一个或多个二硫键。

[0059] 在一些实施方案中,抗体和/或缀合抗体是单特异性的。在一些实施方案中,抗体和/或缀合抗体是多特异性的,在本文称为多特异性抗体和/或缀合的多特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体和/或缀合的多特异性抗体是二特异性的或三官能性的。在一些实施方案中,将抗体和/或缀合抗体配制为双特异性T细胞衔接器前体 (pro-Bispecific

T Cell Engager, pro-BITE) 分子的一部分。在一些实施方案中,将抗体和/或缀合抗体配制成为嵌合抗原受体前体 (pro-Chimeric Antigen Receptor, pro-CAR) 修饰的T细胞或其它改造的受体的一部分。

[0060] 在一些实施方案中,可激活抗体和/或缀合的可激活抗体是单特异性的。在一些实施方案中,可激活抗体和/或缀合的可激活抗体是多特异性的,在本文称为多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体。本文所用术语例如“可激活抗体”及其所有语法变化,除非另有说明,否则欲包括但不限于其中可激活抗体是本公开内容的多特异性可激活抗体的实施方案。本文所用术语例如“缀合的可激活抗体”及其所有语法变化,除非另有说明,否则欲包括但不限于其中缀合的可激活抗体是本公开内容的缀合的多特异性可激活抗体的实施方案。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体是二特异性的或三官能性的。在一些实施方案中,将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体配制成为双特异性T细胞衔接器前体 (pro-BITE) 分子的一部分。在一些实施方案中,将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体配制成为嵌合抗原受体前体 (pro-CAR) 修饰的T细胞或其它改造的受体的一部分。

[0061] 在一些实施方案中,本文所述可激活抗体、缀合的可激活抗体、多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体与一种或多种其它作用剂或其它作用剂的组合联用。合适的其它作用剂包括用于既定应用(例如癌症)的现有药物和/或手术疗法。例如,可激活抗体、缀合的可激活抗体、多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体可与其它化疗剂或抗肿瘤剂联用。

[0062] 在活化状态下的本文所述可激活抗体结合指定靶标并包括 (i) 与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段 (AB); (ii) 未切割状态下的抑制 AB 与靶标结合的掩蔽部分 (MM); 和 (c) 与 AB 偶联的可切割部分 (CM), 其中 CM 是用作基质金属蛋白酶的底物的多肽。

[0063] 在一些实施方案中,未切割状态下的可激活抗体具有如下从 N 端到 C 端的结构排列: MM-CM-AB 或 AB-CM-MM。

[0064] 在一些实施方案中,可激活抗体包含在 MM 和 CM 之间的连接肽。

[0065] 在一些实施方案中,可激活抗体包含在 CM 和 AB 之间的连接肽。

[0066] 在一些实施方案中,可激活抗体包含第一连接肽 (LP1) 和第二连接肽 (LP2), 且未切割状态下的可激活抗体具有如下从 N 端到 C 端的结构排列: MM-LP1-CM-LP2-AB 或 AB-LP2-CM-LP1-MM。

[0067] 在一些实施方案中,LP1 和 LP2 各自为长度为约 1-20 个氨基酸的肽。

[0068] 在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。

[0069] 在一些实施方案中,LP1 或 LP2 的至少一个包含选自以下的氨基酸序列: (GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO:1) 和 (GGGS)_n (SEQ ID NO:2), 其中 n 为至少 1 的整数。

[0070] 在一些实施方案中,LP1 或 LP2 的至少一个包含选自以下的氨基酸序列: GGSG (SEQ ID NO:3)、GGSGG (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:5)、GSGGG (SEQ ID NO:6)、GGGSG (SEQ ID NO:7) 和 GSSSG (SEQ ID NO:8)。

[0071] 在一些实施方案中,LP1 包含氨基酸序列 GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS (SEQ ID NO:156) 或 GSSGGSGGS (SEQ ID NO:157)。

[0072] 在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:158)、GSSGT (SEQ ID NO:12) 或GSSG (SEQ ID NO:13)。

[0073] 在一些实施方案中,对于与靶标结合,AB具有约100nM或更小的平衡解离常数。

[0074] 在一些实施方案中,可激活抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段。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、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,结合靶标的所述抗体或其免疫活性片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0075] 在一些实施方案中,可激活抗体是多特异性可激活抗体。本文提供的多特异性可激活抗体是这样的多特异性抗体,其识别两种或更多种不同的抗原或表位,并包括与多特异性抗体的至少一个抗原结合结构域或表位结合结构域连接的至少一个掩蔽部分 (MM),使得MM的偶联降低抗原结合结构域或表位结合结构域结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM通过用作至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分 (CM) 与多特异性抗体的抗原结合结构域或表位结合结构域偶联。本文提供的可激活多特异性抗体在循环中是稳定的,在既定治疗和/或诊断部位被激活,但不在正常(即健康)组织中被激活,且当被激活时,显示至少与相应的未修饰的多特异性抗体相当的靶标结合。

[0076] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段 (AB1),其中VHCDR1序列、VHCDR2序列和VH CDR3序列的至少一个选自至少包括氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:498) 的VH CDR1序列;包括至少氨基酸序列SIDPEGRQTYYADSVKG (SEQ ID NO:499) 的VH CD2序列;包括至少氨基酸序列DIGGRSAFDY (SEQ ID NO:500) 的VH CDR3序列及其组合。

[0077] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段 (AB1),其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的至少一个选自至少包括氨基酸序列RASQSISSY (SEQ ID NO:501) 的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:502) 的VL CDR2序列;至少包括氨基酸序列QQTVVAPPL (SEQ ID NO:503) 的VL CDR3序列及其组合。

[0078] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段 (AB1),其中VHCDR1序列、VHCDR2序列和VH CDR3序列的至少一个选自包括与氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:498) 有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VH CDR1序列;包括与氨基酸序列SIDPEGRQTYYADSVKG (SEQ ID NO:499) 有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VH CD2序列;包括与氨基酸序列DIGGRSAFDY (SEQ ID NO:500) 有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或更高同一性的序列的VH CDR3序列及其组合。

[0079] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的至少一个选自包括与氨基酸序列RASQSISSY (SEQ ID NO:501)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VL CDR1序列;包括与氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:502)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VL CDR2序列;和包括与氨基酸序列QQTVVAPPL (SEQ ID NO:503)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VL CDR3序列及其组合。

[0080] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列、VH CDR3序列、VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列至少包括氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:498);VH CD2序列至少包括氨基酸序列SIDPEGRQTYYADSVKG (SEQ ID NO:499);VH CDR3序列至少包括氨基酸序列DIGGRSAFDY (SEQ ID NO:500);VL CDR1序列至少包括氨基酸序列RASQSISSY (SEQ ID NO:501);VL CDR2序列至少包括氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:502);且VLCDR3序列至少包括氨基酸序列QQTVVAPPL (SEQ ID NO:503)。

[0081] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性地结合Jagged靶标(例如Jagged 1和/或Jagged 2),并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列、VH CDR3序列、VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列包括与氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:498)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VH CD2序列包括与氨基酸序列SIDPEGRQTYYADSVKG (SEQ ID NO:499)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VH CDR3序列包括与氨基酸序列DIGGRSAFDY (SEQ ID NO:500)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VLCDR1序列包括与氨基酸序列RASQSISSY (SEQ ID NO:501)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VL CDR2序列包括与氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:502)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;和VL CDR3序列包括与氨基酸序列QQTVVAPPL (SEQ ID NO:503)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。

[0082] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的至少

一个选自至少包括氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:504)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFTS(SEQ ID NO:505)的VH CD2序列;至少包括氨基酸序列ALTYYDYEFA(SEQ ID NO:506)的VH CDR3序列;及其组合。

[0083] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合EGFR且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的至少一个选自至少包括氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:507)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:508)的VLCDR2序列;和至少包括氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:509)的VLCDR3序列及其组合。

[0084] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合EGFR且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的至少一个选自包括与氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:504)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VH CDR1序列;包括与氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFTS(SEQ ID NO:505)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VH CD2序列;包括与氨基酸序列ALTYYDYEFA(SEQ ID NO:506)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VH CDR3序列;及其组合。

[0085] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合EGFR且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的至少一个选自包括与氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:507)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VL CDR1序列;包括与氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:508)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VLCDR2序列;和包括与氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:509)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列的VL CDR3序列及其组合。

[0086] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合EGFR且含有VHCDR1序列、VHCDR2序列、VHCDR3序列、VLCDR1序列、VLCDR2序列和VL CDR3序列的组合的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列至少包括氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:504);VH CD2序列至少包括氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFTS(SEQ ID NO:505);VH CDR3序列至少包括氨基酸序列ALTYYDYEFA(SEQ ID NO:506);VLCDR1序列至少包括氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:507);VLCDR2序列至少包括氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:508);和VLCDR3序列至少包括氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:509)。

[0087] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限

于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,包括特异性结合EGFR且含有VHCDR1序列、VHCDR2序列、VHCDR3序列、VLCDR1序列、VLCDR2序列和VL CDR3序列的组合的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中VH CDR1序列包括与氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:504)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VH CD2序列包括与氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFTS(SEQ ID NO:505)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VH CDR3序列包括与氨基酸序列ALTYYDYEFA(SEQ ID NO:506)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VL CDR1序列包括与氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:507)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;VL CDR2序列包括与氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:508)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列;和VL CDR3序列包括与氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:509)有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。

[0088] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括选自SEQ ID NO:54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112和114的重链氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括选自SEQ ID NO:55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111和113的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括选自SEQ ID NO:54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112和114的重链氨基酸序列和选自SEQ ID NO:55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111和113的轻链氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括与选自以下的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的重链氨基酸序列:SEQ ID NO:54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112和114。在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括与选自以下的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的轻链氨基酸序列:SEQ ID NO:55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111和113。在一些实施方案中,本文提供的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体和/或缀合的多特异性可激活抗体,至少包括与选自以下的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的重链氨基酸序列:SEQ ID NO:54、56、57、58、61、63、65、68、

70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112和114和与选自以下的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的轻链氨基酸序列:SEQ ID NO:55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111和113。

[0090] 在一些实施方案中,对于与AB结合MM的平衡解离常数大于AB与靶标结合的平衡解离常数。

[0091] 在一些实施方案中,对于与AB结合MM的平衡解离常数不超过AB与靶标结合的平衡解离常数。

[0092] 在一些实施方案中,MM在切割状态下不干扰AB与靶标结合或不与AB竞争与靶标结合。

[0093] 在一些实施方案中,MM是约2-40个氨基酸长的多肽。例如,MM是至多40个氨基酸长的多肽。

[0094] 在一些实施方案中,MM多肽序列不同于AB的任何天然结合配偶体的序列。在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性。在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体有不超过40%、30%、25%、20%、15%或10%同一性。

[0095] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与其靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少2倍。

[0096] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与其靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少3倍。

[0097] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与其靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少5倍。

[0098] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与其靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少10倍。

[0099] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与其靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少20倍。

[0100] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少40倍。

[0101] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少100倍。

[0102] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少1000倍。

[0103] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低AB与靶标结合的能力,使得当与MM偶联时AB对于靶标的解离常数(K_d)是当不与MM偶联时AB对于靶标的 K_d 的至少10,000倍。

[0104] 在一些实施方案中,MMP蛋白酶与靶标共定位于组织中,且当可激活抗体暴露于MMP中时MMP切割可激活抗体中的CM。

[0105] 在一些实施方案中,在靶标存在下,当采用靶标置换测定法例如描述于PCT公布号WO 2009/025846和WO 2010/081173的测定法体外测定时,与当CM被切割时相比,当CM不被切割时MM降低AB与靶标结合的能力达至少90%。

[0106] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少2倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下(即,当可激活抗体在切割状态下),AB结合靶标。

[0107] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少5倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下(即,当可激活抗体在切割状态下),AB结合靶标。

[0108] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少10倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下(即,当可激活抗体在切割状态下),AB结合靶标。

[0109] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少20倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下(即,当可激活抗体在切割状态下),AB结合靶标。

[0110] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少40倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下,AB结合靶标。

[0111] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少50倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下,AB结合靶标。

[0112] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少100倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下,AB结合靶标。

[0113] 在一些实施方案中,CM位于可激活抗体中,使得在未切割状态下,可激活抗体与靶标的结合降低至以是与靶标结合的未修饰AB的平衡解离常数的至少200倍的平衡解离常数发生,而在切割状态下,AB结合靶标。

[0114] 在一些实施方案中，CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0115] 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是两种或更多种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的两种或更多种底物。在一些实施方案中,CM包含至少两种或更多种MMP9底物。在一些实施方案中,CM包含至少两种或更多种MMP14底物。

[0116] 在一些实施方案中, CM是MMP的底物并包括序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)、QNQALRMA (SEQ ID NO:15)、AQNLGMV (SEQ ID NO:16)、STFPFGMF (SEQ ID NO:17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)、RPSPMWAY (SEQ ID NO:21)、WATPRPMR (SEQ ID NO:22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)、LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)、LPGGLSPW (SEQ ID NO:26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)、RMHRLRSLG (SEQ ID NO:29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)、AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)。

NO:31)、LLAPSHRA(SEQ ID NO:32),PAGLWLDP(SEQ ID NO:33)和/或ISSGLSS(SEQ ID NO:159)。

[0117] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLSS(SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列QNQALRMA(SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AQNLGMV(SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列STFPFGMF(SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PVGYTSSL(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列DWLYWPGI(SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MIAPVAYR(SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RPSPMWAY(SEQ ID NO:21)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列WATPRPMR(SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列FRLLDWQW(SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LKAAPRWA(SEQ ID NO:24)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPSHLVLT(SEQ ID NO:25)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LPGGLSPW(SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MGLFSEAG(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SPLPLRVP(SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RMHLRSLG(SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LAAPLGLL(SEQ ID NO:30)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AVGLLAPP(SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LLAPSHRA(SEQ ID NO:32)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PAGLWLDP(SEQ ID NO:33)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLSS(SEQ ID NO:159)。

[0118] 在一些实施方案中,CM是至少2种蛋白酶的底物。在一些实施方案中,至少一种蛋白酶是MMP,且至少一种蛋白酶选自表7所示蛋白酶。

[0119] 在一些实施方案中,可激活抗体至少包括第一CM和第二CM。在一些实施方案中,第一CM和第二CM各自为不超过15个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中,在未切割状态下可激活抗体中的第一CM和第二CM具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-MM、MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。在一些实施方案中,可激活抗体包括在MM和CM1之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM1和CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在MM和CM1之间的连接肽和在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在MM和CM1之间的连接肽和在CM1和CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM1和CM2之间的连接肽和在CM2和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在MM和CM1之间的连接肽,在CM1和CM2之间的连接肽,和在CM2和AB之间的连接肽。

[0120] 在一些实施方案中,可激活抗体包括包括至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一CM和包括底物序列的第二CM。第二CM(CM2)的示例性底物包括但不限于可被表7所列的以下酶或蛋白酶的一种或多种切割的底物。

[0121] 在一些实施方案中,选择CM2与特定蛋白酶一起使用。在一些实施方案中,CM2是选自以下至少一种蛋白酶的底物:基质金属蛋白酶(MMP)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、u型纤溶酶原激活物(uPA,亦称为尿激酶)、legumain、基质蛋白酶(MT-SP1)、凝血酶、半胱氨酸蛋白酶例如组织蛋白酶、ADAM17、BMP-1、HtrA1和TMPRSS例如TMPRSS3或TMPRSS4。

[0122] 在一些实施方案中,CM2是嗜中性粒细胞弹性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是uPA的底物。在一些实施方案中,CM2是legumain的底物。在一些实施方案中,CM2是基

质蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是凝血酶的底物。在一些实施方案中,CM2是半胱氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是组织蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2是ADAM17的底物。在一些实施方案中,CM2是BMP-1的底物。在一些实施方案中,CM2是HtrA1的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS3的底物。在一些实施方案中,CM2是TMPRSS4的底物。

[0123] 例如,合适的CM2被至少一种蛋白酶切割并包括序列TGRGPSWV (SEQ ID NO:34)、SARGPSRW (SEQ ID NO:35)、TARGPSFK (SEQ ID NO:36)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:37)、GGWHTGRN (SEQ ID NO:38)、HTGRSGAL (SEQ ID NO:39)、PLTGRSGG (SEQ ID NO:40)、AARGPAIH (SEQ ID NO:41)、RGPAFNPM (SEQ ID NO:42)、SSRGPAYL (SEQ ID NO:43)、RGPATPIM (SEQ ID NO:44)、RGPA (SEQ ID NO:45)、GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:46)、FPRPLGITGL (SEQ ID NO:47)、VHMPLGFLGP (SEQ ID NO:48)、SPLTGRSG (SEQ ID NO:49)、SAGFSLPA (SEQ ID NO:126)、LAPLGLQRR (SEQ ID NO:50)、SGGPLGVR (SEQ ID NO:51)、PLGL (SEQ ID NO:52)、GPRSFG (SEQ ID NO:315) 和/或GPRSFG (SEQ ID NO:316)。

[0124] 在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列TGRGPSWV (SEQ ID NO:34)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SARGPSRW (SEQ ID NO:35)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列TARGPSFK (SEQ ID NO:36)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列LSGRSDNH (SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GGWHTGRN (SEQ ID NO:38)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列HTGRSGAL (SEQ ID NO:39)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列PLTGRSGG (SEQ ID NO:40)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列AARGPAIH (SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPAFNPM (SEQ ID NO:42)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SSRGPAYL (SEQ ID NO:43)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPATPIM (SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列RGPA (SEQ ID NO:45)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列FPRPLGITGL (SEQ ID NO:47)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列VHMPLGFLGP (SEQ ID NO:48)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SPLTGRSG (SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列LAPLGLQRR (SEQ ID NO:50)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列SGGPLGVR (SEQ ID NO:51)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列PLGL (SEQ ID NO:52)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GPRSFG (SEQ ID NO:315)。在一些实施方案中,CM2包含氨基酸序列GPRSFG (SEQ ID NO:316)。

[0125] 在一些实施方案中,CM2是至少一种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是表7所列的至少一种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是MMP9的底物。在一些实施方案中,CM2是MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1是第一MMP的底物,且CM2是第二MMP的底物,其中第一MMP和第二MMP是不同的MMP。在一些实施方案中,CM1是MMP的第一底物序列,CM2是相同MMP的第二底物序列,其中CM1和CM2具有不同的底物序列。在一些实施方案中,CM2是两种或更多种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是至少MMP9或MMP14的底物。在一些实施方案中,CM2是两种或更多种MMP的底物。在一些实施方案中,CM2是至少MMP9和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1和CM2是MMP9的两种底物。在一些实施方案中,CM1和CM2是MMP14的两种底物。在一些实施方案中,CM1是MMP9的底物和CM2是MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1是MMP14的底物和CM2是MMP9的底物。

[0126] 在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一种是MMP的底物并包括序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:14)、QNQALRMA (SEQ ID NO:15)、AQNLLGMV (SEQ ID NO:16)、STFPFGMF (SEQ ID NO:17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO:18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO:19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO:20)、RPSPMWAY (SEQ ID NO:21)、WATPRPMR (SEQ ID NO:22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO:23)、LKAAPRWA (SEQ ID NO:24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO:25)、LPGLSPW (SEQ ID NO:26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO:27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO:28)、RMHLRSLG (SEQ ID NO:29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO:30)、AVGLLAPP (SEQ ID NO:31)、LLAPSHRA (SEQ ID NO:32)、PAGLWLDP (SEQ ID NO:33)和/或 ISSGLSS (SEQ ID NO:159)。

[0127] 在一些实施方案中,第一切割剂和第二切割剂是相同的基质金属蛋白酶,第一CM 和第二CM是该酶的不同底物。在一些实施方案中,第一切割剂和第二切割剂是不同的蛋白 酶,其中至少一种蛋白酶是MMP。在一些实施方案中,第一切割剂和第二切割剂共定位于靶 组织中。在一些实施方案中,第一CM和第二CM被靶组织中的至少一种切割剂切割。

[0128] 在一些实施方案中,可激活抗体被暴露于MMP中并被MMP切割,使得在激活或切割 状态下,在MMP切割CM后,激活的抗体包括包括LP2和/或CM序列的至少一部分的轻链氨基酸 序列。

[0129] 在一些实施方案中,CM包含蛋白酶切割位点的非主侧 (non-prime side);即,CM包 含至少P1和P2个氨基酸,而在一些实施方案中,包含P1、P2和P3个氨基酸,而在一些实施方 案中,包含P1、P2、P3和P4个氨基酸。在一些实施方案中,CM包含蛋白酶切割位点的非主侧或 主侧。在一些实施方案中,CM包含非主侧但缺乏蛋白酶切割位点的主侧的至少部分。在一些 实施方案中,CM包含非主侧但缺乏蛋白酶切割位点的主侧。所述CM可直接或通过接头与抗 体或本文公开的其它分子(例如但不限于检测部分)连接。

[0130] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括是或来源于西 妥昔单抗或帕尼单抗的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和 包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗 EGFR可激活抗体,其至少包括是或来源于西妥昔单抗或帕尼单抗的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的 CM。在一些实施方案中,抗EGFR可激活抗体还包括第一连接肽 (LP1) 和第二连接肽 (LP2),且 未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些 实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自 以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO:1) 和(GGGS)_n (SEQ ID NO:2),其中 n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列: GGSG (SEQ ID NO:3)、GGSGG (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:5)、GSGGG (SEQ ID NO:6)、 GGGSG (SEQ ID NO:7) 和GSSSG (SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列 GSSGGSGCGSG (SEQ ID NO:9)、GSSGGSGCGSG (SEQ ID NO:10)、GSSGGSGCGSGS (SEQ ID NO: 11)、GSSGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:156) 或GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS (SEQ ID NO: 158)、GSSGT (SEQ ID NO:12) 或GSSG (SEQ ID NO:13)。

[0131] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ

ID NO:504的VH CDR1序列、SEQ ID NO:505的VH CDR2序列、SEQ ID NO:506的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:507的VL CDR1序列、SEQ ID NO:508的VL CDR2序列和SEQ ID NO:509的VL CDR2序列的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ ID NO:504的VH CDR1序列、SEQ ID NO:505的VH CDR2序列、SEQ ID NO:506的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:507的VL CDR1序列、SEQ ID NO:508的VL CDR2序列和SEQ ID NO:509的VL CDR2序列的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗EGFR可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSAGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0132] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:56、57或58的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:59的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:56、57或58的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:59的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:160、167-200和497的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗EGFR可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSAGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0133] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID

NO:56的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:59的轻链氨基酸序列的AB;包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:56的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:59的轻链氨基酸序列的AB;包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗EGFR可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GS GGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGG S)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0134] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ ID NO:504的VH CDR1序列、SEQ ID NO:505的VH CDR2序列、SEQ ID NO:506的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:507的VL CDR1序列、SEQ ID NO:508的VL CDR2序列和SEQ ID NO:509的VL CDR2序列的AB;包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗EGFR可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ ID NO:504的VH CDR1序列、SEQ ID NO:505的VH CDR2序列、SEQ ID NO:506的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:507的VL CDR1序列、SEQ ID NO:508的VL CDR2序列和SEQ ID NO:509的VL CDR2序列的AB;包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗EGFR可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GS GGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGG S)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS GGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS GGSG(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0135] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、

110、112或114的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111或113的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:201-263和496的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112或114的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111或113的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:201-263和496的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗Jagged可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0136] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:112的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:111的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:217的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括包含SEQ ID NO:112的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:111的轻链氨基酸序列的AB;包含选自SEQ ID NO:217的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗Jagged可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGS(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0137] 在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ

ID NO:498的VH CDR1序列、SEQ ID NO:499的VH CDR2序列、SEQ ID NO:500的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:501的VL CDR1序列、SEQ ID NO:502的VL CDR2序列和SEQ ID NO:503的VL CDR2序列的AB;包含选自SEQ ID NO:217的氨基酸序列的MM;和包含选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,可激活抗体是抗Jagged可激活抗体,其至少包括含有包含SEQ ID NO:498的VH CDR1序列、SEQ ID NO:499的VH CDR2序列、SEQ ID NO:500的VH CDR3序列的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:501的VL CDR1序列、SEQ ID NO:502的VL CDR2序列和SEQ ID NO:503的VL CDR2序列的AB;包含选自SEQ ID NO:217的氨基酸序列的MM;和包含选自表8A-8M提供的序列的氨基酸序列的CM。在一些实施方案中,抗Jagged可激活抗体还包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,LP1和LP2各自为长度为约1-20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:3)、GGSGG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:9)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:10)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:11)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:155)、GSSGGSGGS(SEQ ID NO:156)或GSSGGSGGS(SEQ ID NO:157)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:158)、GSSGT(SEQ ID NO:12)或GSSG(SEQ ID NO:13)。

[0138] 在一些实施方案中,可激活抗体还包括与AB缀合的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是治疗剂。在一些实施方案中,作用剂是抗肿瘤剂。在一些实施方案中,作用剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,作用剂通过接头与AB缀合。在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,作用剂是核酸损伤剂,例如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,作用剂通过包括至少一种MMP可切割底物序列的接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂是选自表3所列的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是吡咯并苯并二氮杂草。

[0139] 在一些实施方案中,作用剂是抗炎药。

[0140] 在一些实施方案中,可激活抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0141] 在一些实施方案中,缀合抗体包括可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记包括成像剂、造影剂、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。在一些实施方案中,成像剂包含放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素是铟或锝。

在一些实施方案中，造影剂包含碘、钆或氧化铁。在一些实施方案中，酶包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在一些实施方案中，荧光标记包含黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、改进的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在一些实施方案中，发光标记包含N-methylacrydium衍生物。在一些实施方案中，标记包含Alexa Fluor[®]标记，例如Alexa Fluor[®] 680或Alexa Fluor[®] 750。在一些实施方案中，基于配体的标记包含生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或一种或多种半抗原。

[0142] 在一些实施方案中，可激活抗体还包括信号肽。在一些实施方案中，信号肽通过间隔物与可激活抗体缀合。在一些实施方案中，间隔物在信号肽不存在时与可激活抗体缀合。在一些实施方案中，间隔物与可激活抗体的MM直接连接。在一些实施方案中，间隔物在间隔物-MM-CM-AB从N端到C端的结构排列中与可激活抗体的MM直接连接。与可激活抗体的MM的N端直接连接的间隔物的实例是QGQSGQ(SEQ ID NO:53)。在一些实施方案中，间隔物至少包括氨基酸序列QGQSGQ(SEQ ID NO:53)。

[0143] 在一些实施方案中，可激活抗体的AB天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中，可对AB进行改造以包括一个或多个二硫键。

[0144] 在一些实施方案中，可激活抗体的血清半寿期长于相应抗体的半寿期；例如，可激活抗体的pK长于相应抗体的pK。在一些实施方案中，可激活抗体的血清半寿期类似于相应抗体的半寿期。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少15天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少12天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少11天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少10天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少9天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少8天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少7天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少6天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少5天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少4天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少3天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少2天。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少24小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少20小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少18小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少16小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少14小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少12小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少10小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少8小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少6小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少4小时。在一些实施方案中，当给予生物时，可激活抗体的血清半寿期为至少3小时。

[0145] 在一些实施方案中，可激活抗体和/或缀合的可激活抗体是单特异性的。在一些实施方案中，可激活抗体和/或缀合的可激活抗体是多特异性的，例如以非限制性实例为例为

双特性的或三官能性的。在一些实施方案中,将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体配制成分子的一部分。在一些实施方案中,将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体配制成嵌合抗原受体前体(pro-CAR)修饰的T细胞或其它改造的受体的一部分。

[0146] 本公开内容还提供包括包括特异性结合指定靶标的抗体或抗体片段(AB)的可激活抗体的组合物和方法,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,可激活抗体进一步包括是至少一种MM的底物的可切割部分(CM)。本文提供的组合物和方法使得一种或多种作用剂能够与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接而又不损害可激活抗体的活性(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一种或多种作用剂能够与AB中的一个或多个半胱氨酸残基连接而又不减少或以别的方式妨碍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作用剂(例如各种治疗剂、诊断剂和/或预防剂的任一种)缀合的可激活抗体,例如,在一些实施方案中,没有任何作用剂与可激活抗体的MM缀合。本文提供的组合物和方法产生缀合的可激活抗体,其中在未切割状态下MM保持有效且高效掩蔽可激活抗体的AB的能力。本文提供的组合物和方法产生缀合的可激活抗体,其中在可切割CM的MM的存在下,可激活抗体仍被激活,即被切割。

[0147] 可激活抗体具有用于作用剂的至少一个缀合点,但在本文提供的方法和组合物中,可获得小于与作用剂缀合的所有可能的缀合点。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二硫键的硫原子,但非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。所述残基可在抗体结构中天然存在或可能通过位点定向诱变、化学转化或非天然氨基酸的错误掺入而掺入抗体中。

[0148] 本文还提供制备在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激活抗体的组合物的方法,并提供与游离硫醇基起反应的药物。所述方法一般包括用还原剂(例如TCEP)部分还原可激活抗体中的链间二硫键;并使与游离硫醇基反应的药物与部分还原的可激活抗体缀合。本文所用术语部分还原是指其中使可激活抗体与还原剂接触并还原小于所有的二硫键例如小于所有可能的缀合位点的情况。在一些实施方案中,还原小于99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或小于5%的所有可能的缀合位点。

[0149] 在一些实施方案中,提供还原并使作用剂(例如药物)与可激活抗体缀合在安置作用剂时产生选择性的方法。所述方法一般包括用还原剂部分还原可激活抗体,使得可激活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,并使作用剂与AB中的链间硫醇基缀合。选择缀合位点使得允许所需的作用剂安置以允许缀合发生在所需位点上。还原剂为例如TCEP。通过鉴定产生其中在未切割状态下MM保持有效且高效掩蔽可激活抗体的AB的能力的缀合的可激活抗体的条件,来确定还原反应条件,例如还原剂与可激活抗体的比率、温育长度、温育期间的温度、还原反应溶液的pH等。还原剂与可激活抗体的比率可随可激活抗体而变化。在一些实施方案中,还原剂与可激活抗体的比率的范围可为约20:1-1:1、约10:1-1:1、约9:1-1:1、约8:1-1:1、约7:1-1:1、约6:1-1:1、约5:1-1:1、约4:1-1:1、约3:1-

1:1、约2:1-1:1、约20:1-1:1.5、约10:1-1:1.5、约9:1-1:1.5、约8:1-1:1.5、约7:1-1:1.5、约6:1-1:1.5、约5:1-1:1.5、约4:1-1:1.5、约3:1-1:1.5、约2:1-1:1.5、约1.5:1-1:1.5或约1:1-1:1.5。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1-1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1-1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1-1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1-1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约8:1-约1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约2.5:1-1:1。

[0150] 在一些实施方案中,提供还原可激活抗体的AB中的链间二硫键并使作用剂(例如含硫醇基的作用剂,例如药物)与所得链间硫醇基缀合以选择性地将作用剂安置在AB中的方法。所述方法一般包括用还原剂部分还原AB以形成至少2个链间硫醇基而非在可激活抗体中形成所有可能的链间硫醇基;并使作用剂与部分还原的AB的链间硫醇基缀合。例如,在所需的还原剂:可激活抗体比率下在约37°C下使可激活抗体的AB部分还原约1小时。在一些实施方案中,还原剂与可激活抗体的比率的范围可为约20:1-1:1、约10:1-1:1、约9:1-1:1、约8:1-1:1、约7:1-1:1、约6:1-1:1、约5:1-1:1、约4:1-1:1、约3:1-1:1、约2:1-1:1、约20:1-1:1.5、约10:1-1:1.5、约9:1-1:1.5、约8:1-1:1.5、约7:1-1:1.5、约6:1-1:1.5、约5:1-1:1.5、约4:1-1:1.5、约3:1-1:1.5、约2:1-1:1.5、约1.5:1-1:1.5或约1:1-1:1.5。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1-1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1-1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1-1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1-1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约8:1-约1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约2.5:1-1:1。

[0151] 含硫醇基的试剂可为例如半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸。还原剂可为例如TCEP。在一些实施方案中,可在缀合前使用例如柱层析法、透析或渗滤,纯化还原的可激活抗体。在一些实施方案中,在部分还原后和在缀合前不纯化还原的抗体。

[0152] 本公开内容还提供部分还原的可激活抗体,其中可激活抗体的至少一个链间二硫键已用还原剂还原而又不妨碍可激活抗体中的任何链内二硫键,其中可激活抗体包括与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未切割状态下的可激活抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可切割部分(CM),其中CM是用作至少一种MMP的底物的多肽。在一些实施方案中,MM通过CM与AB偶联。在一些实施方案中,还原剂不妨碍可激活抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,还原剂不妨碍可激活抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂为TCEP。

[0153] 本公开内容还提供部分还原的可激活抗体,包括但不限于本公开内容的多特异性可激活抗体,其中可激活抗体的至少一个链间二硫键已用还原剂还原而不妨碍或以其它方式损害可激活抗体的活性和/或功效,其中可激活抗体包括与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未切割状态下的可激活抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可切割部分(CM),且CM是用作蛋白酶的底物的多肽。以非限制性实例为例,可激活抗体的活性和/或功效为掩蔽活性、可激活抗体的活化和/或激活的可激活抗体的结合活性。在一些实施方案中,还原剂不妨碍可激活抗体的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,还原剂不妨碍可激活抗体内的MM的一个或多个链内二硫键。在一些实施方案中,未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实

施方案中,还原剂为TCEP。

[0154] 本公开内容还提供包括与单甲基阿里他汀D(MMAD)有效负荷(payload)连接的可激活抗体的缀合的可激活抗体,其中可激活抗体包括与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未切割状态下的可激活抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM)和与AB偶联的可切割部分(CM),且CM是用作至少一种MMP蛋白酶的底物的多肽。

[0155] 在一些实施方案中,可使作用剂与AB连接的几种方法的任一种使MMAD-缀合的可激活抗体缀合:(a)与AB的糖部分连接,或(b)与AB的巯基连接,或(c)与AB的氨基连接,或(d)与AB的羧酸酯基连接。

[0156] 在一些实施方案中,使MMAD有效负荷通过接头与AB缀合。在一些实施方案中,使MMAD有效负荷通过接头与AB中的半胱氨酸缀合。在一些实施方案中,使MMAD有效负荷通过接头与AB中的赖氨酸连接。在一些实施方案中,使MMAD有效负荷通过接头与AB中的其它残基(例如本文公开的那些残基)连接。在一些实施方案中,接头是含硫醇基的接头。在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,接头是非可切割的接头。在一些实施方案中,接头选自表5和6所示接头。在一些实施方案中,可激活抗体和MMAD有效负荷通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,可激活抗体和MMAD有效负荷通过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可激活抗体和MMAD有效负荷通过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接。在一些实施方案中,可激活抗体和MMAD有效负荷通过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接。在一些实施方案中,采用本文公开的部分还原和缀合技术,使MMAD有效负荷与AB缀合。

[0157] 在一些实施方案中,靶标选自表1所列靶标。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是或来源于选自表2所列抗体的抗体。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,对于与靶标结合,AB具有约100nM或更小的平衡解离常数。在一些实施方案中,对于与AB结合MM的平衡解离常数大于AB与靶标结合的平衡解离常数。在一些实施方案中,MM不干扰切割状态下的可激活抗体的AB与靶标结合或不与其竞争与靶标结合。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,且MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性。在一些实施方案中,MM不包括与靶标超过25%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,MM不包括与靶标超过10%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,MMP蛋白酶与靶标共定位于组织中,且当可激活抗体暴露于MMP蛋白酶时,MMP蛋白酶切割可激活抗体中的CM。在一些实施方案中,MMP蛋白酶是MMP9蛋白酶。在一些实施方案中,MMP蛋白酶是MMP14蛋白酶。在一些实施方案中,可激活抗体包括在MM和CM之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括在CM和AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可激活抗体包括第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且未切割状态下的可激活抗体具有如下从N端到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,两个连接肽彼此不必相同。在一些实施方案中,LP1和LP2各自为长度为约1-20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:1) 和 (GGGS)_n (SEQ ID NO:2), 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: GGS (SEQ ID NO:3)、GGSGG (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:5)、GSAGG (SEQ ID NO:6)、GGGSG (SEQ ID NO:7) 和 GSAGG (SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中, 可激活抗体包括第二CM; 在一些实施方案中, 第二CM是选自表7所示酶的酶的底物。

[0158] 本公开内容还提供包括本文提供的MMP可切割底物序列的一个或多个的多肽和其它较大分子。以非限制性实例为例, 本文提供的MMP可切割底物序列可用于前药组合物及其使用方法。这些本文提供的MMP可切割底物序列还可用于探针和其它检测剂及其使用方法。例如, 本文提供的MMP可切割底物序列可与荧光素(fluor)和其它猝灭剂联用以产生检测剂, 例如成像剂和/或其它诊断剂。本领域普通技术人员应认识到本文提供的MMP可切割底物序列可用于可使用可被一种或多种MMP(例如MMP9和/或MMP14)切割的底物的本领域的任何组合物和/或方法。

[0159] 本公开内容还提供编码本文所述抗体和/或可激活抗体的分离的核酸分子以及包括这些分离的核酸序列的载体。本公开内容提供通过使细胞在引起抗体和/或可激活抗体表达的条件下培养来产生抗体和/或可激活抗体的方法, 其中细胞包含所述载体。

[0160] 本公开内容提供如下制备结合指定靶标的本公开内容的缀合抗体的方法: (a) 使包含编码抗体的核酸构建体的细胞在引起抗体表达的条件下培养, (i) 其中抗体包括可切割部分(CM), 和(ii) 其中CM是用作基质金属蛋白酶的底物的多肽; (b) 回收抗体; 和(c) 使回收的抗体与一种或多种其它作用剂缀合。

[0161] 本公开内容还提供如下制备在活化状态下结合指定靶标的本公开内容的可激活抗体的方法: (a) 使包含编码可激活抗体的核酸构建体的细胞在引起可激活抗体表达的条件下培养, 其中可激活抗体包含掩蔽部分(MM)、可切割部分(CM)和特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB), (i) 其中CM是用作MMP的底物的多肽; 和(ii) 其中CM位于可激活抗体中, 使得在未切割状态下, MM干扰AB与靶标的特异性结合, 且在切割状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标; 和(b) 回收可激活抗体。

[0162] 本公开内容提供通过将治疗有效量的本文所述缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者以预防受试者的靶标相关疾病、延缓受试者的靶标相关疾病的进程、治疗受试者的靶标相关疾病、减轻受试者的靶标相关疾病的症状或以其它方式改善受试者的靶标相关疾病的方法。

[0163] 本公开内容提供通过将治疗有效量的本文所述缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者以预防受试者的炎症和/或炎性病症、延缓炎症和/或炎性病症的进程、治疗炎症和/或炎性病症的进程、减轻炎症和/或炎性病症的症状和/或以其它方式改善炎症和/或炎性病症的方法。本公开内容还提供通过将治疗有效量的本文所述缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者以预防受试者的癌症、延缓癌症的进程、治疗癌症、减轻癌症的症状或以其它方式改善癌症的方法。本公开内容还提供通过将治疗有效量的本文所述缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者以预防受试者的自身免疫性疾病、延缓自身免疫性疾病的进程、治疗自身免疫性疾病、减轻自身免疫性疾病的症状或以其它方式改善自身免疫性疾病的方法。

[0164] 可在疾病的任何阶段给予用于这些方法和应用的任何实施方案的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体。例如,可将所述缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患有从早期到转移的任何阶段的癌症的患者。术语受试者和患者在本文可互换作用。

[0165] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人、非人灵长类动物、陪伴动物(例如猫、狗、马)、农场动物、役用动物或动物园动物。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。在一些实施方案中,受试者是陪伴动物。在一些实施方案中,受试者是在兽医护理下的动物。

[0166] 将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体及其治疗制剂给予患有或易感与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。采用本领域已知的各种方法的任一种鉴定患有或易感与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。例如,采用各种临床和/或实验室检验的任一种,例如身体检查和血液、尿液和/或粪便分析,鉴定患有癌症或其它瘤性病况的受试者以评价健康状况。例如,采用各种临床和/或实验室检验的任一种,例如身体检查和/或体液分析,例如血液、尿液和/或粪便分析,鉴定患有炎症和/或炎性病症的受试者以评价健康状况。

[0167] 如果达到各种实验室或临床目的任一个,则将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患有与异常靶标表达和/或活性有关的疾病或病症的患者视为成功。例如,如果与疾病或病症有关的一个或多个症状被缓解、减轻、抑制或不发展到更远的(即恶化)状态,则将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患有与异常靶标表达和/或活性有关的疾病或病症的患者视为成功。如果疾病或病症进入缓解或不发展到更远(即恶化)状态,则将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患有与异常靶标表达和/或活性有关的疾病或病症的患者视为成功。

[0168] 在一些实施方案中,在与一种或多种其它作用剂组合治疗期间和/或之后,给予缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体,所述其它作用剂例如以非限制性实例为例为抗炎药、免疫抑制剂、化疗剂例如烷化剂、抗代谢药、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性抗生素和/或任何其它核酸损伤剂。在一些实施方案中,其它作用剂是紫杉烷类(taxane),例如紫杉醇(例如Abraxane®)。在一些实施方案中,其它作用剂是抗代谢药,例如吉西他滨。在一些实施方案中,其它作用剂是烷化剂,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,其它作用剂是靶向剂,例如激酶抑制剂,例如索拉非尼或埃罗替尼。在一些实施方案中,其它作用剂是靶向剂,例如另一种抗体,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,其它作用剂是蛋白体抑制剂,例如硼替佐米或carfilzomib。在一些实施方案中,其它作用剂是免疫调节剂,例如lenolidomide或IL-2。在一些实施方案中,其它作用剂是放射。在一些实施方案中,其它作用剂是本领域技术人员视为护理标准的作用剂。在一些实施方案中,其它作用剂是本领域技术人员熟知的化疗剂。

[0169] 在一些实施方案中,其它作用剂是抗体、另一种缀合的抗体、另一种可激活抗体和/或另一种缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,同时给予缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和其它作用剂。例如缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和其它作用剂可配制在单一组合物中或作为两种或更多种不同的组合物给予。在一些实施

方案中,序贯给予缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和其它作用剂,或在治疗方案期间的不同时间给予抗体和/或缀合的抗体和其它作用剂。例如在给予其它作用剂之前给予抗体和/或缀合的抗体、在给予其它作用剂之后给予抗体和/或缀合的抗体,或以交替方式给予抗体和/或缀合的抗体和其它作用剂。如本文所述,以单剂量或以多剂量给予抗体和/或缀合的抗体和其它作用剂。

[0170] 在一些实施方案中,使CM与包括与掩蔽部分(MM)偶联的特异性结合指定靶标的抗体或其抗原结合片段的可激活抗体连接或以别的方式相连,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,通过CM使MM偶联。示例性靶标包括但不限于表1所示靶标。示例性AB包括但不限于表2所示靶标。本文提供的可激活抗体在循环中是稳定的,在既定的治疗和/或诊断部位但不在正常(例如健康)组织或非治疗和/或诊断所靶向的其它组织中被激活,且当被激活时,显示与相应的未修饰的抗体至少相当的靶标结合。

[0171] 本公开内容还提供在各种诊断和/或预防适应症中使用缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的方法和药盒。

[0172] 在一些实施方案中,本公开内容提供如下检测受试者或样品中切割剂和目标靶标存在与否的方法和试剂盒:(i)使受试者或样品与可激活抗体接触,其中可激活抗体包含掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割、非激活状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;和(ii)其中,在未切割的非激活状态下,MM干扰AB与靶标特异性结合,而在切割的激活状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争与靶标特异性结合;和(ii)测量受试者或样品中激活的可激活抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂和靶标存在于受试者或样品中,而其中受试者或样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂、靶标或切割剂和靶标两者不存在于受试者或样品中。

[0173] 在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂来实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0174] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可激活抗体包括可检测标记。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可检测标记包括成像剂、造影剂、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。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,放射性同位素是铟或锝。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,造影剂包含碘、钆或氧化铁。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,酶包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,荧光标记包含黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、改进的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,发光标记包含N-methylacrydium衍生物。在

这些方法的一些实施方案中,标记包含Alexa Fluor[®]标记,例如Alexa Fluor[®] 680或Alexa Fluor[®] 750。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,基于配体的标记包含生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或一种或多种半抗原。

[0175] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,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。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、陪伴动物(例如猫、狗、马)、农场动物、役用动物或动物园动物。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。在一些实施方案中,受试者是陪伴动物。在一些实施方案中,受试者是在兽医护理下的动物。

[0176] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,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。

[0177] 在方法和试剂盒的一些实施方案中,采用所述方法以鉴定或以别的方式精修适于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群,接着通过将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者进行治疗。例如对靶标和在这些方法测试的可激活抗体的可切割部分(CM)中切割底物的至少一种MMP两者为试验阳性的患者被鉴定为用于用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适的候选者,然后将治疗有效量的受测试的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患者。同样地,对靶标和在采用这些方法测试的切割可激活抗体的CM中切割底物的MMP的任一个或两个为试验阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,所述患者可用其它可激活抗体测试直到鉴定出合适的可激活抗体用于治疗(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。在一些实施方案中,然后对于试验阳性的患者,将治疗有效量的可激活抗体和/或缀合的抗体给予患者。

[0178] 本公开内容的药物组合物可包括本公开内容的抗体和载体。这些药物组合物可包括在试剂盒、例如诊断试剂盒中。

[0179] 附图简述

图1A和1B是描述含有包含氨基酸序列CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO:160) 的掩蔽部分、包含MMP14底物520(本文亦称为MN520) ISSGLLSS (SEQ ID NO:14) 的切割部分和抗EGFR抗体C225v5的重链和轻链的可激活抗EGFR抗体抑制H292异种移植物肺癌模型的肿瘤生长的能力的系列图,其中完整的可激活抗体构建体在本文称为Pb-MN520。

[0180] 图2A和2B是描述通过5nM MMP9切割底物库(在本文称为SMP87)的系列图。

[0181] 图3A和3B是描述通过5nM MMP9切割底物序列VAGRSMRP (SEQ ID NO:484) 的系列图。

[0182] 图4是描述底物序列频率和功能的关系的曲线图。

[0183] 图5A和5B是描述通过60nM MMP14切割底物库SMP39的系列图。

[0184] 图6A和6B是描述通过30nM MMP14切割底物序列QNQALRMA (SEQ ID NO:15) 的系列图。

[0185] 图7A和7B是用于本文提供的有效实施例的肽展示平台的系列示意图。图7A是在本文称为“展示平台CYTX-DP-XXXXXX”或“CYTX-DP-XXXXXX”的展示平台的序列(SEQ ID NO:512)的示意图。图7B是在本文称为“展示平台SP-CYTX-DP-XXXXXX”或“SP-CYTX-DP-XXXXXX”的展示平台的序列(SEQ ID NO:513)的示意图,其中SP-CYTX-DP-XXXXXX (SEQ

ID NO:513)是含信号肽的CYTX-DP-XXXXXXX(SEQ ID NO:512)平台。

[0186] 发明详述

本公开内容提供包括是至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的可切割部分(CM)的氨基酸序列。这些CM可用于各种治疗、诊断和预防适应症中。

[0187] 本文提供的有效实施例表明这些CM当在肽展示平台中展示时,显示当在指定条件下暴露于MMP蛋白酶时多个所需的切割特征。例如,表9显示(a)在CYTX-DP展示平台中测试的MMP9-选择性底物的百分比,当在37°C在补充有150mM NaCl、10mM CaCl₂和0.05% (w/v) Brij-35的50mM Tris-HCl, pH 7.4中与50nM人MMP9温育1小时时,其显示至少20%切割(用50nM MMP9,>20%切割);(b)在CYTX-DP展示平台中测试的MMP14-选择性底物的百分比,当在37°C在补充有10mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的50mM HEPES, pH 6.8中与50nM人MMP14温育1小时时,其显示至少20%切割(用50nM MMP14,>20%切割);和(c)在CYTX-DP展示平台中测试的MMP9-选择性或MMP-14-选择性底物的百分比,当在37°C在补充有100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl, pH 7.4中与500pM人纤溶酶温育1小时时,其显示少于20%切割(用500pM纤溶酶,<20%切割)。

[0188] 在一些实施方案中,MMP9底物当在CYTX-DP平台中展示时,显示在37°C下在补充150mM NaCl、10mM CaCl₂和0.05% (w/v) Brij-35的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与50nM人MMP9温育1小时时至少20%切割。在一些实施方案中,MMP9底物当在CYTX-DP平台中展示时,显示当在37°C下在补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与500pM人纤溶酶一起温育1小时时小于20%切割。在一些实施方案中,MMP9底物当在CYTX-DP平台中展示时,显示当在37°C下在补充150mM NaCl、10mM CaCl₂和0.05% (w/v) Brij-35的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与50nM人MMP9一起温育1小时时至少20%切割,并且显示当在37°C下在补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与500pM人纤溶酶一起温育1小时时小于20%切割。

[0189] 在一些实施方案中,MMP14底物显示当在37°C下在补充10mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的50mM HEPES (pH 6.8) 中与50nM人MMP14一起温育1小时时至少20%切割。在一些实施方案中,MMP14底物当在CYTX-DP平台中展示时,显示当在37°C下在补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与500pM人纤溶酶一起温育1小时时小于20%切割。在一些实施方案中,MMP14底物显示当在37°C下在补充10mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的50mM HEPES (pH 6.8) 中与50nM人MMP14一起温育1小时时至少20%切割,并且显示当在37°C下在补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中与500pM人纤溶酶一起温育1小时时小于20%切割。

[0190] 在一些实施方案中,所观察到的对于MMP9的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于100M⁻¹s⁻¹。在一些实施方案中,所观察到的对于MMP9的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于1,000M⁻¹s⁻¹。在一些实施方案中,所观察到的对于MMP9的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于10,000M⁻¹s⁻¹。

[0191] 在一些实施方案中,所观察到的对于MMP14的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于100M⁻¹s⁻¹。在一些实施方案中,所观察到的对于MMP14的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于1,000M⁻¹s⁻¹。在一些实施方案中,所观察到的对于MMP14的可激活抗体中的底物的k_{cat}/K_M值大于10,000M⁻¹s⁻¹。

[0192] 本公开内容还提供包括这些MMP可切割底物的一种或多种的抗体。例如这些MMP可切割底物当使抗体与一种或多种其它作用剂缀合以产生缀合的抗体时是有用的。这些MMP可切割底物可用于可激活抗体构建体。

[0193] 缀合的抗体和/或可激活抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)。示例性的AB的靶标类别包括但不必限于细胞表面受体和分泌的结合蛋白(例如生长因子)、可溶性酶、结构蛋白质(例如胶原、纤连蛋白)等。在一些实施方案中,缀合的抗体和/或可激活抗体具有结合胞外靶标(通常为胞外蛋白质靶标)的AB。在一些实施方案中,设计缀合的抗体和/或可激活抗体用于细胞摄取,且在细胞内可切换。

[0194] 作为非限制性实例,AB是表1中所列任何靶标的结合配偶体。

[0195] 表1:示例性靶标

I-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAPI
α -4 整联蛋白	CD56	DLK1	透明质酸酶	Lewis X	STEAP2
α -V 整联蛋白	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
α 4 β 1 整联蛋白	CD70	DPP-4	IFN α	LRP4	TAPA1
α 4 β 7 整联蛋白	CD71	DSG1	IFN β	LRRC26	TGF β
AGR2	CD74	EGFR	IFN γ	MCSP	TIGIT
抗 Lewis-Y		EGFRviii	IgE	间皮素	TIM-3
Apelin J 受体	CD80	内皮素 B 受体 (ETBR)	IgE 受体 (Fc ϵ RI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	黏蛋白 -16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K ATP 酶	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	嗜中性粒细 胞弹性蛋白 酶	TLR8
C5 补体	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132	RSV 的 F 蛋白 (IL-2RG)	IL11	呆蛋白	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Notch 受体	TNF α
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR

碳酸酐酶 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12R β 1	Notch 2	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	运铁蛋白
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	运铁蛋白受体
CD11a	CEACAM5 (CEA)	叶酸受体	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAPI
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R	PDGFR α	VCAM-1 (wsx1)
CD25	胶原	GITR	IL29	PDGFR β	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-I	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	磷脂酰-丝氨酸	VEGF-D 酸
CD38	CTGF	GP IIb/IIIa 受体	IL4R	PIGF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	胰岛素受体	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPNMB	Jagged 配体	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	鞘氨醇 1 磷酸	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

作为非限制性实例,AB是或来源于表2所列抗体。

[0196] 表2:示例性的Ab来源

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

Simulect™ (巴利昔单抗)	IL2R
Soliris™ (依库珠单抗)	补体 C5
Raptiva™ (依法珠单抗)	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	CD20
Arzerra™ (奥法木单抗)	CD20
Obinutuzumab	CD20
Zenapax™ (达克珠单抗)	CD25
Adcetris™ (brentuximab vedotin)	CD30
Myelotarg™ (吉妥珠单抗)	CD33
Mylotarg™ (吉妥珠单抗奥佐米星)	CD33
Campath™ (阿仑珠单抗)	CD52
ReoPro™ (阿昔单抗(abiciximab))	糖蛋白受体 IIb/IIIa
Xolair™ (奥马珠单抗)	IgE
Herceptin™ (曲妥珠单抗)	Her2
Kadcyla™ (trastuzumab emtansine)	Her2
Synagis™ (帕利珠单抗)	RSV 的 F 蛋白
(伊匹木单抗)	CTLA-4
(tremelimumab)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(培妥珠单抗)	Her2-neu
(厄马索单抗)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (阿巴西普)	CTLA-4
(tanezumab)	NGF
(巴土昔单抗)	磷脂酰丝氨酸
(扎芦木单抗)	EGFR
(马帕木单抗)	EGFR
(马妥珠单抗)	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™ (阿来西普)	1-92-LFA-3
Antril™, Kineret™ (akinra)	IL-1Ra
GC1008	TGFβ
	Notch, 例如 Notch 1
	Jagged 1 或 Jagged 2
(阿德木单抗)	EpCAM
(figitumumab)	IGF1R
(托珠单抗)	IL-6 受体
Stelara™ (ustekinumab)	IL-12/IL-23
Prolia™ (地舒单抗)	RANKL

本公开内容的示例性缀合的抗体和/或可激活抗体包括例如结合白介素6受体(IL-6R)并包括是或来源于在本文称为“Av1”抗体的抗体的重链和轻链的抗体,所述Av1抗

体结合白介素-6受体(IL-6R)。以下SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55分别显示了Av1重链和Av1轻链的氨基酸序列。

[0197] Av1抗体重链氨基酸序列：

```
QVQLQESGPLVVRPSQTLSLTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNP
SLKSRVTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSЛАRTTAMDYWGQGSLTVSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:54)
```

Av1抗体轻链氨基酸序列：

```
DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
GSGSGTDFTTISSLQPEDATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:55)
```

本公开内容的示例性缀合的抗体和/或可激活抗体包括例如结合白介素6受体(IL-6R)并且包括是或来源于Av1抗体的重链和轻链和掩蔽部分的抗体。本公开内容的示例性缀合的抗体和/或可激活抗体包括与AV1轻链N端连接的氨基酸序列。这些N端氨基酸序列包括例如YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO:161)、QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO:162)、MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO:163)、QGQSGQYGSWSNYVHIFMDC (SEQ ID NO:164)、QGQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO:165) 或QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO:166)。还要认识到所述氨基酸序列可与AV1重链的N端或AV1重链或轻链的C端连接。

[0198] 本公开内容的示例性可激活抗体包括例如结合表皮生长因子受体(EGFR)并且包括是或来源于选自以下抗体的重链和轻链的抗体：在本文称为“c225v5”抗体的抗体、在本文称为“c225v4”抗体的抗体和在本文称为“c225v6”抗体的抗体，其每一个均结合EGFR。c225v5抗体、c225v4抗体和c225v6抗体具有相同的轻链序列，在本文称为“c225轻链”。下面显示c225v5重链、c225v4抗体、c225v6抗体和c225轻链的氨基酸序列。

[0199] C225v5抗体重链氨基酸序列：

```
QVQLKQSGGPLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAWGQGTLTVSAAS
TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYS
LSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:56)
```

C225v4抗体重链氨基酸序列：

```
QVQLKQSGGPLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYN
```

TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNTAIYYCARALTYDYEFAWGQGTLTVSAAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK*(SEQ ID NO:57)

C225v6抗体重链氨基酸序列：

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSICTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYN
 TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNTAIYYCARALTYDYEFAWGQGTLTVSAAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYASTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK*(SEQ ID NO:58)

C225抗体轻链氨基酸序列：

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWFQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSFRSGSG
 SGTDFTLSINSVEDIADYYCQQNNWPTFGAGTKLELKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGE*(SEQ ID NO:59)

本公开内容的示例性缀合的抗体和/或可激活抗体包括例如结合Jagged靶标(例如Jagged-1、Jagged-2和/或Jagged-1和Jagged-2两者),并且包括是或来源于以下所示可变重链和可变轻链序列的可变重链区和可变轻链区的组合的抗体。

[0200] 可变轻链氨基酸序列Lc4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:60)

可变重链氨基酸序列Hc4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF
 TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:61)

可变轻链氨基酸序列Lc5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:62)

可变重链氨基酸序列Hc5

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF
 TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:63)

可变轻链氨基酸序列Lc7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:64)

可变重链氨基酸序列Hc7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:65)

可变轻链氨基酸序列Lc8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:67)

可变重链氨基酸序列Hc8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:68)

可变轻链氨基酸序列Lc13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:69)

可变重链氨基酸序列Hc13

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:70)

可变轻链氨基酸序列Lc16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:71)

可变重链氨基酸序列Hc16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYYGQFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:72)

可变轻链氨基酸序列Lc19

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:73)

可变重链氨基酸序列Hc19

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:74)

可变轻链氨基酸序列Lc21

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:75)

可变重链氨基酸序列Hc21

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:76)

可变轻链氨基酸序列Lc24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTLSQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:77)

可变重链氨基酸序列Hc24

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:78)

可变轻链氨基酸序列Lc26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:79)

可变重链氨基酸序列Hc26

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:80)

可变轻链氨基酸序列Lc27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:81)

可变重链氨基酸序列Hc27

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFYGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:82)

可变轻链氨基酸序列Lc28

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:83)

可变重链氨基酸序列Hc28

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:84)

可变轻链氨基酸序列Lc30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:85)

可变重链氨基酸序列Hc30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:86)

可变轻链氨基酸序列Lc31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:87)

可变重链氨基酸序列Hc31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:88)

可变轻链氨基酸序列Lc32

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:89)

可变重链氨基酸序列Hc32

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTYYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:90)

可变轻链氨基酸序列Lc37

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG

TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:91)

可变重链氨基酸序列Hc37

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:92)

可变轻链氨基酸序列Lc39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:93)

可变重链氨基酸序列Hc39

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:94)

可变轻链氨基酸序列Lc40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:95)

重链氨基酸序列Hc40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:96)

可变轻链氨基酸序列Lc47

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:97)

可变重链氨基酸序列Hc47

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTEYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:98)

可变4B2轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTLDAPPQFGQGTLTVSS (SEQ ID NO:99)

可变4B2重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:100)

可变4D11轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTLTVSS (SEQ ID NO:101)

可变4D11重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:102)

可变4E7轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSLVAPLTFGQGTLTVSS (SEQ ID NO:103)

可变4E7重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTKYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 104)

可变4E11轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQALDAPLMFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO: 105)

可变4E11重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEPMGQLTEYADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 106)

可变6B7轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO: 107)

可变6B7重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYY ADSVKGR

FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 108)

可变6F8轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO: 109)

可变6F8重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYY ADSVKGR

FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 110)

本公开内容的示例性缀合的抗体和/或可激活抗体包括例如结合Jagged靶标(例如Jagged-1、Jagged-2和/或Jagged-1和Jagged-2两者),并且包括是或来源于下面所示重链和轻链序列的重链区和轻链区的组合的抗体。

[0201] 4D11轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS

GSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTLVKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS

GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACE

VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111)

4D11重链序列:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA

DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSSAST

KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTSWNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSL

SVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPP

KPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSV

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLT

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN

HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 112)

4D11v2重链序列

EVHLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA

DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSSAST

KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSL
 SVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:113)

4D11v2轻链序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTIXKA染料
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:114)

本文提供的可激活抗体和可激活抗体组合物含有特异性结合靶标(例如人靶标)的至少抗体或其抗体片段(在本公开内容中统称为AB),其中AB被掩蔽部分(MM)修饰。

[0202] 在一些实施方案中,选择掩蔽部分与特定的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括序列CISPRG (SEQ ID NO:167) 的MM。以非限制性实例为例,MM可包括序列例如CISPRGC (SEQ ID NO:497)、CISPRGCG (SEQ ID NO:168)、CISPRGCPDPYVMY (SEQ ID NO:160)、CISPRGCPDPYVM (SEQ ID NO:169)、CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO:170) 和CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO:171)。其它合适的掩蔽部分包括公开于PCT公布号WO 2010/081173中的任何EGFR特异性掩蔽物,例如以非限制性实例为例,GSCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO:172)、CISPRGCGGSSASQSGQGHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO:173)、CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:174)、ADHVFWGSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO:175)、CHHVYWGHCISPRGCPG (SEQ ID NO:176)、CPHFTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:177)、CNHHYHYYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:178)、CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:179)、CPYYTLSYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:180)、CNHVYFGTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:181)、CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:182)、CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO:183)、YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO:184)、CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO:185)、CNHHYHYYCGCISPRGCG (SEQ ID NO:186)、CNHVYFGTCGCISPRGCG (SEQ ID NO:187)、CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO:188)、CPHFTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO:189)、CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO:190)、CHHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO:191)、CPYYTLSYCGCISPRGCG (SEQ ID NO:192)、CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO:193)、ADHVFWGSYGCISPRGCG (SEQ ID NO:194)、YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO:195)、CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO:196)、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:197)、CISPRGCGQPIPSVK (SEQ ID NO:198)、CISPRGCTQPYHVS (SEQ ID NO:199) 和/或CISPRGCNAVGLGS (SEQ ID NO:200)。

[0203] 以非限制性实例为例,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括以下序列的掩蔽部分:例如QGQSGQCNIWVGGDCRGWQG (SEQ ID NO:496)、QGQSGQGQQWCNIWINGDCRGWNG (SEQ ID NO:201)、PWCMQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO:202)、QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO:203)、CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO:204)、SCSLWTSGSCLPHSP (SEQ ID NO:205)、YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO:206)、CFLYSCTDVSYWNNT

(SEQ ID NO:207)、PWCMQRQDYLRCPQP (SEQ ID NO:208)、CNLWISGGDCRGLAG (SEQ ID NO:209)、CNLWVSGGDCRGVQG (SEQ ID NO:210)、CNLWVSGGDCRGLRG (SEQ ID NO:211)、CNLWISGGDCRGLPG (SEQ ID NO:212)、CNLWVSGGDCRDAPW (SEQ ID NO:213)、CNLWVSGGDCRDLLG (SEQ ID NO:214)、CNLWVSGGDCRGLQG (SEQ ID NO:215)、CNLWLHGGDCRGWQG (SEQ ID NO:216)、CNIWLVGGDCRGWQG (SEQ ID NO:217)、CTTWFCGGDCGVMRG (SEQ ID NO:218)、CNIWGPSVDCGALLG (SEQ ID NO:219)、CNIWVNNGDCRSFEG (SEQ ID NO:220)、YCLNLPRYMQDMCWA (SEQ ID NO:221)、YCLALPHYMQADCAR (SEQ ID NO:222)、CFLYS CGDVS YWGSA (SEQ ID NO:223)、CYLYSCTDSA FWNNR (SEQ ID NO:224)、CYLYS CNDV SYWSNT (SEQ ID NO:225)、CFLYS CTDV SYW (SEQ ID NO:226)、CFLYS CTDV AYWN SA (SEQ ID NO:227)、CFLYS CTDV SYWGDT (SEQ ID NO:228)、CFLYS CTDV SYWGNS (SEQ ID NO:229)、CFLYS CTDV AYWN NT (SEQ ID NO:230)、CFLYS CGDVS YWGN PGLS (SEQ ID NO:231)、CFLYS CTDV AYWSGL (SEQ ID NO:232)、CYLYS CTDG SYWN ST (SEQ ID NO:233)、CFLYS CSDV SYWGNI (SEQ ID NO:234)、CFLYS CTDV AYW (SEQ ID NO:235)、CFLYS CTDV SYWGST (SEQ ID NO:236)、CFLYS CTDV AYWGDT (SEQ ID NO:237)、GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (SEQ ID NO:238)、GCNIWLVGGDCRGWIGDTNG (SEQ ID NO:239)、GCNIWLVGGDCRGWIEDSNG (SEQ ID NO:240)、GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (SEQ ID NO:241)、GCNIWLVGGDCRGWLGEAVG (SEQ ID NO:242)、GCNIWLVGGDCRGWLEEAVG (SEQ ID NO:243)、GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (SEQ ID NO:244)、GAPVFCNIWLNGGDCRGWMG (SEQ ID NO:245)、GQQQCWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO:246)、GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (SEQ ID NO:247)、GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (SEQ ID NO:248)、GASQYCNLWINGGDCRGWRG (SEQ ID NO:249)、GCNIWLVGGDCRPWVEGG (SEQ ID NO:250)、GCNIWAVGGDCRPFVDGG (SEQ ID NO:251)、GCNIWLNGGDCRAWVDTG (SEQ ID NO:252)、GCNIWIVGGDCRPFINDG (SEQ ID NO:253)、GCNIWLNGGDCRPVVF GG (SEQ ID NO:254)、GCNIWLSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO:255)、GCNIWVNNGDCRSFVYSG (SEQ ID NO:256)、GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO:257)、GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO:258)、GCNIWLNGGDCRTFVASG (SEQ ID NO:259)、GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO:260)、GFLEN CNIWLNGGDCRTG (SEQ ID NO:261)、GIYENCNIWLNGGDCRMG (SEQ ID NO:262) 和/或 GIPDNCNIWINGGDCRYG (SEQ ID NO:263)。

[0204] 以非限制性实例为例,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以下序列的掩蔽部分:例如QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO:264)、QGQSGQGDFDIPFPAPHWVPIT (SEQ ID NO:265)、QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO:266)、YRSCNWNYVSIFLDC (SEQ ID NO:267)、PGAFDIPFPAPHWVPNT (SEQ ID NO:268)、ESSCWNYVHIYMDC (SEQ ID NO:269)、YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO:270)、YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO:271)、YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO:161)、YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:272)、YGSCNWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:273)、YTSCNWNYVHIFMDC (SEQ ID NO:274)、YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO:275)、WRSCNWNYAHIFLDC (SEQ ID NO:276)、WSNCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:277)、DRSCTWNYVRISYDC (SEQ ID NO:278)、SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO:279)、SRSCIWNYAHILDC (SEQ ID NO:280)、SMSCYWQYERIFLDC (SEQ ID NO:281)、YRSCNWNYVSIFLDC (SEQ ID NO:282)、SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO:283)、YKSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO:284)、YGSCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:285)、FSSCNWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:286)、WRSCNWNYAHIFLDC (SEQ ID NO:287)、YGSCQWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:

288)、YRSCNWNYVHIFLDC (SEQ ID NO:289)、NMSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO:290)、FGPCTWNYARISWDC (SEQ ID NO:291)、XXsCXWXYvhIfXdC (SEQ ID NO:292)、MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO:163)、RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO:293)、AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:294)、VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO:295)、DGGPAGCSWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:296)、AVGPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:297)、CTWNYVHIFMDCGECEGP (SEQ ID NO:298)、GGVPEGCTWNYAHIFMEC (SEQ ID NO:299)、AEVPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:300)、AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO:301)、SGASGGCKWNYVHIFMDC (SEQ ID NO:302)、TPGCRWNYVHIFMECEAL (SEQ ID NO:303)、VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO:304)、PGAFDIPFPWAHWVPNT (SEQ ID NO:305)、RGACDIPFPWAHWIPNT (SEQ ID NO:306)、QGDFDIPFPWAHWVPIT (SEQ ID NO:162)、XGafDIPFPWAHWvPnT (SEQ ID NO:307)、RGDGNDSDIPFPWAHWVPRT (SEQ ID NO:308)、SGVGRDRDIPFPWAHWVPRT (SEQ ID NO:309)、WAGGNDCDIPFPWAHWIPNT (SEQ ID NO:310)、WGDGMDVDIPFPWAHWVPVT (SEQ ID NO:311)、AGSGNDSDIPFPWAHWVPRT (SEQ ID NO:312)、ESRSGYADIPFPWAHWVPRT (SEQ ID NO:313) 和/或 RECGRCGDIPFPWAHWVPRT (SEQ ID NO:314)。

[0205] 与未被MM修饰的AB与靶标的特异性结合或亲代AB与靶标的特异性结合相比,当AB被MM修饰且在靶标存在时,AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。

[0206] 被MM修饰的AB对于靶标的 K_d 是未被MM修饰的AB或亲代AB对于靶标的 K_d 的至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或介于5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、10-100,000,000倍或更多倍之间。相反地,被MM修饰的AB对于靶标的结合亲和力是未被MM修饰的AB或亲代AB对于靶标的结合亲和力的至多1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/20、1/25、1/40、1/50、1/100、1/250、1/500、1/1,000、1/2,500、1/5,000、1/10,000、1/50,000、1/100,000、1/500,000、1/1,000,000、1/5,000,000、1/10,000,000、1/50,000,000或更低,或介于1/5-1/10、1/10-1/100、1/10-1/1,000、1/10-1/10,000、1/10-1/100,000、1/10-1/1,000,000、1/10-1/10,000,000、1/100-1/1,000,000、1/100-1/10,000,000、1/100-1/10,000,000、1/100-1/10,000,000、1/100-1/10,000,000、1/100-1/10,000,000或100,000-10,000,000倍之间。

[0207] MM对于AB的解离常数(K_d)一般大于AB对于靶标的 K_d 。MM对于AB的 K_d 可为AB对于靶标的 K_d 的至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反地,MM对于AB的结合亲和力一般低于AB对于靶标的结合亲和力。MM对于AB的结合亲和力可为AB对于靶标的结合亲和力的至多1/5、1/10、1/25、1/50、1/100、1/250、1/500、1/1,000、1/2,500、1/5,000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000或甚至1/10,000,000。

[0208] 与未被MM修饰的AB与靶标的特异性结合或亲代AB与靶标的特异性结合相比,当AB被MM修饰且在靶标存在时AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体内或在体外测定

法中测量时,当与未被MM修饰的AB与靶标的结合或亲代AB与靶标的结合相比时,当被MM修饰时AB结合靶标的能力可降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%达至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更久。

[0209] MM抑制AB与靶标结合。MM结合AB的抗原结合结构域并抑制AB与靶标结合。MM可在空间上抑制AB与靶标结合。MM可变构地抑制AB与其靶标结合。在这些实施方案中,当在体内或在体外测定法中测量时,与未被MM修饰的AB、亲代AB或未与MM偶联的AB与靶标的结合相比,当AB被修饰或与MM偶联并在靶标存在时,AB与靶标没有结合或基本上没有结合,或AB与靶标结合不超过0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或50%达至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长。

[0210] 当AB与MM偶联或被MM修饰时,MM“掩蔽”或降低或以别的方式抑制AB与靶标特异性结合。当AB与MM偶联或被MM修饰时,所述偶联或修饰可引起降低或抑制AB特异性结合其靶标的能力的结构改变。

[0211] 与MM偶联或被MM修饰的AB可用下式表示(以从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序):

(MM) - (AB)

(AB) - (MM)

(MM) - L - (AB)

(AB) - L - (MM)

其中MM为掩蔽部分,AB为抗体或其抗体片段,L为接头。在许多实施方案中,可能需要将一个或多个接头(例如柔性接头)插入该组成中使得提供柔性。

[0212] 在某些实施方案中,MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不含或基本不含同源性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相似性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过25%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过20%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过10%同一性。

[0213] 在一些实施方案中,可激活抗体包括被MM修饰的AB并还包括一个或多个可切割部分(CM)。所述可激活抗体显示与AB的靶标的可激活/可转换的结合。可激活抗体一般包括被掩蔽部分(MM)修饰或与掩蔽部分(MM)偶联的抗体或抗体片段(AB)和可修饰或可切割部分(CM)。在一些实施方案中,CM含有用作至少一种目标基质金属蛋白酶的底物的氨基酸序列。

[0214] 排列可激活抗体的元件使得MM和CM如此定位致使在切割(或相对活性)的状态下且在靶标存在时AB结合靶标,而在未切割(或相对无活性)的状态下在靶标存在时,AB与其

靶标的特异性结合被降低或抑制。由于AB特异性结合其靶标的能力被MM抑制或掩蔽所致，AB与其靶标的特异性结合可被降低。

[0215] 被MM和CM修饰的AB对于靶标的 K_d 是未被MM和CM修饰的AB或亲代AB对于靶标的 K_d 的至少5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更大，或介于5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1,000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍之间。相反地，被MM和CM修饰的AB对于靶标的结合亲和力是未被MM和CM修饰的AB或亲代AB对于靶标的结合亲和力的至多1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/20、1/25、1/40、1/50、1/100、1/250、1/500、1/1,000、1/2,500、1/5,000、1/10,000、1/50,000、1/100,000、1/500,000、1/1,000,000、1/5,000,000、1/10,000,000、1/50,000,000或更低，或介于1/5-1/10、1/10-1/100、1/10-1/1,000、1/10-1/10,000、1/10-1/100,000、1/10-1/1,000,000、1/10-1/10,000,000、1/100-1/1,000、1/100-1/10,000、1/100-1/100,000、1/100-1/1,000,000、1/100-1/10,000,000、1/1,000-1/10,000、1/1,000-1/100,000、1/1,000-1/1,000,000、1/1000-1/10,000,000、1/10,000-1/100,000、1/10,000-1/1,000,000或1/100,000-1/10,000,000之间。

[0216] 与未被MM和CM修饰的AB或亲代AB与靶标的特异性结合相比，当AB为被MM和CM修饰且在靶标存在但不在改性剂(例如MMP)存在时，AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体内或在体外测定法中测量时，在与亲代AB与其靶标的结合或未被MM和CM修饰的AB与其靶标的结合相比时，AB当被MM和CM修饰时结合靶标的能力可被降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%达至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长。

[0217] 本文所用术语切割状态是指在CM被至少一种基质金属蛋白酶修饰后可激活抗体的状态。本文所用术语未切割状态是指在不存在CM被MMP切割时可激活抗体的状态。上述术语“可激活抗体”在本文用来指在其未切割(天然)状态以及在其切割状态两者下的可激活抗体。对于普通技术人员显而易见的是，在一些实施方案中，切割的可激活抗体由于CM被蛋白酶切割所致会缺乏MM，导致至少MM释放(例如其中MM不通过共价键(例如半胱氨酸残基间的二硫键)与可激活抗体连接)。

[0218] 所谓可激活或可转换的意指可激活抗体显示当在受抑制、掩蔽或未切割状态下(即第一构象)时与靶标结合的第一水平和在未被抑制、未掩蔽和/或切割状态下(即第二构象)时与靶标结合的第二水平，其中靶标结合的第二水平大于结合的第一水平。一般而言，靶标对可激活抗体的AB的接近在能够切割CM的切割剂存在时大于所述切割剂不存在时。因此，当可激活抗体呈未切割状态时，AB受抑制免于靶标结合且可被掩蔽免于靶标结合(即第一构象使得AB无法结合靶标)，且呈切割状态时，AB与靶标结合不受抑制或不被掩蔽。

[0219] 选择可激活抗体的CM和AB使得AB表示指定靶标的结合部分，CM表示与靶标一起共定位于受试者的治疗部位或诊断部位的MMP的底物。在例如能够切割CM中的位点的MMP以比

在非治疗部位的组织中(例如健康组织中)相对较高的水平存在于治疗部位或诊断部位的含有靶标的组织中时,本文公开的可激活抗体特别有用。

[0220] 在一些实施方案中,如果AB不被掩蔽或以别的方式被抑制免于与靶标结合,则可激活抗体提供可以别的方式产生于非治疗部位AB结合的降低的毒性和/或不良副作用。

[0221] 一般而言,可通过选择目标AB并构建可激活抗体的其余部分来设计可激活抗体,使得当在构象上被限制时,MM提供掩蔽AB或降低AB与其靶标结合。可考虑结构设计标准以提供该功能特征。

[0222] 提供显示在受抑制构象相对于未被抑制构象中靶标结合的所需动态范围的可转换表型的可激活抗体。动态范围一般是指(a)第一组条件下参数的最大检出水平与(b)第二组条件下参数的最小检出水平的比率。例如在可激活抗体的情况下,动态范围是指(a)在能够切割可激活抗体的CM的MMP存在时与可激活抗体结合的靶蛋白质的最大检出水平与(b)在所述蛋白酶不存在时与可激活抗体结合的靶蛋白质的最小检出水平的比率。可激活抗体的动态范围可计算为可激活抗体切割剂(例如酶)处理的平衡解离常数与该可激活抗体切割剂处理的平衡解离常数的比率。可激活抗体的动态范围越大,可激活抗体的可转换表型越好。具有相对较高动态范围值(例如大于1)的可激活抗体显示更可取的转换表型,使得与切割剂不存在时相比,在能够切割可激活抗体的CM的切割剂(例如酶)存在时,通过可激活抗体的靶蛋白质结合发生至较大程度(例如主要发生)。

[0223] 可激活抗体可以各种结构配置提供。下面提供示例性可激活抗体式。明确预期,AB、MM和CM的N端至C端的顺序可在可激活抗体内逆转。还明确预期,CM和MM可在氨基酸序列中重叠,例如使得CM被包含在MM内。

[0224] 例如可激活抗体可用下式表示(以从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序:

(MM) - (CM) - (AB)
(AB) - (CM) - (MM)

其中MM为掩蔽部分,CM为可切割部分,AB为抗体或其片段。应注意虽然MM和CM在上式中表示为截然不同的组分,但是在本文公开的所有示例性实施方案(包括式)中,预期MM和CM的氨基酸序列可重叠,例如使得CM完全或部分包含在MM内。另外,上式提供可位于可激活抗体元件的N端或C端的其它氨基酸序列。

[0225] 在某些实施方案中,MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不含或基本不含同源性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相似性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过25%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过20%同一性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体有不超过10%同一性。

[0226] 在许多实施方案中,可能需要将一个或多个接头(例如柔性接头)插入可激活抗体构建体中,使得在MM-CM连接处、CM-AB连接处或两者的一处或多处提供柔性。例如AB、MM和/或CM可能不含足够数目的残基(例如Gly、Ser、Asp、Asn,尤其Gly和Ser,特别Gly)以提供所

需的柔性。因此所述可激活抗体构建体的可转换表型可获益于引入一个或多个氨基酸以提供柔性接头。另外,如下所述,在可激活抗体作为在构象上受限的构建体提供时,可有效插入柔性接头以促进未切割的可激活抗体中环状结构的形成和保持。

[0227] 例如在某些实施方案中,可激活抗体包含下式之一(其中下式表示以N端至C端方向或C端至N端方向的氨基酸序列) :

(MM) -L1- (CM) - (AB)

(MM) - (CM) - L2- (AB)

(MM) - L1- (CM) - L2- (AB)

其中MM、CM和AB如上定义;其中L1和L2各自独立且任选存在或不存在,是包括至少1个柔性氨基酸(例如Gly)的相同或不同的柔性接头。另外,上式提供可位于可激活抗体元件的N端或C端的其它氨基酸序列。实例包括但不限于靶向部分(例如存在于靶标组织中的细胞的受体的配体)和血清半寿期延长部分(例如结合血清蛋白质的多肽,例如免疫球蛋白(例如IgG)或血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HAS)))。

[0228] CM按以下速率被至少一种MMP特异性切割:约 $0.001\text{--}1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 或至少0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250或 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。

[0229] 对于被酶特异性切割,实现酶和CM间的接触。包含与MM和CM偶联的AB的可激活抗体在靶标和足够的酶活性存在时,CM可被切割。足够的酶活性可指酶进行与CM接触和实现切割的能力。可容易地预期因为其它细胞因子或酶的蛋白质修饰,酶可在CM附近但不能切割。

[0230] 适用于本文所述组成的接头一般是这样的接头,其提供修饰的AB或可激活抗体的柔性以利于AB与靶标结合的抑制。所述接头一般称为柔性接头。可容易地选择合适的接头,且合适的接头可具有任何合适的不同长度,例如1个氨基酸(例如Gly)-20个氨基酸、2个氨基酸-15个氨基酸、3个氨基酸-12个氨基酸,包括4个氨基酸-10个氨基酸、5个氨基酸-9个氨基酸、6个氨基酸-8个氨基酸或7个氨基酸-8个氨基酸,且长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

[0231] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)n、(GSGGS)n(SEQ ID N0:1)和(GGGS)n(SEQ ID N0:2),其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此能够用作组分间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸更显著接近 ϕ - ψ 空间,且受到比具有较长侧链的残基小得多的限制(参见Scherraga, Rev.Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性的柔性接头包括但不限于Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID N0:3)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID N0:4)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID N0:5)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID N0:6)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID N0:7)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID N0:8)等。本领域普通技术人员应认识到,可激活抗体的设计可包括是全部或部分是柔性的接头,使得接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构的一个或多个部分以提供所需的可激活抗体结构。

[0232] 在一些实施方案中,本文所述可激活抗体还包括与可激活抗体缀合的作用剂。在一些实施方案中,缀合剂为治疗剂,例如抗炎剂和/或抗肿瘤剂。在所述实施方案中,作用剂

与可激活抗体的糖部分缀合，例如在一些实施方案中，其中糖部分位于可激活抗体中抗体或抗原结合片段的抗原结合区以外。在一些实施方案中，作用剂与可激活抗体中的抗体或抗原结合片段的巯基缀合。

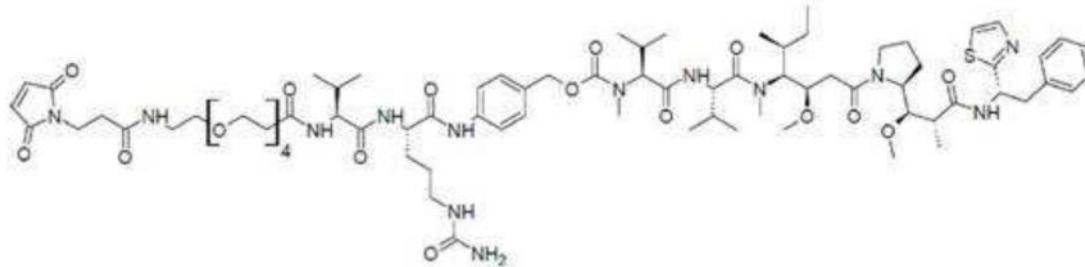
[0233] 在一些实施方案中，作用剂是细胞毒性剂例如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。

[0234] 在一些实施方案中，作用剂是可检测部分例如标记或其它标志物。例如作用剂是或包括放射性标记的氨基酸、可通过标记的抗生素蛋白检测的一种或多种生物素部分(例如含有可通过光学或量热方法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生素)、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，可检测部分通过间隔分子连接。

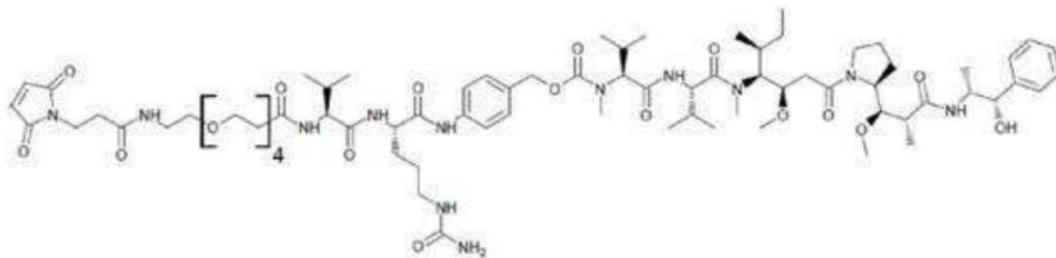
[0235] 本公开内容还涉及包含与细胞毒性剂例如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)缀合的抗体的免疫缀合物。合适的细胞毒性剂包括例如多拉司他汀及其衍生物(例如阿里他汀E、AFP、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE)。例如作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)或单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中，作用剂是选自表3所列的作用剂。在一些实施方案中，作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中，作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中，作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中，作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中，作用剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中，作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中，作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中，作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中，作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中，作用剂是吡咯并苯并二氮杂草。

[0236] 在一些实施方案中，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-瓜氨酸接头使作用剂与AB连接。在一些实施方案中，使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头使作用剂与AB连接。在一些实施方案中，使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头使作用剂与AB连接。在一些实施方案中，作用剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头与AB连接的单甲基阿里他汀D(MMAD)，该接头有效负荷构建体在本文称为“vc-MMAD”。在一些实施方案中，作用剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头与AB连接的单甲基阿里他汀E(MMAE)，且该接头有效负荷构建体在本文称为“vc-MMAE”。vc-MMAD和vc-MMAE的结构如下：

vc-MMAD：



vc-MMAE：



可使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉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(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、塑莲根毒蛋白A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制物(*Momordica charantia* inhibitor)、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Sapaponaria officinalis*)抑制物、多花白树毒蛋白、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢菌毒素。可获得各种放射性核素用于放射性缀合的抗体的产生。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0237] 使用各种双官能蛋白质偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基噻烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(例如己二(亚胺酸)二甲酯HCL)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(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)、双重氮衍生物(例如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(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),实现抗体和细胞毒性剂的缀合。例如可按Vitetta等,Science 238:1098(1987)所述,制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是示例性的螯合剂,用于放射性核苷酸(radionucleotide)与抗体缀合。(参见W094/11026)。

[0238] 表3列出可应用于本文所述公开内容的一些示例性药剂,但绝无意是穷尽性列表。

[0239] 表3:用于缀合的示例性药剂

细胞毒性剂

阿里他汀

涡轮他汀(Turbostatin)

阿里他汀E

Phenstatins

单甲基阿里他汀D(MMAD)

羟基phenstatin

单甲基阿里他汀E(MMAE)

Spongistatin 5

脱甲基阿里他汀E(DMAE)

Spongistatin 7

阿里他汀F

Halistatin 1

单甲基阿里他汀F(MMAF)

Halistatin 2

脱甲基阿里他汀F(DMAF)

Halistatin 3

阿里他汀衍生物，例如其酰胺	修饰的苔藓抑素
阿里他汀酪胺	Halocomstatins
阿里他汀喹啉	吡咯并苯并咪唑类(PBI)
多拉司他汀	Cibrostatin6
多拉司他汀衍生物	Doxaliform
多拉司他汀 16 DmJ	Anthracyclins 类似物
多拉司他汀 16 Dpv	
类美登素，例如 DM-1; DM-4	
类美登素衍生物	西马多丁类似物(CemCH2-SH)
倍癌霉素	假单胞菌毒素 A (PE38)变体
倍癌霉素衍生物	假单胞菌毒素 A (ZZ-PE38)变体
α -鹅膏菌素	ZJ-101
葱环类抗生素	OSW-1
多柔比星	O6-苄基鸟嘌呤的 4-硝基苄氧羰基衍生物
柔红霉素	拓朴异构酶抑制剂
苔藓抑素	哈米特林(Hemiasterlin)
喜树碱	三尖杉碱
喜树碱衍生物	高三尖杉酯碱
7-取代的喜树碱	吡咯并苯并二氮杂草二聚体(PBD)
10, 11-二氟亚甲基二氧基喜树碱	官能化的吡咯并苯并二氮杂环庚烯
考布他汀	卡奇霉素
脱溴海兔毒素	鬼臼毒素
Kahalalide-F	紫杉烷
Discodermolide	长春花生物碱类
Ecteinascidins	
<u>可缓合的检测试剂</u>	
<u>抗病毒剂</u>	荧光素和其衍生物
阿昔洛韦	异硫氰酸荧光素(FITC)
Vira A	
Symmetrel	
<u>放射性药物</u>	
	^{125}I
<u>抗真菌剂</u>	^{131}I
制霉菌素	^{89}Zr
	^{111}In
<u>其它抗-肿瘤剂</u>	^{123}I
阿霉素	^{131}I
柔红霉素	^{99}mTc
博来霉素	^{201}Tl

左旋溶肉瘤素	^{133}Xe
硫酸长春碱制剂	^{11}C
长春新碱	^{62}Cu
氟尿嘧啶	^{18}F
甲氨蝶呤	^{68}Ga
塞替派	^{13}N
比生群	^{15}O
诺消灵	^{38}K
硫鸟嘌呤	^{82}Rb
丙卡巴肼	^{99m}Tc (锝)
阿糖胞苷	

重金属

<u>抗-细菌剂</u>	钡
氨基糖苷类	金

链霉素	铂
新霉素	

卡那霉素	<u>抗-支原体剂</u>
阿米卡星	泰乐菌素(Tylosine)

庆大霉素	大观霉素
妥布霉素	

链霉素 B
大观霉素

氨基西林
磺胺

多粘菌素
氯霉素

本领域普通技术人员应认识到,可使各种可能的部分与所得的本公开内容的抗体偶联。(参见例如“缀合疫苗(Conjugate Vaccines)”,Contributions to Microbiology and Immunology,J.M.Cruise和R.E.Lewis,Jr(编辑),Carver Press,NewYork,(1989),其完整内容通过引用结合到本文中)。

[0240] 偶联可通过结合两个分子的任何化学反应实现,只要抗体和其它部分保留其相应活性。这种连接可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、插入、配位结合和络合。然而,在一些实施方案中,结合是共价结合。可通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的掺入实现共价结合。许多二价或多价连接剂可用于使蛋白质分子(例如本公开内容的抗体)与其它分子偶联。例如代表性偶联剂可包括有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和己二胺。该列表无意指穷尽本领域已知的各种偶联剂类别,而是较常见的偶联剂的例举。(参见Killen和Lindstrom,Jour.Immun.133:1335-2549(1984);Jansen等,Immunological Reviews 62:185-216(1982);以及Vitetta等,Science 238:1098(1987))。

[0241] 在一些实施方案中,除本文提供的组合物和方法以外,还可通过插入或以别的方式包括在可激活抗体序列内的修饰氨基酸序列对缀合的可激活抗体进行修饰以进行位点

特异性缀合。设计这些修饰的氨基酸序列以允许在缀合的可激活抗体内缀合剂的受控安置和/或剂量。例如可对可激活抗体进行改造以在提供反应性硫醇基且不负面影响蛋白质折叠和装配、也不改变抗原结合的轻链和重链的位置上包括半胱氨酸取代。在一些实施方案中,可对可激活抗体进行改造以在可激活抗体内包括或以别的方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供用于缀合的合适位置。在一些实施方案中,可对可激活抗体进行改造以在可激活抗体序列内包括或以别的方式引入可用酶激活的肽序列。

[0242] 合适的接头描述于文献。(参见例如描述MBS(M-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用的Ramakrishnan,S.等,Cancer Res.44:201-208(1984))。另参见描述通过寡肽接头与抗体偶联的卤代乙酰基酰肼衍生物的使用的美国专利号5,030,719。在一些实施方案中,合适的接头包括:(i)EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐;(ii)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.,目录号(21558G);(iii)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.,目录号21651G);(iv)碘基-LC-SPDP(碘基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基联硫基)-丙酰胺]己酸酯(Pierce Chem.Co.,目录号2165-G);和(v)与EDC缀合的碘基-NHS(N-羟基碘基-琥珀酰亚胺:Pierce Chem.Co.,目录号24510)。其它接头包括但不限于SMCC、碘基-SMCC、SPDB或碘基-SPDB。

[0243] 上述接头含有具有不同特性的组分,因此导致具有不同物理化学性质的缀合物。例如烷基羧化物的碘基-NHS酯比芳族羧化物的碘基-NHS酯更稳定。含NHS-酯的接头比碘基-NHS酯不易溶解。此外,接头SMPT含有位阻二硫键,并可形成稳定性提高的缀合物。二硫键一般比其它键较不稳定,因为二硫键在体外被切割,产生较少可获得的缀合物。特别是碘基-NHS可提高碳二亚胺偶联的稳定性。碳二亚胺偶联(例如EDC)当与碘基-NHS联用时,形成比仅碳二亚胺偶联反应更耐受水解的酯。

[0244] 在一些实施方案中,接头是可切割的。在一些实施方案中,接头是不可切割的。在一些实施方案中,存在两个或更多个接头。两个或更多个接头全都相同,即可切割或不可切割,或者两个或更多个接头不相同,即至少一个可切割和至少一个不可切割。

[0245] 本公开内容采用使作用剂与AB连接的几种方法:(a)与AB的糖部分连接,或(b)与AB的巯基连接,或(c)与AB的氨基连接,或(d)与AB的羧酸酯基连接。按照本公开内容,AB可通过具有至少2个反应基的中间接头与作用剂共价连接,一个接头与AB反应,一个与作用剂反应。可选择可包括任何相容的有机化合物的接头,使得与AB(或作用剂)的反应不会不利地影响AB反应性和选择性。此外,接头与作用剂的连接不会破坏作用剂的活性。与氧化的抗体或氧化的抗体片段反应的合适接头包括含有选自伯胺、仲胺、肼、酰肼、羟胺、苯肼、氨基脲和氨基硫脲基的胺的接头。所述反应性官能团可作为接头的结构的一部分存在,或可通过不含所述基团的接头的适当的化学修饰而引入。

[0246] 按照本公开内容,用于与还原的AB连接的合适接头包括具有能够与还原的抗体或片段的巯基反应的某些反应基的接头。所述反应基包括但不限于:反应性卤代烷基(包括例如卤代乙酰基)、对汞基苯甲酸基和能够迈克尔加成反应的基团(包括例如马来酰亚胺和Mitra和Lawton,1979,J.Amer.Chem.Soc.101:3097-3110)所述类型的基团。

[0247] 按照本公开内容,用于与既非氧化也非还原的AB连接的合适接头包括具有能够与存在于Ab中的未修饰的赖氨酸残基的伯氨基反应的某些官能团的接头。所述反应基包括但

不限于NHS羧酸酯或碳酸酯、磺基-NHS羧酸酯或碳酸酯、4-硝基苯基羧酸酯或碳酸酯、五氟苯基羧酸酯或碳酸酯、酰基咪唑、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0248] 按照本公开内容,用于与既非氧化也非还原的AB连接的合适接头包括具有能够与存在于被合适的试剂激活的Ab的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧酸基反应的某些官能团的接头。合适的激活试剂包括含或不含添加的NHS或磺基-NHS的EDC和用于羧酰胺形成的其它脱水剂。在这些情况下,存在于合适的接头中的官能团可包括伯胺和仲胺、肼、羟胺和酰肼。

[0249] 作用剂可在接头与AB连接之前或之后与接头连接。在某些应用中,可能需要先产生AB-接头中间体,其中接头不含相关作用剂。根据具体应用,则可将具体的作用剂与接头共价连接。在一些实施方案中,AB先与MM、CM和相关接头连接,然后与用于缀合目的的接头连接。

[0250] 分支接头:在具体的实施方案中,利用具有用于作用剂连接的多个位点的分支接头。对于多位点接头,与AB的单一共价连接可导致能够在多个位点结合作用剂的AB-接头中间体。位点可以是醛或巯基或任何作用剂可与之连接的化学位点。

[0251] 在一些实施方案中,较高比活(或作用剂与AB的较高比率)可通过AB上的多个位点的单位点接头的连接来实现。这种众多的位点可通过两种方法引入AB中。第一,可在同一AB中产生多个醛基和/或巯基。第二,可使与AB的醛或巯基(具有用于随后与接头连接的多功能位点的一种“分支接头”)连接。分支接头或多位点接头的功能位点可以是醛或巯基或可以是接头可与之连接的任何化学位点。可通过综合这两种方法,也就是说使多位点接头与AB上的多个位点连接,获得甚至更高的比活。

[0252] 可切割接头:容易被补体系统的酶(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)切割的肽接头可用于本公开内容的一个实施方案。按照本公开内容的方法,作用剂通过易被补体切割的接头连接。抗体选自可激活补体的类别。抗体-作用剂缀合物因此激活补体级联并在靶部位释放作用剂。按照本公开内容的另一种方法,作用剂通过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)切割的接头连接。这些可切割接头可用于包括胞外毒素的缀合的可激活抗体,例如以非限制性实例为例,表3所示任何胞外毒素。

[0253] 表4提供可切割接头序列的非限制性实例。

[0254] 表4:用于缀合的示例性接头序列

可切割序列的类型	氨基酸序列
<u>纤溶酶可切割序列</u>	
尿激酶原	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 127)
TGF β	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 128)
纤溶酶原	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 129)
葡萄球菌激酶	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 130)
<u>因子 Xa 可切割序列</u>	
	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 131)
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 132)
	IEGR (SEQ ID NO: 133)
	IDGR (SEQ ID NO: 134)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 135)
<u>MMP 可切割序列</u>	
明胶酶 A	PLGLWA (SEQ ID NO: 136)
<u>胶原酶可切割序列</u>	
牛皮肤胶原($\alpha_1(I)$ 链)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 137)
牛皮肤胶原($\alpha_2(I)$ 链)	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 138)
牛软骨胶原($\alpha_1(II)$ 链)	GIAGQ (SEQ ID NO: 139)
人肝胶原($\alpha_1(III)$ 链)	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 140)
人 α_2 M	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 141)
人 PZP	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 142)
大鼠 α_1 M	AGLGVVER (SEQ ID NO: 143)
大鼠 α_2 M	AGLGISST (SEQ ID NO: 144)
大鼠 α_1 I ₃ (2J)	EPQALAMS (SEQ ID NO: 145)
大鼠 α_1 I ₃ (27J)	QALAMSAI (SEQ ID NO: 146)
人成纤维细胞胶原酶	AAYHLVVSQ (SEQ ID NO: 147)
<u>(自溶切割)</u>	MDAFLESS (SEQ ID NO: 148)
	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 149)
	SAPAVESE (SEQ ID NO: 150)
	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 151)
	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 152)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 153)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 154)

另外,作用剂可通过二硫键(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),所以这可还原二硫键,随后在递送部位释放作用剂。在某些具体的实施方案中,可修饰CM的还原剂还可修饰缀合的可激活抗体的接头。

[0255] 间隔物和可切割元件:在一些实施方案中,还需要以使作用剂和可激活抗体的AB之间的间隔优化的方式构建接头。这可使用以下通用结构的接头实现:

W- $(\text{CH}_2)_n$ -Q

其中

W为--NH--CH₂--或--CH₂--；

Q为氨基酸、肽；和

n为0-20的整数。

[0256] 在一些实施方案中，接头可包含间隔物元件和可切割元件。间隔物元件用作使可切割元件位于远离AB的核心，使得可切割元件更容易接近负责切割的酶。某些上述分支接头可用作间隔物元件。

[0257] 在整个阐述中，应了解，接头与作用剂的连接（或间隔物元件与可切割元件，或可切割元件与作用剂的连接）不必是特定的连接或反应方式。提供合适的稳定性和生物相容性的产物的任何反应均是可接受的。

[0258] 血清补体与接头的选择：按照本公开内容的方法，在需要释放作用剂时，使用作为可激活补体的类别的抗体的AB。所得缀合物保留结合抗原并激活补体级联两者的能力。因此，按照本公开内容的这个实施方案，作用剂与可切割接头或可切割元件的一端连接，接头基团的另一端与AB的特定位点连接。例如，如果作用剂具有羟基或氨基，则可分别通过酯键或酰胺键与肽、氨基酸或其它适当选择的接头的羧基端连接。例如所述作用剂可通过碳二亚胺反应与接头肽连接。如果作用剂含有可干扰与接头连接的官能团，则可在连接前封闭这些干扰官能团，并且一旦制备产物缀合物或中间体，则解封闭。然后直接或在进一步修饰后使用接头的相反端或氨基端与能够激活补体的AB结合。

[0259] 接头（或接头的间隔物元件）可具有任何所需长度，其一端可与可激活抗体的AB的特定位点共价连接。接头或间隔物元件的另一端可与氨基酸或肽接头连接。

[0260] 因此当这些缀合物在补体存在下与抗原结合时，将切割使作用剂与接头连接的酰胺键或酯键，导致作用剂以其活性形式释放。这些缀合物当给予受试者时，将实现作用剂在靶部位的递送和释放，并且对于如表3提供的药剂、抗生素、抗代谢物、抗增殖剂等（但不限于此）的体内递送是特别有效的。

[0261] 用于释放而无补体活化的接头：在靶向递送的又一个应用中，需要无补体活化的作用剂的释放，因为补体级联的活化最终将裂解靶细胞。因此，当作用剂的递送和释放应在不杀死靶细胞的情况下完成时，该方法是有用的。当需要将例如激素、酶、皮质甾类、神经递质、基因或酶等细胞介质递送至靶细胞时，这才是目的。可通过使作用剂通过适度易被血清蛋白酶切割的接头与能够激活补体的AB连接，来制备这些缀合物。当把该缀合物给予个体时，可快速形成抗原-抗体复合物，而作用剂的切割将慢慢发生，因此导致化合物在靶部位中释放。

[0262] 生物化学交联剂：在一些实施方案中，可使用某些生物化学交联剂使可激活抗体与一种或多种治疗剂缀合。交联试剂形成使两个不同分子的官能团连接在一起的分子桥。为了以逐步方式连接两种不同的蛋白质，可使用消除不需要的均聚物形成的异双官能交联剂。

[0263] 可被溶酶体蛋白酶切割的肽基接头也是有用的，例如Val-Cit、Val-Ala或其它二肽。另外，可使用在溶酶体的低pH环境下可切割的酸不稳定接头，例如双唾液酸酰。其它合适的接头包括组织蛋白酶不稳定底物，特别是在酸性pH下显示最佳功能的底物。

[0264] 示例性的异双官能交联剂参照表5。

[0265] 表5：示例性的异双官能交联剂

异双官能交联剂

接头	针对以下起作用	优势和应用	在交联后的间隔臂长度(埃)
SMPT	伯胺	较大稳定性	11.2 Å
	巯基		
SPDP	伯胺	硫醇化 可切割交联	6.8 Å
	巯基		
LC-SPDP	伯胺	延长的间隔臂	15.6 Å
	巯基		
磺基-LC-SPDP	伯胺	延伸的间隔臂 水溶性	15.6 Å
	巯基		
SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应基 酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋白缀合	11.6 Å
	巯基		
磺基-SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应基 水溶性 酶-抗体缀合	11.6 Å
	巯基		
MBS	伯胺	酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋白缀合	9.9 Å
	巯基		
磺基-MBS	伯胺	水溶性	9.9 Å
	巯基		
SIAB	伯胺	酶-抗体缀合	10.6 Å
	巯基		
磺基-SIAB	伯胺	水溶性	10.6 Å
	巯基		
SMPB	伯胺	延长的间隔臂 酶-抗体缀合	14.5 Å
	巯基		
磺基-SMPB	伯胺	延长的间隔臂 水溶性	14.5 Å
	巯基		
EDE/磺基-NHS	伯胺	半抗原-载体蛋白缀合	0
	羧基		
ABH	糖	与糖基团反应 非选择性	11.9 Å

不可切割接头或直接连接；在本公开内容的一些实施方案中，可设计缀合物使得将作用剂递送至靶标但不被释放。这可通过使作用剂直接或通过非可切割的接头与AB连接来实现。

[0266] 这些不可切割接头可包括氨基酸、肽、D-氨基酸或可被修饰以包括随后可用于通过本文所述方法与AB连接的官能团的其它有机化合物。所述有机接头的通式可为：

W- $(\text{CH}_2)_n\text{Q}$

其中

W为--NH--CH₂--或--CH₂--；

Q为氨基酸，肽；和

n为0-20的整数。

[0267] 不可切割缀合物：在一些实施方案中，可使化合物与不激活补体的AB连接。当使用不能够补体活化的AB时，该连接可使用易被活化补体切割的接头或使用通过不易被活化补体切割的接头来实现。

[0268] 本文公开的抗体也可配制为免疫脂质体。通过本领域已知方法，例如描述于Epstein等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688(1985)；Hwang等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030(1980)和美国专利号4,485,045和4,544,545的方法，制备含有抗体的脂质体。循环时间延长的脂质体描述于美国专利号5,013,556。

[0269] 特别有用的脂质体可通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。使脂质体通过规定孔径的滤器挤出，得到具有所需直径的脂质体。可按Martin等，J.Biol.Chem.,257:286-288(1982)所述，通过二硫键交换反应，使本公开内容的抗体的Fab'片段与脂质体缀合。

[0270] 定义：

除非另有说明，否则与本公开内容联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。术语“a”实体或“an”实体是指该实体的一个或多个。例如化合物是指一种或多种化合物。因此术语“a”、“an”、“一种或多种”和“至少一种”可互换使用。此外，除非文中另有要求，否则单数术语应包括复数，复数术语应包括单数。一般而言，结合本文所述细胞和组织培养、分子生物学和蛋白质及寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交技术使用的命名法是本领域众所周知和常用的那些。将标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成及组织培养和转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术按照生产商说明书或按本领域通常实施的或本文描述的进行。按照本领域众所周知的常规方法并按整个本说明书中引述和阐述的各种通用和更具体的参考文献中所述的实施前述技术和程序。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))。与本文所述分析化学、合成有机化学及医学和制药化学的实验室规程和技术联用的命名法是众所周知和常用于本领域的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制剂、制剂和递送及患者治疗。

[0271] 如按照本公开内容所用，除非另有说明，否则下列术语应理解为具有以下含义：

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，即含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合部位的分子。所谓“特异性结合”或“与……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且不与其它多肽反应或以较低得多的亲和力($K_d > 10^{-6}$)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。

[0272] 已知基本的抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成，每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约100-110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分界定主要负

责效应子功能的恒定区。一般而言，获自人的抗体分子是指类别IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任一种，其因存在于分子中的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有亚类，例如IgG₁、IgG₂等。此外，在人中，轻链可以是κ链或λ链。

[0273] 本文所用术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指抗体分子群，其只含有由独特轻链基因产物和独特重链基因产物组成的抗体分子的一种分子类别。具体地说，单克隆抗体的互补决定区(CDR)在该群的所有分子中都相同。MAb含有能与特征在于对其有独特结合亲和力的抗原的特定表位免疫反应的抗原结合部位。

[0274] 术语“抗原结合部位”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合部位由重(“H”)链和轻(“L”)链的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区的3个高度趋异的序列段(称为“超变区”)插在更保守的侧翼序列段(称为“构架区”或“FR”的)之间。因此，术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白的超变区之间和与免疫球蛋白的超变区相邻的氨基酸序列。在抗体分子中，轻链的3个超变区和重链的3个超变区在三维空间中彼此相对配置在一起形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补，重链和轻链每一个的3个超变区称为“互补决定区”或“CDR”。各结构域中氨基酸的位置编号符合Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987和1991))或Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196: 901-917(1987); Chothia等, Nature 342:878-883(1989)的定义。

[0275] 本文所用术语“表位”包括能够与免疫球蛋白、scFv或T细胞受体特异性结合的任何蛋白质决定簇。术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面群聚组成，并用通常具有特定的三维结构特性以及特定的电荷特性。例如可针对多肽的N端或C端肽产生抗体。当解离常数≤1μM时，抗体被称为特异性结合抗原；在一些实施方案中，≤100nM，而在一些实施方案中，≤10nM。

[0276] 本文所用术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白对其有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。可以相互作用的解离常数(K_d)表示免疫结合相互作用的强度或亲和力，其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。可采用本领域众所周知的方法，定量测定所选多肽的免疫结合性质。一种这样的方法能够测量抗原结合部位/抗原复合物形成和解离的速率，其中这些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同等影响速率的几何参数。因此，可通过计算浓度和缔合和解离的实际速率来确定“结合速率”(K_{on})和“解离速率”(K_{off})两者。(参见Nature 361: 186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率能够排除与亲和力无关的所有参数，并等于解离常数 K_d 。(一般参见Davies等(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。如通过例如放射性配体结合测定法等测定法或本领域技术人员已知的类似测定法测量的，当平衡结合常数(K_d)≤1μM，在一些实施方案中≤100nM，在一些实施方案中≤10nM，而在一些实施方案中≤100pM-约1pM时，本公开内容的抗体被称为对靶标有特异性结合。

[0277] 本文所用术语“分离的多核苷酸”可意指基因组、cDNA或合成源或其一些组合的多核苷酸，根据其来源，“分离的多核苷酸”(1)不与“分离的多核苷酸”在自然界存在于其中的多核苷酸的全部或一部分结合，(2)与在自然界不与之连接的多核苷酸有效连接，或(3)在自然界不作为较大序列的部分存在。本公开内容的多核苷酸包括编码本文所示重链免疫球

蛋白分子的核酸分子和编码本文所示轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0278] 术语“分离的蛋白质”在本文是指cDNA、重组RNA或合成源或其一些组合的蛋白质，根据其来源或衍生的来源，“分离的蛋白质”(1)不与存在于自然界的蛋白质结合，(2)不含来自相同来源的其它蛋白质，例如不含鼠蛋白质，(3)由来自不同物种的细胞表达，或(4)自然界中不存在。

[0279] 术语“多肽”在本文用作通用术语，是指天然蛋白质、多肽序列的片段或类似物。因此，天然蛋白质片段和类似物是多肽属的种类。本公开内容的多肽包含本文所示重链免疫球蛋白分子和本文所示轻链免疫球蛋白分子以及由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(反之亦然)形成的抗体分子及其片段和类似物。

[0280] 本文所用术语“天然存在的”在用于某一对象时是指该对象存在于自然界中的事实。例如存在于生物(包括病毒)中、可从自然界分离且不是实验室中人为有意修饰的或本来是天然存在的多肽或多核苷酸序列。

[0281] 本文所用术语“有效连接”是指所述组分的位置位于允许它们以其既定方式起作用的关系。与编码序列“有效连接”的控制序列以在与控制序列相容的条件下实现编码序列表达的方式连接。

[0282] 本文所用术语“控制序列”是指实现其所连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。所述控制序列的性质随原核生物中的宿主生物而不同，所述控制序列在真核生物中一般包括启动子、核糖体结合部位和转录终止序列，一般来讲，所述控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”欲包括至少其存在是表达和加工必需的所有组分，并还可包括其存在是有利的其它组分，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”意指长为至少10个碱基的核苷酸、核糖核苷酸或脱氧核苷酸或核苷酸任一类型的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0283] 本文提及的术语寡核苷酸包括由天然存在的和非天然存在的寡核苷酸键连接在一起的天然存在的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是一般包含长为200个碱基或更少的多核苷酸亚类。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度为10-60个碱基，而在一些实施方案中，长为12、13、14、15、16、17、18、19个或20-40个碱基。寡核苷酸通常为单链的，例如对于探针，虽然寡核苷酸可为双链的，例如用于构建基因突变体。本公开内容的寡核苷酸是有义或反义寡核苷酸。

[0284] 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“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“寡核苷酸键”包括寡核苷酸键例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯(phoshoranilate)、氨基磷酸酯(phosphorimidate)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 CancerDrugDesign 6:539(1991);Zon等,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,第87-108页(F.Eckstein,编辑,OxfordUniversityPress,OxfordEngland(1991));Stec等,美国专利号5,151,510;Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)。需要时，寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0285] 如本文所用,20个常用氨基酸及其缩略语遵循常规用法。参见Immunology-A Synthesis(第2版,E.S.Golub和D.R.Gren,编辑,SinauerAssociates,Sunderland7 Mass.(1991))。20个常用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、乳酸和其它非常用氨基酸也可为本公开内容的多肽的合适组分。非常用氨基酸的实例包括:4羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸和其它类似氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟基脯氨酸)。在本文所用多肽表示法中,按照标准用法和惯例,左手方向是氨基端方向,右手方向是羧基端方向。

[0286] 同样,除非另有说明,否则单链多核苷酸序列的左手端是双链多核苷酸序列的5'端左手方向,被称为5'方向。新生RNA转录物的5'-3'加入方向被称为转录方向,DNA链上具有与RNA相同的序列且是RNA转录物的5'至5'端的序列区被称为“上游序列”,DNA链上具有与RNA相同的序列且是RNA转录物3'至3'端的序列区称为“下游序列”。

[0287] 当应用于多肽时,术语“基本同一性”意指在例如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重进行最佳比对时,2个肽序列共有至少80%序列同一性,在一些实施方案中,至少90%序列同一性,在一些实施方案中,至少95%序列同一性,而在一些实施方案中,至少99%序列同一性。

[0288] 在一些实施方案中,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。

[0289] 如本文所述,预期抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变化为本公开内容所包括,条件是氨基酸序列的变化在一些实施方案中,保持至少75%、至少80%、90%、95%,而在一些实施方案中保持99%。特别是预期保守氨基酸置换。保守置换是发生在其侧链上相关的氨基酸的家族内的置换。遗传编码的氨基酸一般被分成以下家族:(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)无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,其是脂族-羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨酰胺,其是含有酰胺的家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,其是脂族家族;和(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其是芳族家族。例如,有理由预期,亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸被谷氨酸、苏氨酸被丝氨酸的单独置换或氨基酸被结构相关的氨基酸的类似置换将不会对所得分子的结合或性质有重大作用,尤其如果置换不包括构架位置内的氨基酸。可通过测定多肽衍生物的比活,容易地确定氨基酸变化是否产生功能性肽。本文详细描述了测定法。本领域普通技术人员可容易地制备抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物。片段或类似物的合适的氨基端和羧基端出现在功能结构域的边界附近。可通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专有序列数据库进行比较,来鉴定结构和功能结构域。在一些实施方案中,应用计算机比较方法鉴定已知结构和/或功能的其它蛋白质中出现的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。Bowie等Science 253:164 (1991)。因此,前述实例表明,本领域技术人员可识别可用于界定本公开内容的结构和功能结构域的序列基序和结构构象。

[0290] 合适的氨基酸取代为:(1)降低对蛋白酶解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)改变形成蛋白质复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和(5)赋予或改进所述类似物的其它物理化学或功能性质的氨基酸取代。类似物可包括序列的各种突变蛋白而非天然存在的肽序列。例如,可在天然存在的序列(例如在外形分子间接触的结构域以外的多肽的部分)进行单个或多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)。保守氨基酸取代不应大大改变亲本序列的结构特性(例如置换氨基酸往往不应破坏出现在亲本序列中的螺旋或破坏表征亲本序列的二级结构的其它类型)。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 and 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)。

[0291] 本文所用术语“多肽片段”是指具有氨基端和/或羧基端缺失和/或一个或多个内部缺失,但其余氨基酸序列与例如从全长cDNA序列推导的天然存在的序列的相应位置相同的多肽。片段通常为至少5、6、8或10个氨基酸长,在一些实施方案中,至少14个氨基酸长,在一些实施方案中,至少20个氨基酸长,通常至少50个氨基酸长,而在一些实施方案中,至少70个氨基酸长。本文所用术语“类似物”是指由至少25个氨基酸的区段组成的多肽,其与推导的氨基酸序列的一部分具有相当同一性且在合适的结合条件下对靶标具有特异性结合。通常,相对于天然存在的序列,多肽类似物包含保守氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物通常为至少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,并且常常可像全长天然存在的多肽一样长。

[0292] 术语“作用剂”在本文用来表明化合物、化合物的混合物、生物大分子或从生物材料制备的提取物。

[0293] 本文所用术语“标记”或“标记的”是指可检测标记的掺入,例如通过掺入放射性标记的氨基酸或与可通过标记的抗生物素蛋白(例如含有可通过光学或量热方法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素)检测的生物素部分的多肽连接。在某些情况下,标记或标志也可能是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的多种方法是本领域已知的并可采用。多肽的标记的实例包括但不限于:放射性同位素或放射性核素(例如³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I)、荧光标记(例如FITC、罗丹明、镧系元素磷光体(lanthanide phosphors))、酶标记(例如辣根过氧化物酶、对半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光、生物素基、被第二报道分子识别的预定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合部位、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记不同长度的间隔臂连接以降低可能的位阻。本文所用术语“药剂或药物”是指能够在适当给予患者时引起所需治疗作用的化合物或组合物。

[0294] 按照本领域的常规用法,以The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., 编辑, McGraw-Hill, San Francisco (1985)) 为例,本文使用其它化学术语。

[0295] 本文所用“基本纯的”意指是存在的主要物类的目标物类(object species)(即以摩尔浓度计,它比组合物中的任何其它各物类更丰富),而在一些实施方案中,基本纯的部分是其中目标物类包含存在的所有大分子物类的至少约50%(以摩尔浓度计)的组合物。

[0296] 基本纯的组合物一般可包含超过组合物中存在的所有大分子物类的约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,使物质种类纯化至基本

同质(通过常规检测方法无法检出组合物中的污染物类),其中组合物基本由单一大分子物类组成。

[0297] 术语患者包括人和兽医受试者。

[0298] 本公开内容的可激活抗体特异性结合指定靶标,例如人靶蛋白质。本公开内容还包括与本文所述可激活抗体相同的表位结合的可激活抗体。

[0299] 本领域技术人员应认识到,无需过度实验,通过确定单克隆抗体(例如鼠单克隆或人源化抗体)是否防止本文所述方法所用单克隆抗体与靶标结合便可测定前者是否具有与后者相同的特异性。如通过本公开内容的单克隆抗体的结合降低所示,如果待测单克隆抗体与本公开内容的单克隆抗体竞争,则两种单克隆抗体与相同或密切相关的表位结合。用于测定单克隆抗体是否具有本公开内容的单克隆抗体的特异性的方法是使本公开内容的单克隆抗体与靶标一起预温育,然后加入待测单克隆抗体以确定待测单克隆抗体在其结合靶标的能力上是否被抑制。如果待测单克隆抗体被抑制,则它很可能具有与本公开内容的单克隆抗体相同或功能上相当的表位特异性。

[0300] 多特异性可激活抗体

本公开内容还提供多特异性可激活抗体。本文提供的多特异性可激活抗体是这样的特异性抗体,其识别两种或更多种不同的抗原或表位并包括与多特异性抗体的至少一个抗原结合结构域或表位结合结构域连接的至少一种掩蔽部分(MM),使得MM的偶联降低抗原结合结构域或表位结合结构域结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM通过用作至少一种MMP蛋白酶的底物的可切割部分(CM)与多特异性抗体的抗原结合结构域或表位结合结构域偶联。本文提供的可激活多特异性抗体在循环中是稳定的,在既定治疗和/或诊断部位被激活,但不在正常(即健康)组织中被激活,且当被激活时,显示至少与相应的未修饰的多特异性抗体相当的靶标结合。

[0301] 在一些实施方案中,设计多特异性可激活抗体以占用免疫效应细胞,本文亦称为免疫效应细胞占用性多特异性可激活抗体(*immune-effector cell engaging multispecific activatable antibodies*)。在一些实施方案中,设计多特异性可激活抗体以占用白细胞,本文亦称为白细胞占用性多特异性可激活抗体。在一些实施方案中,设计多特异性可激活抗体以占用T细胞,本文亦称为T细胞占用性多特异性可激活抗体。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体占用白细胞,例如T细胞、自然杀伤(NK)细胞、骨髓单核细胞、巨噬细胞和/或其它免疫效应细胞上的表面抗原。在一些实施方案中,免疫效应细胞是白细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是NK细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是单核细胞,例如骨髓单核细胞。在一些实施方案中,设计多特异性可激活抗体以结合一个以上靶标和/或一个以上表位或以别的方式与之相互作用,本文亦称为多抗原打靶可激活抗体。本文所用术语“靶标”和“抗原”在本文可互换使用。

[0302] 在一些实施方案中,本公开内容的免疫效应细胞占用性多特异性可激活抗体包括打靶抗体或其抗原结合片段和免疫效应细胞占用性抗体或其抗原结合部分,其中打靶抗体或其抗原结合片段和/或免疫效应细胞占用性抗体或其抗原结合部的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,免疫效应细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一免疫效应细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得

MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,免疫效应细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一免疫效应细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力,且打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,非免疫效应细胞占用性抗体为癌症打靶抗体。在一些实施方案中,非免疫细胞效应抗体为IgG。在一些实施方案中,免疫效应细胞占用性抗体为scFv。在一些实施方案中,打靶抗体(例如非免疫细胞效应抗体)为IgG,免疫效应细胞占用性抗体为scFv。在一些实施方案中,免疫效应细胞是白细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是NK细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是骨髓单核细胞。

[0303] 在一些实施方案中,本公开内容的T细胞占用性多特异性可激活抗体包括打靶抗体或其抗原结合片段和T细胞占用性抗体或其抗原结合部分,其中打靶抗体或其抗原结合片段和/或T细胞占用性抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力,且打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。

[0304] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括癌症打靶抗体或其抗原结合片段和T细胞占用性抗体或其抗原结合部分,其中癌症打靶抗体或其抗原结合片段和/或T细胞占用性抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力,且癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0305] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段和T细胞占用性scFv,其中癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段和/或T细胞占用性抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其

抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,T细胞占用性抗体或其抗原结合片段包括结合第一T细胞占用性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合第一靶标的能力,且癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0306] 在免疫效应细胞占用性多特异性可激活抗体的一些实施方案中,一种抗原通常是存在于肿瘤细胞或与疾病有关的其它细胞类型表面上的抗原,例如但不限于表1所列的任何靶标,例如但不限于EGFR、erbB2、EpCAM、Jagged、PD-L1、B7H3或CD71(运铁蛋白受体),而另一种抗原通常为存在于T细胞、自然杀伤(NK)细胞、骨髓单核细胞、巨噬细胞和/或其它免疫效应细胞的表面上的刺激性或抑制性受体,例如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。在一些实施方案中,抗原是存在于T细胞或NK细胞表面上的刺激性受体;所述刺激性受体的实例包括但不限于CD3、CD27、CD28、CD137(亦称为4-1BB)、GITR、HVEM、ICOS、NKG2D和OX40。在一些实施方案中,抗原是存在于T细胞表面上的抑制性受体;所述抑制性受体的实例包括但不限于BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、TIM3和NK表达的KIR。赋予T细胞表面抗原特异性的抗体结构域还可被与T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其它免疫效应细胞受体(例如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PD-L1、PD-L2或TNFSF9)结合的配体或配体结构域取代。

[0307] 本公开内容的一个实施方案是在癌症小环境中可激活的且包括针对肿瘤靶标的抗体(例如IgG或scFv)和针对在活化T细胞或NK细胞表面上表达的共刺激性受体的激动剂抗体(例如IgG或scFv)的多特异性可激活抗体,其中癌症靶抗体和/或激动剂抗体的至少一种被掩蔽。共刺激性受体的实例包括但不限于CD27、CD137、GITR、HVEM、NKG2D和OX40。在这个实施方案中,多特异性可激活抗体一旦被肿瘤相关蛋白酶激活,则可以肿瘤依赖性方式有效交联并激活T细胞或NK细胞表达的共刺激性受体,通过其内源T细胞抗原或NK-激活受体,提高对任何肿瘤抗原起反应的T细胞的活性。这些T细胞或NK细胞共刺激性受体的活化依赖性质可使激活的多特异性可激活抗体的集中于肿瘤特异性T细胞,而不独立于其抗原特异地激活所有T细胞。在一个实施方案中,多特异性可激活抗体的至少共刺激性受体抗体被掩蔽以防止可存在于同样表达被多特异性可激活抗体中的肿瘤靶标导向抗体识别的抗原的组织的自体反应性T细胞的活化,但其活性因缺乏共同受体占用受到抑制。

[0308] 本公开内容的一个实施方案是在特征在于T细胞过度刺激的疾病(例如但不限于自身免疫性疾病或炎性疾病小环境)中可激活的多特异性可激活抗体。所述多特异性可激活抗体包括针对包含被自身免疫性疾病或炎性疾病中的T细胞靶定的组织中表达的表面抗原的靶标的抗体(例如IgG或scFv)和针对在T细胞或NK细胞的表面上表达的抑制性受体的抗体(例如IgG或scFv),其中疾病组织靶标抗体和/或T细胞抑制性受体抗体的至少一种被掩蔽。抑制性受体的实例包括但不限于BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、TIM3和NK表达的

KIR。被自身免疫性疾病中的T细胞靶中的组织抗原的实例包括但不限于多发性硬化的髓鞘或神经细胞上表达的表面抗原或1型糖尿病中的胰岛细胞上表达的表面抗原。在这个实施方案中,多特异性可激活抗体当位于在自身免疫攻击或炎症影响下的组织中时被激活并共占用T细胞或NK细胞抑制性受体以通过内源TCR或激活受体抑制对靶向任何疾病组织的抗原起反应的自体反应性T细胞的活性。在一个实施方案中,至少一个或多个抗体被掩蔽以防止其中也可能表达靶抗原的非疾病组织的T细胞应答。

[0309] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括抗CD3 epsilon (CD3 ϵ ,本文亦称为CD3e和CD3) scFv和打靶抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或打靶抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,且打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。

[0310] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括抗CD3 ϵ scFv和癌症打靶抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或癌症打靶抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,且癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0311] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括抗CD3 ϵ scFv和癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或癌症打靶IgG抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,且癌症打靶抗体IgG或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0312] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括来源于OKT3的抗CD3 ϵ

(CD3 ϵ) scFv, 其中打靶抗体或其抗原结合片段和/或OKT3 scFv或OKT3来源的scFv的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中, 打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力, 且打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。

[0313] 在一些实施方案中, T细胞占用性多特异性可激活抗体包括OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和癌症打靶抗体或其抗原结合片段, 其中OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和/或癌症打靶抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中, 癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力, 且癌症打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0314] 在一些实施方案中, T细胞占用性多特异性可激活抗体包括OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段, 其中OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和/或癌症打靶IgG抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中, 癌症打靶IgG抗体或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中, OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CD3 ϵ 的能力, 且癌症打靶抗体IgG或其抗原结合片段包括结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0315] 在一些实施方案中, T细胞占用性多特异性可激活抗体包括抗CTLA-4scFv, 其中打靶抗体或其抗原结合片段和/或抗CTLA-4scFv的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中, 抗CTLA-4scFv包括结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接, 使得MM1的偶联降低AB1结合CTLA-4的能力。在一些实施方案中, 打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2), 其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接, 使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中, 抗CTLA-4scFv包括结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1), 其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连

接,使得MM1的偶联降低AB1结合CTLA-4的能力,且打靶抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。

[0316] 在一些实施方案中,T细胞占用性多特异性可激活抗体包括抗CTLA-4scFv和打靶IgG抗体或其抗原结合片段,其中抗CTLA-4scFv和/或打靶IgG抗体或其抗原结合部分的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包括结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CTLA-4的能力。在一些实施方案中,打靶IgG抗体或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包括结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中使AB1与掩蔽部分(MM1)连接,使得MM1的偶联降低AB1结合CTLA-4的能力,且打靶抗体IgG或其抗原结合片段包括结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中使AB2与掩蔽部分(MM2)连接,使得MM2的偶联降低AB2结合第二靶标的能力。

[0317] 在一些实施方案中,多抗原打靶抗体和/或多抗原打靶可激活抗体至少包括结合第一靶标和/或第一表位的第一抗体或其抗原结合片段和结合第二靶标和/或第二表位的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,多抗原打靶抗体和/或多抗原打靶可激活抗体结合两种或更多种不同的靶标。在一些实施方案中,多抗原打靶抗体和/或多抗原打靶可激活抗体结合相同靶标的两个或更多个不同的表位。在一些实施方案中,多抗原打靶抗体和/或多抗原打靶可激活抗体结合两个或更多个不同的靶标的组合和相同靶标的两个或更多个不同的表位。

[0318] 在一些实施方案中,包含IgG的多特异性可激活抗体具有被掩蔽的IgG可变结构域。在一些实施方案中,包含scFv的多特异性可激活抗体具有被掩蔽的scFv结构域。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中IgG可变结构域的至少一个与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中scFv结构域的至少一个与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中IgG可变结构域的至少一个与掩蔽部分偶联且scFv结构域的至少一个与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中IgG可变结构域和scFv结构域的每一个与其本身的掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,另一个抗体结构域对T细胞表面抗原具有特异性。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,另一个抗体结构域对另一个靶抗原具有特异性。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体的一个抗体结构域对靶抗原的表位具有特异性,另一个抗体结构域对靶抗原的另一个表位具有特异性。

[0319] 在多特异性可激活抗体中,scFv可与IgG可激活抗体重链的羧基端、与IgG可激活抗体轻链的羧基端或与IgG可激活抗体重链和轻链两者的羧基端融合。在多特异性可激活抗体中,scFv可与IgG可激活抗体重链的氨基端、与IgG可激活抗体轻链的氨基端或与IgG可激活抗体重链和轻链两者的氨基端融合。在多特异性可激活抗体中,scFv可与IgG可激活抗体的一个或多个羧基端和一个或多个氨基端的任何组合融合。在一些实施方案中,与可切割部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)与IgG的抗原结合结构域连接并将其掩蔽。在一些实施方

案中,与可切割部分 (CM) 连接的掩蔽部分 (MM) 与至少一个 scFv 的抗原结合结构域连接并将其掩蔽。在一些实施方案中,与可切割部分 (CM) 连接的掩蔽部分 (MM) 与 IgG 的抗原结合结构域连接并将其掩蔽,且与可切割部分 (CM) 连接的掩蔽部分 (MM) 与至少一个 scFv 的抗原结合结构域连接并将其掩蔽。

[0320] 本公开内容提供包括但不限于以下的多特异性可激活抗体结构的实例: (VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂、(VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂、(MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂、(MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂、(VL-CL)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂、(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂、(MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂、(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂或(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂,其中:VL和VH表示IgG中所含的第一特异性轻链和重链可变结构域;VL*和VH*表示scFv所含的第二特异性的可变结构域;L1为连接掩蔽部分 (MM) 和可切割部分 (CM) 的接头肽;L2为连接可切割部分 (CM) 和抗体的接头肽;L3为连接 scFv 的可变结构域的接头肽;L4为连接第一特异性的抗体与第二特异性的抗体的接头肽;CL为轻链恒定结构域;CH1、CH2、CH3为重链恒定结构域。第一和第二特异性可针对任何抗原或表位。

[0321] 在T细胞占用性多特异性可激活抗体的一些实施方案中,一种抗原通常是在于肿瘤细胞或与疾病有关的其它细胞类型表面上的抗原,例如但不限于表1所列的任何靶标,例如但不限于EGFR、erbB2、EpCAM、Jagged、PD-L1、B7H3或CD71(运铁蛋白受体),而另一种抗原通常是在于T细胞、自然杀伤(NK)细胞、骨髓单核细胞、巨噬细胞和/或其它免疫效应细胞的表面上的受体上的刺激性(本文亦称为激活)或抑制性受体,例如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137(亦称为TNFRSF9)、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。赋予T细胞表面抗原特异性的抗体结构域还可被与T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其它免疫效应细胞受体结合的配体或配体结构域取代,例如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PD-L1、PD-L2或TNFSF9。在多抗原打靶可激活抗体的一些实施方案中,一种抗原选自表1所列靶标,另一种抗原选自

表1所列靶标。

[0322] 在一些实施方案中,打靶抗体是抗EGFR抗体。在一些实施方案中,打靶抗体是C225v5,其对与EGFR的结合有特异性。在一些实施方案中,打靶抗体是C225,其对与EGFR的结合有特异性。在一些实施方案中,打靶抗体是C225v4,其对与EGFR的结合有特异性。在一些实施方案中,打靶抗体是C225v6,其对与EGFR的结合有特异性。在一些实施方案中,打靶抗体是抗Jagged抗体。在一些实施方案中,打靶抗体是4D11,其对与人和小鼠Jagged 1和Jagged 2的结合有特异性。在一些实施方案中,打靶抗体是4D11v2,其对与人和小鼠Jagged 1和Jagged 2的结合有特异性。

[0323] 在一些实施方案中,打靶抗体可为可激活抗体的形式。在一些实施方案中,scFv (s) 可为Pro-scFv的形式(参见例如WO 2009/025846、WO 2010/081173)。

[0324] 在一些实施方案中,scFv对结合CD3 ϵ 有特异性,并且是或来源于结合CD3 ϵ 的抗体或其片段,例如CH2527、FN18、H2C、OKT3、2C11、UCHT1或V9。在一些实施方案中,scFv对结合CTLA-4有特异性(本文亦称为CTLA和CTLA4)。

[0325] 在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包括氨基酸序列:

```
GGGSAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG
TKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSGTQVQLVQTGGGVQPGRSRLRLSCAASGSTFSSYAM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLY
WYFDLWGRGTLTVSSAS (SEQ ID NO:510)
```

在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包括与SEQ ID NO:510的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0326] 在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包括氨基酸序列:

```
GGGSAGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH
WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
ARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGSGGGSQIVLTQSPA IMSASPGEKVMT
CSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQW
SSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO:511)
```

在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包括与SEQ ID NO:511的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0327] 在一些实施方案中,scFv对结合一种或多种T细胞、一种或多种NK-细胞和/或一种或多种巨噬细胞有特异性。在一些实施方案中,scFv对结合选自以下的靶标有特异性:B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。

[0328] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体还包括与AB缀合的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是治疗剂。在一些实施方案中,作用剂是抗肿瘤剂。在一些实施方案中,作用剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,作用剂通过接头与多特异性可激活抗体缀合。在一些实施方案中,作用剂通过可切割接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂通过包括至少一种MMP可切割底物序列的接头与AB缀合。在一些实施方案中,接头是非可切割的接头。在一些实施方案中,作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,作用剂是核酸损伤剂,例如DNA

烷基化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,作用剂是选自表4所列的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是吡咯并苯并二氮杂草。

[0329] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0330] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,可对多特异性可激活抗体进行改造以包括一个或多个二硫键。

[0331] 本公开内容还提供编码本文所述多特异性可激活抗体的分离的核酸分子以及包括这些分离的核酸序列的载体。本公开内容提供通过在引起可激活抗体表达的条件下培养细胞来产生多特异性可激活抗体的方法,其中细胞包含所述核酸分子。在一些实施方案中,细胞包含所述载体。

[0332] 本公开内容还提供如下制备本公开内容的多特异性可激活抗体的方法:(a)在引起多特异性可激活表达的条件下培养包含编码多特异性可激活抗体的核酸构建体的细胞,和(b)回收多特异性可激活抗体。

[0333] 本公开内容还提供包括特异性结合第一靶标或第一表位的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1)和结合第二靶标或第二表位的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)的多特异性可激活抗体和/或多特异性可激活抗体组合物,其中至少AB1与掩蔽部分(MM1)偶联或以别的方式连接,使得MM1的偶联降低AB1结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM1通过包括蛋白酶(例如与AB1的靶标共定位于受试者的治疗部位或诊断部位的蛋白酶)的底物的第一可切割部分(CM1)序列与AB1偶联。本文提供的多特异性可激活抗体在循环中是稳定的,在既定治疗和/或诊断部位被激活,但不在正常(即健康)组织中被激活,且当被激活时,显示与相应的未修饰的多特异性抗体至少相当的与AB1的靶标的结合。

[0334] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体包含MM1和CM1之间的连接肽。

[0335] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体包含CM1和AB1之间的连接肽。

[0336] 在一些实施方案中,可激活抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),且多特异性可激活抗体的至少一部分具有未切割状态下的如下从N端到C端的结构排列:MM1-LP1-CM1-LP2-AB1或AB1-LP2-CM1-LP1-MM1。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不必相同。

[0337] 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:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),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:3)、GGSAG(SEQ ID NO:4)、GSGSG(SEQ ID NO:5)、GSGGG(SEQ ID NO:6)、GGGSG(SEQ ID NO:7)和GSSSG(SEQ ID NO:8)。

[0338] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体包括特异性结合第一靶标或第一表位的至少第一抗体或其抗原结合片段(AB1)和特异性结合第二靶标或第二表位的第二抗体或其

抗原结合片段(AB2)。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中AB的每一个独立选自单克隆抗体、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,多特异性可激活抗体中AB的每一个是啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0339] 在一些实施方案中,对于与其相应的靶标或表位结合,多特异性可激活抗体中AB的每一个具有约100nM或更小的平衡解离常数。

[0340] 在一些实施方案中,MM1与其相应AB结合的平衡解离常数大于AB与其相应靶标或表位的平衡解离常数。

[0341] 在一些实施方案中,MM1与其相应AB结合的平衡解离常数不超过AB与其相应靶标或表位的平衡解离常数。

[0342] 在一些实施方案中,当多特异性可激活抗体为切割状态时,MM1不干扰其相应的AB与其相应的靶标或表位结合或不与其相应的AB竞争与其相应的靶标或表位结合。

[0343] 在一些实施方案中,MM1是约2-40个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个是长度不超过40个氨基酸的多肽。

[0344] 在一些实施方案中,MM1具有不同于相应AB的靶标的多肽序列的多肽序列。

[0345] 在一些实施方案中,MM1具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性的多肽序列。在一些实施方案中,MM1具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过25%同一性的多肽序列。在一些实施方案中,MM1具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过10%同一性的多肽序列。

[0346] 在一些实施方案中,MM1的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的 K_d 的至少20倍。

[0347] 在一些实施方案中,MM1的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的 K_d 的至少40倍。

[0348] 在一些实施方案中,MM1的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的 K_d 的至少100倍。

[0349] 在一些实施方案中,MM1的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的 K_d 的至少1000倍。

[0350] 在一些实施方案中,MM1的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应的靶标或表位的MM1偶联时AB的 K_d 的至少10,000倍。

[0351] 在一些实施方案中,MM1是选自本文公开的MM的氨基酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,当多特异性可激活抗体为未切割状态时,多特异性可激活抗体包括抑制AB2与其靶标结合的至少第二掩蔽部分(MM2)和与AB2偶联的第二可切割部分(CM2),其中CM2是用作第二蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中,CM2是不超过15个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中,第二蛋白酶与第二靶标或表位一起共定位于组织中,其

中当多特异性可激活抗体暴露于第二蛋白酶中时,第二蛋白酶切割多特异性可激活抗体中的CM2。在一些实施方案中,第一蛋白酶和第二蛋白酶与第一靶标或表位和第二靶标或表位一起共定位于组织中。在一些实施方案中,第一蛋白酶和第二蛋白酶是相同的蛋白酶。在一些实施方案中,CM1和CM2是相同蛋白酶的不同底物。在一些实施方案中,蛋白酶选自表7所示蛋白酶。在一些实施方案中,第一蛋白酶和第二蛋白酶是不同的蛋白酶。在一些实施方案中,第一蛋白酶和第二蛋白酶是选自表7所示的不同的蛋白酶。

[0353] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个(例如MM1和至少MM2)的与其相应AB结合的平衡解离常数大于AB与其相应靶标或表位的平衡解离常数。

[0354] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个的与其相应AB结合的平衡解离常数不超过AB与其相应靶标或表位的平衡解离常数。

[0355] 在一些实施方案中,当多特异性可激活抗体为切割状态时,多特异性可激活抗体中MM的每一个不干扰其相应的AB与其相应的靶标或表位结合或不与其相应的AB竞争与其相应的靶标或表位结合。

[0356] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个是长度为约2-40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个是长度不超过40个氨基酸的多肽。

[0357] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个具有不同于相应AB的靶标的多肽序列。

[0358] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过50%同一性的多肽序列。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过25%同一性的多肽序列。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中MM的每一个具有与相应AB的任何天然结合配偶体有不超过10%同一性的多肽序列。

[0359] 在一些实施方案中,MM的每一个的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的 K_d 的至少20倍。

[0360] 在一些实施方案中,MM的每一个的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的 K_d 的至少40倍。

[0361] 在一些实施方案中,MM的每一个的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的 K_d 的至少100倍。

[0362] 在一些实施方案中,MM的每一个的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的 K_d 的至少1000倍。

[0363] 在一些实施方案中,MM的每一个的偶联降低相应的AB结合其靶标或表位的能力,使得当与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的解离常数(K_d)是当不与针对其相应靶标或表位的MM偶联时AB的 K_d 的至少10,000倍。

[0364] 在一些实施方案中,MM的每一个是选自本文公开的MM的氨基酸序列。

[0365] 在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一个被至少一种MMP蛋白酶切割。在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:ISSGLLSS (SEQ ID NO: 14)、QNQALRMA (SEQ ID NO: 15)、AQNLGGMV (SEQ ID NO: 16)、STFPFGMF (SEQ ID NO: 17)、PVGYTSSL (SEQ ID NO: 18)、DWLYWPGI (SEQ ID NO: 19)、MIAPVAYR (SEQ ID NO: 20)、RPSPMWAY (SEQ ID NO: 21)、WATPRPMR (SEQ ID NO: 22)、FRLLDWQW (SEQ ID NO: 23)、LKAAAPRWA (SEQ ID NO: 24)、GPSHLVLT (SEQ ID NO: 25)、LPGGLSPW (SEQ ID NO: 26)、MGLFSEAG (SEQ ID NO: 27)、SPLPLRVP (SEQ ID NO: 28)、RMHLRSLG (SEQ ID NO: 29)、LAAPLGLL (SEQ ID NO: 30)、AVGLLAPP (SEQ ID NO: 31)、LLAPSHRA (SEQ ID NO: 32)、PAGLWLDP (SEQ ID NO: 33) 和ISSGLSS (SEQ ID NO: 159)。

[0366] 在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:364-370、379-393、402-409、420-424、434、435、450-452、457、470-472、474和483。

[0367] 在一些实施方案中,CM1和/或CM2的至少一个包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:328、336-339和348-351。

[0368] 在一些实施方案中,切割第一可切割部分(CM1)序列的蛋白酶与组织中多特异性可激活抗体中的AB1的靶标一起共定位,且当多特异性可激活抗体暴露于蛋白酶中时,蛋白酶切割多特异性可激活抗体中的CM1。

[0369] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体包括一个以上可切割部分序列,切割至少一个可切割部分序列的蛋白酶与多特异性可激活抗体中的AB区的至少一个的靶标一起共定位组织中,且当多特异性可激活抗体暴露于蛋白酶中时,蛋白酶切割多特异性可激活抗体中的CM。

[0370] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少2倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0371] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少3倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0372] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少4倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0373] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少5倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0374] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少10倍发生,而在切割状态下,AB结合其

靶标。

[0375] 在一些实施方案中,各个CM,例如CM1和至少CM2,位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少20倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0376] 在一些实施方案中,各个CM位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少40倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0377] 在一些实施方案中,各个CM位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少50倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0378] 在一些实施方案中,各个CM位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少100倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0379] 在一些实施方案中,各个CM位于多特异性可激活抗体中,使得在未切割状态下,多特异性可激活抗体与AB区之一的靶标的结合降低到以平衡解离常数是未修饰的AB与其靶标结合的平衡解离常数的至少200倍发生,而在切割状态下,AB结合其靶标。

[0380] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中的各个CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0381] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体的至少一个CM包括选自SEQ ID NO:14-33和159的氨基酸序列,其它CM包括氨基酸序列LSGRSDNH (SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,至少一个CM包括氨基酸序列LSGRSDNH (SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,选择至少一个可切割部分与特定的蛋白酶联用,例如已知与多特异性可激活抗体的至少一个靶标共定位的蛋白酶。例如,用于本公开内容的多特异性可激活抗体的合适的可切割部分被至少一种蛋白酶例如尿激酶、legumain和/或基质蛋白酶(本文亦称为MT-SP1或MTSP1)切割。在一些实施方案中,合适的可切割部分包括下列序列的至少一个:TGRGPSWV (SEQ ID NO:34)、SARGPSRW (SEQ ID NO:35)、TARGPSFK (SEQ ID NO:36)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:37)、GGWHTGRN (SEQ ID NO:38)、HTGRSGAL (SEQ ID NO:39)、PLTGRSGG (SEQ ID NO:40)、AARGPAIH (SEQ ID NO:41)、RGPAFNPM (SEQ ID NO:42)、SSRGPAYL (SEQ ID NO:43)、RGPATPIM (SEQ ID NO:44)、RGPA (SEQ ID NO:45)、GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:46)、FPRPLGITGL (SEQ ID NO:47)、VHMPLGFLGP (SEQ ID NO:48)、SPLTGRSG (SEQ ID NO:49)、SAGFSLPA (SEQ ID NO:126)、LAPLGLQRR (SEQ ID NO:50)、SGGPLGV (SEQ ID NO:51)和/或PLGL (SEQ ID NO:52)。

[0382] 在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中的一个CM是至少一种MMP蛋白酶的底物,另一个CM是选自表7所示蛋白酶的底物。在一些实施方案中,蛋白酶选自uPA、legumain、基质蛋白酶、ADAM17、BMP-1、TMPRSS3、TMPRSS4、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、MMP-7、MMP-9、MMP-12、MMP-13和MMP-14。在一些实施方案中,蛋白酶是组织蛋白酶,例如但不限于组织蛋白酶S。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体中的各CM是选自uPA(尿激酶纤溶酶原激活物)、legumain和基质蛋白酶的蛋白酶的底物。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legumain。在一些实施方案中,蛋白酶包括基质蛋白酶。在一些实

施方案中，蛋白酶包括基质金属蛋白酶 (MMP)。

[0383] 在一些实施方案中，多特异性可激活抗体的至少一个CM是至少2种蛋白酶的底物。在一些实施方案中，每种蛋白酶选自表7所示蛋白酶。在一些实施方案中，多特异性可激活抗体的至少一个CM是至少2种蛋白酶的底物，其中蛋白酶之一选自uPA、legumain和基质蛋白酶，另一种蛋白酶选自表7所示蛋白酶。在一些实施方案中，多特异性可激活抗体的至少一个CM是选自uPA、legumain和基质蛋白酶的至少2种蛋白酶的底物。

[0384] 在一些实施方案中，多特异性可激活抗体包括至少第一CM (CM1) 和第二CM (CM2)。在一些实施方案中，CM1和CM2是连接MM与AB的单一可切割接头的一部分。在一些实施方案中，CM1是连接MM1与AB1的可切割接头的一部分，CM2是连接MM2与AB2的单独的可切割接头的一部分。在一些实施方案中，多特异性可激活抗体包含超过2个CM。在一些实施方案中，所述多特异性可激活抗体包含超过2个CM和超过2个MM。在一些实施方案中，CM1和CM2各自为不超过15个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中，第一CM和第二CM的至少一个是用作选自表7的蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中，第一CM和第二CM的至少一个是用作选自uPA、legumain和基质蛋白酶的蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中，第一CM被选自靶标组织中的uPA、legumain和基质蛋白酶的第一切割剂切割，第二CM被靶标组织中的第二切割剂切割。在一些实施方案中，其它蛋白酶选自表7所示蛋白酶。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂是选自表7的相同的蛋白酶，且第一CM和第二CM是该酶的不同底物。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂是选自uPA、legumain和基质蛋白酶的相同的蛋白酶，且第一CM和第二CM是该酶的不同底物。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂是选自表7所列的相同蛋白酶，且第一CM和第二CM是相同的底物。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂是不同的蛋白酶。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂是选自表7所示的不同蛋白酶。在一些实施方案中，第一切割剂和第二切割剂共定位于靶组织中。在一些实施方案中，第一CM和第二CM被靶组织中的至少一种切割剂切割。

[0385] 在一些实施方案中，多特异性可激活抗体被暴露于蛋白酶中并被蛋白酶切割，使得在激活或切割状态下，激活的多特异性可激活抗体在蛋白酶切割CM后包括轻链氨基酸序列，其包括LP2和/或CM序列的至少一部分。

[0386] 本公开内容还提供包括至少包含特异性结合靶标的第一抗体或抗体片段 (AB1) 和第二抗体或抗体片段 (AB2) 的多特异性可激活抗体的组合物和方法，其中多特异性可激活抗体中的至少第一AB与降低AB1结合其靶标的能力的掩蔽部分 (MM1) 偶联。在一些实施方案中，各AB与降低其相应的AB结合各靶标的能力的MM偶联。例如，在双特异性可激活抗体实施方案中，AB1与降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分 (MM1) 偶联，且AB2与降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2) 偶联。在一些实施方案中，多特异性可激活抗体包含2个以上的AB区；在所述实施方案中，AB1与降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分 (MM1) 偶联，AB2与降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2) 偶联，AB3与降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分 (MM3) 偶联，对于多特异性可激活抗体的各AB以此类推。

[0387] 在一些实施方案中，多特异性可激活抗体进一步包括是蛋白酶的底物的至少一个可切割部分 (CM)，其中CM连接MM与AB。例如在一些实施方案中，多特异性可激活抗体包括特异性结合靶标的至少第一抗体或抗体片段 (AB1) 和第二抗体或抗体片段 (AB2)，其中多特异性可激活抗体中的至少第一AB通过可切割部分 (CM1) 与降低AB1结合其靶标的能力的掩蔽

部分 (MM1) 偶联。在一些双特异性可激活抗体实施方案中,AB1通过CM1与MM1偶联,AB2通过第二可切割部分 (CM2) 与降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2) 偶联。在一些实施方案中,多特异性可激活抗体包含2个以上的AB区;在这些实施方案的一些中,AB1通过CM1与MM1偶联,AB2通过CM2与MM2连接,AB3通过第三可切割部分 (CM3) 与降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分 (MM3) 连接,对于多特异性可激活抗体中的各AB以此类推。

[0388] 具有非结合空间部分或非结合空间部分的结合配偶体的可激活抗体本公开内容还提供包括非结合空间部分 (non-binding steric moieties,NB) 或非结合空间部分的结合配偶体 (BP) 的可激活抗体,其中BP募集或以别的方式吸收NB至可激活抗体。本文提供的可激活抗体包括例如包括非结合空间部分 (NB) 、可切割接头 (CL) 和结合靶标的抗体或抗体片段 (AB) 的可激活抗体;包括非结合空间部分 (BP) 的结合配偶体、CL和AB的可激活抗体;和包括募集NB的BP、CL和结合靶标的AB的可激活抗体。其中NB与可激活抗体的CL和AB共价连接或通过同与可激活抗体的CL和AB共价连接的BP相互作用的可激活抗体在本文称为“含NB的可激活抗体”。所述可激活或可转换的意指可激活抗体显示当可激活抗体在被抑制、被掩蔽或未切割状态下(即第一构象)时与靶标结合的第一水平,以及当可激活抗体在未抑制、未掩蔽和/或切割状态下(即第二构象,即激活的抗体)时与靶标结合的第二水平,其中靶标结合的第二水平大于靶标结合的第一水平。与常规抗体治疗剂相比,可激活抗体组合物将显示升高的生物利用度和更有利的生物分布。

[0389] 在一些实施方案中,如果AB不被掩蔽或以别的方式被抑制免于结合所述部位,则提供否则可产生于非治疗部位和/或非诊断部位的结合的毒性和/或不良副作用降低的可激活抗体。

[0390] 在一个实施方案中,可激活抗体包括非结合空间部分 (NB) 、可切割接头 (CL) 和与靶标特异性结合的抗体或抗体片段 (AB) ,其中NB是不与AB特异性结合的多肽;CL是包括酶的底物 (S) 的多肽;使CL如此定位使得在未切割状态下NB干扰AB与靶标结合,在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合;且NB不抑制CL被酶切割。如本文和各方面所用,术语多肽是指包括至少两个氨基酸残基的任何多肽,包括较大的多肽、全长蛋白质及其片段,且术语多肽不限于单链多肽,可包括多单元(例如多链)多肽。在其中多肽具有较短长度(例如共小于50个氨基酸)的情况下,术语肽和多肽在本文可互换作用,在多肽具有较长长度(例如50个氨基酸或更大)的情况下,术语多肽和蛋白质在本文可互换作用。

[0391] 在一个实施方案中,可激活抗体包括非结合空间部分 (NB) 、可切割接头 (CL) 和与靶标特异性结合的抗体或抗体片段 (AB) ,其中 (i) NB包括不与AB特异性结合的多肽; (ii) CL是长度多达50个氨基酸、包括酶的底物 (S) 的多肽; (iii) 使CL如此定位使得在未切割状态下NB干扰AB与靶标结合,在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合;和 (iv) NB不抑制CL被酶切割。例如CL具有多达15个氨基酸的长度、多达20个氨基酸的长度、多达25个氨基酸的长度、多达30个氨基酸的长度、多达35个氨基酸的长度、多达40个氨基酸的长度、多达45个氨基酸的长度、多达50个氨基酸的长度、范围为10-50个氨基酸的长度、范围为15-50个氨基酸的长度、范围为20-50个氨基酸的长度、范围为25-50个氨基酸的长度、范围为30-50个氨基酸的长度、范围为35-50个氨基酸的长度、范围为40-50个氨基酸的长度、范围为45-50个氨基酸的长度、范围为10-40个氨基酸的长度、范围为15-40个氨基酸的长度、范围为20-40个氨基酸的长度、范围为25-40个氨基酸的长度、范围为30-40个氨基酸的长度、范围为35-40个氨基

基酸的长度、范围为10-30个氨基酸的长度、范围为15-30个氨基酸的长度、范围为20-30个氨基酸的长度、范围为25-30个氨基酸的长度、范围为10-20个氨基酸的长度或范围为10-15个氨基酸的长度。

[0392] 在一个实施方案中,可激活抗体包括非结合空间部分 (NB) 、可切割接头 (CL) 和与靶标特异性结合的抗体或抗体片段 (AB) ,其中 (i) NB包括不与AB特异性结合的多肽; (ii) CL是包括酶的底物 (S) 的多肽; (iii) 使CL如此定位使得在未切割状态下NB干扰AB与靶标结合,在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合; (iv) NB不抑制CL被酶切割; 和(v) 在未切割状态下可激活抗体具有如下从N端到C端的结构排列:NB-CL-AB或AB-CL-NB。

[0393] 在一个实施方案中,可激活抗体包括非结合空间部分 (NB) 、可切割接头 (CL) 和与靶标特异性结合的抗体或抗体片段 (AB) ,其中 (i) NB包括不与AB特异性结合的多肽; (ii) CL是包括酶的底物 (S) 的多肽; (iii) 使CL如此定位使得在未切割状态下NB干扰AB与靶标结合,在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合,且其中与经切割的AB结合靶标的能力相比,未切割的可激活抗体中的NB降低AB结合靶标的能力达至少50%,例如至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少100%; 和(iv) NB不抑制CL被酶切割。例如采用本文描述的测定法或体外靶标置换测定法,例如描述于PCT公布号WO 2009/025846和WO 2010/081173的测定法,测定AB结合靶标的能力的降低。

[0394] 在一个实施方案中,可激活抗体包括非结合空间部分 (NB) 的结合配偶体 (BP) 、可切割接头 (CL) 和与靶标特异性结合的抗体或抗体片段 (AB) ,其中BP是当暴露于其中时与NB结合的多肽; NB不与AB特异性结合; CL是包括酶的底物 (S) 的多肽; 使CL如此定位使得在未切割状态下在NB存在时,NB干扰AB与靶标结合,而在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合,且BP不干扰AB与靶标结合; 和NB和BP不抑制CL被酶切割。在这个实施方案的一些实例中,可激活抗体的BP任选与NB结合。在一个实施方案中,NB体内被可激活抗体的BP募集。

[0395] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体被配制成组合物。在这些实施方案的一些中,组合物还包括NB,其中NB与包括BP、CL和AB的可激活抗体共配制。在这个实施方案的一些实例中,BP选自白蛋白结合肽、血纤蛋白原结合肽、纤连蛋白结合肽、血红蛋白结合肽、运铁蛋白结合肽、免疫球蛋白结构域结合肽和其它血清蛋白质结合肽。

[0396] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,NB是可溶性的球状蛋白质。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,NB在血流中循环的蛋白质。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,NB选自白蛋白、血纤蛋白原、纤连蛋白、血红蛋白、运铁蛋白、免疫球蛋白结构域和其它血清蛋白质。

[0397] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,CL是包括蛋白酶的底物 (S) 的多肽。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,蛋白酶共定位于组织中,且当可激活抗体暴露于蛋白酶中时,蛋白酶切割可激活抗体中的CL。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,CL是长度多达50个氨基酸的多肽。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,CL是包括底物 (S) 的多肽,所述底物为多达的长度15个氨基酸,例如3个氨基酸长、4个氨基酸长、5个氨基酸长、6个氨基酸长、7个氨基酸长、8个氨基酸长、9个氨基酸长、10个氨基酸长、11个氨基酸长、12个氨基酸长、13个氨基酸长、14个氨基酸长或15

个氨基酸长。

[0398] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,在未切割状态下可激活抗体具有如下从N端到C端的结构排列:NB-CL-AB、AB-CL-NB、BP-CL-AB或AB-CL-BP。在其中可激活抗体包括BP且可激活抗体是在相应的NB存在下的实施方案中,在未切割状态下可激活抗体具有如下从N端到C端的结构排列:NB:BP-CM-AB或AB-CM-BP:NB,其中“:”表示相互作用,例如NB和BP间的结合。

[0399] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体包括特异性结合指定靶标且是单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv、scab、dAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合靶标的所述抗体或其免疫活性片段为小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0400] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体包括包含本文提供的氨基酸序列的可变重链区和包含本文提供的氨基酸序列的可变轻链区的组合。在一些实施方案中,可激活抗体包括包含与本文提供的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列的可变重链区和包含与本文提供的氨基酸序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列的可变轻链区的组合。

[0401] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体还包括与AB缀合的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是治疗剂。在一些实施方案中,作用剂是抗肿瘤剂。在一些实施方案中,作用剂是毒素或其片段。在一些实施方案中,作用剂通过接头与AB缀合。在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,作用剂通过不可切割接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂是选自表3所列的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,作用剂是核酸损伤剂,例如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是吡咯并苯并二氮杂草。

[0402] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0403] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体还包括间隔物。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体还包括信号肽。在一些实施方案中,信号肽通过间隔物与可激活抗体缀合。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,间隔物与可激活抗体的MM直接连接。

[0404] 在一些实施方案中,可激活抗体的血清半寿期长于相应抗体的半寿期;例如可激活抗体的pK长于相应抗体的pK。在一些实施方案中,可激活抗体的血清半寿期类似于相应抗体的半寿期。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少15天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少12天。在一些实施方案

中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少11天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少10天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少9天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少8天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少7天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少6天。在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少5天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少4天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少3天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少2天。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少24小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少20小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少18小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少16小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少14小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少12小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少10小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少8小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少6小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少4小时。在一些实施方案中,当给予生物时,可激活抗体的血清半寿期为至少3小时。

[0405] 本公开内容还提供编码这些可激活抗体的任一个的分离的核酸分子以及包括这些分离的核酸序列的载体。本公开内容提供通过将在引起可激活抗体表达的条件下培养来产生可激活抗体的方法,其中细胞包含所述核酸序列。在一些实施方案中,细胞包含所述载体。

[0406] 含NB的可激活抗体对于靶标的解离常数(K_d)大于当不与NB或NB:BP结合时AB对于靶标的 K_d 。含NB的可激活抗体对于靶标的解离常数(K_d)大于亲代AB对于靶标的 K_d 。例如,含NB的可激活抗体对于靶标的 K_d 是当不与NB或NB:BP结合时AB对于靶标的 K_d 或亲代AB对于靶标的 K_d 的至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更大、或介于5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000或100,000-10,000,000倍之间。相反地,含NB的可激活抗体对于靶标的结合亲和力低于当不与NB或NB:BP结合时AB对于靶标的结合亲和力或亲代AB对于靶标的结合亲和力。例如,含NB的可激活抗体对于靶标的结合亲和力是当不与NB或NB:BP结合时AB对于靶标的结合亲和力或亲代AB对于靶标的结合亲和力至多1/5、1/10、1/25、1/50、1/100、1/250、1/500、1/1,000、1/2,500、1/5,000、1/10,000、1/50,000、1/100,000、1/500,000、1/1,000,000、1/5,000,000、1/10,000,000、1/50,000,000或更低,或介于1/5-1/10、1/10-1/100、1/10-1/1,000、1/10-1/10,000、1/10-1/100,000、1/10-1/1,000,000、1/10-1/10,000,000、1/100-1/1,000、1/100-1/10,000、1/100-1/100,000、1/100-1/1,000,000、1/100-1/10,000,000或1/1,000-1/10,000、1/1,000-1/100,000、1/1,000-1/1,000,000、1/1,000-1/10,000,000、1/1,000-1/100,000,000或1/1,000-1/1,000,000,000。

1000-1/10,000,000、1/10,000-1/100,000、1/10,000-1/1,000,000、1/10,000-1/10,000,000、1/100,000-1/1,000,000、1/或100,000-1/10,000,000之间。

[0407] 与当不与NB或NB:BP结合时AB的特异性结合相比,当含NB的可激活抗体是在靶标存在下时,AB与靶标的特异性结合被降低或抑制。与亲代AB与靶标的特异性结合相比,当含NB的可激活抗体是在靶标存在下时,AB与靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体外和/或体内测量时,当与未与NB或NB:BP结合的AB的结合或亲代AB与靶标的结合相比,含NB的可激活抗体结合靶标的能力被降低达例如至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长。

[0408] 与当不与NB或NB:BP结合时AB的特异性结合相比,当含NB的可激活抗体是在靶标存在下但不在改性剂(例如蛋白酶或其它酶)存在下时,AB与靶标的特异性结合被降低或抑制。与亲代AB与靶标的特异性结合相比,当含NB的可激活抗体是在靶标存在下但不在改性剂(例如蛋白酶、其它酶、还原剂或光)存在下时,AB与靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体外和/或体内测量时,当与未与NB或NB:BP结合的AB的结合或亲代AB与靶标的结合相比,含NB的可激活抗体结合靶标的能力被降低达例如至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长。

[0409] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体包括与AB缀合产生可激活抗体缀合物的作用剂。在可激活抗体缀合物的一些实施方案中,作用剂是治疗剂。在一些实施方案中,作用剂是诊断剂。在一些实施方案中,作用剂是可检测标记。在可激活抗体缀合物的一些实施方案中,作用剂是抗肿瘤剂。在可激活抗体缀合物的一些实施方案中,作用剂是毒素或其片段。在可激活抗体缀合物的一些实施方案中,作用剂通过接头与AB缀合。在可激活抗体缀合物的一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,作用剂通过不可切割接头与AB缀合。在一些实施方案中,作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,作用剂是核酸损伤剂,例如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,作用剂是选自表3所列的作用剂。在一些实施方案中,作用剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是阿里他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,作用剂是单甲基阿里他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,作用剂是类美登素或类美登素衍生物。在一些实施方案中,作用剂是DM1或DM4。在一些实施方案中,作用剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,作用剂是吡咯并苯并二氮杂革。

[0410] 在这些可激活抗体实施方案的任一个的一些实例中,可激活抗体是双重靶向结合可激活抗体。所述双重靶向结合可激活抗体含有可结合相同或不同靶标的两个Ab。在具体的实施方案中,双重打靶可激活抗体含有双特异性抗体或抗体片段。

[0411] 设计双重靶向结合可激活抗体,使得具有通过与能够结合可激活抗体的AB的一个或两个靶标共定位于靶标组织的切割剂可切割的CL。可设计具有抗相同或不同靶标的一个

以上AB的双重靶向结合可激活抗体使得具有一个以上CL,其中第一CL通过在第一靶标组织中的切割剂是可切割的,且其中第二CL是通过第二靶标组织中的切割剂可切割的,其中靶标一个或多个与可激活抗体的AB结合。在一个实施方案中,第一和第二靶标组织在空间上被分隔开,例如在生物体的不同部位。在一个实施方案中,第一和第二靶标组织是在时间分隔开的相同组织,例如2个不同时间点的相同组织,例如第一时间点是在组织是早期肿瘤时,第二时间点是在组织是晚期肿瘤时。

[0412] 本公开内容还提供编码本文所述可激活抗体的核酸分子。本公开内容还提供包括这些核酸的载体。通过在引起可激活抗体表达的条件下培养细胞来产生本文所述可激活抗体,其中细胞包括这些核酸分子或载体。

[0413] 本公开内容还提供制备可激活抗体的方法。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)将包括编码可激活抗体的核酸构建体的细胞在引起可激活抗体表达的条件下培养,其中可激活抗体包括(i)非结合空间部分(NB);(ii)可切割接头(CL);和(iii)特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中(1)NB不与AB特异性结合;(2)CL是包括酶的底物(S)的多肽;(3)使CL如此定位使得在未切割状态下NB干扰AB与靶标结合,在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合;和(4)NB不抑制CL被酶切割;和(b)回收可激活抗体。

[0414] 在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)将包括编码可激活抗体的核酸构建体的细胞在引起可激活抗体表达的条件下培养,其中可激活抗体包括(i)非结合空间部分(NB)的结合配偶体(BP);(ii)可切割接头(CL);和(iii)特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中(1)NB不与AB特异性结合;(2)CL是包括酶的底物(S)的多肽;(3)使CL如此定位使得在未切割状态下在NB存在时,NB干扰AB与靶标结合,而在切割状态下NB不干扰AB与靶标结合,且BP不干扰AB与靶标结合;和(4)NB和BP不抑制CL被酶切割;和(b)回收可激活抗体。在这个实施方案的一些实例中,可激活抗体的BP与NB结合。

[0415] 可激活抗体和缀合的可激活抗体的用途

应了解,本公开内容的治疗实体的给药将与合适的载体、赋形剂和掺入制剂以提供改进的转移、递送、耐受性等的其它作用剂一起给予。大量合适的制剂可参见所有药剂师已知的处方集:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company, Easton, PA(1975)),特别是其中Blaug, Seymour的第87章。这些制剂包括例如散剂、糊剂、软膏剂、胶冻剂、蜡制剂、油、脂质类、含脂质(阳离子或阴离子)囊泡(例如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(不同分子量的聚乙二醇)、含有碳蜡的半固体凝胶剂和半固体混合物。前述混合物的任一种在本公开内容的治疗和疗法中是适当的,条件是制剂中的活性成分通过配制不失活,且制剂与给药途径在生理学上是相容的和可耐受的。有关与药剂师熟知的制剂、赋形剂和载体有关的其它信息,另参见Baldrick P.“Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance(药用赋形剂发展: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(固体蛋白质药剂的冻干和开发).”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—一些新兴概念).”J Pharm Sci. 89(8):967-78(2000);Powell等,“Compendium of excipients for parenteral formulations(用于胃肠

外制剂的赋形剂摘要) "PDAJ Pharm Sci Technol. 52:238-311(1998) 及其中的引用。

[0416] 使用包括缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的本公开内容的治疗制剂预防、治疗或以别的方式改善与异常靶标表达和/或活性有关的疾病或病症。例如,使用包括缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的本公开内容的治疗制剂治疗或以别的方式改善炎症、炎性病症、自身免疫性疾病和/或癌症或其它肿瘤性病况。在一些实施方案中,癌症是靶标在其中表达的实体瘤或血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是靶标在其中表达的实体瘤。在一些实施方案中,癌症是靶标在其中表达的血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,靶标在实质(例如在癌中,通常实施器官或组织的功能的部分器官或组织)中表达。在一些实施方案中,靶标在细胞、组织或器官中表达。在一些实施方案中,靶标在间质(即细胞、组织或器官的连接性支持构架)中表达。在一些实施方案中,靶标在成骨细胞中表达。在一些实施方案中,靶标在内皮(血管)中表达。在一些实施方案中,靶标在癌干细胞中表达。在一些实施方案中,可激活抗体与之缀合的作用剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,可激活抗体与之缀合的作用剂是核酸损伤剂。

[0417] 结合用于诊断或治疗与靶标表达和/或活性(例如异常靶标表达和/或活性)有关的疾病或病症的任何已知方法,测定预防、改善或治疗的功效。延长受试者的生存或以别的方式延迟受试者的与靶标表达和/或活性(例如异常靶标表达和/或活性)有关的疾病或病症的进展,表明缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体提供临床益处。

[0418] 缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体可以药物组合物的形式给予。例如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, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 以及PeptideAndProtein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第4卷), 1991, M.Dekker, New York 中提供了涉及制备所述组合物的原理和考虑事项以及在组分选择中的指导。

[0419] 在其中使用抗体片段的一些实施方案中,选择与靶蛋白质的结合结构域特异性结合的最小片段。例如根据抗体的可变区序列,可设计保持结合靶蛋白质序列的能力的肽分子。所述肽可用化学方法合适和/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))。对于待治疗的具体适应症,制剂还可按需含有一种以上的活性化合物,例如在一些实施方案中,具有不会不利影响彼此的补充活性的那些。在一些实施方案中,另外,组合物可包含提高其功能的作用剂,例如细胞毒性剂、细胞因子、化疗剂或生长抑制剂。所述分子适宜以对既定目的是有效的量的组合存在。

[0420] 还可将活性成分包封在例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊(例如羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚甲基丙烯酸甲酯微囊)、胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒和纳米囊)或粗乳状液中。

[0421] 待用于体内给药的制剂必需是无菌的。这容易通过除菌滤膜过滤实现。

[0422] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质为成型制品的形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚甲基丙烯酸2-羟基乙酯或聚乙烯醇)、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和γ乙基-L-谷氨酸共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如

LUPRONDEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙立德组成的注射用微球体)和聚D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物例如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质为期较短的时间。

[0423] 在一些实施方案中,缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体含有可检测标记。使用完整抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab)₂)。有关探针或抗体的术语“标记的”,旨在包括通过使可检测物质与探针或抗体偶联(即物理连接)直接标记探针或抗体,以及与直接标记的另一种试剂反应间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括如下检测第一抗体:使用荧光标记的第二抗体并将DNA探针用生物素末端标记使得可用荧光标记的链霉抗生物素检测。术语“生物样品”旨在包括自受试者分离的组织、细胞和生物流体以及受试者内存在的组织、细胞和流体。因此,在术语“生物样品”用法中所包括的是血液和血液流分或组分,包括血清、血浆或淋巴。即可使用本公开内容的检测方法体外以及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,检测分析物mRNA的体外技术包括RNA印迹杂交和原位杂交。检测分析物蛋白质的体外技术包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀法、免疫化学染色法和免疫荧光法。检测分析物基因组DNA的体外技术包括DNA印迹杂交。用于进行免疫测定法的程序描述于例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”,第42卷,J.R.Crowther(编辑)HumanPress,Totowa,NJ,1995;“Immunoassay”,E.Diamandis和T.Christopoulos,AcademicPress,Inc.,SanDiego,CA,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985。此外,检测分析物蛋白质的体内技术包括将标记的抗分析物蛋白质抗体引入受试者中。例如,抗体可用放射性标记进行标记,所述放射性标记在受试者中的存在和位置可通过标准成像技术检测。

[0424] 本公开内容的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体还可用于各种诊断和预防制剂中。在一个实施方案中,将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有发生一种或多种上述病症的风险的患者。可使用基因型、血清学或生化标志物,测定易感染上述一种或多种病症的患者或器官。

[0425] 在一些实施方案中,将缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予诊断有与一种或多种上述病症有关的临床适应症的个人。在确诊时,给予缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体以减轻或逆转临床适应症的作用。

[0426] 本公开内容的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体还可用于检测患者样品中的靶标,因此可用作诊断剂。例如,将本公开内容的抗体和/或可激活抗体及其缀合形式用于体外测定法,例如ELISA,以检测患者样品中的靶标水平。

[0427] 在一个实施方案中,将本公开内容的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体固定在固体支持体(例如微量滴定板的孔)上。固定的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体用作可存在于试验样品中的任何靶标的俘获抗体。在使固定的抗体与患者样品接触之前,将固体支持体冲洗,并用封闭剂(例如牛乳蛋白质或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0428] 随后将各孔用疑似含有抗原的试验样品或含有标准量的抗原的溶液处理。所述样品是来自疑似具有被视为是病理学诊断的循环抗原水平的患者的例如血清样品。在冲掉试验样品或标准品后,将固体支持体用被可检测标记的第二抗体处理。标记的第二抗体用作

检测抗体。测量可检测标记的水平,通过与产生于标准样品的标准曲线相比较,测定试验样品中靶抗原的浓度。

[0429] 应认识到,根据在体外诊断测定中使用本公开内容的抗体及其缀合形式获得的结果,可根据靶抗原的表达水平,对受试者的疾病分期。对于指定疾病,血样取自诊断为处于疾病进展中的不同阶段和/或处于疾病治疗性治疗的不同点上的受试者。使用提供各个进展或治疗阶段的统计显著性结果的样品群体,标明可视为每个阶段特有的抗原的浓度范围。

[0430] 缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体还可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,所述方法是体外方法。在一些实施方案中,所述方法是体内方法。在一些实施方案中,所述方法是原位方法。在一些实施方案中,所述方法是离体方法。例如,具有酶促可切割CM的可激活抗体可用来检测能够切割CM的酶存在与否。所述可激活抗体可用于诊断学,这可包括通过测量指定宿主生物的指定细胞或组织中的激活的抗体(即产生于切割可激活抗体的抗体)的蓄积,体内检测(例如定性或定量检测)酶活性(或在一些实施方案中,还原电势升高的环境,例如可提供二硫键还原的环境)。所述激活的抗体的蓄积表明不仅组织表现酶促活性(或升高还原电势取决于CM的性质),而且组织还表达激活的抗体与之结合的靶标。

[0431] 例如,可以选择CM作为存在于肿瘤部位、在生物受限制部位(例如在脓肿中、在器官中等)的病毒或细菌感染部位等的基质金属蛋白酶(MMP)的底物。AB可以是结合靶抗原的AB。采用本文公开的方法,或适当时采用本领域技术人员所熟悉的方法,可使可检测标记(例如荧光标记或放射性标记或放射示踪物)与AB或抗体和/或可激活抗体的其它区缀合。合适的可检测标记论述于上述筛选方法的文中,下面提供其它具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽有特异性的AB,连同其活性在目标疾病组织升高的MMP,可激活抗体将显示相对于其中CM特异性酶不以可检测水平存在或以比疾病组织中低的水平存在或是无活性的(例如呈酶原形式或与抑制剂的复合物)的组织,与疾病组织结合的速率提高。由于小的蛋白质和肽通过肾过滤系统从血液中快速清除,且因为对CM有特异性的酶不以可检测水平存在(或在非疾病组织中以较低水平存在或以无活性的构象存在),因此疾病组织中激活的抗体的蓄积相对于非疾病组织提高。

[0432] 在另一个实例中,可激活抗体可用来检测样品中切割剂存在与否。例如,在可激活抗体含有对被酶切割敏感的CM时,可激活抗体可用来(定性或定量)检测样品中酶的存在情况。在另一个实例中,在可激活抗体含有对被还原剂切割敏感的CM时,可激活抗体可用来(定性或定量)检测样品中还原条件的存在情况。为了促进在这些方法中的分析,可激活抗体可被可检测地标记,并且可与支持体(例如固体支持体,例如载玻片或珠粒)结合。可检测标记可位于在切割后不释放的可激活抗体的部分,例如,可检测标记可以是猝灭的荧光标记或直到发生切割才可检测的其它标记。该测定法可如下进行:例如使固定化可检测标记的可激活抗体与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以发生切割的时间,然后洗涤除去过量的样品和污染物。然后通过与样品接触之前可激活抗体的可检测信号的变化,例如由于可激活抗体被样品中的切割剂切割所致可检测信号的存在和/或增加,评样品中切割剂(例如酶或还原剂)的存在与否。

[0433] 可改编所述检测方法以同样供检测在切割时能够结合可激活抗体的AB的靶标的

存在与否。因此,可以改编该测定法以评价切割剂存在与否和目标靶标存在与否。切割剂的存在与否可通过上述可激活抗体的可检测标记的存在和/或增加检测,且靶标的存在与否可通过例如使用可检测标记的抗靶标抗体通过检测靶标-AB复合物来检测。

[0434] 例如,通过蛋白酶切割,且与特定靶标结合,可激活抗体还可用于原位成像以证实可激活抗体活化。原位成像是一种能够确定生物样品(例如细胞培养物或组织切片)中的蛋白水解活性和靶标的位置的技术。采用该技术,根据可检测标记(例如荧光标记)的存在,可证实与指定靶标的结合和蛋白水解活性两者。

[0435] 这些技术可用于任何冷冻细胞或来源于疾病部位(例如肿瘤组织)的组织或健康组织。这些技术还可用于新鲜细胞或组织样品。

[0436] 在这些技术中,可激活抗体用可检测标记进行标记。可检测标记可以是荧光染料(例如荧光团、异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明异硫氰酸酯(TRITC)、Alexa Fluor®标记)、近红外(NIR)染料(例如Qdot®纳米晶体)、胶态金属、半抗原、放射性标记、生物素和扩增试剂例如链霉抗生物素、或酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0437] 与标记的可激活抗体一起温育的样品中标记的检出表明,样品含有靶标并含有对可激活抗体的CM有特异性的基质金属蛋白酶(MMP)。在一些实施方案中,可使用广谱蛋白酶抑制剂(例如本文所述那些)和/或通过使用对蛋白酶有特异性的作用剂,例如对蛋白酶基质蛋白酶(MT-SP1)有特异性并抑制基质蛋白酶的蛋白水解活性的抗体例如A11,证实MMP的存在;参见例如2010年11月11日公开的国际公布号WO 2010/129609。使用广谱蛋白酶抑制剂(例如本文所述那些)和/或通过使用更大选择性的抑制剂的相同方法,可用来鉴定对可激活抗体的CM有特异性的MMP。在一些实施方案中,靶标的存在可使用对靶标(例如另一种抗体)有特异性的作用剂来证实,或可检测标记可与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中,未标记的可激活抗体可与通过标记的第二抗体或更复杂的检测系统的检测一起使用。

[0438] 类似技术也可用于体内成像,其中受试者(例如哺乳动物,包括人)中荧光信号的检测表明疾病部位含有靶标和含有对可激活抗体的CM有特异性的MMP。

[0439] 这些技术还可用于试剂盒和/或用作试剂用于根据可激活抗体中的蛋白酶特异性CM,检测、鉴定或表征各种细胞、组织和生物中的蛋白酶活性。

[0440] 本公开内容提供在各种诊断和/或预防适应症中使用抗体和/或可激活抗体的方法。例如,本公开内容提供如下检测受试者或样品中切割剂和目标靶标存在与否的方法:(i)使受试者或样品与可激活抗体接触,其中可激活抗体包含掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割、非激活状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;和(b)其中在未切割的非激活状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,而在切割的激活状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标;和(ii)测量受试者或样品中激活的可激活抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂和靶标存在于受试者或样品中,而其中受试者或样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂、靶标或切割剂和靶标两者缺乏和/或不足以存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可

激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0441] 本公开内容还提供如下检测受试者或样品中切割剂存在与否的方法:(i)使受试者或样品在目标靶标(例如靶标)存在下与可激活抗体接触,其中可激活抗体包含掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割、非激活状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;和(b)其中在未切割的非激活状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,而在切割的激活状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标;和(ii)测量受试者或样品中激活的可激活抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂存在于受试者或样品中,而其中受试者或样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂缺乏和/或不充分存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0442] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中切割剂和靶标存在与否的方法的试剂盒,其中试剂盒包括包含掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB)的至少可激活抗体,其中未切割、非激活状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;和(b)其中在未切割的非激活状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,而在切割的激活状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标;和(ii)测量受试者或样品中激活的可激活抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂存在于受试者或样品中,而其中受试者或样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂缺乏和/或不充分存在于受试者或样品中。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0443] 本公开内容还提供如下检测受试者或样品中切割剂存在与否的方法:(i)使受试者或样品与可激活抗体接触,其中可激活抗体包含掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)、特异性结合靶标的抗原结合结构域(AB)和可检测标记,其中未切割、非激活状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;其中在未切割的非激活状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,

而在切割的激活状态下MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标；且其中可检测标记位于在CM切割后释放的可激活抗体的部分；和(ii)测量受试者或样品中可检测标记的水平，其中受试者或样品中可检测水平的可检测标记表明，切割剂缺乏和/或不充分存在于受试者或样品中，而其中受试者或样品中无可检测水平的可检测标记表明，切割剂存在于受试者或样品中。在一些实施方案中，可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中，可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中，可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中，可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现，其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中，第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0444] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中切割剂和靶标存在与否的方法的试剂盒，其中试剂盒包括用于接触受试者或生物样品的至少本文所述可激活抗体和/或缀合的可激活抗体(例如治疗剂与之缀合的可激活抗体)和检测受试者或生物样品中激活的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的水平的工具，其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明，切割剂和靶标存在于受试者或生物样品中，而其中受试者或生物样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明，切割剂、靶标或切割剂和靶标两者不存在和/或不充分存在于受试者或生物样品中，使得无法检出受试者或生物样品中的靶标结合和/或可激活抗体的蛋白酶切割。

[0445] 本公开内容还提供如下检测受试者或样品中切割剂存在与否的方法：(i)使受试者或生物样品在靶标存在下与可激活抗体接触，和(ii)测量受试者或生物样品中激活的可激活抗体的水平，其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明，切割剂存在于受试者或生物样品中，而其中受试者或生物样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明，切割剂不存在和/或不以可检测水平充分存在于受试者或生物样品中，使得在受试者或生物样品中无法检出可激活抗体的蛋白酶切割。所述可激活抗体包括掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB)，其中未切割(即非激活)状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM；(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽，且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列；和(b)其中未切割状态下的可激活抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合，而其中切割(即激活)状态下可激活抗体的MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标。在一些实施方案中，可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中，可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中，可检测标记与掩蔽部分连接。在一些实施方案中，可检测标记与蛋白酶切割位点的可切割部分N端连接。在一些实施方案中，AB的单一抗原结合部位被掩蔽。在其中本公开内容的抗体具有至少2个抗原结合部位的一些实施方案中，至少一个抗原结合部位被掩蔽，而至少一个抗原结合部位不被掩蔽。在一些实施方案中，所有抗原结合部位被掩蔽。在一些实施方案中，测量步骤包括使用包含可检测标记的第二试剂。

[0446] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中切割剂和靶标存在与否的方法的试剂盒，其中试剂盒包括用于以下的至少本文所述可激活抗体和/或缀合的可激活抗体：使受试者或生物样品在靶标存在下与可激活抗体接触，并测量受试者或生物样品中激活的可激活抗体的水平，其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明，切割剂存

在于受试者或生物样品中,而其中受试者或生物样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂不存在和/或不以可检测水平充分存在于受试者或生物样品中,使得无法测出受试者或生物样品中的可激活抗体的蛋白酶切割。所述可激活抗体包括掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割(即非激活)状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;和(b)其中未切割状态下的可激活抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,而其中切割(即激活)状态下的可激活抗体的MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可检测标记与掩蔽部分连接。在一些实施方案中,可检测标记与蛋白酶切割位点的可切割部分N端连接。在一些实施方案中,AB的单一抗原结合部位被掩蔽。在其中本公开内容的抗体具有至少2个抗原结合部位的一些实施方案中,至少一个抗原结合部位被掩蔽,而至少一个抗原结合部位不被掩蔽。在一些实施方案中,所有抗原结合部位被掩蔽。在一些实施方案中,测量步骤包括使用包含可检测标记的第二试剂。

[0447] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中切割剂存在与否的方法的试剂盒,其中试剂盒包括用于以下的至少本文所述可激活抗体和/或缀合的可激活抗体:与受试者或生物样品接触,并检测受试者或生物样品中激活的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的水平的工具,其中可激活抗体包括位于在CM切割后释放的可激活抗体的部分的可检测标记,其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂不存在和/或不充分存在于受试者或生物样品中,使得无法检出受试者或生物样品中的靶标结合和/或可激活抗体的蛋白酶切割,而其中受试者或生物样品中无可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂以可检测水平存在于受试者或生物样品中。

[0448] 本公开内容提供如下检测受试者或样品中切割剂和靶标存在与否的方法:(i)使受试者或生物样品与可激活抗体接触,其中可激活抗体包括位于在CM切割后释放的可激活抗体的部分的可检测标记,和(ii)测量受试者或生物样品中激活的可激活抗体的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂、靶标或切割剂和靶标两者不存在和/或不充分存在于受试者或生物样品中,使得无法检出受试者或生物样品中的靶标结合和/或可激活抗体的蛋白酶切割,而其中受试者或生物样品中激活的可激活抗体的可检测水平降低表明,切割剂和靶标存在于受试者或生物样品中。可检测标记的水平降低为,例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。所述可激活抗体包括掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割(即非激活)状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;和(b)其中未切割状态下的可激活抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,而其中切割(即激活)状态下的可激活抗体的MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在

一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0449] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中切割剂和靶标存在与否的方法的试剂盒,其中试剂盒包括用于使受试者或生物样品接触的至少本文所述可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和检测受试者或生物样品中激活的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的水平的工具,其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的可激活抗体表明,切割剂、靶标或切割剂和靶标两者不存在和/或不充分存在于受试者或生物样品中,使得无法检出受试者或生物样品中的靶标结合和/或可激活抗体的蛋白酶切割,而其中受试者或生物样品中激活的可激活抗体的可检测水平降低表明,切割剂和靶标存在于受试者或生物样品中。可检测标记的水平降低为例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。

[0450] 本公开内容还提供如下检测受试者或样品中切割剂存在与否的方法:(i)使受试者或生物样品与可激活抗体接触,其中可激活抗体包括位于在CM切割后释放的可激活抗体的部分的可检测标记;和(ii)测量受试者或生物样品中可检测标记的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记表明,切割剂不存在和/或不以可检测水平充分存在于受试者或生物样品中,使得无法测出受试者或生物样品中的可激活抗体的蛋白酶切割,而其中受试者或生物样品中可检测标记的可检测水平降低表明,切割剂存在于受试者或生物样品中。可检测标记的水平降低为例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。所述可激活抗体包括掩蔽部分(MM)、被切割剂切割的可切割部分(CM)和特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中未切割(即非激活)状态下的可激活抗体包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;和(b)其中未切割状态下的可激活抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,而其中切割(即激活)状态下的可激活抗体的MM不干扰AB与靶标特异性结合或不与AB竞争特异性结合靶标。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0451] 本公开内容还提供用于检测受试者或样品中目标切割剂存在与否的方法的试剂盒,其中试剂盒包括用于接触受试者或生物样品的至少本文所述可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和检测受试者或生物样品中激活的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的水平的工具,其中可激活抗体包括位于在CM切割后释放的可激活抗体的部分的可检测标记,其中受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记表明,切割剂、靶标或切割剂和靶标两者不存在和/或不充分存在于受试者或生物样品中,使得无法检出受试者或生物样品中的靶

标结合和/或可激活抗体的蛋白酶切割,而其中受试者或生物样品中可检测标记的可检测水平降低表明,切割剂和靶标存在于受试者或生物样品中。可检测标记的水平降低为例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。

[0452] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可激活抗体包括可检测标记。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可检测标记包括成像剂、造影剂、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。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,放射性同位素是铟或锝。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,造影剂包含碘、钆或氧化铁。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,酶包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,荧光标记包含黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、改进的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,发光标记包含N-methylacrydium衍生物。在这些方法的一些实施方案中,标记包含Alexa Fluor®标记,例如Alexa Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,基于配体的标记包含生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或一种或多种半抗原。

[0453] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,受试者是人。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、陪伴动物(例如猫、狗、马)、农场动物、役用动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是啮齿动物。

[0454] 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。

[0455] 在一些实施方案中,原位成像和/或体内成像可用于鉴定要治疗的患者的方法。例如在原位成像中,使用可激活抗体筛选患者样品以鉴定在合适部位(例如在肿瘤部位)中具有合适的蛋白酶和靶标的患者。

[0456] 在一些实施方案中,使用原位成像鉴定或以别的方式精选适于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群。例如对靶标(例如靶标)和切割待测可激活抗体(例如在疾病部位蓄积激活的抗体)的可切割部分(CM)中的底物的蛋白酶测试阳性的患者被鉴定为用于用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适的候选者。同样地,采用这些方法对靶标(例如靶标)和切割待测可激活抗体中的CM中的底物的蛋白酶的任一个或两个测试为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,对于第一可激活抗体测试为阴性的这类患者可用包含不同CM的其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。在一些实施方案中,然后对于试验阳性的患者,给予患者治疗有效量的缀合的可激活抗体。

[0457] 在一些实施方案中,使用体内成像鉴定或以别的方式精选适于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群。例如对靶标(例如靶标)和切割待测可激活抗体(例如在疾病部位蓄积激活的抗体)的可切割部分(CM)中的底物的蛋白酶测试阳性的患者被鉴定为用于用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适的候选者。同样地,测试阴性的患者可被鉴定为另

一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,对于第一可激活抗体测试为阴性的这类患者可用包含不同CM的其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。在一些实施方案中,然后对于试验阳性的患者,给予患者治疗有效量的缀合的可激活抗体。

[0458] 在方法和试剂盒的一些实施方案中,使用方法或试剂盒鉴定或以别的方式精选适用于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群。例如对靶标(例如靶标)和切割待在这些方法中测试的可激活抗体的可切割部分(CM)中的底物的蛋白酶两者测试阳性的患者被鉴定为用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适候选者。同样地,采用这些方法测试对靶标(例如靶标)和切割待测试可激活抗体中的CM中的底物的蛋白酶两者为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,所述患者可用其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。在一些实施方案中,测试对靶标(例如靶标)的任一个为阴性的患者被鉴定为用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适候选者。在一些实施方案中,测试对靶标(例如靶标)的任一个为阴性的患者被鉴定为不是用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适候选者。在一些实施方案中,所述患者可用其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。在一些实施方案中,可激活抗体是治疗剂与之缀合的可激活抗体。在一些实施方案中,可激活抗体不与作用剂缀合。在一些实施方案中,可激活抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,测量受试者或样品中可激活抗体的水平使用特异性结合激活的抗体的第二试剂实现,其中试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0459] 在一些实施方案中,使用方法或试剂盒鉴定或以别的方式精选适用于用本公开内容的抗靶标可激活抗体和/或缀合的可激活抗体(例如治疗剂与之缀合的可激活抗体)治疗的患者群,接着通过将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予有需要的受试者进行治疗。例如对靶标(例如靶标)和切割待在些方法测试的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体的可切割部分(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所述CM的所述抗体和/或所述缀合的可激活抗体治疗的合适候选者,然后将治疗有效量的受测试的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予患者。同样地,采用这些方法对靶标(例如靶标)和切割待测试可激活抗体中的CM中的底物的蛋白酶的任一个或两个测试为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,所述患者可用其它抗体和/或缀合的可激活抗体治疗直到鉴定出用于治疗的合适的抗体和/或缀合的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体)。在一些实施方案中,然后对于试验阳性的患者,将治疗有效量的可激活抗体和/或缀合抗体给予患者。

[0460] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,MM是长为约4-40个氨基酸的肽。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可激活抗体包含接头肽,其中接头肽位于MM和CM之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可激活抗体包含接头肽,其中接头肽位于AB和CM之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可激活抗体包含第一接头肽(L1)和第二接头肽(L2),其中第一接头肽位于MM和CM之间,第二接头肽位于AB和CM之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,L1和L2的每一个是长度为约1-20个氨基酸的肽,且其中L1和L2的每

一个不必是相同的接头。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,L1和L2的一个或两个包含甘氨酸-丝氨酸聚合物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,L1和L2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:(GS)n、(GSGGS)n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)n(SEQ ID NO:2),其中n为至少1的整数。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,L1和L2的至少一个包含具有式(GGS)n的氨基酸序列,其中n为至少1的整数。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,L1和L2的至少一个包含选自以下的氨基酸序列:Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:3)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:4)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:5)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:6)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:7)和Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:8)。

[0461] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,AB包含选自本文提供的交叉反应抗体序列的抗体或抗体片段序列。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,AB包含Fab片段、scFv或单链抗体(scAb)。

[0462] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,切割剂是在受试者或样品中与靶标共定位的蛋白酶,CM是用作蛋白酶的底物的多肽,其中当可激活抗体暴露于蛋白酶中时,蛋白酶切割可激活抗体中的CM。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM与AB的N端偶联。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM与AB的C端偶联。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM与AB的VL链的C端偶联。

[0463] 本公开内容的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体用于诊断和预防制剂。在一个实施方案中,将可激活抗体给予有发生上述炎症、炎性病症、癌症或其它病症的一种或多种的风险的患者。

[0464] 可采用基因型、血清学或生化标志物,确定易染一种或多种上述病症的患者或器官。

[0465] 在一些实施方案中,将可激活抗体和/或缀合的可激活抗体给予诊断有与一种或多种上述病症有关的临床适应症的个人。在确诊时,给予可激活抗体和/或缀合的可激活抗体以减轻或逆转临床适应症的作用。

[0466] 本公开内容的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体还可用于检测患者样品中的靶标,因此可用作诊断剂。例如,本公开内容的可激活抗体和/或缀合的可激活抗体用于体外测定法,例如ELISA,以检测患者样品中的靶标水平。

[0467] 在一个实施方案中,使本公开内容的可激活抗体固定在固体支持体(例如微量滴定板的孔)上。固定化可激活抗体用作可存在于试验样品中的任何靶标的俘获抗体。在使固定的抗体与患者样品接触之前,将固体支持体冲洗,并用封闭剂(例如牛乳蛋白质或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0468] 随后将各孔用疑似含有抗原的试验样品或含有标准量的抗原的溶液处理。所述样品是来自疑似具有被视为是病理学诊断的循环抗原水平的患者的例如血清样品。在冲掉试验样品或标准品后,将固体支持体用被可检测标记的第二抗体处理。标记的第二抗体用作检测抗体。测量可检测标记的水平,通过与产生于标准样品的标准曲线相比较,测定试验样品中靶抗原的浓度。

[0469] 应认识到,根据在体外诊断测定中使用本公开内容的抗体获得的结果,可根据靶

抗原的表达水平,对受试者的疾病分期。对于指定疾病,血样取自诊断为处于疾病进展中的不同阶段和/或处于疾病治疗性治疗的不同点上的受试者。使用提供各个进展或治疗阶段的统计显著性结果的样品群体,标明可视为每个阶段特有的抗原的浓度范围。

[0470] 可激活抗体和/或缀合的可激活抗体还可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,所述方法是体外方法。在一些实施方案中,所述方法是体内方法。在一些实施方案中,所述方法是原位方法。在一些实施方案中,所述方法是离体方法。例如具有酶促可切割CM的可激活抗体可用来检测能够切割CM的酶存在与否。所述可激活抗体可用于诊断学,这可包括通过测量指定宿主生物的指定细胞或组织中的激活的抗体(即产生于切割可激活抗体的抗体)的蓄积,体内检测(例如定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,还原电势升高的环境,例如可提供二硫键还原的环境)。所述激活的抗体的蓄积表明不仅组织表达酶促活性(或升高还原电势取决于CM的性质),而且组织还表达激活的抗体与之结合的靶标。

[0471] 例如,可选择CM为存在于肿瘤部位、在生物受限制的部位(例如在脓肿中、在器官中等)的病毒或细菌感染部位等的蛋白酶的蛋白酶底物。AB可以是结合靶抗原的AB。采用本领域技术人员熟悉的方法,可使可检测标记(例如荧光标记或放射性标记或放射示踪物)与可激活抗体的AB或其它区缀合。合适的可检测标记论述于上述筛选方法的文中,下面提供其它具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽有特异性的AB,连同其活性在目标疾病组织中升高的蛋白酶,可激活抗体将显示相对于其中CM特异性酶不以可检测水平存在或以比疾病组织中低的水平存在或是无活性的(例如呈酶原形式或与抑制剂的复合物)的组织,与疾病组织结合的速率提高。由于小的蛋白质和肽通过肾过滤系统从血液中快速清除,且因为对CM有特异性的酶不以可检测水平存在(或在非疾病组织中以较低水平存在或以无活性的构象存在),因此疾病组织中激活的抗体的蓄积相对于非疾病组织提高。

[0472] 在另一个实例中,可激活抗体可用来检测样品中切割剂存在与否。例如,在可激活抗体含有对被酶切割敏感的CM时,可激活抗体可用来(定性或定量)检测样品中酶的存在情况。在另一个实例中,在可激活抗体含有对被还原剂切割敏感的CM时,可激活抗体可用来(定性或定量)检测样品中还原条件的存在情况。为了促进在这些方法中的分析,可激活抗体可被可检测地标记,并且可与支持体(例如固体支持体,例如载玻片或珠粒)结合。可检测标记可位于在切割后不释放的可激活抗体的部分,例如,可检测标记可以是猝灭的荧光标记或直到发生切割才可检测的其它标记。该测定法可如下进行:例如使固定化可检测标记的可激活抗体与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以发生切割的时间,然后洗涤除去过量的样品和污染物。然后通过与样品接触之前可激活抗体的可检测信号的变化,例如由于可激活抗体被样品中的切割剂切割所致可检测信号的存在和/或增加,评样品中切割剂(例如酶或还原剂)的存在与否。

[0473] 可改编所述检测方法以同样供检测在切割时能够结合可激活抗体的AB的靶标的存在与否。因此,可以改编该测定法以评价切割剂存在与否和目标靶标存在与否。切割剂的存在与否可通过上述可激活抗体的可检测标记的存在和/或增加检测,且靶标的存在与否可通过例如使用可检测标记的抗靶标抗体通过检测靶标-AB复合物来检测。

[0474] 例如,通过蛋白酶切割,且与特定靶标结合,可激活抗体还可用于原位成像以证实可激活抗体活化。原位成像是一种能够确定生物样品(例如细胞培养物或组织切片)中的蛋白水解活性和靶标的位置的技术。采用该技术,根据可检测标记(例如荧光标记)的存在,可

证实与指定靶标的结合和蛋白水解活性两者。

[0475] 这些技术可用于任何冷冻细胞或来源于疾病部位(例如肿瘤组织)的组织或健康组织。这些技术还可用于新鲜细胞或组织样品。

[0476] 在这些技术中,可激活抗体用可检测标记进行标记。可检测标记可以是荧光染料、(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明异硫氰酸酯(TRITC)、近红外(NIR)染料(例如Qdot®纳米晶体)、胶态金属、半抗原、放射性标记、生物素和扩增试剂例如链霉抗生物素或酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0477] 与标记的可激活抗体一起温育的样品中标记的检出表明,样品含有靶标并含有对可激活抗体的CM有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中,可使用广谱蛋白酶抑制剂(例如本文所述那些)和/或通过使用对蛋白酶有特异性的作用剂,例如对蛋白酶基质蛋白酶(MT-SP1)有特异性并抑制基质蛋白酶的蛋白水解活性的抗体例如A11,证实蛋白酶的存在;参见例如2010年11月11日公开的国际公布号WO 2010/129609。使用广谱蛋白酶抑制剂(例如本文所述那些)和/或通过使用更大选择性的抑制剂的相同方法可用来鉴定对可激活抗体的CM有特异性的蛋白酶或蛋白酶类别。在一些实施方案中,靶标的存在可使用对靶标(例如另一种抗体)有特异性的作用剂来证实,或可检测标记可与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中,未标记的可激活抗体可与通过标记的第二抗体或更复杂的检测系统的检测一起使用。

[0478] 类似技术也可用于体内成像,其中受试者(例如哺乳动物,包括人)中荧光信号的检测表明,疾病部位含有靶标和含有对可激活抗体的CM有特异性的蛋白酶。

[0479] 这些技术还可用于试剂盒和/或用作试剂用于根据可激活抗体中的蛋白酶特异性CM,检测、鉴定或表征各种细胞、组织和生物中的蛋白酶活性。

[0480] 在一些实施方案中,原位成像和/或体内成像可用于鉴定要治疗的患者的方法。例如在原位成像中,使用可激活抗体筛选患者样品以鉴定在合适部位(例如在肿瘤部位)中具有合适的蛋白酶和靶标的患者。

[0481] 在一些实施方案中,使用原位成像鉴定或以别的方式精选适于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群。例如,对靶标和切割待测可激活抗体的可切割部分(CM)中的底物的蛋白酶(例如在疾病部位蓄积激活的抗体)两者测试为阳性的患者被鉴定为用包含所述CM的这类可激活抗体治疗的合适候选者。同样地,采用这些方法对靶标和切割待测试可激活抗体中的CM中的底物的蛋白酶的任一个或两个测试为阴性的患者被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者(即不适用于用待测的可激活抗体治疗)。在一些实施方案中,对于第一可激活抗体测试为阴性的这类患者可用包含不同CM的其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。

[0482] 在一些实施方案中,使用体内成像鉴定或以别的方式精选适于用本公开内容的可激活抗体治疗的患者群。例如,对靶标和切割待测可激活抗体(例如在疾病部位蓄积激活的抗体)的可切割部分(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所述CM的这类可激活抗体治疗的合适候选者。同样地,测试为阴性的患者被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者(即不适用于用待测的可激活抗体治疗)。在一些实施方案中,对于第一可激活抗体测试为阴性的这类患者可用包含不同CM的其它可激活抗体测试直到鉴定出用于治疗的合适的可激活抗体(例如包含在疾病部位被患者切割的CM的可激活抗体)。

[0483] 药物组合物

可将本公开内容的缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体(本文亦称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物掺入适于给药的药物组合物中。所述组合物通常包含缀合的抗体、可激活抗体和/或缀合的可激活抗体和药学上可接受的载体。本文所用术语“药学上可接受的载体”旨在包括与给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣材料、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体描述于本领域的标准参考文献Remington's Pharmaceutical Sciences的最新版本,通过引用结合到本文中。这类载体或稀释剂的合适实例包括但不限于水、盐水、林格氏液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。还可使用脂质体和非水性溶媒,例如固定油。药用活性物质的所述介质和作剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或作用剂与活性化合物不相容,否则考虑其在组合物中的应用。还可将补充的活性化合物掺入组合物中。

[0484] 本公开内容的药物组合物被配制成为与其给药途径相容。给药途径包括胃肠外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(即局部)、跨粘膜和直肠给药。用于胃肠外、皮内或皮下应用的溶液剂或混悬剂可包括下列组分: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,例如苄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;和用于调节张度的作用剂,例如氯化钠或葡萄糖。可用酸和碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可将胃肠外制剂包封在用玻璃和塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0485] 适于注射用的药物组合物包括无菌水性溶液剂(其中为水溶性的)或分散剂和用于无菌注射用溶液剂或分散剂临时配制的无菌粉剂。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的,并且应为达到存在易于注射程度的流体。在制备和存储条件下必须更稳定,并且必须防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和流体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散剂的情况下通过保持所需粒度和通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,实现对微生物作用的防止。在一些实施方案中,需要在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇、氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的作用剂,例如单硬脂酸铝和明胶,引起注射用组合物的吸收延迟。

[0486] 可按所需要的量将活性化合物掺入上列成分之一或组合的适当溶剂中,需要时,接着过滤除菌,来制备无菌注射用溶液剂。一般而言,通过将活性化合物掺入含有基础分散介质和所需的来自上文列举的其它成分的无菌溶媒中,来制备分散剂。在用于制备无菌注射用溶液剂的无菌粉剂的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,得到来自其前述除菌过滤溶液的活性成分加任何其它所需成分的粉剂。

[0487] 口服组合物一般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。对于口服治疗性给药,可将活性化合物与赋形剂一起掺入,并以片剂、含片或胶囊剂的形式使用。口服组合物还可使用液体载体制备以用作漱口剂,其中液体载体中的化合

物口服应用和漱口和咳出或下咽。可包括药物相容的粘合剂和/或辅料作为组合物的部分。片剂、丸剂、胶囊剂、含片等可含有下列成分或类似性质的化合物的任一种：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，例如欧薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味料。

[0488] 对于通过吸入给药，以装有合适的抛射剂（例如气体例如二氧化碳）的加压容器或分配器或喷雾器的喷雾剂形式递送化合物。

[0489] 全身给药还可通过跨粘膜或经皮方法给予。对于跨粘膜或经皮给药，在制剂中使用适于待渗透屏障的渗透剂。所述渗透剂一般是本领域已知的，例如对于跨粘膜给药，包括洗涤剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。跨粘膜给药可通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂实现。对于经皮给药，活性化合物被制成本领域广为人知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂或乳膏剂。

[0490] 还可以栓剂（例如用常规栓剂基质例如可可脂和其它甘油酯）或滞留型灌肠剂的形式制备化合物用于直肠递送。

[0491] 在一个实施方案中，活性化合物用保护化合物免于从机体快速清除的载体制备，例如控释制剂，包括植入剂和微胶囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酯和聚乳酸。制备所述制剂的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。材料还可市购获自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc.。还可使用脂质体混悬剂（包括靶向感染细胞的脂质体与靶向病毒抗原的单克隆抗体）作为药学上可接受的载体。这些可按照本领域技术人员已知方法，例如描述于美国专利号4,522,811的方法制备。

[0492] 特别有利的是配制剂量单位形式的口服或胃肠外组合物以易于给药和剂量的一致性。本文所用剂量单位形式是指适宜作为用于待治疗的单位剂量的物理离散单位；每单位含有经计算产生所需治疗作用的预定量的活性化合物以及所需药用载体。本公开内容的剂量单位形式的规格受活性化合物的独特性质和要实现的具体治疗效果以及配混用于治疗个体的所述活性化合物的本领域固有限制的支配并直接取决于此。

[0493] 药物组合物可与给药说明书一起装入容器、包装或分配器中。

[0494] 下面的实施例中将进一步描述本发明，所述实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

实施例

[0495] 实施例1. 滑液激活包含本公开内容的底物的猝灭探针的能力该实施例表明滑液样品切割本公开内容的MMP底物序列的能力。具体来说，在可激活抗体构建体的情况下测试了MMP可切割序列，所述构建体包含通过包括待评价的MMP可切割序列的接头区与抗IL-6R抗体序列连接的掩蔽部分。

[0496] 将下列MMP可切割可激活抗体与滑液一起温育：

4792¹⁰⁴¹⁹AV1氨基酸

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGSGSISSGLSSGGSDIQMTQSPSSLASVGD
RTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP
EDIATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE

AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSS

PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:115)

4792¹⁰⁴¹⁹AV1核苷酸

Caaggccagtctggccagtgatgggtcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggattgccc
gagcggtggcagcggtggcttgggt

gctcaggtatttagtagtggtagtcgtggcgttctgacatccagatgactcagttctc
ctgtccgcctctgtggggaccgagtc

ccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggtatcagcagaagccccggaaa
gcacctaagctgctgatctactataacc

tccaggctgcactctggcgtgccagtcggttcagttcagggagcggaccacttac
catctcaagcctgcagccagaggat

tgccacatactattgtcagcagggcaatacactgcctacactttggccagggaccaaggtggaaa
tcaaacgtacggtggctgcaccatct

gtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaa
taacttctatcccagagaggccaaagtaca

gtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagaagg
acagcacctacagcctcagcagc

accctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccatcagg
cctgagctcggccgtcacaaga

gcttcaacagggagagtgt (SEQ ID NO:116)

4792⁵⁵⁹AV1氨基酸

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSQNQALRMAGGSDIQMTQSPSSLASVG

DRVITICRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSQGTDFFTISSLQ

PEDIATYYCQQQNTLPYTFQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR

EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLS

SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:117)

4792⁵⁵⁹AV1核苷酸

caaggccagtctggccagtgatgggtcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggattgccc
gagcggtggcagcggtggcttgggt

gctcacagaatcaggcattacgtatggcaggcgttctgacatccagatgactcagttctc
ctgtccgcctctgtggggaccgagtc

accatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggtatcagcagaagccccggaaa
agcacctaagctgctgatctactataacc

ctccaggctgcactctggcgtgccagtcggttcagttcagggagcggaccacttac
ccatctcaagcctgcagccagaggat

attgccacatactattgtcagcagggcaatacactgcctacactttggccagggaccaaggtgg
aatcaaacgtacggtggctgcaccatc

tgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtac

agtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaag
gacagcacctacagcctcagcag

caccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagg
gcctgagctcgccccgtcacaaag

agcttcaacagggagagtgt (SEQ ID NO:118)

4792⁶⁰¹AV1氨基酸

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSQAQNLLGMVGGSIDIQMTQSPSSLSASVG

DRVТИCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ

PEDIATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR

EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLS

SPVTKSFRGEC (SEQ ID NO:119)

4792⁶⁰¹AV1核苷酸

Caaggccagtctggccagttatggtcctgcagttggaaactatgtacacatattcatggattgcggctc
gagcggtggcagcggtggctctgggt

gctcagcacagaatctgttagtatggtaggcggttctgacatccagatgactcagtcctcttagctcc
ctgtccgcctctgtggggaccgagtc

ccatcacatgcagagccagccaggatattctagttacactgaactggatcagcagaagcccgaaaa
gcacctaagctgctgatctactatacc

tccaggctgcactctggcgtgccagtcggttcagtggtcaggagcggaccgcacttcactttac
catctcaaggcctgcagccagaggat

tgccacatactattgtcagcaggcaatacactgcctacactttggccaggaccaggatggaaaa
tcaaacgtacggtggctgcaccatct

gtcttcatcttccgcctatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgtgcctgt
taacttctatccagagaggccaaagtaca

gtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagg
acagcacctacagcctcagcagc

accctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcaggg
cctgagctccccgtcacaaaga

gcttcaacagggagagtgt (SEQ ID NO:120)

4792³⁴⁵⁷AV1氨基酸

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSSTFPFGMFGGSDIQMTQSPSSLSASVGD

RVТИCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP

EDIATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPRE

AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSS

PTVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:121)

4792³⁴⁵⁷AV1核苷酸

Caaggccagtctggccagttatggtcctgcagttggaaactatgtacacatattcatggattgcggctc
gagcggtggcagcggtggctctgggt

gctcaagtacattccattcggtatgttcggcggtctgacatccagatgactcagtcctcttagctcc

ctgtccgcctctgtggggaccgagtcac
 catcacatgcagagccagccaggatattttagttacctgaactggtatcagcagaagcccgaaaag
 cacctaagctgtatctactataacct
 ccaggctgcactctggcgtccccagtcggcgtcaggagcggaaaccgacttcactttacc
 atctcaagcctgcagccagaggatatt
 gccacatactattgtcagcaggcaatacactgccctacactttggccagggaccaaggtggaaat
 caaacgtacggctgcaccatctg
 tcttcatcttcccgcacatctgtatgagcagttgaaatctggactgcctctgtgtgcctgctgaat
 aacttctatcccagagaggccaaagtacag
 tggaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagga
 cagcacctacagcctcagcagca
 ccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggc
 ctgagctcgcccgtcacaaagag
 cttcaaacagggagagtgt (SEQ ID NO:122)
 4792³⁴⁵⁸AV1氨基酸
 QQQSGQYGSWSNYVHIFMDCGSSGGSGGGSPVGYTSSLGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
 RVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSTDFFTFTISSLQP
 EDIATYYCQQGNLTPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:123)
 4792³⁴⁵⁸AV1核苷酸
 Caaggccagtcggccagttatggcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggattgcggctc
 gagcggtgtggcagcggctgtgg
 gctcacctgtggatatacgagtagtctggcggtctgacatccagatgactcagtcctctagctcc
 ctgtccgcctctgtggggaccgagtc
 ccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacctgaactggtatcagcagaagcccgaaaag
 cacctaagctgtatctactataacc
 tccaggctgcactctggcgtccccagtcggcgtcaggagcggaaaccgacttcactttacc
 atctcaagcctgcagccagaggatatt
 tgccacatactattgtcagcaggcaatacactgccctacactttggccagggaccaaggtggaaat
 tcaaacgtacggctgcaccatct
 gtttcatcttcccgcacatctgtatgagcagttgaaatctggactgcctctgtgtgcctgctgaa
 taacttctatcccagagaggccaaagtaca
 gtggaaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagg
 acagcacctacagcctcagcagc
 accctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggc
 cctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagtgt (SEQ ID NO:124)
 4792³⁴⁶³AV1氨基酸
 QQQSGQYGSWSNYVHIFMDCGSSGGSGGGSDWLYWPGIGGSDIQMTQSPSSLSASVGD

DRVТИCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSTDFFTISSLQ
 PEDIATYYCQQGNTLPYTFQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID NO:125)

4792³⁴⁶³AV1核苷酸

Caaggccagtctggccagtgatgggtcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggattgcggctc
 gagcggtgtggcagcggtggctctggtg

gctcagactgggtatactggcctggattggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctcc
 ctgtccgcctctgtggggaccgagtc

ccatcacatgcagagccagccaggatattctagttacactgaactggtatcagcagaagccccggaaaa
 gcacctaagctgctgatctactatacc

tccaggctgcactctggcgtgccagtcggttcagtgctcagggagcggaccgacttcactttac
 catctcaagcctgcagccagaggat

tgccacatactattgtcagcaggcaatacactgcctacactttggccagggaccaaggtggaaa
 tcaaacgtacggtggctgcaccatct

gtttcatcttccgcacatctgatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgtgcctgctgaa
 taacttctatcccagagaggccaaagtaca

gtggaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagg
 acagcacctacagcctcagcagc

accctgacgctgagcaaaggcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcaggg
 cctgagctcgcgcgtcacaaagagctcaacagggagagtgt (SEQ ID NO:66)

通过测量在滑液中温育后,可激活抗体结合人IL6R与抗IL6R亲本抗体结合IL6R相比的能力的ELISA方式,测定可激活抗体活化的程度。简单地说,将NuncMaxisorp板用含100μl/孔(微升/孔)的500-nM人IL6R溶液(R and D Systems,目录号227-SR/CF)的PBS(pH 7.4)在4℃下包被过夜。将板用PBST(PBS(pH 7.4)、0.05% Tween-20)洗涤3次。然后将孔用200μl/孔含2% NFDM(无脂奶粉)的PBST在室温下封闭2小时。将IL6R包被的板用PBST(PBS(pH 7.4),0.05% Tween-20)洗涤3次。将各可激活抗体稀释系列-滑液反应混合物以及亲代抗IL6R抗体的稀释系列加入IL6R包被的ELISA板的合适孔中。将板在室温下温育1小时,然后用PBST(PBS(pH 7.4)、0.05% Tween-20)洗涤3次。加入100μl/孔在2% NFDM-PBST中1:3000稀释的山羊-抗人IgG(Fab特异性,Sigma目录号A0293),将板在室温下温育1小时。将板用PBST(PBS(pH 7.4)、0.05% Tween-20)洗涤6次,然后用TMB和1N HCl显色。

[0497] 表6提供该实验的结果。数据表明包含表6中的底物的抗IL6R可激活抗体被获自RA患者的至少一些滑液样品(SyF)切割。

[0498] 表6. 可激活抗体活化

底物/序列	体内 活化	SyF 中 活化	SyF 中的 发生率
10419 ISSGLSS (SEQ ID NO: 159)	<5%	>30%	3/3
559 QNQALRMA (SEQ ID NO: 15)	<5%	20%	3/3
601 AQNLLGMV (SEQ ID NO: 16)	<5%	>30%	3/3
3457 STFPFGMF (SEQ ID NO: 17)	10%	>50%	3/3
3458 PVGYTSSL (SEQ ID NO: 18)	10%	20%	3/3
3463 DWLYWPGI (SEQ ID NO: 19)	<5%	>30%	3/3

实施例2. 具有MMP可切割底物的可激活抗EGFR抗体抑制肿瘤生长

该实施例表明在H292异种移植物肺癌模型中，含有包含氨基酸序列CISPRGCPDPYVMY (SEQ ID NO:160) 的掩蔽部分、包含MMP14底物520(本文亦称为MN520) ISSGLLSS (SEQ ID NO:14) 的切割部分和抗EGFR抗体C225v5的重链 (SEQ ID NO:56) 和轻链 (SEQ ID NO:59) 的可激活抗EGFR抗体(其中完整的可激活抗体构建体在本文称为Pb-MN520) 抑制肿瘤生长的能力。可激活抗体的轻链配置为掩蔽部分-MMP底物-C225v5的轻链。
[0499] 图1A是使用Pb-520 (12.5mg/kg, 蓝色实线) 和IVIG (12.5mg/kg, 绿色短划线) 、在不同时间给药予以治疗的荷有H292异种移植物肿瘤的小鼠中所见作用的图示。数据表示为平均肿瘤体积±SEM。

[0500] 图1B是荷有H292肿瘤的小鼠中Pb-520可激活抗体的系统稳定性的图示。血样通过第7天眶后放血获取，并通过用毛细管电泳(GXII; Caliper LifeSciences) 分析IgG牵出，来测定底物520的循环稳定性。应用LabChip GX软件(Caliper LifeSciences)，测定切割和未切割轻链的浓度。

[0501] 实施例3. 材料与方法

试剂和菌株：无需更改即使用链霉抗生物素缀合的藻红蛋白(SA-PE) (Invitrogen, Life Technologies)。人MMP9(Research&Diagnostics Systems, Inc.)按照所提供的方案激活且无需更改即使用。人MMP14(Research&Diagnostics Systems, Inc.)按

照所提供的方案激活且无需更改即使用。人纤溶酶(Haematologic Technologies Inc.)无需更改即使用。人tPA(Molecular Innovations)无需更改即使用。与Mona(单核细胞衔接物蛋白质)的SH3结构域融合的YPet在CytomX Therapeutics生产且无需更改即使用。使用MMP14缓冲液HCM(50mM HEPES(pH6.8)、10mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂)。使用MMP9缓冲液TCNB(50mM Tris-HCl、10mM CaCl₂、150mM NaCl、0.05% (w/v) Brij-35, pH 7.5)。使用纤溶酶缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、0.01% Tween20和1mMEDTA)。使用TBST(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% Tween20 (pH 7.4))。使用大肠杆菌(E.coli) MC1061 (Casadaban等, JMB 138 (2) :179-207 (1980))。所有细菌生长均在剧烈搅拌的同时在补充34μg/mL氯霉素(除非规定另一种抗生素)的Luria-Bertani液体培养基(LB)中在37℃下进行。

[0502] 底物切割和支架稳定性分析:对于筛选和克隆分析,通过稀释到新鲜培养基(1:50)中对过夜培养物进行次培养,并生长1.5-2小时。然后次培养物用0.04%阿拉伯糖诱导,在37℃下搅拌时温育45分钟-1小时。为了停止进一步生长,使细胞在冰上温育15分钟-1小时。收获细胞等分部分,并用PBS(pH 7.4)洗涤。通过离心使细胞沉淀,除去上清液,并将细胞重新悬浮于含有酶的反应缓冲液中;使反应混合物在37℃下静置温育。为了终止反应,取出细胞,在PBS中稀释10倍,通过离心沉淀,并重新悬浮于含有(CLiPS) SA-PE(20μg/mL)或YPet-MONA(50nM)的PBS中。在冰上温育(30分钟)后,将细胞用PBS洗涤,并使用FACSAriaTM细胞分选仪分析。

[0503] 对于MMP9蛋白酶切割测定,诱导培养物45分钟-1小时。MMP9的反应缓冲液为TCNB。在将新鲜细胞用5nM-25nM MMP9温育1小时后,进行MMP9水解的测定。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用描述于2013年8月9日提交的PCT专利申请PCT/US13/54378的平台eCLiPS3.0-NSUB_SP,所述专利申请以国际公布号W0 2014/026136于2014年2月13日公开,其内容通过引用以其整体结合到本文中),以确保水解发生在指定的底物区。

[0504] 对于MMP14蛋白酶切割测定,诱导培养物45分钟-1小时。MMP14的反应缓冲液为HCM。在与3nM-250nM MMP14反应或1小时后,进行MMP14水解的测定。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用本文所述平台eCLiPS3.0-NSUB_SP)以确保水解发生在指定的底物区。

[0505] 对于人纤溶酶稳定性测定,使用平台eCLiPS3.0-NSUB_SP;诱导培养物45分钟-1小时。纤溶酶的反应缓冲液为补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mMEDTA的50mM Tris-HCl pH 7.5。在与纤溶酶反应1小时后进行纤溶酶水解的测定。

[0506] 对于人tPA稳定性测定,使用平台eCLiPS3.0-NSUB_SP;诱导培养物45分钟-1小时。tPA的反应缓冲液为TBST。在与tPA反应1小时后进行tPA水解的测定。

[0507] 氨基和羧基端标记条件:链霉抗生物素缀合的藻红蛋白(SAPE)用于标记CPX N端的链霉抗生物素结合亲和力配体。与Mona的SH3结构域融合的荧光蛋白YPet用于标记CPX C端的MONA结合亲和力配体。对于无蛋白酶反应的细胞的最佳标记,将细胞在4℃下与SAPE(20μg/mL)或YPet-MONA(50nM)温育30分钟。对于下述实施例,使用30分钟温育。

[0508] 动力学数据分析:采用测量在蛋白酶处理时克隆细胞群的平均荧光变化的流式细胞术,直接测定细胞表面展示的肽底物的转化程度。具体地说,对于各样品,利用以下关系,通过流式细胞术分析测定转化

$$\text{转化} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} \quad [1]$$

其中(FL_-)为在没有酶的情况下温育后的荧光,(FL_+)为在有酶的情况下温育后的荧光,(FL_0)为未标记的细胞的荧光。假设使用的预期底物浓度大大低于靶蛋白酶的底物的预期 K_m ,Michaelis-Menten模型简化为:

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{cat}}{K_m}[S][E] \quad [2]$$

允许底物转化表示为

$$\text{转化} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{cat}}{K_m} \cdot [E] \cdot t\right) \quad [3]$$

其中[S]为底物浓度,[E]为酶浓度,t为时间。为了求出示二阶速率常数(k_{cat}/K_m) ,将方程式[3]简化为:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = -\ln(1 - C)/(t * p)$$

其中C为产物转化,t为时间,p为蛋白酶浓度。

[0509] 序列数据分析-DirectedFamilies:对底物进行IonTorrent™测序(参见例如Rothenberg,JM,Nature 475,348-352)。通过不变的载体序列对原始Ion Torrent读数进行修剪,恰好获得可变肽插入序列。使插入序列翻译,将具有终止密码子的序列排除在进一步分析之外。通过从所有可行的肽读数中获得的次数,得到各序列的频率。通过在选择后各序列的实测频率与选择前各序列的频率的比较,获得序列的富集。从这些数据鉴定并分离各序列,在CLC总实验室(CLCAccWorkbench 6.6.2,可联机获得)对序列进行比对。将比对文件输入Jalview(参见例如Waterhouse,A.M.等,2009,Bioinformatics 9,1189-1191),并应用BLOSUM62算法(S Henikoff S等,1992,Proc Natl Acad Sci U SA.89,10915-10919),装配平均距离树。受限制的序列群包括与目标序列最接近的聚簇的成员。延伸的序列群包括受限制的序列群加上与最近缘的共同祖先共有的分支的成员(适用时)。

[0510] 实施例4.平台支架中底物库的选择和表征

全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够选择被MMP9切割的底物群。按2010年2月23日授予专利权的美国专利号7,666,817B2所述,使用重组人MMP9,进行选择。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用平台eCLIPS3.0-NSUB_SP)以确保水解发生在指定的底物区。用MMP9和MMP14测试所选择的底物库。图2A和2B显示在TCNB缓冲液中被5nM MMP9切割的库SMP87。

[0511] 实施例5.平台支架中底物切割动力学的表征

全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够简单且直接的定量表征切割动力学。因此,采用流式细胞术,以底物转化为基础为各分离的克隆排序,并通过DNA测序鉴定克隆。以这种方式,可测定几种不同的蛋白酶浓度下的各个克隆的转化程度,并拟合至Michaelis-Menten模型(动力学数据分析部分)。求出各底物相对于MMP9的实测二阶速率常数(k_{cat}/K_m)。在各反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用平台

eCLiPS3.0-NSUB_SP),以确保水解发生在指定的底物区。例如图3A和3B显示被TBST中的5nM MMP9切割的包含氨基酸序列VAGRSMRP(SEQ ID NO:484)的底物。

[0512] 实施例6. 平台支架中下一代测序频率和底物切割动力学的关系

采用Ion Torrent下一代测序(Ion Torrent Next-Generation Sequencing),对最终的富集底物库进行测序。通过不变的载体序列对原始Ion Torrent读数进行剪切,以恰好获得可变肽插入序列。使插入序列翻译,将具有终止密码子的序列排除在进一步分析之外。选出精选的克隆(显示一系列频率)用于功能分析。所选择的克隆用人MMP9切割,测定各自的 k_{cat}/K_m 。然后对库中克隆拷贝数的对数相对于 k_{cat}/K_m 的对数作图。图4显示特定切割部分的频率(拷贝数)与其被MMP9切割的能力间的关系(MMP9 k_{cat}/K_m M⁻¹s⁻¹)。

[0513] 实施例7. 平台支架中底物库的选择和表征

全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够选择的被MMP14切割的底物群。按美国专利号7,666,817B2所述,使用重组人MMP14,进行选择。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用平台eCLiPS3.0-NSUB_SP),以确保水解发生在指定的底物区。用MMP9和MMP14测试所选择的底物库。图5A和5B显示被HCM缓冲液中的60nMMMP14切割的库SMP39。

[0514] 实施例8. 平台支架中底物切割动力学的表征

全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够简单且直接的定量表征切割动力学。因此,采用流式细胞术,以底物转化为基础为各分离的克隆排序,并通过DNA测序鉴定克隆。以这种方式,可测定几种不同的蛋白酶浓度下的各个克隆的转化程度,并拟合至Michaelis-Menten模型(动力学数据分析部分)。求出各底物相对于MMP14的实测二阶速率常数(k_{cat}/K_m)。在各反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用平台eCLiPS3.0-NSUB_SP),以确保水解发生在指定的底物区。例如图6A和6B显示被HCM缓冲液中30nM MMP14切割的包含氨基酸序列QNQALRMA(SEQ ID NO:15)的底物。

[0515] 实施例9. 可激活抗体中的体外底物活性

该实施例表明当掺入可激活抗体时,本公开内容的底物的体外活性。

[0516] 将这些研究中鉴定的几种底物插入具有3954掩蔽物和西妥昔单抗的C225v5变体(描述于PCT公布号WO 2013/163631,通过引用以其整体结合到本文中)的可激活抗体中。

[0517] 如下测定所得可激活抗体的底物将被MMP9或MMP14切割的能力。在TCNB、50mM Tris-HCl、10mM CaCl₂、150mM NaCl、0.05% (w/v) Brrij-35, pH 7.5中进行MMP9蛋白酶消化。在50mM HEPES (pH 6.8)、10mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂中进行MMP14消化。使不同浓度的活性部位测定的MMP9或MMP14与固定的可激活抗体浓度混合以保持底物:蛋白酶比率为至少50。将包含MMP9底物的样品在37°C下温育直到24小时。将包含MMP14底物的样品在37°C下温育4小时。为了终止反应,在95°C下将5μl的消化物加到含有20mM 2-巯基乙醇的7μl HT蛋白质表达样品缓冲液(Caliper LifeSciences)中10分钟。在热变性后,加入32μl ddH₂O,按照生产商说明书,在LabChip GXII上分析样品。应用LabChip GXII软件以求出轻链峰面积。通过将轻链峰面积代入下列方程式计算产物转化:切割的LC/(切割的LC+未切割的LC), LC=轻链。用下列方程式求出 k_{cat}/K_m 值

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = -\ln(1 - C)/(t^*p)$$

其中C为产物转化, t为时间(s), p为蛋白酶浓度(M), 其假设底物浓度低于K_m且超过蛋白酶浓度。

[0518] 包含针对被MMP14切割测试的针对被MMP14切割选出的底物的所得可激活抗体的k_{cat}/K_M值范围对于MMP14为约400-60,000M⁻¹s⁻¹。包含针对被MMP9切割测试的针对被MMP9切割选出的底物的所得可激活抗体被MMP9切割。

[0519] 实施例10. 可激活抗体体内的底物稳定性

该实施例表明当掺入可激活抗体中并给小鼠注射时,本公开内容的底物的体内稳定性。

[0520] 3只裸小鼠(Crl:NU-Foxn1nu)在第0天以12.5mg/kg接受单一IP剂量的各可激活抗体。在第4天(给药后~96小时),通过CO₂窒息使小鼠安乐死,立即收集血液作为血浆-EDTA,并保存在-80°C下。

[0521] 使用磁珠,通过抗人IgG免疫沉淀从血浆纯化可激活抗体。如k_{cat}/K_M部分所述,通过毛细管电泳,制备洗脱的可激活抗体用于分析。简单地说,将5μl洗脱的IgG加入含2-巯基乙醇的7μl蛋白质表达样品缓冲液中。循环稳定性的量化与产物转化的量化相同。

[0522] 10种包含针对被MMP14切割选出的本公开内容的底物的可激活抗体中,7种表明收集的血浆样品中小于20%切割。7种包含针对被MMP9切割选出的本公开内容的底物的可激活抗体中,4种显示在收集的血浆样品中不超过20%切割。

[0523] 实施例11. 材料与方法

试剂和菌株:人MMP9(目录号911-MP, Research&Diagnostics Systems, Inc.)按照所提供的方案激活且无需更改即使用。人MMP14(目录号918-M), Research&Diagnostics Systems, Inc.)按照所提供的方案激活且无需更改即使用。人纤溶酶(目录号HCPM-0140, Haematologic Technologies Inc.)无需更改即使用。将抗EE单克隆抗体(Covance, Princeton, NJ)用Alexa647(Life Sciences)标记且无需其它更改即可使用(称为EE647)。大肠杆菌MC1061或MC1061来源的菌株(DH10β)被用于所有实验(Casadaban等, JMB 138(2): 179-207(1980))。所有细菌生长在补充34μg/mL氯霉素(cm)(除非规定另一种抗生素)的Luria-Bertani液体培养基(LB)中,在搅拌的同时在37°C下进行。

[0524] 展示平台:按2014年2月13日公布的国际公布号WO 2014/026136(其内容通过引用以其整体结合到本文中)所述,产生各经改造以含有实施方案的8-氨基酸底物的展示平台并使用。成熟的(即没有信号肽)CYTX-DP-XXXXXXX展示平台(SEQ ID NO:512)的氨基酸序列见图7A。XXXXXXX(SEQ ID NO:514)表示各底物插入其中的位置。还包括其信号肽的CYTX-DP-XXXXXXX(SEQ ID NO:512)展示平台的氨基酸序列,即,SP-CYTX-DP-XXXXXXX展示平台(SEQ ID NO:513)见图7B。

[0525] CYTX-DP-XXXXXXX展示平台:

```
GQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGGSGGSAYYGITAGPAYRINDW
ASIYGVVGVGYGSGPGGSYGFSYGAGLQFNPMENVALDFSYEQSRIRSVDVGTWILSVGYR
FGSKSRRATSTVTGGYAQSADAQQMNMKGFLNKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGGGSSQAAAGHH
HHHHHH(SEQ ID NO:512)
```

SP-CYTX-DP-XXXXXXX展示平台:

```
MKKIACLSALAAVLAFATAGTSVAGQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGG
```

SGGSAGSAYYGITAGPAYRINDWASIYGVVGVGYSGPGGSYGF SYGAGLQFNPMENVAL
DFSYEQSRSRISVDTWILSVGYRFGSKSRATSTVTGGYAQS DAQGQMNKMGFNLKYRYEEDNSPL
GVIGSFTYTGGSGGGQAAAGHHHHHHH (SEQ ID NO:513)

底物切割和切割动力学分析:对于克隆分析,通过稀释入新鲜培养基(1:40)中对过夜培养物进行次培养,并生长1.5-2小时。然后用0.04%阿拉伯糖诱导次培养物,并在振动的同时在37°C下温育40分钟-1小时。为了停止进一步生长,然后将细胞在冰上温育15分钟-1小时。收获细胞等分部分,并用PBS(pH 7.4)洗涤。通过离心使细胞沉淀,除去上清液,并将细胞重新悬浮于含有酶的反应缓冲液中;在振荡的同时将反应混合物在37°C下温育。为了终止反应,取出细胞,在PBS中稀释10倍,通过离心沉淀,并重新悬浮于含有EE647(20微克/ml(本文亦称为ug/ml或μg/ml))的PBS中。在冰上温育(1小时)后,将细胞用PBS洗涤,并使用Accuri C6细胞分选仪分析。

[0526] 对于MMP9蛋白酶切割测定,诱导培养物45分钟。MMP9的反应缓冲液为补充150mM NaCl、10mM CaCl₂和0.05% (w/v) Brij-35的50mM Tris-HCl (pH 7.4)。在用5nM-150nM MMP9切割1小时后,进行MMP9水解的测定。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用例如CYTX-DP-NSUB,一种其中“底物”是非可切割的接头GGGSGGGS (SEQ ID NO:515)的展示平台),以确保水解发生在指定的底物区。

[0527] 对于MMP14蛋白酶切割测定,诱导培养物45分钟。MMP14的反应缓冲液为补充10mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的50mM HEPES (pH 6.8)。在用5nM-150nM MMP14切割1小时后,进行MMP14水解的测定。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用例如CYTX-DP-NSUB),以确保水解发生在指定的底物区。

[0528] 对于人纤溶酶稳定性测定,诱导培养物45分钟。纤溶酶的反应缓冲液为补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl pH 7.4。在用500pM纤溶酶切割1小时后,进行纤溶酶水解的测定。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用例如CYTX-DP-NSUB),以确保水解发生在指定的底物区。

[0529] 氨基和羧基端标记条件:Alexa-647缀合的抗EE抗体(EE647)用来标记CYTX-DP展示平台N端的EE结合亲和力配体。Alexa-647缀合的抗His抗体(His647)用来标记CYTX-DP展示平台C端的8His结合亲和力配体。对于没有蛋白酶反应的细胞的最佳标记,使细胞在4°C下与EE647(20μg/mL)或His647(2μg/mL)一起温育1小时。对于下述实施例,使用1小时温育。

[0530] 动力学数据分析:采用测量在蛋白酶处理时克隆细胞群的平均荧光变化的流式细胞术,直接测定细胞表面展示的肽底物的转化程度。具体地说,对于各样品,利用以下关系,通过流式细胞术分析测定转化

$$\text{转化}_{\text{CLIPS}} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} \quad [1]$$

其中(FL_-)为在没有酶的情况下温育后的荧光,(FL_+)为在有酶的情况下温育后的荧光,(FL_0)为未标记的细胞的荧光。假设使用的预期底物浓度大大低于靶蛋白酶的底物的预期 K_m ,Michaelis-Menten模型简化为

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{\text{cat}}}{k_M}[S][E] \quad [2]$$

允许底物转化表示为

$$\text{转化}_{MM} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{cat}}{K_M}[E] \cdot t\right) \quad [3]$$

其中 $[S]$ 为底物浓度, $[E]$ 为酶浓度, t 为时间。为了求出示二阶速率常数 (k_{cat}/K_M) , 使各底物的时间依赖性转化拟合至方程式 [3]。

[0531] 实施例12.CYTX-DP展示平台中底物可切割性的表征

该实施例表明实施方案的底物被MMP但非纤溶酶切割的能力。

[0532] 全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够简单且直接的定量表征切割动力学。编码底物的克隆通过DNA测序鉴定,并亚克隆至CYTX-DP展示平台,使得表达的展示平台含有替换XXXXXXXX(SEQ ID NO:514)的8-氨基酸底物。针对被MMP9或MMP14(靶蛋白酶,即用于选择底物的蛋白酶)和纤溶酶(脱靶蛋白酶)切割,评价各底物展示克隆(共127个独立的含底物的展示平台);通过流式细胞术测定周转。从是包含氨基酸序列SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22或23的底物(来自库中的MMP9底物)的同一库中选出31个MMP9选出的底物。9个MMP9选出的底物包含共有氨基酸序列SEQ ID NO:328、336、337、338、339、348、349、350或351(MMP9共有序列)。从是包含氨基酸序列SEQ ID NO:14、15、16、24、25、26、27、28、29、30或33的底物(来自第1库的MMP14底物)的同一库中选出38个MMP14选出的底物。是包含氨基酸序列SEQ ID NO:31或32的底物(来自第2库的MMP14底物)的来源的同一库中选出10个MMP14选出的底物。39个MMP14选出的底物选自共有氨基酸序列SEQ ID NO:364-370、379-393、402-409、420-424、434-435、450-452、457、470-472、474或483(MMP14共有序列)。

[0533] 以这种方式,可测定各克隆切割的程度,且汇总数据以确定被靶蛋白酶切割和不是脱靶蛋白酶的克隆的百分比。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解(使用例如CYTX-DP-NSUB),以确保水解发生在指定的底物区。结果见表9。

[0534] 表9.底物可切割性的总结统计

发现尝试	底物群	用 50 nM MMP9 或 MMP14 >20%切割	用 500 pM 纤溶酶 <20%切割
MMP9 选 出的底物	所有所测的 MMP9 底物	35% (14/40)	85% (34/40)
	来自库中的 MMP9 底物	39% (12/31)	84% (26/31)
	MMP9 共有底物	22% (2/9)	89% (8/9)
MMP14 选 出的底物	所有所测的 MMP14 底物	85% (74/87)	94% (82/87)
	来自第 1 库和第 2 库的 MMP14 底 物	79% (38/48)	94% (45/48)
	来自第 1 库的 MMP14 底物	79% (30/38)	95% (36/38)
	来自第 2 库的 MMP14 底物	80% (8/10)	100% (9/10)
MMP14 共有底 物	MMP14 共有底 物	92% (36/39)	95% (37/39)
	总计	69% (88/127)	91% (116/127)
合并的 MMP9 和 MMP14			

表9表示在CYTX-DP展示平台中测试的MMP9选出的底物的百分比,该平台显示当与50nM人MMP9(目录号911-MP,Research&Diagnostics Systems, Inc.,按照所提供的方案激活且无需更改即使用)一起在补充150mM NaCl、10mM CaCl₂和0.05% (w/v) Brij-35的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中在37℃下温育1小时时至少20% 切割(>20% 切割,用50nM MMP9); (b) 在CYTX-DP展示平台测试的MMP14选出的底物的百分比,该平台显示当与50nM人MMP14(目录号918-MP,Research&Diagnostics Systems, Inc.,按照所提供的方案激活且无需更改即使用)在补充10mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的50mM HEPES (pH 6.8) 中在37℃下温育1小时时至少20% 切割(>20% 切割,用50nM MMP14); 和(c) 在CYTX-DP展示平台中测试的MMP9选出的或MMP-14选出的底物的百分比,该平台显示当与500pM人纤溶酶(目录号HCPM-0140, Haematologic Technologies, Inc.,无需更改便使用)一起在补充100mM NaCl、0.01% Tween20和1mM EDTA的50mM Tris-HCl (pH 7.4) 中在37℃下温育1小时小于20% 切割(<20% 切割,用500pM纤溶酶)。

[0535] 实施例13.CYTX-DP展示平台中底物切割动力学的表征

该实施例显示不同底物的切割动力学。

[0536] 全细胞上的多拷贝底物展示的使用使得能够简单且直接的定量表征切割动力学。克隆通过DNA测序鉴定，并按前面的实施例所述，亚克隆至CYTX-DP-XXXXXXX (SEQ ID NO: 512) 展示平台。针对切割评价72个独特底物展示克隆，选择亚类以评价由其靶蛋白酶引起的切割动力学。可测定几种不同的蛋白酶浓度下的各个克隆的转化程度，并拟合至本文所述Michaelis-Menten模型。然后将观测的 k_{cat}/K_M 值对底物库内克隆的频率作图，观察到频率和 k_{cat}/K_M 之间的相关性。在各个反应条件下测量位于底物位置侧翼的区域的背景水解（使用例如CYTX-DP-NSUB），以确保水解发生在指定的底物区。结果见表10。

[0537] 表10. 底物动力学的总结统计

	底物群	靶蛋白酶 $k_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E2}$	靶蛋白酶 $k_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E3}$	靶蛋白酶 $k_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E4}$
MMP9 底物	所有所测的 MMP9 底物	100% (16/16)	100% (16/16)	63% (10/16)
	来自库中的 MMP9 底物	100% (15/15)	100% (15/15)	67% (10/15)
	MMP9 共有底物	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
MMP14 底物	All MMP-14	100% (55/55)	98% (54/55)	36% (20/55)
	来自第 1 库和第 2 库的 MMP14 底物	100% (47/47)	98% (46/47)	36% (17/47)
	来自第 1 库的 MMP14 底物	100% (38/38)	100% (38/38)	39% (15/38)
	来自第 2 库的 MMP14 底物	100% (9/9)	89% (8/9)	22% (2/9)
	MMP14 共有底物	100% (8/8)	100% (8/8)	38% (3/8)
合并的 MMP9 和 MMP14	总计	100% (71/71)	99% (70/71)	42% (30/71)

实施例14. 包含MMP底物的可激活抗体的体内功效和原位活化

该实施例表明包含实施方案的MMP底物的可激活抗体在体内是有效的。该实施例还表明所述可激活抗体在原位成像测定法中，在例如2014年7月10日公开的国际公布号W0 2014/107559中所述测定法（其内容通过引用以其整体结合到本文中）中是可激活的。将包含实施方案的不同MMP底物（1种MMP9选出的和5种MMP14选出的）的6种可激活抗体以10mg/

kg或12.5mg/kg给予荷有H292异种移植物肿瘤(肺癌)的小鼠。所有6种可激活抗体还含有包含氨基酸序列CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO:160) 的掩蔽部分和包含轻链 (SEQ ID NO:59) 和重链 (SEQ ID NO:56) 的抗EGFR抗体C225v5抗体。可激活抗体的轻链的配置为掩蔽部分-MMP底物-C225v5的轻链。所有6种可激活抗体表明以平均% Δ 抑制测量的22%-81%范围的肿瘤生长抑制。平均% Δ 抑制计算为 (均值 (C) - 均值 (C0)) - (均值 (T) - 均值 (T0)) / (均值 (C) - 均值 (C0)) * 100%，其中T为现有试验组值，T0为现有试验组初始值，C为对照组值，C0为对照组初始值。在该研究中，EGFR抗体西妥昔单抗表明96-98%抑制。

[0538] 采用WO 2014/107559的实施例中描述的条件，使相同的6种可激活抗体接受H292肿瘤组织的原位成像测定法。所有6种可激活抗体被激活，表明了所有6种MMP底物被切割，并释放的抗体在肿瘤组织中与EGFR结合。染色信号的范围为西妥昔单抗IHC信号强度的15% - 65%。一般而言，各可激活抗体活化的百分比表明与H292小鼠模型中证实的可激活抗体的功效正相关。

[0539] 在WO 2014/107559的实施例中所述条件下使用包含MMP14选出的底物的抗Jagged可激活抗体(例如2013年12月27日公开的国际公布号WO 2013/192550中引述的抗Jagged可激活抗体，其内容通过引用以其整体结合到本文中)，使来自10名三阴乳腺癌患者的组织进行原位成像。10个组织样品中有9个显示与西妥昔单抗的IHC信号强度相比，范围为15% - 100%的可激活抗体活化染色评分：10个组织样品中有8个显示西妥昔单抗的IHC信号强度相比，范围为30% - 100%的可激活抗体活化染色评分。

[0540] 其它实施方案

虽然结合其详细描述对本发明进行了描述，但前面的描述旨在说明而不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、优势和修改均在所附权利要求书的范围内。

图 1A

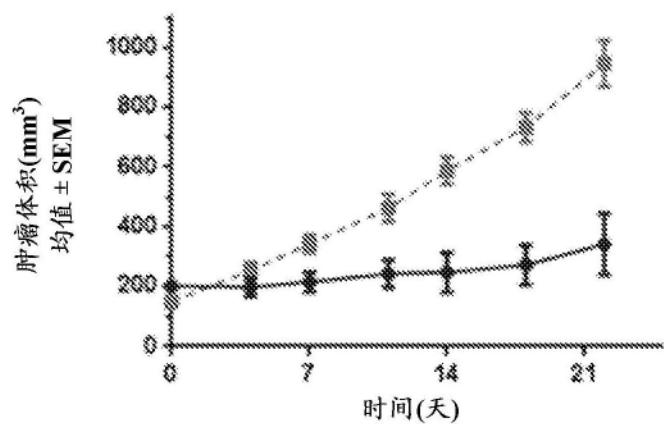


图 1B

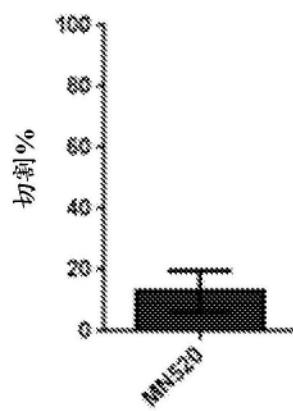
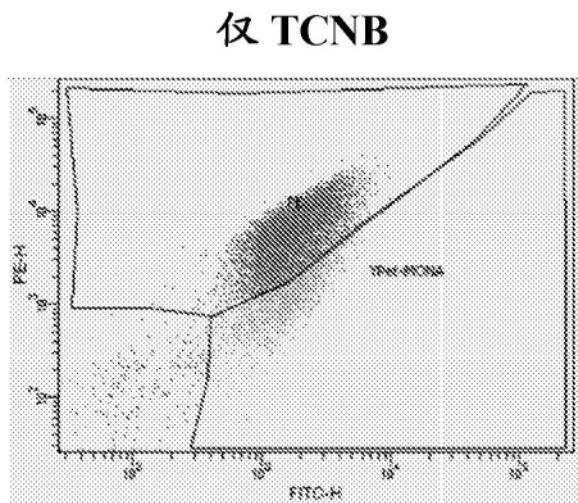


图 2A



仅 TCNB

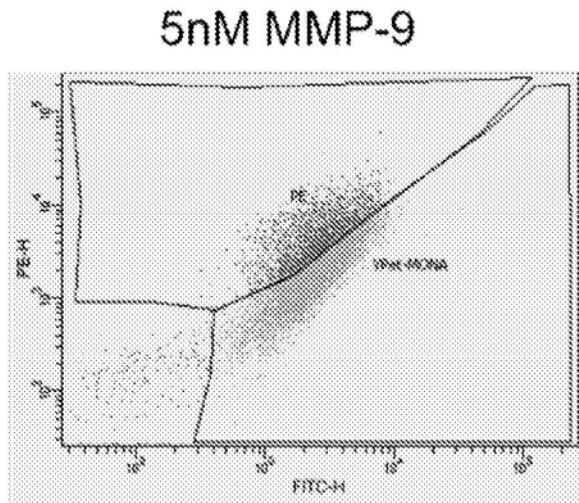


图 2B

5nM MMP-9

图 3A

图 3B

仅 TCNB

5 nM MMP-9

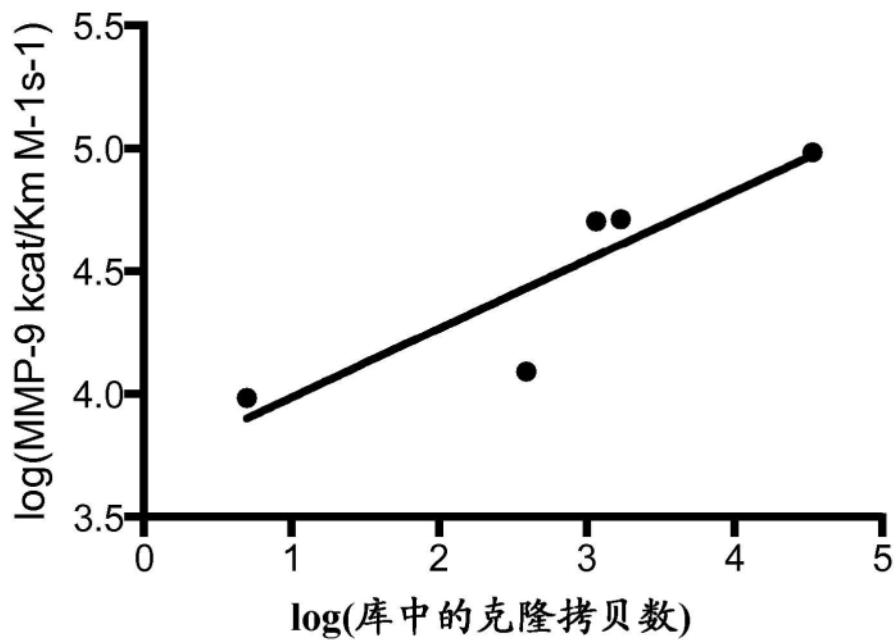
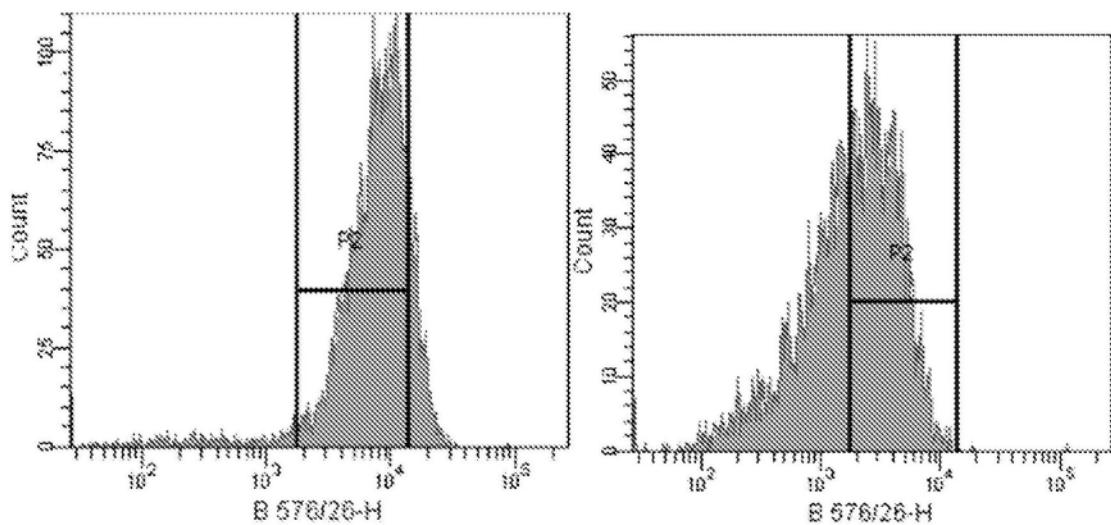


图4

图 5A

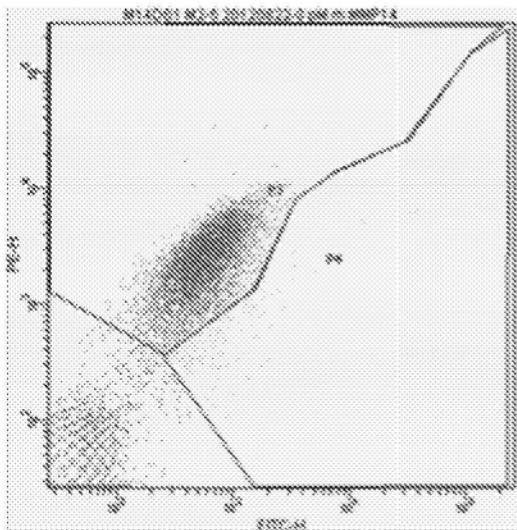
仅 HCM

图 5B

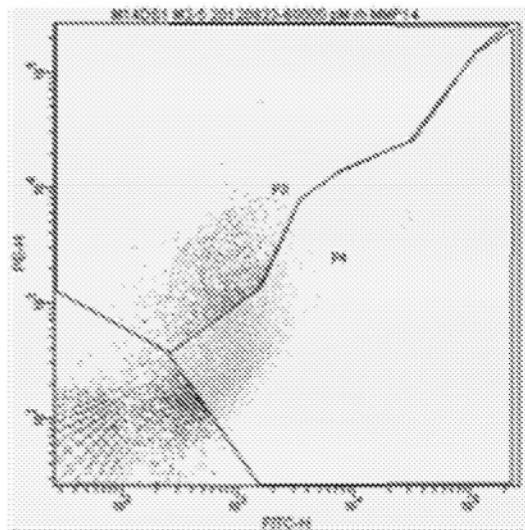
60 nM MMP14

图 6A

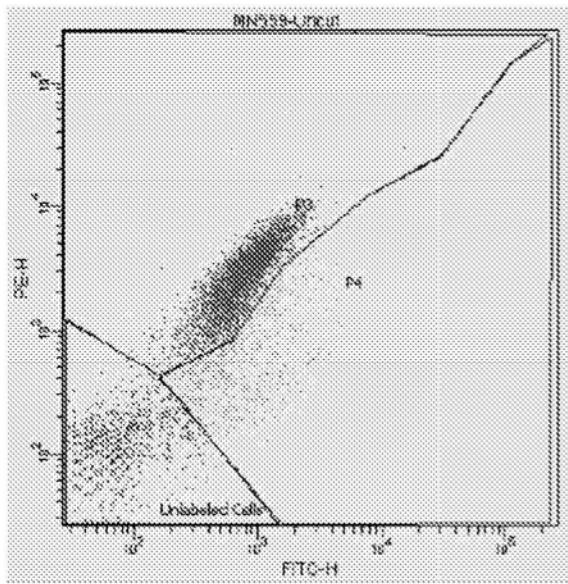
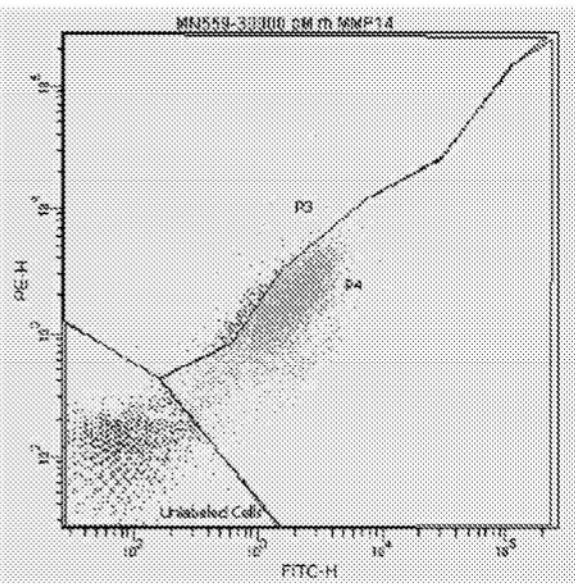
仅 HCM

图 6B

30 nM MMP14

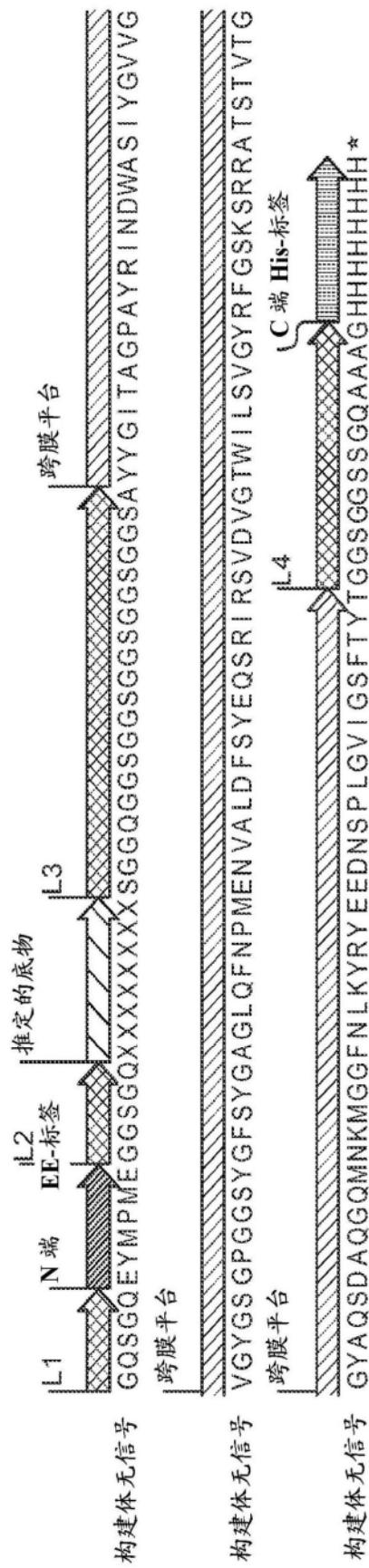


图7A

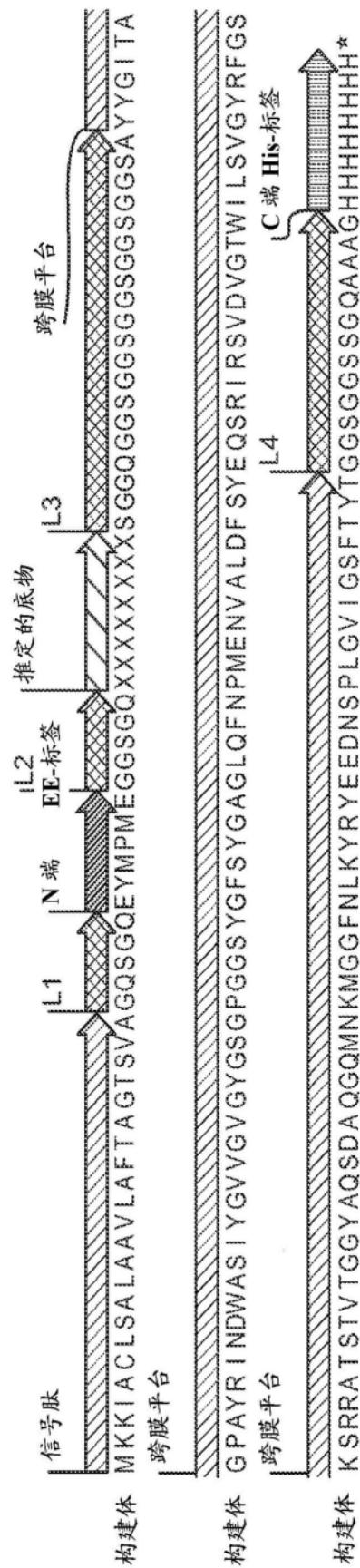


图7B