(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111212853 A
(43)申请公布日 2020.05.29

(21)申请号 201880066681.8

(22)申请日 2018.08.30

(30)优先权数据
62/552,345 2017.08.30 US
62/553,098 2017.08.31 US
62/554,919 2017.09.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/048965 2018.08.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/046652 EN 2019.03.07

(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 L·卡曼 R·汉弗莱 W·M·卡瓦诺 J.特雷特 A·Y·威维 M·威尔

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
代理人 郗名悦 刘文娜

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 47/65(2006.01)

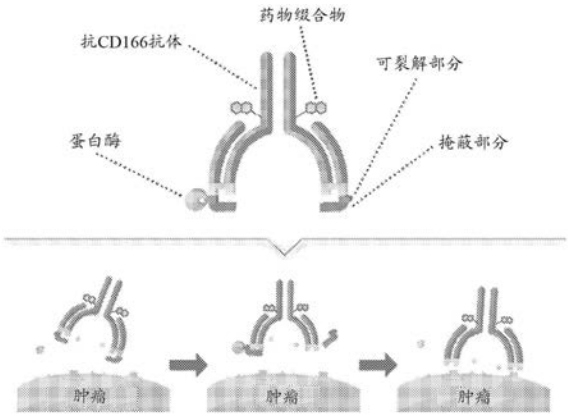
权利要求书5页 说明书83页
序列表57页 附图11页

(54)发明名称

可活化的抗CD166抗体及其使用方法

(57)摘要

本文提供了特异性地结合至CD166的可活化抗体和特异性地结合至CD166的缀合的可活化抗体。还提供了在各种治疗、诊断和预防适应症中制备和使用这些可活化抗体的方法。



CN 111212853 A

1.一种治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含：

a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；

b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及

c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

2.如权利要求1所述的方法，其中所述癌症是乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

3.一种抑制或减少受试者中表达CD166的细胞的生长、增殖或转移的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含：

a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；

b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及

c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

4.如权利要求3所述的方法，其中所述受试者患有乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

5.如权利要求3所述的方法，其中所述细胞是乳腺细胞、前列腺细胞、子宫内膜细胞、卵巢细胞、头部或颈部鳞状细胞、胆管细胞或肺细胞。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中所述剂是美登木素生物碱或其衍生物。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法，其中所述剂是DM4。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法，其中所述DM4经由接头缀合至所述AA。

9.如权利要求8所述的方法，其中所述接头包含SPBD部分。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法，其中所述AB连接至所述CM。

11.如权利要求1-10中任一项所述的方法，其中所述MM连接至所述CM，以使得所述处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

12.如权利要求1-11中任一项所述的方法，其中所述AA包含在所述MM与所述CM之间的连接肽。

13.如权利要求1-12中任一项所述的方法，其中所述AA包含在所述CM与所述AB之间的连接肽。

14.如权利要求12所述的方法，其中连接肽包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列。

15.如权利要求1-14中任一项所述的方法，其中所述AA包含在所述CM与所述AB之间的连接肽。

16.如任一权利要求15所述的方法，其中连接肽包含15的氨基酸序列。

17.如权利要求1-16中任一项所述的方法，其中所述AA包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2)，并且其中所述处于所述未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排

列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。

18.如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述轻链在其N-末端连接至间隔区。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列。

20.如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述MM和所述CM连接至所述轻链。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述MM连接至所述CM,以使得所述处于未裂解状态的AA在其轻链上从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:间隔区-MM-LP1-CM-LP2-轻链。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列,LP1包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列,并且LP2包含GGS的氨基酸序列。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述AA的轻链包含SEQ ID NO:314的序列。

24.如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述AA的轻链包含SEQ ID NO:246的序列。

25.如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述受试者是至少18岁。

26.如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述受试者具有0-1的ECOG体能状态。

27.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述受试者具有活动性转移性癌症的组织学上确认的诊断。

28.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述受试者具有局部晚期不可切除的实体瘤的组织学上确认的诊断。

29.如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述受试者在施用时具有至少3个月的预期寿命。

30.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有乳腺癌。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述乳腺癌是ER+。

32.如权利要求30-31中任一项所述的方法,并且已经接受了先前的抗激素疗法并且经历了疾病进展。

33.如实权利要求30所述的方法,其中所述受试者患有三阴性乳腺癌并且已经经历了至少两种先前线疗法。

34.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有去势抵抗性前列腺癌。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种先前疗法。

36.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有胆管癌。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述受试者已经在含吉西他滨方案的至少一个先前线中失败。

38.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有子宫内膜癌。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种用于子宫外或晚期疾病的含铂方案。

40.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有上皮性卵巢癌。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有铂耐药性癌。

42.如权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有铂难治性卵巢癌。

43.如权利要求40所述的方法,其中所述受试者具有BRCA突变并且是PARP抑制剂难治性的或在其它方面不适合用PARP抑制剂。

44.如权利要求40所述的方法,其中所述受试者具有非BRCA突变。

45.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有头颈部小细胞癌(HNSCC)。

46.如权利要求45所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种含铂方案。

47.如权利要求45所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种PD-1/PD-L1抑制剂。

48.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC)。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种含铂方案。

50.如权利要求48所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种检查点抑制剂。

51.如权利要求48所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种PD-1/PD-L1抑制剂。

52.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约0.25mg/kg至约6mg/kg的剂量施用所述缀合至剂的AA。

53.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约0.25mg/kg。

54.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约0.5mg/kg。

55.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约1mg/kg。

56.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约2mg/kg。

57.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约4mg/kg。

58.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约5mg/kg。

59.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约6mg/kg。

60.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约0.25mg/kg至0.5mg/kg。

61.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约0.5mg/kg至1mg/kg。

62.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约1mg/kg至2mg/kg。

63.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约2mg/kg至4mg/kg。

64.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约4mg/kg至5mg/kg。

65.如权利要求52所述的方法,其中所述剂量是约5mg/kg至6mg/kg。

66.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约10mg至约200mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

67.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约25mg至约500mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

68.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约10mg至约25mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

69.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约20mg至约50mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

70.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约30mg至约75mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

71.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中向所述受试者以约40mg至约100mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

72.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约50mg至约125mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

73.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约60mg至约150mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

74.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约80mg至约200mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

75.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约100mg至约250mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

76.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约120mg至约300mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

77.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约140mg至约350mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

78.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约160mg至约400mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

79.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约180mg至约450mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

80.如权利要求1-51中任一项所述的方法，其中向所述受试者以约200mg至约500mg的固定剂量施用所述缀合至剂的AA。

81.如权利要求1-80中任一项所述的方法，其中向所述受试者静脉内施用所述缀合至剂的AA。

82.如权利要求1-81中任一项所述的方法，其中每21天向所述受试者静脉内施用所述缀合至剂的AA。

83.如权利要求52-65、81和82中任一项所述的方法，其中向所述受试者以基于所述受试者的实际体重的剂量施用所述缀合至剂的AA。

84.如权利要求52-65、81和82中任一项所述的方法，其中向所述受试者以基于所述受试者的经调整的理想体重的剂量施用所述缀合至剂的AA。

85.一种用于治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含：

a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；

b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及

c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列；并且

其中AA以治疗有效量施用至有需要的受试者。

86.一种用于抑制或减少受试者中表达CD166的细胞的生长、增殖或转移以治疗癌症的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含：

a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；

b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及

c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;并且

其中所述AA以治疗有效量施用至有需要的受试者。

可活化的抗CD166抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年8月30日提交的美国临时申请号62/552,345、2017年8月31日提交的美国临时申请号62/553,098以及2017年9月6日提交的美国临时申请号62/554,919的权益,所述临时申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 对序列表的引用

[0004] 根据美国法典第37篇第1.821条经由EFS-Web以计算机可读形式(CFR)与此同时以电子方式提交的呈文件名称“CYTM054004WO_30AUG2018_FINAL_ST25.txt”的“序列表”以引用的方式并入本文。序列表的电子副本创建于2018年8月30日,并且在磁盘上的大小为49千字节。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及施用用于治疗癌症的抗CD166缀合的可活化抗体的特定给药方案。

背景技术

[0006] 已经证明基于抗体的疗法是对包括癌症的若干疾病的有效治疗,但是在一些情况下,由于广泛靶标表达所致的毒性限制了它们的治疗有效性。此外,基于抗体的治疗剂表现出其它局限性,如施用后从循环中迅速清除。

[0007] 在小分子治疗剂领域,已经开发了策略来提供活性化学实体的前药。此类前药以相对无活性(或活性显著较低)的形式施用。一旦施用,前药就在体内代谢为活性化合物。此类前药策略可提供药物对其预期靶标的选择性增加且副作用减少。

[0008] 因此,在基于抗体的治疗剂领域中持续需要模拟小分子前药的期望特性的抗体。

发明内容

[0009] 在本发明的一个方面,本文提供了一种治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA),其中所述AA包含(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;(b)偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及(c)偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述轻链包含SEQ ID NO:314的序列;在一些实施方案中,所述轻链包含SEQ ID NO:246的序列。在一些实施方案中,所述癌症是乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0010] 在本发明的一个相关方面,本文提供了一种抑制或减少受试者中表达CD166的细

胞的生长、增殖或转移的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；(b)偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及(c)偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:314的序列；在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:246的序列。

[0011] 在本发明的另一个相关方面，本文提供了一种用于治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的可活化的抗体(AA)，所述可活化抗体缀合至剂，其中所述AA包含(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；(b)偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及(c)偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:314的序列；在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:246的序列。在一些实施方案中，所述癌症是乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。所述AA以治疗有效量施用至所述受试者。

[0012] 在本发明的又一个相关方面，本文提供了一种用于抑制或减少受试者中表达CD166的细胞的生长、增殖或转移以治疗癌症的缀合至剂的可活化抗体(AA)，其中所述AA包含(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链；(b)偶联至所述AB的掩蔽部分(MM)，其中当所述AA处于未裂解状态时，所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合，其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列；以及(c)偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽，并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:314的序列；在一些实施方案中，所述轻链包含SEQ ID NO:246的序列。所述AA以治疗有效量施用至有需要的受试者。

[0013] 在一些实施方案中，所述受试者患有乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。在一些实施方案中，所述细胞是乳腺细胞、前列腺细胞、子宫内膜细胞、卵巢细胞、头部或颈部鳞状细胞、胆管细胞或肺细胞。

[0014] 在一些实施方案中，缀合至所述AA的剂是美登木素生物碱或其衍生物；例如，与所述AA缀合的剂是DM4；在一些实施方案中，所述DM4经由接头缀合至所述AA；在一些实施方案中，所述接头包含SPBD(N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)部分。

[0015] 在一些实施方案中，所述AB例如经由连接肽连接至所述CM。在一些实施方案中，所述MM连接至所述CM，以使得处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中，所述AA包含在所述MM与所述CM之间的连接肽；例

如,所述连接肽可包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述AA包含在所述CM与所述AB之间的连接肽;例如,所述连接肽包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述AA包含在所述CM与所述AB之间的连接肽;例如,所述连接肽包含GGS的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述AA包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且其中所述处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。

[0017] 在一些实施方案中,所述轻链在其N-末端连接至间隔区;在一些实施方案中,所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列;在一些实施方案中,所述MM和CM连接至所述轻链;在一些实施方案中,所述MM连接至所述CM,以使得所述处于未裂解状态的AA在其轻链上从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:间隔区-MM-LP1-CM-LP2-轻链;在一些实施方案中,所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列,LP1包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列,并且LP2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述轻链在其N-末端连接至间隔区;在一些实施方案中,所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列;在一些实施方案中,所述MM和CM连接至所述轻链;在一些实施方案中,所述MM连接至所述CM,以使得所述处于未裂解状态的AA在其轻链上从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:间隔区-MM-LP1-CM-LP2-轻链;在一些实施方案中,所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列,LP1包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列,并且LP2包含GGS的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述受试者为至少18岁;在一些实施方案中,所述受试者具有0-1的ECOG体能状态;在一些实施方案中,所述受试者具有活动性转移性癌症的组织学上确认的诊断;在一些实施方案中,所述受试者具有局部晚期不可切除的实体瘤的组织学上确认的诊断;在一些实施方案中,所述受试者在施用时具有大于3个月的预期寿命。

[0019] 在一些实施方案中,所述受试者患有乳腺癌;在一些实施方案中,所述乳腺癌是ER+;在一些实施方案中,所述受试者已经接受了先前抗激素疗法并且经历了疾病进展;在另一个实施方案中,所述受试者患有三阴性乳腺癌并且已经进行了至少两种先前线疗法。

[0020] 在一些实施方案中,所述受试者患有去势抵抗性前列腺癌,在一些实施方案中,所述受试者已经接受了至少一种先前疗法。

[0021] 在一些实施方案中,所述受试者患有胆管癌。在一些实施方案中,所述受试者已经在含吉西他滨方案的至少一个先前线中失败。

[0022] 在一些实施方案中,所述受试者患有子宫内膜癌;在一些实施方案中,所述受试者已经接受了用于子宫外或晚期疾病的至少一种含铂方案。

[0023] 在一些实施方案中,所述受试者患有上皮性卵巢癌。在一些实施方案中,所述受试者患有铂耐药性癌;在一些实施方案中,所述受试者患有铂难治性卵巢癌;在一些实施方案中,所述受试者具有BRCA突变并且是PARP抑制剂难治性的。在其它实施方案中,所述受试者具有非BRCA突变。

[0024] 在一些实施方案中,所述受试者患有头颈部小细胞癌(HNSCC);在一些实施方案中,所述受试者已经接受了多于一种含铂方案;在一些实施方案中,所述受试者已经接受了多于一种PD-1/PD-L1抑制剂。

[0025] 在一些实施方案中,所述受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC),在一些实施方案中,

所述受试者已经接受了至少一种含铂方案;在一些实施方案中,所述受试者已经接受了至少一种PD-1/PD-L1抑制剂。在一些实施方案中,所述受试者已经接受了至少一种检查点抑制剂。

[0026] 在一些实施方案中,向所述受试者以约0.25mg/kg至约6mg/kg的剂量施用缀合至剂的AA;例如,所施用的剂量是约0.25mg/kg;所施用的剂量是约0.5mg/kg;所施用的剂量是约1mg/kg;所施用的剂量是约2mg/kg;所施用的剂量是约4mg/kg;所施用的剂量是约5mg/kg;所施用的剂量是约6mg/kg。

[0027] 在一些实施方案中,向所述受试者以约0.25mg/kg至约6mg/kg的剂量施用缀合至剂的AA;例如,所施用的剂量是约0.25mg/kg至约0.5mg/kg;所施用的剂量是约0.5mg/kg至约1mg/kg;所施用的剂量是约1mg/kg至约2mg/kg;所施用的剂量是约2mg/kg至约4mg/kg;所施用的剂量是约4mg/kg至约5mg/kg;所施用的剂量是约5mg/kg至约6mg/kg。

[0028] 在一些实施方案中,向所述受试者以约10mg至约200mg的固定剂量或以约25mg至约500mg的固定剂量施用缀合至剂的AA;例如,所施用的固定剂量是约10mg至约25mg;所施用的固定剂量是约20mg至约50mg;所施用的固定剂量是约30mg至约75mg;所施用的固定剂量是约40mg至约100mg;所施用的固定剂量是约50mg至约125mg;所施用的固定剂量是约60mg至约150mg;所施用的固定剂量是约80mg至约200mg;所施用的固定剂量是约100mg至约250mg;所施用的固定剂量是约120mg至约300mg;所施用的固定剂量是约140mg至约350mg;所施用的固定剂量是约160mg至约400mg;所施用的固定剂量是约180mg至约450mg;所施用的固定剂量是约200mg至约500mg。

[0029] 在一些实施方案中,向所述受试者静脉内施用缀合至剂的AA;在一些实施方案中,每21天向所述受试者静脉内施用缀合至剂的AA。

[0030] 在一些实施方案中,向所述受试者以基于所述受试者的实际体重的剂量施用缀合至剂的AA。在一些实施方案中,向所述受试者以基于所述受试者的经调整的理想体重的剂量施用缀合至剂的AA。

附图说明

[0031] 图1描绘在存在肿瘤特异性蛋白酶的肿瘤微环境中优先活化的可活化的抗CD166抗体药物缀合物。

[0032] 图2通过免疫组织化学(IHC)展示人肿瘤样品中CD166的表达。

[0033] 图3示出在TNBC的小鼠肿瘤模型中可活化的抗CD166抗体药物缀合物和抗CD166抗体药物缀合物的抗肿瘤活性。还示出通过免疫组织化学(IHC)得到的CD166表达。(AADC＝可活化的抗CD166抗体药物缀合物;ADC＝抗CD166药物缀合物)

[0034] 图4示出在非小细胞肺癌的小鼠肿瘤模型中可活化的抗CD166抗体药物缀合物和抗CD166抗体药物缀合物的抗肿瘤活性。还示出通过IHC得到的CD166表达。

[0035] 图5示出在卵巢癌的小鼠患者来源的异种移植物(PDX)模型中可活化的抗CD166抗体药物缀合物和抗CD166抗体药物缀合物的抗肿瘤活性。还示出通过IHC得到的CD166表达。

[0036] 图6示出可活化的抗CD166抗体药物缀合物的A部分和B部分临床试验设计。

[0037] 图7A-7B展示肿瘤中可活化的抗CD166抗体的优先活化。

[0038] 图8A-8B展示部分地通过蛋白裂解酶(MT-SP1)或MMP14活化的可活化的抗CD166抗

体缀合物的完整形式和活化形式的分离。

[0039] 图9A-9E示出在人受试者中在施用可活化的抗CD166抗体药物缀合物后各种分析物的血清水平随时间推移的示例性药代动力学数据。

具体实施方式

[0040] 本发明提供了特异性地结合CD166(也称为活化的白细胞粘附分子(ALCAM))的可活化的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述可活化的单克隆抗体被含有CD166的细胞内化。CD166是结合CD6的细胞粘附分子,CD6是属于清除受体富含半胱氨酸(SRCR)的蛋白质超家族(SRCRSF)的细胞表面受体。已知CD166与细胞-细胞和细胞-基质相互作、细胞粘附、细胞迁移以及T细胞活化和增殖相关。CD166的异常表达和/或活性以及CD166相关的信号传导一直牵涉于许多疾病和病症(如癌症、炎症和自身免疫)的发病机制中。例如,CD166在多种癌症类型(例如像前列腺癌、乳腺癌、肺癌如NSCLC和/或SCLC、口咽癌、子宫颈癌以及头颈癌如HNSCC)中高度表达。

[0041] 本公开提供了可活化的抗CD166抗体,所述可活化的抗CD166抗体可用于治疗、预防与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症、延缓所述疾病或病症的进展、改善和/或减轻所述疾病或病症的症状的方法中。例如,所述可活化的抗CD166抗体用于治疗、预防癌症或其它赘生性疾患、延缓癌症或其它赘生性疾患的进展、改善和/或减轻癌症或其它赘生性疾患的症状的方法中。

[0042] 本公开提供了可活化的抗CD166抗体,所述可活化的抗CD166抗体可用于治疗、预防与表达CD166的细胞相关的疾病或病症、延缓所述疾病或病症的进展、改善和/或减轻所述疾病或病症的症状的方法中。在一些实施方案中,所述细胞与异常CD166表达和/或活性相关。在一些实施方案中,所述细胞与正常CD166表达和/或活性相关。例如,所述可活化的抗CD166抗体用于治疗、预防癌症或其它赘生性疾患、延缓癌症或其它赘生性疾患的进展、改善和/或减轻癌症或其它赘生性疾患的症状的方法中。

[0043] 本公开提供了可活化的抗CD166抗体,所述可活化的抗CD166抗体可用于治疗、预防其中患病细胞表达CD166的疾病或病症、延缓所述疾病或病症的进展、改善和/或减轻所述疾病或病症的症状的方法中。在一些实施方案中,所述患病细胞与异常CD166表达和/或活性相关。在一些实施方案中,所述患病细胞与正常CD166表达和/或活性相关。例如,所述可活化的抗CD166抗体用于治疗、预防癌症或其它赘生性疾患、延缓癌症或其它赘生性疾患的进展、改善和/或减轻癌症或其它赘生性疾患的症状的方法中。

[0044] 所述可活化的抗CD166抗体包括特异性地结合偶联至掩蔽部分(MM)的CD166的抗体或其抗原结合片段,以使得所述MM的偶联降低所述抗体或其抗原结合片段结合CD166的能力。所述MM经由包含蛋白酶例如与CD166共定位在受试者的治疗部位的蛋白酶的底物(可裂解部分,CM)的序列偶联至所述抗体/抗原结合片段。

[0045] 定义

[0046] 除非另外定义,否则与本公开结合使用的科学和技术术语将具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。术语“一个/种(a或an)”实体是指一个/种或多个/种所述实体。例如,一种化合物是指一种或多种化合物。因此,术语“一个/种(a/an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。另外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包

括复数并且复数术语应包括单数。总体而言，与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学及杂交结合使用的命名法和它们的技术是本领域中众所周知并且常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如，电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术是根据制造商的说明书或如本领域中通常所实现或如本文所述来进行。前述技术和程序通常根据本领域中熟知的常规方法和如在贯穿本说明书所引用且论述的各种一般和更具体的参考文献中所述来进行。参见例如，Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。结合本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的术语以及它们的实验室方法和技术是本领域中熟知且常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及受试者的治疗。

[0047] 如根据本公开所用，除非另外指示，否则以下术语应理解成具有以下含义：

[0048] 如本文所用，术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性(例如，抗原结合)蛋白质，即含有特异性地结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性地结合”或“与……免疫反应”或“免疫特异性地结合”意指抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应并且不与其它多肽反应或以低得多的亲和力结合($K_d>10^{-6}$)。抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、结构域抗体、单链抗体、Fab和$F(ab')_2$片段、scFv以及Fab表达文库。

[0049] 已知基础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，每一对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基-末端部分包含主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基-末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。一般来说，从人获得的抗体分子与类别IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种有关，它们因所述分子中存在的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有子类别，如IgG_1、IgG_2等。此外，在人中，轻链可以是κ链或λ链。

[0050] 如本文所用，术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指仅含有由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成的抗体分子的一种分子种类的抗体分子的群体。特别地，单克隆抗体的互补决定区(CDR)在所述群体的所有分子中是相同的。MAb含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点，所述表位的特征在于针对所述抗原结合位点的独特结合亲和力。

[0051] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N-末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区内的三个高度趋异性区段(称为“高变区”)插置在称为“框架区”或“FR”的更保守的侧翼区段之间。因此，术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间并与免疫球蛋白中的高变区相邻的氨基酸序列。在抗体分子中，轻链的三个高变区和重链的三个高变区相对于彼此安置于三维空间中以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补，并且重链和轻链各自的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。根据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等人Nature 342:878-883(1989)的定义将氨基酸分配至各结构域。

[0052] 如本文所用，术语“表位”包括能够特异性地结合至免疫球蛋白、scFv或T细胞受体

的任何多肽决定簇。术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面组群(诸如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。例如,可产生针对多肽的N-末端或C-末端肽的抗体。当解离常数≤1μM;在一些实施方案中,≤100nM并且在一些实施方案中≤10nM时,抗体被说成特异性地结合抗原。

[0053] 如本文所用,术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指在免疫球蛋白分子与所述免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可用相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的K_d代表较大的亲和力。可使用本领域中熟知的方法来定量选定多肽的免疫结合性质。一种这种方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等地影响速率的几何参数。因此,可通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率来确定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})。(参见Nature 361:186-87(1993))。K_{off}/K_{on}的比率能够取消与亲和力无关的所有参数,并且等于解离常数K_d。(总体上参见,Davies等人(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。如通过诸如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定的测定所测量的,当结合常数(K_d)为≤1μM,在一些实施方案中≤100nM,在一些实施方案中≤10nM,并且在一些实施方案中≤100pM至约1pM时,本公开的抗体被说成特异性地结合至靶标。

[0054] 如本文所用的术语“分离的多核苷酸”将意指基因组、cDNA或合成来源或它们的某一组合的多核苷酸,所述“分离的多核苷酸”根据其来源(1)不与“分离的多核苷酸”见于自然界中所处的多核苷酸的全部或一部分缔合,(2)可操作地连接至其在自然界中不连接的多核苷酸,或(3)不作为较大序列的一部分存在于自然界中。根据本公开的多核苷酸包含编码本文所示的重链免疫球蛋白分子的核酸分子,以及编码本文所示的轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0055] 本文提及的术语“分离的蛋白质”是指cDNA、重组RNA或合成来源或它们的某一组合的蛋白质;所述“分离的蛋白质”根据其来源或衍生来源(1)不与在自然界中所见的蛋白质缔合,(2)不含来自相同来源的其它蛋白质,例如不含鼠类蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)不存在于自然界中。

[0056] 术语“多肽”在本文中用作通用术语,是指多肽序列的天然蛋白质、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。根据本发明的多肽包含本文所示的重链免疫球蛋白分子和本文所示的轻链免疫球蛋白分子,以及通过包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子的组合形成的抗体分子,如κ轻链免疫球蛋白分子,反之亦然,以及它们的片段和类似物。

[0057] 如本文所用的术语“天然存在的”当应用于对象时是指对象可见于自然界中的事实。例如,可从自然中的来源分离并且不通过人在实验室中有意修饰的存在于生物体(包括病毒)中或另外天然存在的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0058] 如本文所用的术语“可操作地连接”是指所描述的组分的位置处于允许它们以其预期的方式起作用的关系。“可操作地连接”至编码序列的控制序列是以使得在与控制序列相容的条件下达成编码序列的表达的方式连接。

[0059] 如本文所用的术语“控制序列”是指实现它们所连接的编码序列的表达和加工所

必需的多核苷酸序列。此类控制序列的性质取决于宿主生物体而不同;在原核生物中,此类控制序列一般包含启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,此类控制序列一般包含启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意图至少包括其存在对于表达和加工而言必需的所有组分,并且还可包括其存在有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。如本文提及的术语“多核苷酸”是指长度为至少10个碱基的核苷酸,是核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或者是任类型的核苷酸的修饰形式。所述术语包括DNA的单链和双链形式。

[0060] 本文提及的术语寡核苷酸包括通过天然存在的和非天然存在的寡核苷酸键联连接在一起的天然存在的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是通常包含200个碱基或更少碱基的长度的多核苷酸亚群。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是10至60个碱基,并且在一些实施方案中,长度是12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基。寡核苷酸通常是单链的,例如用于探针,但是寡核苷酸可以是双链的,例如用于构建基因突变体。本公开的寡核苷酸是有义或反义寡核苷酸。

[0061] 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的核苷酸等。本文提及的术语“寡核苷酸键联”包括诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯以及氨基磷酸酯等的寡核苷酸键联。参见例如,LaPlanche等人Nucl.Acids Res.14:9081(1986);Stec等人J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984);Stein等人Nucl.Acids Res.16:3209(1988);Zon等人Anti Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon等人Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,第87-108页(F.Eckstein,编辑,Oxford University Press,Oxford England(1991));Stec等人美国专利号5,151,510;Uhlmann和Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)。如果需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0062] 如本文所用,20种常规氨基酸以及它们的缩写遵循常规用法。参见Immunology-A Synthesis(第2版,E.S.Golub和D.R.Green,编辑,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991))。20种常规氨基酸的立体异构体(例如D-氨基酸)、非天然氨基酸(如α-,α-二取代的氨基酸)、N-烷基氨基酸、乳酸以及其它非常规氨基酸也可以是本公开多肽的适合组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟基脯氨酸、γ-羧基谷氨酸、ε-N,N,N-三甲基赖氨酸、ε-N-乙酰赖氨酸、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-甲基精氨酸以及其它类似氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟基脯氨酸)。在本文所用的多肽记法中,根据标准用法和惯例,左手方向是氨基末端方向,并且右手方向是羧基末端方向。

[0063] 类似地,除非另外指定,否则单链多核苷酸序列的左手端是5’端;双链多核苷酸序列的左手方向被称为5’方向。5’至3’添加初生RNA转录物的方向被称为转录方向;在具有与RNA相同的序列的DNA链上并且是5’至RNA转录物的5’端的序列区域被称为“上游序列”;在具有与RNA相同的序列的DNA链上并且是3’至RNA转录物的3’端的序列区域被称为“下游序列”。

[0064] 在应用于多肽时,术语“实质同一性”意指当诸如通过使用默认空位隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个肽序列共享至少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%序列同一性并且在一些实施方案中至少99%序列同一性。

[0065] 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。

[0066] 如本文所论述，抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列中的微小变化被认为涵盖在本公开中，条件是氨基酸序列中的变化保持至少75％，在一些实施方案中，至少80％、90％、95％，在一些实施方案中99％。特别地，考虑保守性氨基酸置换。保守性置换是在它们的侧链中相关的氨基酸的家族内发生的那些置换。遗传编码的氨基酸通常分成以下家族：(1)酸性氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸；(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；以及(4)不带电荷的极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸以及苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、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、酪氨酸以及缬氨酸。其它氨基酸家族包括(i)丝氨酸和苏氨酸，它们是脂肪族-羟基家族；(ii)天冬酰胺和谷氨酰胺，它们是含有酰胺的家族；(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，它们是脂族家族；和(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸，它们是芳香族家族。例如，合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸分离置换天冬氨酸、用丝氨酸分离置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换氨基酸将不会对所得分子的结合或性质具有重大影响，特别是在置换不涉及框架位点内的氨基酸的情况下。氨基酸改变是否产生功能性肽可通过测定多肽衍生物的特异性活性容易地确定。测定在本文中详细描述。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域的普通技术人员容易地制备。片段或类似物的适合的氨基和羧基末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开或专有序列数据库进行比较来鉴定结构性和功能性结构域。在一些实施方案中，计算机化的比较方法用于鉴定在具有已知结构和/或功能的其它蛋白质中出现的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。用于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等人Science 253:164(1991)。因此，前述实例证明，根据本公开，本领域的技术人员可识别可用于定义结构性和功能性结构域的序列基序和结构构象。

[0067] 适合的氨基酸取代是以下的那些：(1)降低对蛋白水解的敏感性，(2)降低对氧化的敏感性，(3)改变用于形成蛋白质复合物的结合亲和力，(4)改变结合亲和力，以及(5)赋予或改变此类类似物的其它物理化学或功能性质。类似物可包括除天然存在的肽序列以外的序列的各种突变蛋白。例如，单个或多个氨基酸取代(例如保守性氨基酸取代)可在天然存在的序列中进行(例如，在形成分子间接触的结构域外部的多肽部分中进行)。保守性氨基酸取代不应实质上改变亲本序列的结构特征(例如，置换氨基酸不应倾向于打断亲本序列中存在的螺旋，或破坏表征亲本序列的其它类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例在Proteins,Structures and Molecular Principles(Creighton编辑,W.H.Freeman and Company,New York(1984))；Introduction至Protein Structure(C.Branden和J.Tooze编辑,Garland Publishing,New York,N.Y.(1991))；以及Thornton等人,Nature 354:105(1991)中描述。

[0068] 如本文所用的术语“多肽片段”是指具有氨基末端和/或羧基末端缺失和/或一个或多个内部缺失、但是其中剩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中的相应位置相同的多肽。片段通常是至少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，并且在一些

实施方案中至少70个氨基酸长。如本文所用的术语“类似物”是指由至少25个氨基酸的区段组成的多肽，所述区段与推导的氨基酸序列的一部分具有实质同一性并且在适合的结合条件下与靶标具有特异性结合。通常，多肽类似物相对于天然存在的序列包含保守性氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物通常是至少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，并且经常可与全长天然存在的多肽一样长。

[0069] 术语“剂”在本文中用于表示化合物、化合物的混合物、生物大分子或从生物材料制得的提取物。

[0070] 如本文所用，术语“标记”或“标记的”是指并入可检测的标记物，例如通过并入放射性标记的氨基酸或附接至具有可通过标记的抗生物素蛋白(例如含有可通过光学方法或比色方法检测的荧光标记物或酶促活性的链霉抗生物素蛋白)检测的生物素基部分的多肽。在某些情形下，标记或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域中已知的并且可使用。用于多肽的标记的实例包括但不限于以下：放射性同位素或放射性核素(例如，^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I)、荧光标记(例如，FITC、若丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(例如，辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光基团、生物素基团、由二级报告分子识别的预定多肽表位(例如，亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中，标记通过各种长度的间隔臂附接以降低潜在位阻。如本文所用的术语“药物剂或药物”是指当适当施用于受试者时能够诱导所需治疗作用的化合物或组合物。

[0071] 本文中的其它化学术语根据本领域中的常规用法使用，如由The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker,S.,编辑,McGraw-Hill,San Francisco(1985))所例示。

[0072] 如本文所用，“基本上纯的”意指目标种类是存在的占优势种类(即，在摩尔基础上它比所述组合物中的任何其它单独种类更丰富)，并且在一些实施方案中，基本上纯化的级分是其中目标种类占存在的所有大分子种类的至少约50％(在摩尔基础上)的组合物。

[0073] 一般而言，基本上纯的组合物将包含组合物中存在的所有大分子物种的大于约80％，更优选大于约85％、90％、95％和99％。在一些实施方案中，目标种类被纯化至必要的均质性(通过常规的检测方法不能在所述组合物中检测到污染物种类)，其中所述组合物主要由单一大分子种类组成。

[0074] 术语受试者包括人和兽类受试者。

[0075] 可活化抗体(AA)

[0076] 本公开提供了包含特异性地结合哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)的AA。

[0077] 在一些实施方案中，所述哺乳动物CD166选自由人CD166和食蟹猴CD166组成的组。在一些实施方案中，所述AB以小于1nM的解离常数特异性地结合至人CD166或食蟹猴CD166。在一些实施方案中，所述哺乳动物CD166是人CD166。在一些实施方案中，所述哺乳动物CD166是食蟹猴CD166。在一些实施方案中，所述AB具有以下特征中的一种或多种：(a)所述AB特异性地结合至人CD166；以及(b)所述AB特异性地结合至人CD166和食蟹猴CD166。在一些实施方案中，所述AB具有以下特征中的一种或多种：(a)所述AB特异性地结合人CD166和食蟹猴CD166；(b)所述AB抑制哺乳动物CD6与哺乳动物CD166的结合；(c)所述AB抑制人CD6

与人CD166的结合;以及(d)所述AB抑制食蟹猴CD6与食蟹猴CD166的结合。

[0078] 在一些实施方案中,所述AB以小于或等于5nM、小于或等于10nM、小于或等于50nM、小于或等于100nM、小于或等于500nM和/或小于或等于1000nM的EC 50阻断天然配体或受体结合至哺乳动物CD166的能力。在一些实施方案中,所述AB以小于或等于5nM、小于或等于10nM、小于或等于50nM、小于或等于100nM、小于或等于500nM和/或小于或等于1000nM的EC 50阻断哺乳动物CD6结合至哺乳动物CD166的能力。在一些实施方案中,CD166的天然配体或受体是CD6。

[0079] 在一些实施方案中,所述AB以5nM至1000nM、5nM至500nM、5nM至100nM、5nM至50nM、5nM至10nM、10nM至1000nM、10nM至500nM、10nM至100nM、10nM至50nM、50nM至1000nM、50nM至500nM、50nM至100nM、100nM至1000nM、100nM至500nM、150nM至400nM、200nM至300nM、500nM至1000nM的EC50阻断天然配体结合至哺乳动物CD166的能力。在一些实施方案中,所述AB以5nM至1000nM、5nM至500nM、5nM至100nM、5nM至50nM、5nM至10nM、10nM至1000nM、10nM至500nM、10nM至100nM、10nM至50nM、15nM至75nM、30nM至80nM、40nM至150nM、50nM至1000nM、50nM至500nM、50nM至100nM、100nM至1000nM、100nM至500nM、150nM至400nM、200nM至300nM、500nM至1000nM的EC50阻断哺乳动物CD6结合至哺乳动物CD166的能力。在一些实施方案中,CD166的天然配体或受体是CD6。

[0080] 在一些实施方案中,本公开的AB抑制或减少表达哺乳动物CD166的细胞的生长、增殖和/或转移。不意图受任何理论束缚,本公开的AB可通过特异性地结合至CD166并且抑制、阻断和/或阻止天然配体或受体与哺乳动物CD166的结合来抑制或减少表达哺乳动物CD166的细胞的生长、增殖和/或转移。在一些实施方案中,哺乳动物CD166的天然配体或受体是哺乳动物CD6。

[0081] 所述AA的抗体或其抗原结合片段偶联至掩蔽部分(MM),以使得所述MM的偶联降低所述抗体或其抗原结合片段结合CD166的能力。在一些实施方案中,所述MM经由包括蛋白酶的底物的序列偶联,所述蛋白酶例如在患病组织中有活性的蛋白酶和/或与CD166共定位在受试者的治疗部位的蛋白酶。本文提供的可活化的抗CD166抗体(在本文中也可互换地称为抗CD166 AA或CD166可活化抗体)在循环中稳定,在治疗和/或诊断的预期部位活化,但在正常、例如健康组织或不为治疗和/或诊断所靶向的其它组织中不活化,并且在活化时表现出与CD166的结合,所述结合至少与相应的未修饰抗体(在本文也称为亲本抗体)相当。

[0082] 本公开提供了特异性地结合哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),所述抗体或其抗原结合片段用于AA中。在一些实施方案中,所述抗体包括特异性地结合CD166的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合CD166的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、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,这种结合CD166的抗体或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0083] 因此,本文提供了可活化的抗体(AA),所述可活化的抗体包含:(1)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB);偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合;以及偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽。

[0084] 本公开的AA中的抗体(AB)特异性地结合CD166靶标,例如像哺乳动物CD166和/或

人CD166。

[0085] 在一些实施方案中，对于结合至哺乳动物CD166，所述AB具有约100nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至哺乳动物CD166，所述AB具有约10nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至CD166，所述AB具有约5nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至CD166，所述AB具有约1nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至CD166，所述AB具有约0.5nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至CD166，所述AB具有约0.1nM或更小的解离常数。在一些实施方案中，对于结合至哺乳动物CD166，所述AB具有0.01nM至100nM、0.01nM至10nM、0.01nM至5nM、0.01nM至1nM、0.01至0.5nM、0.01nm至0.1nM、0.01nm至0.05nM、0.05nM至100nM、0.05nM至10nM、0.05nM至5nM、0.05nM至1nM、0.05至0.5nM、0.05nm至0.1nM、0.1nM至100nM、0.1nM至10nM、0.1nM至5nM、0.1nM至1nM、0.1至0.5nM、0.5nM至100nM、0.5nM至10nM、0.5nM至5nM、0.5nM至1nM、1nM至100nM、1nM至10nM、1nM至5nM、5nM至100nM、5nM至10nM或10nM至100nM的解离常数。

[0086] 在一些实施方案中，处于未裂解状态的AA以小于或等于1nM、小于或等于5nM、小于或等于10nM、小于或等于15nM、小于或等于20nM、小于或等于25nM、小于或等于50nM、小于或等于100nM、小于或等于150nM、小于或等于250nM、小于或等于500nM、小于或等于750nM、小于或等于1000nM以及122./或小于或等于2000nM的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0087] 在一些实施方案中，处于未裂解状态的AA以大于或等于1nM、大于或等于5nM、大于或等于10nM、大于或等于15nM、大于或等于20nM、大于或等于25nM、大于或等于50nM、大于或等于100nM、大于或等于150nM、大于或等于250nM、大于或等于500nM、大于或等于750nM、大于或等于1000nM以及122./或大于或等于2000nM的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0088] 在一些实施方案中，处于未裂解状态的AA以在1nM至2000nM、1nM至1000nM、1nM至750nM、1nM至500nM、1nM至250nM、1nM至150nM、1nM至100nM、1nM至50nM、1nM至25nM、1nM至15nM、1nM至10nM、1nM至5nM、5nM至2000nM、5nM至1000nM、5nM至750nM、5nM至500nM、5nM至250nM、5nM至150nM、5nM至100nM、5nM至50nM、5nM至25nM、5nM至15nM、5nM至10nM、10nM至2000nM、10nM至1000nM、10nM至750nM、10nM至500nM、10nM至250nM、10nM至150nM、10nM至100nM、10nM至50nM、10nM至25nM、10nM至15nM、15nM至2000nM、15nM至1000nM、15nM至750nM、15nM至500nM、15nM至250nM、15nM至150nM、15nM至100nM、15nM至50nM、15nM至25nM、25nM至2000nM、25nM至1000nM、25nM至750nM、25nM至500nM、25nM至250nM、25nM至150nM、25nM至100nM、25nM至50nM、50nM至2000nM、50nM至1000nM、50nM至750nM、50nM至500nM、50nM至250nM、50nM至150nM、50nM至100nM、100nM至2000nM、100nM至1000nM、100nM至750nM、100nM至500nM、100nM至250nM、100nM至150nM、150nM至2000nM、150nM至1000nM、150nM至750nM、150nM至500nM、150nM至250nM、250nM至2000nM、250nM至1000nM、250nM至750nM、250nM至500nM、500nM至2000nM、500nM至1000nM、500nM至750nM、500nM至500nM、500nM至250nM、500nM至150nM、500nM至100nM、500nM至50nM、750nM至2000nM、750nM至1000nM或1000nM至2000nM范围内的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0089] 在一些实施方案中，处于活化状态的AA以小于或等于0.01nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM或10nM的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0090] 在一些实施方案中，处于活化状态的AA以大于或等于0.01nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM或10nM的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0091] 在一些实施方案中，处于活化状态的AA以在0.01nM至100nM、0.01nM至10nM、0.01nM至5nM、0.01nM至1nM、0.01至0.5nM、0.01nm至0.1nM、0.01nm至0.05nM、0.05nM至100nM、0.05nM至10nM、0.05nM至5nM、0.05nM至1nM、0.05至0.5nM、0.05nm至0.1nM、0.1nM至100nM、0.1nM至10nM、0.1nM至5nM、0.1nM至1nM、0.1至0.5nM、0.5nM至100nM、0.5nM至10nM、0.5nM至5nM、0.5nM至1nM、1nM至100nM、1nM至10nM、1nM至5nM、5nM至100nM、5nM至10nM或10nM至100nM范围内的解离常数特异性地结合至哺乳动物CD166。

[0092] 本发明的示例性可活化的抗CD166抗体包括例如包含重链和轻链的可活化抗体(AA)，所述重链和轻链包含、是或源自以下所示的重链和轻链可变氨基酸序列：

[0093]

人αCD166重链

HuCD166_HcC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
HYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGTLVT

[0094]

VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **(SEQ ID NO: 239)**

[0095]

人αCD166重链

HuCD166_HcC Des-HC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
HYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG **(SEQ ID NO: 480)**

[0096]

人aCD166轻链VL结构域

HuCD166_Lc1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **(SEQ ID NO: 240)**

[0097] 在一些实施方案中，所述AA的血清半衰期长于相应抗体的血清半衰期；例如，所述AA的pK长于相应抗体的pK。在一些实施方案中，所述AA的血清半衰期类似于相应抗体的血清半衰期。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少15天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少12天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少11天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少10天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少9天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少8天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少7天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少6天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少5天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少4天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少3天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少2天。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少24小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少20小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少18小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少16小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少14小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少12小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少10小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少8小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少6小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少4小时。在一些实施方案中，当施用至生物体时，所述AA的血清半衰期是至少3小时。

[0098] 示例性可活化抗体

[0099] 在示例性实施方案中，本公开的AA包含以下序列中的任何一个或多个：

[0100]

SEQ ID NO:239
人 αCD166 重链(HuCD166_HcC) – 氨基酸序列
(上文提供)

[0101]

SEQ ID NO:480
人 αCD166 重链(HuCD166_HcC) – Des-HC -氨基酸序列
(上文提供)

[0102]

SEQ ID NO:240
人 aCD166 轻链 VL 结构域
HuCD166_Lcl
(上文提供)

[0103]

SEQ ID NO:246 氨基酸序列
人 αCD166 轻链(间隔区-MM-LP1-CM-LP2-Ab)
[间隔区(SEQ ID NO:305)] [huCD166Lcl_7614.6_3001 (SEQ ID NO:314)]
[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLP VTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC]

[0104]

SEQ ID NO:314 氨基酸序列
人 aCD166 轻链(MM-LP1-CM-LP2-Ab)
huCD166Lcl_7614.6_3001
LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLP VTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0105]

SEQ ID NO:305 氨基酸序列
间隔区
QGQSGQG

[0106]

SEQ ID NO:222
掩蔽部分 7614.6
LCHPAVLSAWESCSS

[0107]

SEQ ID NO:76
可裂解部分 3001
AVGLLAPPGGLSGRSDNH

[0108]

SEQ ID NO:479
连接肽 1 (LP1)
GGGSSGGS

[0109]

连接肽 2 (LP2)

[0110]

GGS

[0111] 在一个示例性实施方案中,所述AA包含:(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;(b)偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及(c)偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

[0112] 在一个示例性实施方案中,所述AA包含:(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:246的氨基酸序列的轻链,并且经由spdb接头缀合至DM4(这种示例性缀合的AA在本文中称为"间隔区-7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4"),也称为"组合55"。接头毒素SPDB-DM4也称为4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯-N2'-去乙酰基-N2'-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素。

[0113] 在另一个示例性实施方案中,所述AA包含:(a)特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:314的氨基酸序列的轻链,并且经由spdb接头进一步缀合至DM4(这种示例性缀合的AA在本文中称为"7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4",也称为"组合60")。

[0114] 掩蔽部分(MM)

[0115] 本文所述的可活化的抗CD166抗体克服抗体治疗剂的局限性,特别是已知在体内至少有一定程度的毒性的抗体治疗剂。靶标介导的毒性构成开发治疗性抗体的主要限制。本文提供的可活化的抗CD166抗体被设计为解决与传统治疗性抗体在正常组织中抑制靶标相关的毒性。这些可活化的抗CD166抗体保持掩蔽,直到在疾病部位蛋白水解活化。以抗CD166抗体作为亲本治疗性抗体开始,通过经由并入蛋白酶底物的接头(CM)将抗体偶联至抑制性掩膜(掩蔽部分,MM)对本发明的可活化的抗CD166抗体进行工程改造。

[0116] 因此,本文提供的可活化的抗CD166抗体包含掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,所述MM是偶联或以其它方式附接至抗CD166抗体并且位于可活化的抗CD166抗体构建体内、以使得所述MM降低所述抗CD166抗体特异性地结合CD166的能力的氨基酸序列。使用多种已知技术中的任一种来鉴定合适的掩蔽部分。例如,使用Daugherty等人的PCT公布号WO 2009/025846中描述的方法鉴定肽掩蔽部分,所述PCT公布的内容特此以引用的方式整体并入。

[0117] 在一些实施方案中,在CD166存在下,当使用靶标置换测定,例如像PCT公布号WO 2010/081173(其内容特此以引用的方式整体并入)中描述的测定在体外测定时,与所述CM裂解时相比,当所述CM未裂解时,所述MM使所述AB结合CD166的能力降低至少90%。

[0118] 在一些实施方案中,所述MM是长度为约2至40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,所述MM是长度至多约40个氨基酸的多肽。

[0119] 在一些实施方案中,所述MM多肽序列与CD166的序列不同。在一些实施方案中,所述MM多肽序列与所述AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中,所述MM多肽序列与CD166的序列不同,并且与所述AB的任何天然结合配偶体不超过40%、30%、25%、20%、15%或10%相同。

[0120] 在一个示例性实施方案中,本文提供的AA包含MM,所述MM的氨基酸序列如下所示:

[0121]

掩蔽部分 7614.6
LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO:222)

[0122] 与未用MM修饰的AB与靶标的特异性结合或亲本AB与靶标的特异性结合相比,当用MM修饰AB且在靶标存在时,所述AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。

[0123] 用MM修饰的AB对靶标的K_d比未用MM修饰的AB或亲本AB对所述靶标的K_d大至少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5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、25-50、50-250、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、500-2,500、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、2,500-5,000、5,000-50,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、50,000-5,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000之间倍。相反,用MM修饰的AB对靶标的结合亲和力比未用MM修饰的AB或亲本AB对所述靶标的结合亲和力低至少2、3、4、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5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、25-50、50-250、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、500-2,500、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、2,500-5,000、5,000-50,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、50,000-5,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000之间倍。

[0124] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少两倍。

[0125] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少五倍。

[0126] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少10倍。

[0127] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少20倍。

[0128] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少40倍。

[0129] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少100倍。

[0130] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少1000倍。

[0131] 在一些实施方案中,所述MM与所述AB的偶联降低所述AB结合CD166的能力,以使得所述AB在偶联至所述MM时对CD166的解离常数(K_d)比所述AB未偶联至所述MM时对CD166的K_d大至少10,000倍。

[0132] 所述MM对所述AB的解离常数(K_d)通常大于所述AB对靶标的K_d。所述MM对所述AB的

K_d可比所述AB对靶标的K_d大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000倍或甚至10,000,000倍。相反，所述MM对所述AB的结合亲和力通常低于所述AB对靶标的结合亲和力。所述MM对所述AB的结合亲和力可比所述AB对靶标的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000倍或甚至10,000,000倍。

[0133] 在一些实施方案中，所述MM对所述AB的解离常数(Kd)大约等于所述AB对靶标的Kd。在一些实施方案中，所述MM对所述AB的解离常数(Kd)不超过所述AB对靶标的解离常数。

[0134] 在一些实施方案中，所述MM对所述AB的解离常数(Kd)小于所述AB对靶标的解离常数。

[0135] 在一些实施方案中，所述MM对所述AB的解离常数(Kd)大于所述AB对靶标的解离常数。

[0136] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd不超过所述AB与靶标的结合的Kd。

[0137] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd小于所述AB与靶标的结合的Kd。

[0138] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd大约等于所述AB与靶标的结合的Kd。

[0139] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd不小于所述AB与靶标的结合的Kd。

[0140] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd大于所述AB与靶标的结合的Kd。

[0141] 在一些实施方案中，所述MM对所述AB的解离常数(K_d)比所述AB与靶标的结合的Kd大不超过2、3、4、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1-5、5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、25-50、50-250、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、25-500、500-2,500、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、2,500-5,000、5,000-50,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、50,000-5,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000之间倍。在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的Kd比所述AB与靶标的结合的Kd大1-5、2-5、2-10、5-10、5-20、5-50、5-100、10-100、10-1,000、20-100、20-1000或100-1,000之间倍。

[0142] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力小于所述AB与靶标的结合的亲和力。

[0143] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力不超过所述AB与靶标的结合的亲和力。

[0144] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力大约等于所述AB与靶标的结合的亲和力。

[0145] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力不小于所述AB与靶标的结合的亲和力。

[0146] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力大于所述AB与靶标的结合的亲和力。

[0147] 在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力比所述AB与靶标的结合的亲和力低2、3、4、5、10、25、50、100、250、500或1,000倍。在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力比所述AB与靶标的结合的亲和力低1-5、2-5、2-10、5-10、5-20、5-25、5-50、5-100、10-100、10-1,000、20-100、20-1000、25-250、50-500或100-1,000之间倍。在一些实施方案中，所述MM对结合至所述AB的亲和力比所述AB与靶标的结合的亲和力低2至20倍。在一些实施方案中，未与AB共价连接且与所述AB处于等摩尔浓度的MM不会抑制所述AB与靶标的结合。

[0148] 与未用MM修饰的AB与靶标的特异性结合或亲本AB与靶标的特异性结合相比，当用MM修饰AB且在靶标存在时，所述AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体内测量时或在体外测定中，与未用MM修饰的AB与靶标的结合或亲本AB与靶标的结合相比，当用MM修饰时所述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％以及甚至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个月或更长时间。

[0149] 所述MM抑制所述AB与靶标的结合。所述MM结合所述AB的抗原结合结构域并且抑制所述AB与靶标的结合。所述MM可在空间上抑制所述AB与靶标的结合。所述MM可别构地抑制所述AB与其靶标的结合。在这些实施方案中，当在体内测量时或在体外测定中，与未用MM修饰的AB、亲本AB或未偶联至MM的AB与靶标的结合相比，当AB通过MM修饰或偶联至MM且在靶标存在下时，所述AB与靶标不结合或基本上不结合，或存在所述AB与靶标的不超过0.001％、0.01％、0.1％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％或50％的结合持续至少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个月或更长时间。

[0150] 当AB偶联至与MM或通过MM修饰时，所述MM‘掩蔽’降低或以其它方式抑制所述AB与靶标的特异性结合。当AB偶联至MM或通过MM修饰时，这种偶联或修饰可引起降低或抑制所述AB特异性地结合其靶标的能力的结构变化。

[0151] 偶联至MM或用MM修饰的AB可由下式表示(按从氨基(N)末端区域至羧基(C)末端区域的顺序)：

[0152] (MM)-(AB)

[0153] (AB)-(MM)

[0154] (MM)-L-(AB)

[0155] (AB)-L-(MM)

[0156] 其中MM是掩蔽部分，AB是抗体或其抗体片段，并且L是接头。在许多实施方案中，可能希望将一个或多个接头例如柔性接头插入组合物中，以提供柔性。

[0157] 在某些实施方案中，所述MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中，所述MM不包含或基本上不包含与AB的任何天然结合配偶体的同源性。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或80％相似。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、

65％、70％、75％或80％相同。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过25％相同。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过50％相同。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过20％相同。在一些实施方案中，所述MM与AB的任何天然结合配偶体不超过10％相同。

[0158] 可裂解部分(CM)

[0159] 本文提供的可活化的抗CD166抗体包含可裂解部分(CM)。在一些实施方案中，所述CM包含氨基酸序列，所述氨基酸序列是蛋白酶(通常是细胞外蛋白酶)的底物。可使用多种已知技术中的任一种来鉴定适合的底物。例如，使用描述于Daugherty等人的美国专利号7,666,817;Stagliano等人的美国专利号8,563,269;以及La Porte等人的PCT公布号WO 2014/026136中的方法来鉴定肽底物，所述专利各自的内容特此以引用的方式整体并入。(还参见Boulware等人“Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics.”Biotechnol Bioeng.106.3(2010):339-46)。

[0160] 在一些实施方案中，裂解CM的蛋白酶在患病组织中具有活性，例如，上调或以其它方式不受调控，并且当AA暴露于所述蛋白酶时，所述蛋白酶裂解所述AA中的CM。在一些实施方案中，所述蛋白酶与CD166共定位在组织中，并且当AA暴露于所述蛋白酶时，所述蛋白酶裂解所述AA中的CM。图1描绘在存在肿瘤特异性蛋白酶的肿瘤微环境中优先活化的可活化的抗CD166抗体药物缀合物。

[0161] 在一些实施方案中，所述AA包含通过MM修饰的AB，并且还包含一个或多个可裂解部分(CM)。此类AA表现出与AB的靶标的可活化/可转换的结合。AA通常包含通过掩蔽部分(MM)修饰或偶联至掩蔽部分的抗体或抗体片段(AB)以及可修饰或可裂解部分(CM)。在一些实施方案中，所述CM含有充当至少一种蛋白酶的底物的氨基酸序列。

[0162] 在一些实施方案中，所述CM是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0163] 在一些实施方案中，所述CM是多肽，所述多肽包含作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的第一可裂解部分(CM1)和作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)的底物的第二可裂解部分(CM2)。在一些实施方案中，CM1-CM2底物的CM1底物序列和CM2底物序列中的每一个独立地是长度至多15个氨基酸的多肽。

[0164] 在一些实施方案中，所述CM是CM1-CM2底物，其氨基酸序列如下所示：

[0165]

可裂解部分 3001 (底物 3001)
AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:76)

[0166] AA的元件被排列成使得MM和CM被定位成使得在裂解(或相对活性)状态下且在靶标存在下，所述AB结合靶标，当所述AA处于未裂解(或相对无活性)状态下在靶标存在下时，所述AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。由于MM抑制或掩蔽AB特异性地结合其靶标的能力，因此可降低所述AB与其靶标的特异性结合。

[0167] 用MM和CM修饰的AB对靶标的K_d比未用MM和CM修饰的AB或亲本AB对所述靶标的K_d大至少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5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、25-50、50-250、100-1,000、100-10,

000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、25-500、500-2,500、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、2,500-5,000、5,000-50,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、50,000-5,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000之间倍。相反,用MM和CM修饰的AB对靶标的结合亲和力比未用MM和CM修饰的AB或亲本AB对所述靶标的结合亲和力低至少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5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、25-50、50-250、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、25-500、500-2,500、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、2,500-5,000、5,000-50,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、50,000-5,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000之间倍。

[0168] 与未用MM和CM修饰的AB与靶标的特异性结合或与亲本AB与靶标的特异性结合相比,当用MM和CM修饰AB且在存在靶标但不存在修饰剂(例如至少一种蛋白酶)时,所述AB与其靶标的特异性结合被降低或抑制。当在体内测量时或在体外测定中,与亲本AB与其靶标的结合或未用MM和CM修饰的AB与其靶标的结合相比,当用MM和CM修饰时所述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%以及甚至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个月或更长时间。

[0169] 如本文所用,术语“裂解状态”是指在通过至少一种蛋白酶修饰CM后AA的状况。如本文所用,术语“未裂解状态”是指在不存在蛋白酶对CM的裂解的情况下AA的状况。如上所述,术语“可活化的抗体”在本文中用于指处于其未裂解(天然)状态以及其裂解状态的AA。对于普通技术人员而言显而易见的是,在一些实施方案中,裂解的AA可由于蛋白酶对CM的裂解而缺乏MM,从而导致至少MM的释放(例如,其中所述MM未通过共价键(例如,半胱氨酸残基之间的二硫键)连接至AA)。

[0170] 可活化的或可转换的是指当AA处于受抑制、掩蔽或未裂解状态(即,第一构象)时,所述AA表现出与靶标的第一结合水平,并且在处于未受抑制、未掩蔽和/或裂解状态(即第二构象)时表现出与靶标的第二结合水平,其中所述第二靶标结合水平大于所述第一结合水平。一般而言,与不存在这种裂解剂的情况相比,在能够裂解CM的裂解剂(即蛋白酶)存在下,靶标对所述AA的AB的接近更大。因此,当所述AA处于未裂解状态时,所述AB被抑制免于靶标结合并且可被掩蔽免于靶标结合(即,第一构象是使得AB不能结合靶标),并且在裂解状态下,所述AB对于靶标结合不受抑制或不被掩蔽。

[0171] 选择AA的CM和AB以使得AB代表给定靶标的结合部分,并且CM代表蛋白酶的底物。在一些实施方案中,所述蛋白酶与靶标共定位在受试者的治疗部位或诊断部位。如本文所用,共定位是指在相同位置或相对紧密邻近。在一些实施方案中,蛋白酶裂解CM,从而产生结合至位于裂解位点附近的靶标的活化的抗体。本文公开的AA具有特殊用途,其中例如,能够裂解CM中的位点的蛋白酶(即蛋白酶)在治疗部位或诊断部位的含靶标组织中以比非治疗部位的组织中(例如在健康组织中)相对更高的水平存在。在一些实施方案中,本公开的CM还通过一种或多种其它蛋白酶裂解。在一些实施方案中,正是一种或多种其它蛋白酶与靶标共定位并且在体内负责CM的裂解。

[0172] 在一些实施方案中，如果AB未被掩蔽或以其它方式抑制免于与靶标结合，则AA提供降低的毒性和/或可由于AB在非治疗部位的结合以其它方式导致的不良副作用。

[0173] 一般而言，可通过选择目标AB并构建AA的剩余部分来设计AA，以使得在构象受限时，MM可提供AB的掩蔽或降低AB与其靶标的结合。可考虑结构设计标准来提供这种功能特征。

[0174] 提供了在受抑制的构象对比未受抑制的构象中表现出靶标结合的所需动态范围的可转换表型的AA。动态范围通常是指(a)在第一组条件下的参数的最大检测水平与(b)在第二组条件下的所述参数的最小检测值的比率。例如，在可活化抗体的情况下，动态范围是指(a)在至少一种能够裂解AA的CM的蛋白酶存在下，与AA的靶蛋白结合的最大检测水平与(b)在所述蛋白酶不存在下与AA的靶蛋白结合的最低检测水平的比率。可将AA的动态范围计算为AA裂解剂(例如酶)处理的解离常数与所述AA裂解剂处理的解离常数的比率。可活化抗体的动态范围越大，所述可活化抗体的可转换表型越好。具有相对较高的动态范围值(例如，大于1)的AA表现出更合乎需要的转换表型，以使得在能够裂解所述AA的CM的裂解剂(例如，酶)存在下与不存在裂解剂的情况相比，通过所述AA进行的靶蛋白发生的程度更大(例如，主要发生)。

[0175] 所述CM通过至少一种蛋白酶以约0.001-1500x $10^4M^{-1}S^{-1}$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1500x $10^4M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。在一些实施方案中，所述CM以约100,000$M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。在一些实施方案中，所述CM以约1x10E2至约1x10E6 $M^{-1}S^{-1}$(即，约$1x10^2$至约$1x10^6$ $M^{-1}S^{-1}$)的速率特异性地裂解。

[0176] 为了通过酶特异性裂解，在酶与CM之间进行接触。当包含偶联至MM和CM的AB的AA在靶标和足够酶活性存在下时，所述CM可被裂解。足够的酶活性可指所述酶与CM接触并实现裂解的能力。可容易地预见到，酶可能在CM附近，但是由于其它细胞因子或酶的蛋白质修饰而不能裂解。

[0177] 可活化抗体的结构构型

[0178] 可以多种结构构型来提供本公开的AA。下文提供了AA的示例性式。特别考虑的是，在可活化抗体内，AB、MM和CM的N-末端至C-末端顺序可颠倒。还特别考虑到，CM和MM可在氨基酸序列中重叠，例如使得CM包含在MM内。

[0179] 例如，AA可由下式表示(按从氨基(N)末端区域至羧基(C)末端区域的顺序：

[0180] (MM)-(CM)-(AB)

[0181] (AB)-(CM)-(MM)

[0182] 其中MM是掩蔽部分，CM是可裂解部分，并且AB是抗体或其片段。应注意，尽管在上式中MM和CM被指示为不同的组分，但是在本文公开的所有示例性实施方案(包括式)中，考虑MM和CM的氨基酸序列可重叠，例如以使得CM完全或部分包含在MM中。此外，上式提供了可位于AA元件的N-末端或C-末端的额外氨基酸序列。

[0183] 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AA构建体中，以便在MM-CM接点、CM-AB接点或两者处提供柔性。例如，AB、MM和/或CM可能不含有足够数量的残基(例如，Gly、Ser、Asp、Asn，特别是Gly和Ser，特别是Gly)来提供所需的柔性。如此，此类AA构建体的可转换表型可受益于一种或多种氨基酸的引入以提供柔性接头。此外，

如下文所述，当AA以构象受限的构建体提供时，可以可操作地插入柔性接头以促进未裂解的可活化抗体中的环状结构的形成和维持。

[0184] 在一些实施方案中，所述AA包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2)，并且其中所述处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排列：MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中，两个连接肽不需要彼此相同。

[0185] 在一些实施方案中，LP1或LP2中的至少一者包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：$(GS)_n$、$(GGS)_n$、$(GSGGS)_n$(SEQ ID NO:1)和$(GGGS)_n$(SEQ ID NO:2)，其中n是至少一的整数。

[0186] 在一些实施方案中，LP1或LP2中的至少一者包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：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)以及GSSSG(SEQ ID NO:8)。

[0187] 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)、GSSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:12)、GSSGGSGGSG(SEQ ID NO:13)或GSSGGSGGSGS(SEQ ID NO:14)。

[0188] 在一些实施方案中，LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:15)、GSSGT(SEQ ID NO:16)或GSSG(SEQ ID NO:17)。

[0189] 在一些实施方案中，对于结合至CD166，所述AB具有约100nM或更小的解离常数。

[0190] 例如，在某些实施方案中，AA包含以下式之一(其中下式表示在N-末端至C-末端方向或C-末端至N-末端方向上的氨基酸序列)：

[0191] (MM)-LP1-(CM)-(AB)

[0192] (MM)-(CM)-LP2-(AB)

[0193] (MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

[0194] 其中MM、CM和AB如上文所定义；其中LP1和LP2各自独立且任选地存在或不存在，是包含至少1种柔性氨基酸(例如，Gly)的相同或不同的柔性接头。此外，上式提供了可位于AA元件的N-末端或C-末端的额外氨基酸序列。实例包括但不限于靶向部分(例如，靶组织中存在的细胞受体的配体)和延长血清半衰期的部分(例如，结合血清蛋白的多肽，如免疫球蛋白(例如，IgG)或血清白蛋白(例如，人血清白蛋白(HAS))。

[0195] 在一些实施方案中，使AA暴露于蛋白酶并被所述蛋白酶裂解，以使得在活化或裂解状态下，活化的抗体包含轻链氨基酸序列，所述轻链氨基酸序列在所述蛋白酶已经裂解CM后包含LP2和/或CM序列的至少一部分。

[0196] 适用于本文所述的组合物中的接头通常是提供修饰的AB或AA的柔性以促进AB与靶标的结合的抑制的接头。此类接头通常被称为柔性接头。适合的接头可容易地选择并且可具有任何适合的不同长度，诸如1个氨基酸(例如，Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸，包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸，并且可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的长度。

[0197] 示例性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 NO:1)和$(GGGS)_n$(SEQ ID NO:2)，其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域中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，并且因此可能能够充当组分之间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间，并且比具有更长侧链的残基限制少的多(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性柔性接头包括但不限于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)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:8)等。普通技术人员将认识到，AA的设计可包括全部或部分柔性的接头，以使得接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构已提供所需的AA结构的一个或多个部分。

[0198] 在一些实施方案中，所述AA还包含信号肽。在一些实施方案中，所述信号肽经由间隔区缀合至所述AA。在一些实施方案中，所述间隔区在不存在信号肽的情况下缀合至AA。在一些实施方案中，间隔区直接连接至可活化抗体的MM。在一些实施方案中，间隔区在间隔区-MM-CM-AB的N-末端至C-末端的结构排列中直接连接至AA的MM。直接连接至AA的MM的N-末端的间隔区的实例是QGQSGQ(SEQ ID NO:88)。直接连接至AA的MM的N-末端的间隔区的其它实例包括QGQSGQG(SEQ ID NO:305)、QGQSG(SEQ ID NO:306)、QGQS(SEQ ID NO:307)、QGQ、QG以及Q。直接连接至AA的MM的N-末端的间隔区的其它实例包括GQSGQG(SEQ ID NO:359)、QSGQG(SEQ ID NO:360)、SGQG(SEQ ID NO:361)、GQG以及G。在一些实施方案中，没有间隔区连接到所述MM的N-末端。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QGQSGQ(SEQ ID NO:88)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QGQSGQG(SEQ ID NO:305)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QGQSG(SEQ ID NO:306)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QGQS(SEQ ID NO:307)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QGQ。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QG。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸残基Q。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列GQSGQG(SEQ ID NO:359)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列QSGQG(SEQ ID NO:360)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列SGQG(SEQ ID NO:361)。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列GQG。在一些实施方案中，所述间隔区至少包含氨基酸序列G。在一些实施方案中，间隔区不存在。

[0199] 缀合的可活化抗体

[0200] 本文提供的AA组合物和方法使得一种或多种剂能够附接至AB中的一个或多个半胱氨酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸)而不损害可活化的抗CD166抗体的活性(例如掩蔽、活化或结合活性)。在一些实施方案中，本文提供的组合物和方法使得一种或多种剂能够附接至AB中的一个或多个半胱氨酸残基，而不减少或以其它方式干扰MM内的一个或多个二硫键。本文提供的组合物和方法产生缀合至一种或多种剂(例如多种治疗剂、诊断剂和/或预防剂中的任一种)的可活化的抗CD166抗体，例如，在一些实施方案中，没有任何剂缀合至可活化的抗CD166抗体的MM。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化的抗CD166抗体，其中MM保留有效且高效地掩蔽处于未裂解状态的AA的AB的能力。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化的抗CD166抗体，其中在存在可裂解CM的蛋白酶的情况下，AA仍被活化，即被裂解。

[0201] 在一些实施方案中，本文所述的AA还包含缀合至可活化抗体的剂。在一些实施方案中，缀合的剂是治疗剂，如抗炎剂和/或抗肿瘤剂。在此类实施方案中，所述剂缀合至可活

化抗体的碳水化合物部分，例如，在一些实施方案中，其中所述碳水化合物部分位于可活化抗体中的抗体或抗原结合片段的抗原结合区域之外。在一些实施方案中，所述剂缀合至可活化抗体中的抗体或抗原结合片段的巯基。

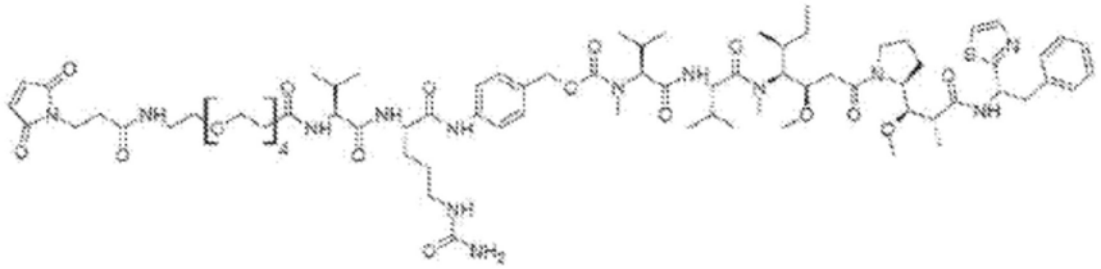
[0202] 在一些实施方案中，所述剂是细胞毒性剂，如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。

[0203] 在一些实施方案中，所述剂是可检测的部分，例如像标记或其它标记物。例如，所述剂是或包括放射性标记的氨基酸、可通过标记的抗生物素蛋白(例如，含有可通过光学方法或比色方法检测的荧光标记物或酶促活性的链霉抗生物素蛋白)检测到的一个或多个生物素基部分、一种或多种放射性同位素或放射性核素、一种或多种荧光标记、一种或多种酶标记和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中，可检测部分通过间隔区分子连接。

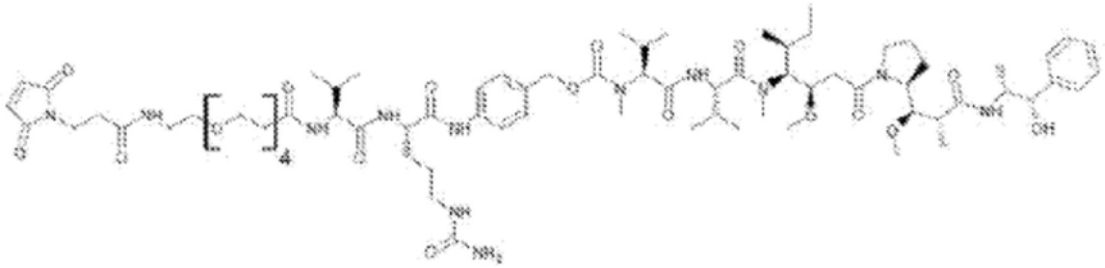
[0204] 本公开还涉及免疫缀合物，所述免疫缀合物包含缀合至细胞毒性剂如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即，放射性缀合物)的抗体。适合的细胞毒性剂包括，例如，尾海兔素(dolastatin)及其衍生物(例如，奥瑞斯他汀E、AFP、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE)。例如，所述剂是单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)或单甲基奥瑞斯他汀D(MMAD)。在一些实施方案中，所述剂是选自表1中所列的组的剂。在一些实施方案中，所述剂是尾海兔素。在一些实施方案中，所述剂是奥瑞斯他汀或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是奥瑞斯他汀E或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)。在一些实施方案中，所述剂是单甲基奥瑞斯他汀D(MMAD)。在一些实施方案中，所述剂是美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中，所述剂是DM1或DM4。在一些实施方案中，所述剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是吡咯并苯并二氮杂䓬。在一个示例性实施方案中，所述剂是DM4。

[0205] 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-瓜氨酸接头将所述剂连接至AB。在一些实施方案中，使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头将所述剂连接至AB。在一些实施方案中，使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头将所述剂连接至AB。在一些实施方案中，所述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连接至AB的单甲基澳瑞斯他汀D(MMAD)，并且这种接头有效负载构建体在本文中称为“vc-MMAD”。在一些实施方案中，所述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连接至AB的单甲基澳瑞斯他汀E(MMAE)，并且这种接头有效负载构建体在本文中称为“vc-MMAE”。在一些实施方案中，使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头将所述剂连接至AB。在一些实施方案中，所述剂是使用马来酰亚胺双PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接至AB的单甲基澳瑞斯他汀D(MMAD)，并且这种接头有效负载构建体在本文中称为“PEG2-vc-MMAD”。vc-MMAD、vc-MMAE和PEG2-vc-MMAD的结构如下所示：

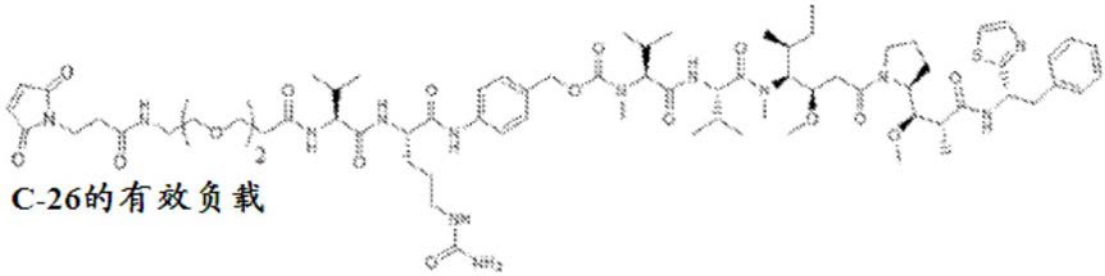
[0206] vc-MMAD：

[0207] 

[0208] vc-MMAE：

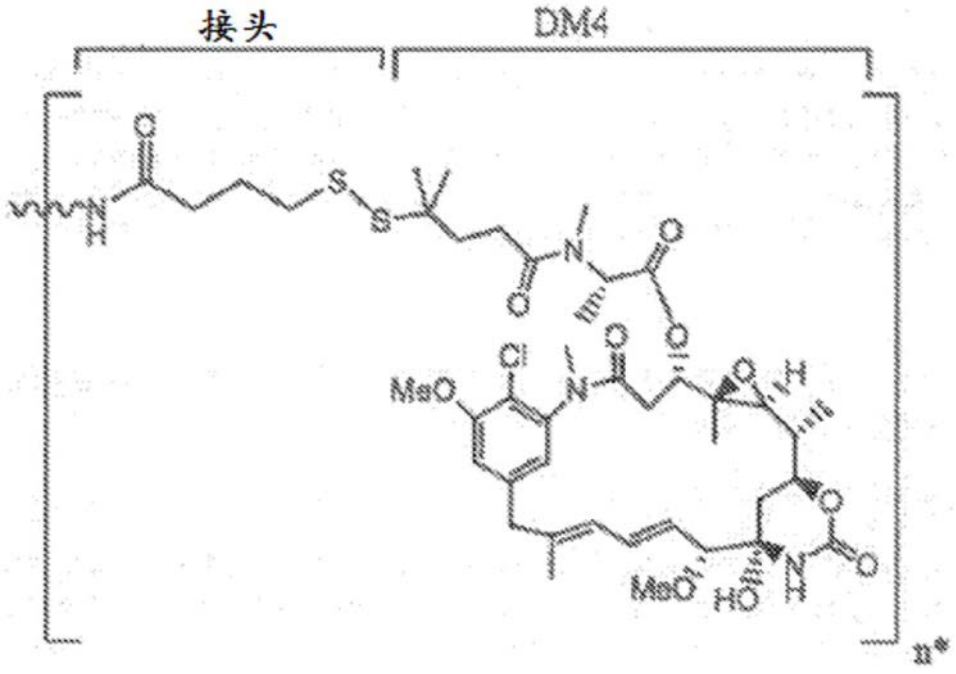
[0209] 

[0210] PEG2-vc-MMAD:

[0211] 

[0212] 在一个示例性实施方案中，所述剂经由赖氨酸缀合至AA。在一个示例性实施方案中，SPDB-DM4通过AA上的赖氨酸的ε-amjino基团(例如所述赖氨酸的ε-氨基)附接至可活化抗体。

[0213] 在示例性实施方案中，所述剂是DM4，并且接头-DM使如下：

[0214] 

[0215] 本公开还提供了缀合的AA，所述缀合的AA包含与单甲基澳瑞斯他汀D(MMAD)有效负载连接的AA，其中所述AA包含特异性地结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制处于未裂解状态的AA的AB与靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，并且所述CM是充当至少一种MMP蛋白酶的底物的多肽。

[0216] 在一些实施方案中，可使用用于将剂附接至AB的若干方法中的任一种来缀合MMAD-缀合的AA：(a)附接至所述AB的碳水化合物部分，或(b)附接至所述AB的巯基，或(c)附接至所述AB的氨基，或(d)附接至所述AB的羧酸酯基团。

[0217] 在一些实施方案中，MMAD有效负载经由接头缀合至AB。在一些实施方案中，MMAD有效负载经由接头缀合至AB中的半胱氨酸。在一些实施方案中，MMAD有效负载经由接头缀合至AB中的赖氨酸。在一些实施方案中，MMAD有效负载经由接头缀合至AB的另一个残基，如本文公开的那些残基。在一些实施方案中，接头是含硫醇的接头。在一些实施方案中，接头是可裂解的接头。在一些实施方案中，接头是不可裂解的接头。在一些实施方案中，接头选自由表6和7中所示的接头组成的组。在一些实施方案中，AA和MMAD有效负载经由马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中，AA和MMAD有效负载经由马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中，AA和MMAD有效负载经由马来酰亚胺己酰基-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，AA和MMAD有效负载经由马来酰亚胺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，使用本文公开的部分还原和缀合技术将MMAD有效负载缀合至AB。

[0218] 在一些实施方案中，本公开的接头的聚乙二醇(PEG)组分由2个乙二醇单体、3个乙二醇单体、4个乙二醇单体、5个乙二醇单体、6个乙二醇单体、7个乙二醇单体、8个乙二醇单体、9个乙二醇单体或至少10个乙二醇单体形成。在本公开的一些实施方案中，PEG组分是支链聚合物。在本公开的一些实施方案中，PEG组分是非支链聚合物。在一些实施方案中，将PEG聚合物组分用氨基或其衍生物、羧基或其衍生物或氨基或其衍生物和羧基或其衍生物两者官能化。

[0219] 在一些实施方案中，本公开的接头的PEG组分是氨基-四乙二醇-羧基或其衍生物。在一些实施方案中，本公开的接头的PEG组分是氨基三乙二醇-羧基或其衍生物。在一些实施方案中，本公开的接头的PEG组分是氨基-二乙二醇-羧基或其衍生物。在一些实施方案中，氨基衍生物是在氨基和与其缀合的羧基之间形成酰胺键。在一些实施方案中，羧基衍生物是在羧基和与其缀合的氨基之间形成酰胺键。在一些实施方案中，羧基衍生物是在羧基和与其缀合的羟基之间形成酯键。

[0220] 可使用的酶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(来自绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、α-帚曲菌素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝裂吉菌素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(tricothecene)。多种放射性核素可用于产生放射缀合的抗体。实例包括^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y以及^{186}Re。

[0221] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可使用多种双官能蛋白偶联剂来制备，所述多种双官

能蛋白偶联剂诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如二甲基己二酰亚胺酯HCL)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双-叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸酯基苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)为一种用于使放射性核苷酸缀合于抗体的示例性螯合剂。(参见WO94/11026)。

[0222] 表1列出可在本文所述的公开内容中采用的一些示例性药剂,但绝不意味着其是详尽列表。

[0223] 表1:用于缀合的示例性药剂

[0224]

细胞毒性剂	
奥瑞斯他汀	Turbostatin
奥瑞斯他汀 E	苯他汀(Phenstatin)
单甲基奥瑞斯他汀 D (MMAD)	羟基苯他汀
单甲基奥瑞斯他汀 E (MMAE)	海绵抑制素 5
脱甲基奥瑞斯他汀 E (DMAE)	海绵抑制素 7
奥瑞斯他汀 F	哈里司汀(Halistatin) 1
单甲基奥瑞斯他汀 F (MMAF)	哈里司汀 2

[0225]

脱甲基奥瑞斯他汀 F (DMAF)	哈里司汀 3
奥瑞斯他汀衍生物，例如其酰胺	修饰的苔藓抑素
奥瑞斯他汀酪胺	Halocomstatin
瑞斯他汀喹啉	吡咯并苯并咪唑(PBI)
尾海兔素	Cibrostatin6
尾海兔素衍生物	Doxaliform
尾海兔素 16 DmJ	蒽环霉素类似物
尾海兔素 16 Dpv	
美登木素生物碱，例如 DM-1；DM-4	
美登木素生物碱衍生物	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
蒽环霉素	OSW-1
阿霉素	O6-苄基鸟嘌呤的 4-硝基苄氧基羰基衍生物
道诺霉素	拓扑异构酶抑制剂
苔藓抑素	哈米特林
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	吡咯并苯并二氮杂䓬二聚体(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䓬
考布他汀	卡奇霉素
脱溴海兔毒素	鬼臼毒素
卡哈拉得-F	紫杉烷
圆皮海绵内酯	长春花生物碱
海鞘素	
	可缀合的检测试剂
抗病毒剂	荧光素及其衍生物

[0226]

阿昔洛韦
Vira A
Symmetrel
抗真菌剂
制霉菌素
另外的抗肿瘤剂
阿霉素
司比定
博来霉素
艾克兰
长春碱
长春新碱
氟尿嘧啶
甲氨蝶呤
噻替派
比生群
诺消灵
硫鸟嘌呤
丙卡巴肼
阿糖胞苷
抗菌剂
氨基糖苷
链霉素
新霉素
卡那霉素
阿米卡星

异硫氰酸荧光素(FITC)
放射性药物
^{125}I
^{131}I
^{89}Zr
^{111}In
^{123}I
^{131}I
^{99}mTc
^{201}Tl
^{133}Xe
^{11}C
^{62}Cu
^{18}F
^{68}Ga
^{13}N
^{15}O
^{38}K
^{82}Rb
^{99}mTc (锝)
重金属
钡
金
铂
抗支原体
泰乐菌素

[0227]

庆大霉素	壮观霉素
妥布霉素	
链霉素B	
壮观霉素	
氨比西林	
磺胺	
多粘菌素	
氯霉素	

[0228] 本领域普通技术人员将认识到,可将多种可能的部分偶联至本公开的所得抗体。(参见例如,"Conjugate Vaccines",Contributions to Microbiology and Immunology,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编辑),Carger Press,New York,(1989),其完整内容以引用的方式并入本文)。

[0229] 在一些实施方案中,AA缀合至一或多当量的剂。在一些实施方案中,AA缀合至一当量的剂。在一些实施方案中,AA缀合至二、三、四、五、六、七、八、九、十或大于十当量的剂。在一些实施方案中,AA是具有均等数量当量的缀合的剂的AA混合物的一部分。在一些实施方案中,AA是具有不均等数量当量的缀合的剂的AA混合物的一部分。在一些实施方案中,AA的混合物是使得缀合至每个AA的剂的平均数目是零至一之间、一至二之间、二与三之间、三与四之间、四与五之间、五与六之间、六与七之间、七与八之间、八与九之间、九与十之间以及十和更大。在一些实施方案中,AA的混合物是使得与每个AA缀合的剂的平均数目是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。在一些实施方案中,存在AA的混合物,以使得缀合至每个AA的剂的平均数目在三与四之间。在一些实施方案中,存在AA的混合物,以使得缀合至每个AA的剂的平均数目在3.4与3.8之间。在一些实施方案中,存在AA的混合物,以使得缀合至每个AA的剂的平均数目在3.4与3.6之间。在一些实施方案中,AA包含一种或多种位点特异性氨基酸序列修饰,以使得赖氨酸和/或半胱氨酸残基的数目相对于可活化抗体的原始氨基酸序列增加或减少,因此在一些实施方案中相应地增加或减少可与可活化抗体缀合的剂的数量,或在一些实施方案中以位点特异性方式限制所述剂与所述AA的缀合。在一些实施方案中,经修饰的AA以位点特异性方式用一种或多种非天然氨基酸修饰,因此在一些实施方案中将剂的缀合限制于仅非天然氨基酸的位点。

[0230] 用于产生缀合的可活化抗体的组合物和方法

[0231] 可活化的抗CD166抗体具有与剂的至少一个缀合点(以产生缀合的AA)。在一些实施方案中,并未使用所有可能的缀合点。在一些实施方案中,一些自然的接触点被修饰或除去以不再可用于与剂缀合。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是氮原子,如赖氨酸的ε氨基。

[0232] 在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与链间二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是参与链间硫键的硫原子,而不是参与链内二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多

个缀合点是半胱氨酸或其它含硫原子的氨基酸残基的硫原子。此类残基可天然存在于抗体结构中，或者可通过定点诱变、化学转化或非天然氨基酸的错误并入而并入抗体中。

[0233] 还提供了制备可活化的抗CD166抗体的缀合物的方法，所述缀合物具有在AB中的一个或多个链间二硫键和在MM中的一个或多个链内二硫键，并且提供了与游离硫醇反应的药物。所述方法通常包括用还原剂例如像TCEP部分地还原AA中的链间二硫键；并且使与游离硫醇反应的药物缀合至部分还原的可活化的抗体。如本文所用，术语部分还原是指其中可活化的抗CD166抗体与还原剂接触并且少于全部二硫键例如少于全部可能的缀合位点被还原的情况。在一些实施方案中，少于99％、98％、97％、96％、95％、90％、85％、80％、75％、70％、65％、60％、55％、50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％、15％、10％或少于5％的所有可能的缀合位点被还原。

[0234] 在其它实施方案中，提供了一种使剂(例如药物)还原并缀合至可活化的抗CD166抗体、从而产生所述剂的放置的选择性方法。所述方法通常包括用还原剂部分还原所述可活化的抗CD166抗体，以使得在AA的掩蔽部分或其它非AB部分中的任何缀合位点不被还原，以及将所述剂缀合至AB中的链间硫醇。选择一个或多个缀合位点，以便允许剂的所需放置，以允许在所需位点发生缀合。还原剂是例如TCEP。还原反应条件例如像还原剂与可活化抗体的比率、孵育时间、孵育过程中的温度、还原反应溶液的pH等通过鉴定产生缀合的AA的条件来确定，其中MM保留有效且高效地掩蔽处于未裂解状态的AA的AB的能力。还原剂与可活化的抗CD166抗体的比率将根据可活化抗体而变化。在一些实施方案中，还原剂与可活化的抗CD166抗体的比率将在约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约5:1至1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约5:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约4:1至1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约4:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约8:1至约1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约2.5:1至1:1的范围内。

[0235] 在一些实施方案中，提供了一种使可活化的抗CD166抗体的AB中的链间二硫键还原并且将剂(例如含硫醇的剂，诸如药物)缀合至所得链间硫醇以使一种或多种剂选择性地定位在AB上的方法。所述方法通常包括用还原剂使所述AB部分还原以形成至少两种链间硫醇而不在可活化抗体中形成所有可能的链间硫醇；以及使所述剂缀合至所述部分还原的AB的链间硫醇。例如，在约37℃下以所需的还原剂:可活化抗体的比率使AA的AB部分还原持续约1小时。在一些实施方案中，还原剂与AA的比率将在约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约5:1至1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约5:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约4:1至1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约4:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约8:1至约1:1的范围内。在一些实施方案中，所述比率在约2.5:1至1:1的范围内。

[0236] 含硫醇的试剂可以是例如半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸。还原剂可以是例如TCEP。在一些实施方案中，可在缀合之前使用例如柱色谱法、透析或渗滤来纯化经还原的AA。或者，在部分还原之后和缀合之前不纯化经还原的抗体。

[0237] 本发明还提供了部分还原的可活化的抗CD166抗体，其中已用还原剂使AA中的至少一个链间二硫键还原而不会干扰所述可活化抗体中的任何链内二硫键，其中所述AA包含特异性地结合至CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制处于未裂解状态的AA的AB与CD166靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中，所述MM经由所述CM偶联至AB。在一些实施方案中，AA的一个或多个链内二硫键不受还原剂干扰。在一些实施方案中，AA内的MM的一个或多个链内二硫键不受还原剂干扰。在一些实施方案中，处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中，还原剂是TCEP。

[0238] 本公开还提供了部分还原的AA，其中已用还原剂使所述AA中的至少一个链间二硫键还原而不会干扰所述可活化抗体中的任何链内二硫键，其中所述AA包含特异性地结合至靶标(例如CD166)的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制处于未裂解状态的AA的AB与所述靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶联至所述AB的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当至少一种蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中，所述MM经由所述CM偶联至AB。在一些实施方案中，AA的一个或多个链内二硫键不受还原剂干扰。在一些实施方案中，AA内的MM的一个或多个链内二硫键不受还原剂干扰。在一些实施方案中，处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中，还原剂是TCEP。

[0239] 在其它实施方案中，提供了一种通过提供具有限定数量和位置的赖氨酸和/或半胱氨酸残基的可活化的抗CD166抗体，使剂(例如药物)还原并缀合至可活化的抗CD166抗体、从而产生所述剂的放置的选择性方法。在一些实施方案中，赖氨酸和/或半胱氨酸残基的限定数量高于或低于亲本抗体或可活化抗体的氨基酸序列中相应残基的数量。在一些实施方案中，限定数量的赖氨酸和/或半胱氨酸残基可产生限定数量的可缀合至抗CD166抗体或可活化的抗CD166抗体的剂当量。在一些实施方案中，限定数量的赖氨酸和/或半胱氨酸残基可产生限定数量的可以位点特异性方式缀合至抗CD166抗体或可活化的抗CD166抗体的剂当量。在一些实施方案中，经修饰的A以位点特异性方式用一种或多种非天然氨基酸修饰，因此在一些实施方案中将剂的缀合限制于仅非天然氨基酸的位点。在一些实施方案中，可用如本文论述的还原剂来使具有限定数量和位置的赖氨酸和/或半胱氨酸残基的抗CD166抗体或可活化的抗CD166抗体部分还原，以使得AA的掩蔽部分或其它非AB部分中的任何缀合位点不被还原，并且将所述剂缀合至所述AB中的链间硫醇。

[0240] 偶联可通过将结合两个分子的任何化学反应来完成，只要抗体和另一部分保留其各自的活性即可。这种键联可包括许多化学机制，例如共价结合、亲和结合、嵌入、配位结合和络合。然而，在一些实施方案中，结合是共价结合。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并入来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白质分子(如本公开的抗体)偶联至其它分子。例如，代表性偶联剂可包括有机化合物如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。此列表并非意图穷尽本领域中已知的各种类别的偶联剂，而是更常见偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom，Jour.Immun.133:1335-2549(1984)；Jansen等人，Immunological Reviews 62:185-216

(1982);以及Vitetta等人,Science 238:1098(1987)。

[0241] 在一些实施方案中,除了本文提供的组合物和方法外,还可通过插入或以其它方式包含在AA序列中的经修饰的氨基酸序列来修饰缀合的AA以进行位点特异性缀合。这些修饰的氨基酸序列被设计成允许缀合的可活化抗体内的缀合的剂的受控放置和/或剂量。例如,可将AA工程改造成在轻链和重链上提供反应性硫醇基团并且不会不利地影响蛋白质折叠和组装、也不改变抗原结合的位置处包括半胱氨酸取代。在一些实施方案中,可将AA工程改造成在AA内包括或以其它方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供适合的缀合位点。在一些实施方案中,可将AA工程改造成在AA序列内包括或以其它方式引入可酶促活化的肽序列。

[0242] 在文献中描述了适合的接头。(参见例如,Ramakrishnan,S.等人,Cancer Res.44:201-208(1984),其描述MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用。还参见美国专利号5,030,719,其描述通过寡肽接头与抗体偶联的卤化乙酰肼衍生物的使用。在一些实施方案中,适合的接头包括:(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-二硫代)-甲苯(Pierce Chem.Co.,目录号(21558G);(iii)SPDP(琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem.Co.,目录号21651G);(iv)磺基-LC-SPDP(6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(Pierce Chem.Co.目录号2165-G);以及(v)缀合至EDC的磺基-NHS(N-羟基磺基-琥珀酰亚胺):Pierce Chem.Co.,目录号24510)。另外的接头包括但不限于SMCC((4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯)、磺基SMCC(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)或磺基SPDB(N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基丁酸酯)。

[0243] 上述接头含有具有不同属性的组分,因此产生具有不同物理化学性质的缀合物。例如,烷基羧酸酯的磺基-NHS酯比芳族羧酸酯的磺基-NHS酯更稳定。含NHS酯的接头比磺基-NHS酯的溶解度低。此外,接头SMPT含有空间位阻的二硫键,并且可形成具有增加的稳定性的缀合物。二硫键联通常比其它键联更不稳定,因为二硫键联在体外裂解,从而导致可用的缀合物较少。特别地,磺基NHS可增强碳二亚胺偶联的稳定性。当与磺基-NHS结合使用时,碳二亚胺偶联(如EDC)形成的酯比单独碳二亚胺偶联反应对水解的抗性更大。在示例性实施方案中,接头是SPDB。在另一个示例性实施方案中,接头是SPDB,剂是DM4。

[0244] 在一些实施方案中,接头是可裂解的。在一些实施方案中,接头是不可裂解的。在一些实施方案中,存在两个或更多个接头。所述两个或更多个接头都是相同的,即可裂解或不可裂解,或者所述两个或更多个接头是不同的,即至少一个可裂解和至少一个不可裂解。

[0245] 本公开利用用于将剂附接至AB的若干方法:(a)附接至所述AB的碳水化合物部分,或(b)附接至所述AB的巯基,或(c)附接至所述AB的氨基,或(d)附接至所述AB的羧酸酯基团。根据本公开,AB可通过具有至少两个反应性基团的中间接头共价附接至剂,一个反应性基团与AB反应并且一个反应性基团与所述剂反应。可选择可包括任何相容性有机化合物的接头,以使得与AB(或剂)的反应不会不利地影响AB的反应性和选择性。此外,接头与剂的附接可能不会破坏所述剂的活性。用于与氧化的抗体或氧化的抗体片段反应的适合的接头包括含有选自由以下组成的组的胺的那些接头:伯胺、仲胺、肼、酰肼、羟胺、苯肼、氨基脲和硫代氨基脲基团的胺。此类反应性官能团可作为接头结构的一部分存在,或者可通过不含有

此类基团的接头的适合的化学修饰而引入。

[0246] 根据本公开，用于附接至还原的AB的适合的接头包括具有能够与经还原的抗体或片段的巯基反应的某些反应性基团的那些接头。此类反应性基团包括但不限于：反应性卤代烷基(包括例如卤代乙酰基)、对苯甲酸汞基团和能够进行迈克尔型加成反应的基团(包括例如马来酰亚胺和由Mitra和Lawton,1979,J.Amer.Chem.Soc.101:3097-3110描述的类型的基团)。

[0247] 根据本公开，既不附接至氧化的Ab也不附接至经还原的Ab的适合的接头包括具有能够与Ab中未修饰的赖氨酸残基中存在的伯氨基反应的某些官能团的那些接头。此类反应性基团包括但不限于NHS羧酸或碳酸酯、磺基-NHS羧酸或碳酸酯、4-硝基苯基羧酸或碳酸酯、五氟苯基羧酸或碳酸酯、酰基咪唑、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0248] 根据本公开，既不附接至氧化的Ab也不附接至经还原的Ab的适合的接头包括具有能够与Ab中的天冬氨酸或谷氨酸残基中存在的羧酸基团反应的某些官能团的那些接头，所述官能团已通过适合的试剂活化。适合的活化剂包括有或无添加的NHS或磺基NHS的EDC，以及用于羧酰胺形成的其它脱水剂。在这些情况下，适合的接头存在中的官能团将包括伯胺和仲胺、肼、羟胺和酰肼。

[0249] 可在将接头附接至AB之前或之后将剂附接至接头。在某些应用中，可能希望首先产生AB-接头中间体，其中所述接头不含缔合剂。取决于特定的应用，然后可将特定的剂共价附接至所述接头。在一些实施方案中，出于缀合目的，首先将AB附接至MM、CM和相关的接头，且然后附接至接头。

[0250] 支链接头：在具体实施方案中，利用具有用于附接剂的多个位点的支链接头。对于多个位点接头，与AB的单价共价附接将产生能够在多个位点结合剂的AB-接头中间体。所述位点可以是醛或巯基基团，或者是剂可附接至的任何化学位点。

[0251] 在一些实施方案中，可通过在AB上的多个位点处附接单位点接头来实现更高的特异性活性(或更高的剂与AB的比率)。可通过两种方法中的任一种将这多个位点引入AB中。首先，可在同一AB中生成多个醛基和/或巯基。第二，可将具有多个功能位点的“支链接头”附接至AB的醛或巯基以用于随后附接至接头。支链接头或多位点接头的功能位点可以是醛或巯基，或者可以是接头可附接至的任何化学位点。通过组合这两种方法，即在AB上的若干位点附接多位点接头，可获得更高的特异性活性。

[0252] 可裂解的接头：易于被补体系统的酶裂解的肽接头，如但不限于u-纤溶酶原活化物、组织纤溶酶原活化物、胰蛋白酶、纤溶酶或具有蛋白水解活性的另一种酶可用于本公开的一个实施方案中。根据本公开的一种方法，剂经由易于被补体裂解的接头附接。抗体选自可活化补体的类别。因此，抗体-剂缀合物活化补体级联并在靶位点释放所述剂。根据本公开的另一种方法，剂经由易于被具有蛋白水解活性的酶，如u-纤溶酶原活化物、组织纤溶酶原活化物、纤溶酶或胰蛋白酶裂解的接头附接。这些可裂解的接头可用于包含细胞外毒素(例如，作为非限制性实例，表1中所示的任何细胞外毒素)的缀合AA中。

[0253] 表2中提供可裂解接头序列的非限制性实例。

[0254] 表2：用于缀合的示例性接头序列

[0255]

可裂解序列的类型	氨基酸序列
纤溶酶可裂解序列	
尿激酶原	PRFKIIGG (SEQ ID NO:89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO:90)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO:91)
纤溶酶原	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO:92)

[0256]

葡激酶	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO:93)
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO:94)
因子 Xa 可裂解序列	IEGR (SEQ ID NO:95)
	IDGR (SEQ ID NO:96)
	GGSIDGR (SEQ ID NO:97)
MMP 可裂解序列	
明胶酶 A	PLGLWA (SEQ ID NO:98)
胶原酶可裂解序列	
小牛皮胶原(α1(I)链)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO:99)
小牛皮胶原(α2(I)链)	GPQGLLGA (SEQ ID NO:100)
牛软骨胶原(α1(II)链)	GIAGQ (SEQ ID NO:101)
人肝脏胶原(α1(III)链)	GPLGIAGI (SEQ ID NO:102)
人 α_2M	GPEGLRVG (SEQ ID NO:103)
人 PZP	YGAGLGVV (SEQ ID NO:104)
	AGLGVVER (SEQ ID NO:105)
	AGLGISST (SEQ ID NO:106)
大鼠 α_1M	EPQALAMS (SEQ ID NO:107)
	QALAMSAI (SEQ ID NO:108)
大鼠 α_2M	AAYHLVSQ (SEQ ID NO:109)
	MDAFLESS (SEQ ID NO:110)
大鼠 α_1I_3(2J)	ESLPVVAV (SEQ ID NO:111)
大鼠 α_1I_3(27J)	SAPAVESE (SEQ ID NO:112)
人成纤维细胞胶原酶	DVAQFVLT (SEQ ID NO:113)
(自溶裂解)	VAQFVLTE (SEQ ID NO:114)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO:115)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO:116)

[0257] 此外,剂可经由二硫键(例如,半胱氨酸分子上的二硫键)附接至AB。由于许多肿瘤自然释放高水平的谷胱甘肽(一种还原剂),因此可还原二硫键,随后在递送部位释放所述剂。在一些实施方案中,将修饰CM的还原剂还将修饰缀合的可活化抗体的接头。

[0258] 间隔区和可裂解元件:在一些实施方案中,可能需要以优化剂与可活化抗体的AB之间的间隔的方式构建接头。这可通过使用具有以下通用结构的接头来完成:

[0259] W-(CH_2)n-Q

[0260] 其中

[0261] W是--NH--CH_2--或--CH_2--;

[0262] Q是氨基酸、肽;并且

[0263] n是0至20的整数。

[0264] 在一些实施方案中，接头可包含间隔区元件和可裂解元件。间隔区元件用于将可裂解元件定位成远离AB的核心，以使得可裂解元件更易于接近负责裂解的酶。上述某些支链接头可充当间隔区元件。

[0265] 在整个论述中，应理解，接头与剂的附接(或间隔区元件与可裂解元件的附接，或可裂解元件与剂的附接)不需要是特定附接或反应模式。任何提供具有适当稳定性和生物相容性的产物的反应都是可接受的。

[0266] 血清补体和接头的选择：根据本公开的一种方法，当需要释放剂时，使用作为能够活化补体的一类抗体的AB。所得缀合物保留结合抗原和活化补体级联两者的能力。因此，根据本公开的这一实施方案，剂连接至可裂解接头或可裂解元件的一端，并且接头基团的另一端附接至AB上的特定位点。例如，如果剂具有羟基或氨基，则可分别经由酯或酰胺键将其附接至肽、氨基酸或其它适合选择的接头的羧基末端。例如，此类剂可经由碳二亚胺反应附接至接头肽。如果剂含有将干扰与接头的附接的官能团，则这些干扰官能团可在附接之前封闭，并且在制备产物缀合物或中间体后解封闭。然后直接或在进一步修饰后使用接头的相反或氨基末端，以结合至能够活化补体的AB。

[0267] 接头(或接头的间隔区元件)可具有任何所需的长度，其一端可共价附接置可活化抗体的AB上的特定位点。接头或间隔区元件的另一端可附接至氨基酸或肽接头。

[0268] 因此，当这些缀合物在补体存在下结合至抗原时，使剂附接至接头的酰胺或酯键将断裂，从而导致所述剂以其活性形式释放。当施用至受试者时，这些缀合物将完成所述剂递送和释放在靶部位，并且对于体内递送如在表1中呈现但不限于表1中的那些的药剂、抗生素、抗代谢药、抗增生剂等特别有效。

[0269] 在无补体活化情况下释放的接头：在靶向递送的又一应用中，由于补体级联的活化将最终溶解靶细胞，所以需要在无补体活化的情况下释放剂。因此，这种方法当应在不杀死靶细胞的情况下完成剂的递送和释放时有用。当需要将细胞介质(如激素、酶、皮质类固醇、神经递质、基因或酶)递送至靶细胞时，这就是目标。这些缀合物可通过经由对通过血清蛋白酶裂解稍微敏感的接头将剂附接至AB而制备，所述AB不能活化补体。当将这种缀合物施用至个体时，抗原-抗体复合物将快速形成，而剂的裂解将缓慢发生，从而导致化合物在靶部位处释放。

[0270] 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将AA缀合至一种或多种治疗剂。交联试剂形成将两个不同分子的官能团连结在一起的分子桥。为了以逐步方式连接两种不同的蛋白质，可使用消除不想要的均聚物形成的异双官能交联剂。

[0271] 可通过溶酶体蛋白酶裂解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环境中可裂解的酸不稳定的接头，例如：双唾液酸醚。其它适合的接头包括组织蛋白酶不稳定的底物，特别是在酸性pH下显示最佳功能的那些底物。

[0272] 表3中列出示例性异双官能交联剂。

[0273] 表3：示例性异双官能交联剂

[0274]

异双官能交联剂			
接头	对……具有反应性	优点和应用	在交联后的间隔区臂长度(埃)
SMPT	伯胺	较大稳定性	11.2 Å
	巯基		
SPDP	伯胺	巯基化	6.8 Å
	巯基	可裂解的交联	
LC-SPDP	伯胺	延伸的间隔区臂	15.6 Å
	巯基		
磺基-LC-SPDP	伯胺	延伸的间隔区臂	15.6 Å
	巯基	水溶性	
SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应基团	11.6 Å
	巯基	酶-抗体缀合	
		半抗原-载体蛋白质缀合	
磺基-SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应基团	11.6 Å
	巯基	水溶性	
		酶-抗体缀合	
MBS	伯胺	酶-抗体缀合	9.9 Å
	巯基	半抗原-载体蛋白质缀合	

[0275]

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	延伸的间隔区臂	14.5 Å
	巯基	酶-抗体缀合	
磺基-SMPB	伯胺	延伸的间隔区臂	14.5 Å
	巯基	水溶性	
EDE/磺基-NHS	伯胺	半抗原-载体缀合	0
	羧基		
ABH	碳水化合物	与糖基反应	11.9 Å
	非选择性		

[0276] 不可裂解的接头或直接附接:在本公开的一些实施方案中,缀合物可被设计成使得剂被递送至靶标但未释放。这可通过将剂直接或经由不可裂解的接头附接至AB来实现。

[0277] 这些不可裂解的接头可包括氨基酸、肽、D-氨基酸或可被修饰以包括随后可由本文所述的方法用于附接至AB的官能团的其它有机化合物。这种有机接头的通式可以是

[0278] $W-(CH_2)n-Q$

[0279] 其中

[0280] W是--NH--CH_2--或--CH_2--；

[0281] Q是氨基酸、肽；并且

[0282] n是0至20的整数。

[0283] 不可裂解的缀合物：在一些实施方案中，化合物可附接至不活化补体的AB。当使用不能进行补体活化的AB时，可使用易于通过活化的补体裂解的接头或使用不易于通过活化的补体裂解的接头来完成这种附接。

[0284] 本文公开的中和抗体也可配制为免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域中已知的方法制备，诸如以下中所述的方法：Epstein等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688(1985)；Hwang等人，Proc.Natl Acad.Sci.USA,77:4030(1980)；以及美国专利号4,485,045和4,544,545。循环时间增加的脂质体在美国专利号5,013,556中公开。

[0285] 特别有用的脂质体可通过使用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物的反相蒸发法产生。将脂质体通过具有限定的孔径的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。本公开的抗体的Fab'片段可如Martin等人，J.Biol.Chem.,257:286-288(1982)中所述经由二硫化物交换反应与脂质体缀合。

[0286] 多特异性可活化抗体

[0287] 在一些实施方案中，可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体是单特异性的。

[0288] 本公开还提供了多特异性的抗CD166可活化抗体。因此，在一些实施方案中，可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体是多特异性的，例如，作为非限制性实例，是双特异性或三官能的。在一些实施方案中，将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体配制为前双特异性T细胞衔接器(BITE)分子的一部分。在一些实施方案中，将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体配制为前嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞或其它工程改造的受体的一部分。

[0289] 在一些实施方案中，将AA或其抗原结合片段并入多特异性AA或其抗原结合片段中，其中所述多特异性AA的至少一个臂特异性地结合CD166。在一些实施方案中，将AA或其抗原结合片段并入双特异性抗体或其抗原结合片段中，其中所述双特异性AA的至少一个臂特异性地结合CD166。

[0290] 本文提供的多特异性AA是多特异性抗体，所述多特异性抗体识别CD166和至少一种或多种不同抗原或表位并且包含与所述多特异性抗体的至少一个抗原或表位结合结构域连接的至少一个掩蔽部分(MM)，以使得所述MM的偶联降低所述抗原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经由充当至少一种蛋白酶的底物的可裂解部分(CM)偶联至所述多特异性抗体的抗原或表位结合结构域。本文提供的可活化的多特异性抗体在循环中稳定，在治疗和/或诊断的预期部位活化，但在正常(即健康组织)中不活化，并且当活化时表现出与相应未修饰的多特异性抗体至少相当的与靶标的结合。

[0291] 在一些实施方案中，多特异性AA被设计成接合免疫效应细胞，在本文中也称为接合免疫效应细胞的多特异性可活化抗体。在一些实施方案中，多特异性AA被设计成接合白细胞，在本文中也称为接合白细胞的多特异性可活化抗体。在一些实施方案中，多特异性AA被设计成接合T细胞，在本文中也称为接合T细胞的多特异性可活化抗体。在一些实施方案中，多特异性AA接合白细胞上如T细胞上、自然杀伤(NK)细胞上、髓样单核细胞上、巨噬细胞

上和/或另一种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，如髓样单核细胞。在一些实施方案中，多特异性AA被设计成与多于一个靶标和/或多于一个表位结合或以其它方式相互作用，在本文中也称为靶向多抗原的可活化抗体。如本文所用，术语“靶标”和“抗原”可互换使用。

[0292] 在一些实施方案中，本公开的接合免疫效应细胞的多特异性AA包含结合CD166的靶向抗体或其抗原结合片段和接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合部分，其中所述靶向抗体或其抗原结合片段和/或接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合部分中的至少一者被掩蔽。在一些实施方案中，接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合片段包含结合第一免疫效应细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合所述第一靶标的能力。在一些实施方案中，所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。在一些实施方案中，所述接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合片段包含结合第一免疫效应细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合所述第一靶标的能力，并且所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。在一些实施方案中，接合非免疫效应细胞的抗体是癌症靶向抗体。在一些实施方案中，非免疫细胞效应抗体是IgG。在一些实施方案中，接合免疫效应细胞的抗体是scFv。在一些实施方案中，靶向CD166的抗体(例如，非免疫细胞效应抗体)是IgG，并且接合免疫效应细胞的抗体是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，免疫效应细胞是髓样单核细胞。

[0293] 在一些实施方案中，本公开的接合T细胞的多特异性AA包含靶向CD166的抗体或其抗原结合片段和接合T细胞的抗体或其抗原结合部分，其中所述靶向CD166的抗体或其抗原结合片段和/或所述接合T细胞的抗体或其抗原结合部分中的至少一者被掩蔽。在一些实施方案中，接合T细胞的抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合所述第一靶标的能力。在一些实施方案中，所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。在一些实施方案中，所述接合T细胞的抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合所述第一靶标的能力，并且所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。

[0294] 在接合免疫效应细胞的多特异性可活化抗体的一些实施方案中，一种抗原是

CD166，并且另一种抗原通常是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/或其它免疫效应细胞表面上存在的刺激性或抑制性受体，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T细胞或NK细胞表面上存在的刺激性受体；此类刺激性受体的实例包括但不限于CD3、CD27、CD28、CD137(也称为4-1BB)、GITR、HVEM、ICOS、NKG2D和OX40。在一些实施方案中，抗原是T细胞表面上存在的抑制性受体；此类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也可被结合至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的配体或配体结构域(如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PDL1、PDL2或TNFSF9)取代。

[0295] 在一些实施方案中，接合T细胞的多特异性AA包含抗CD3ε(CD3ε，在本文中也称为CD3e和CD3)scFv和靶向抗体或其抗原结合片段，其中所述抗CD3εscFv和/或所述靶向抗体或其抗原结合部分中的至少一者被掩蔽。在一些实施方案中，所述CD3εscFv包含结合CD3ε的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合CD3ε的能力。在一些实施方案中，所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。在一些实施方案中，所述CD3εscFv包含结合CD3ε的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)，其中所述AB1附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低所述AB1结合CD3ε的能力，并且所述靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段，所述第二抗体或其片段包括结合CD166的第二抗体或其抗原结合片段(AB2)，其中所述AB2附接至掩蔽部分(MM2)，以使得所述MM2的偶联降低所述AB2结合CD166的能力。

[0296] 在一些实施方案中，靶向多抗原的抗体和/或靶向多抗原的AA至少包含结合第一靶标和/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，所述靶向多抗原的抗体和/或靶向多抗原的AA结合两种或更多种不同的靶标。在一些实施方案中，所述靶向多抗原的抗体和/或靶向多抗原的AA结合同一靶标上的两个或更多个不同的表位。在一些实施方案中，所述靶向多抗原的抗体和/或靶向多抗原的AA结合两种或更多种不同靶标和同一靶标上的两个或更多个不同表位的组合。

[0297] 在一些实施方案中，包含IgG的多特异性AA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AA具有被掩蔽的scFv结构域。在一些实施方案中，多特异性AA具有IgG可变结构域和scFv结构域两者，其中所述IgG可变结构域中的至少一个偶联至掩蔽部分。在一些实施方案中，多特异性AA具有IgG可变结构域和scFv结构域两者，其中所述scFv结构域中的至少一个偶联至掩蔽部分。在一些实施方案中，多特异性AA具有IgG可变结构域和scFv结构域两者，其中所述IgG可变结构域中的至少一个偶联至掩蔽部分，并且所述scFv结构域中的至少一个偶联至掩蔽部分。在一些实施方案中，多特异性AA具有IgG可变结构域和scFv结构域两者，其中所述IgG可变结构域和scFv结构域中的每个均偶联至其自身掩蔽部分。在一些实施方案中，多特异性AA的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性，并且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AA的一个抗

体结构域对靶抗原具有特异性，并且另一抗体结构域对另一靶抗原具有特异性。在一些实施方案中，多特异性AA的一个抗体结构域对靶抗原的表位具有特异性，并且另一抗体结构域对所述靶抗原的另一表位具有特异性。

[0298] 在多特异性可活化抗体中，scFv可融合至IgG可活化抗体的重链的羧基末端、IgG可活化抗体的轻链的羧基末端或IgG可活化抗体的重链和轻链两者的羧基末端。在多特异性可活化抗体中，scFv可融合至IgG可活化抗体的重链的氨基末端、IgG可活化抗体的轻链的氨基末端或IgG可活化抗体的重链和轻链两者的氨基末端。在多特异性可活化抗体中，scFv可融合至IgG可活化抗体的一个或多个羧基末端和一个或多个氨基末端的任何组合。在一些实施方案中，与可裂解部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)附接至并掩蔽IgG的抗原结合结构域。在一些实施方案中，与可裂解部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)附接至并掩蔽至少一个scFv的抗原结合结构域。在一些实施方案中，与可裂解部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)附接至并掩蔽IgG的抗原结合结构域，并且与可裂解部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)附接至并掩蔽至少一个scFv的抗原结合结构域。

[0299] 本公开提供了多特异性AA结构的实例，其包括但不限于以下：$(VL-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)_2$;$(V\ L-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)_2$;$(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)_2$;$(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)_2$;$(VL-CL)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL)_2$:$(M\ M-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2$:$(VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(MM-L1-CM-L2-V\ L-CL)_2$:$(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VL-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VL-CL)_2$:$(VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-C\ M-L1-MM)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-C\ L-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)_2$:$(M\ M-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(V\ L-CL-L4-VL*-L3-VH*)_2$:$(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;$(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)_2$:$(VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$;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代表IgG中包含的具有第一特异性的轻链和重链可变结构域；VL*和VH*代表scFv中包含的具有第二特异性的可变结构域；L1是连接掩蔽部分(MM)和CM(CM)的接头肽；L2是连接所述CM(CM)和抗体的接头肽；L3是连接所述scFv的可变结构域的接头肽；L4是将具有第一特异性的抗体连接至具有第二特异性的抗体的接头肽；CL是轻链恒定结构域；并且CH1、CH2、CH3是重链恒定结构域。所述第一和第二特异性可针对任何抗原或表位。

[0300] 在接合T细胞的多特异性可活化抗体的一些实施方案中，一种抗原是CD166，并且另一种抗原通常是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/或其它免疫效应细胞表面上存在的刺激性(本文也称为活化)或抑制性受体，如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137(也称为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也可被结合至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的配体或配体结构域取代。

[0301] 在一些实施方案中，所述靶向抗体是本文公开的抗CD166抗体。在一些实施方案中，所述靶向抗体可呈可活化抗体的形式。在一些实施方案中，scFv可呈Pro-scFv的形式(参见例如，WO 2009/025846，WO 2010/081173)。

[0302] 在一些实施方案中，所述scFv对结合CD3ε具有特异性，并且包含或源自结合CD3ε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，所述scFv对结合CTLA-4(在本文中也称为CTLA和CTLA4)具有特异性。

[0303] 在一些实施方案中，所述抗CTLA-4scFv包含以下氨基酸序列：

[0304]

抗CTLA-4 scFv
GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPL
TFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAAS
GSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 117)

[0305] 在一些实施方案中，所述抗CTLA-4scFv包含与SEQ ID NO:117的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高相同的氨基酸序列。

[0306] 在一些实施方案中，所述抗CD3εscFv包含以下氨基酸序列：

[0307]

抗CD3ε scFv
GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM
HWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASP
GEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTI
SGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)

[0308] 在一些实施方案中，所述抗CD3εscFv包含与SEQ ID NO:118的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高相同的氨基酸序列。

[0309] 在一些实施方案中，所述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具有特异性。在一些实施方案中，所述scFv对结合选自由以下组成的组的靶标具有特异性：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。

[0310] 在一些实施方案中，所述多特异性AA还包含缀合至所述AB的剂。在一些实施方案中，所述剂是治疗剂。在一些实施方案中，所述剂是抗肿瘤剂。在一些实施方案中，所述剂是

毒素或其片段。在一些实施方案中，所述剂经由接头缀合至所述多特异性AA。在一些实施方案中，所述剂经由可裂解接头缀合至所述AB。在一些实施方案中，所述接头是不可裂解的接头。在一些实施方案中，所述剂是微管抑制剂。在一些实施方案中，所述剂是核酸破坏剂，如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂，或其它DNA破坏剂。在一些实施方案中，接头是可裂解的接头。在一些实施方案中，所述剂是选自表1中所列的组的剂。在一些实施方案中，所述剂是尾海兔素。在一些实施方案中，所述剂是奥瑞斯他汀或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是奥瑞斯他汀E或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)。在一些实施方案中，所述剂是单甲基奥瑞斯他汀D(MMAD)。在一些实施方案中，所述剂是美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中，所述剂是DM1或DM4。在一些实施方案中，所述剂是倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中，所述剂是吡咯并苯并二氮杂䓬。在一些实施方案中，所述剂是吡咯并苯并二氮杂䓬二聚体。

[0311] 在一些实施方案中，所述多特异性AA还包含可检测部分。在一些实施方案中，所述可检测部分是诊断剂。

[0312] 在一些实施方案中，所述多特异性AA天然地包含一个或多个二硫键。在一些实施方案中，所述多特异性AA可被工程改造为包含一个或多个二硫键。

[0313] 本公开还提供了一种编码本文所述的多特异性AA的分离的核酸分子，以及包含这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了通过在导致可活化抗体的表达的条件下培养细胞来产生多特异性AA的方法，其中所述细胞包含这种核酸分子。在一些实施方案中，所述细胞包含这种载体。

[0314] 本公开还提供了一种通过以下方式制造本公开的多特异性AA的方法：(a)在导致所述多特异性可活化抗体的表达的条件下培养包含编码所述多特异性AA的核酸构建体的细胞，以及(b)回收所述多特异性可活化抗体。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0315] 本公开还提供了多特异性AA和/或多特异性AA组合物，所述多特异性AA和/或多特异性AA组合物至少包含特异性地结合第一靶标或第一表位的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)，其中至少AB1偶联或以其它方式附接至掩蔽部分(MM1)，以使得所述MM1的偶联降低AB1结合其靶标的能力。在一些实施方案中，所述MM1经由第一可裂解部分(CM1)序列偶联至AB1，所述第一可裂解部分序列包括蛋白酶的底物，例如作为与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。本文提供的多特异性AA在循环中稳定，在治疗和/或诊断的预期部位活化，但在正常(即健康组织)中不活化，并且当活化时表现出与相应未修饰的多特异性抗体至少相当的与AB1的靶标的结合。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0316] 本公开还提供了包含多特异性AA的组合物和方法，所述多特异性AA至少包含特异性地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)，其中所述多特异性AA中的至少第一AB偶联至掩蔽部分(MM1)，所述掩蔽部分降低AB1结合其靶标的能力。在一些实施方案中，每个AB偶联至MM，所述MM降低其相应AB结合至每个靶标的能力。例如，在双特异性AA实施方案中，AB1偶联至降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分(MM1)，并且AB2偶联至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分(MM2)。在一些实施方案中，所述多特

异性AA包含多于两个AB区域;在此类实施方案中,AB1偶联至降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分(MM1),AB2偶联至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分(MM2),AB3偶联至降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分(MM3),并且对于所述多特异性可活化抗体中的每个AB依此类推。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0317] 在一些实施方案中,所述多特异性AA还包含至少一个可裂解部分(CM),所述至少一个可裂解部分是蛋白酶的底物,其中所述CM将MM连接至AB。例如,在一些实施方案中,所述多特异性AA至少包含特异性地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),其中所述多特异性AA中的至少第一AB经由第一可裂解部分(CM1)偶联至掩蔽部分(MM1),所述掩蔽部分降低AB1结合其靶标的能力。在一些双特异性AA实施方案中,AB1经由CM1偶联至MM1,并且AB2经由第二可裂解部分(CM2)偶联至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分(MM2)。在一些实施方案中,所述多特异性AA包含多于两个AB区域;在这些实施方案的一些中,AB1经由CM1偶联至MM1,AB2经由CM2偶联至MM2,并且AB3经由第三可裂解部分(CM3)偶联至降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分(MM3),并且对于所述多特异性可活化抗体中的每个AB依此类推。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0318] 具有非结合立体部分或非结合立体部分的结合配偶体的可活化抗体

[0319] 本公开还提供了AA,所述AA包含非结合立体部分(NB)或非结合立体部分的结合配偶体(BP),其中所述BP募集或以其它方式将所述NB吸引至所述可活化抗体。本文提供的AA包括例如,包含非结合立体部分(NB)、可裂解的接头(CL)和结合靶标的抗体或抗体片段(AB)的AA;包含非结合立体部分的结合配偶体(BP)、CL和AB的AA;以及包含NB已被募集至其的BP、CL和结合靶标的AB的AA。其中NB共价连接至AA的CL和AB或通过与共价连接至AA的CL和AB的BP相互作用而缔合的AA在本文中称为“含NB的可活化抗体”。可活化的或可转换的是指当AA处于受抑制、掩蔽或未裂解状态(即,第一构象)时,所述AA表现出与靶标的第一结合水平,并且在处于未受抑制、未掩蔽和/或裂解状态(即第二构象,即经活化的抗体)时表现出与所述靶标的第二结合水平,其中所述第二靶标结合水平大于所述第一靶标结合水平。与常规抗体治疗剂相比,所述AA组合物可表现出增加的生物利用度和更有利的生物分布。

[0320] 在一些实施方案中,如果AB未被掩蔽或未以其它方式抑制与这种位点的结合,则AA提供降低的毒性和/或可由非治疗部位和/或非诊断部位的结合以其它方式引起的不良副作用。

[0321] 可使用PCT公布号WO 2013/192546中阐述的方法来制备包含非结合性立体部分(NB)的抗CD166 AA,所述PCT公布的内容特此以引用的方式整体并入。

[0322] 可活化抗体的产生

[0323] 本公开还提供了通过在导致可活化的抗CD166抗体多肽的表达的条件下培养细胞来产生所述多肽的方法,其中所述细胞包含编码本文所述抗体和/或AA的分离的核酸分子,和/或包含这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了通过在导致抗体和/或可活化抗体的表达的条件下培养细胞来产生抗体和/或AA的方法,其中所述细胞包含编码本文所述的抗体和/或AA的分离的核酸分子,和/或包含这些分离的核酸序列的载体。

[0324] 本发明还提供了一种通过以下方式制造在活化状态下结合CD166的AA的方法:(a)在导致可活化抗体的表达的条件下培养包含编码所述AA的核酸构建体的细胞,其中所述AA

包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和特异性地结合CD166的抗体或其抗原结合片段(AB)，(i)其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽；(ii)其中所述CM位于所述AA中，以使得当所述AA处于未裂解状态时，所述MM干扰所述AB与CD166的特异性结合，并且处于裂解状态时，所述MM不干扰或竞争所述AB与CD166的特异性结合；以及(b)回收所述可活化抗体。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0325] 提供用于制备和使用本文提供的AA和缀合的AA的以下示例性核苷酸序列。还提供了与以下提供的核苷酸序列至少90％、95％或甚至99％同源的核苷酸序列。

[0326]

编码 SEQ ID NO: 239 的氨基酸序列的 SEQ ID NO:241

人 αCD166 重链(HuCD166_HcC)-核苷酸序列

CAGATCACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACC
CACCCAGACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCA
GCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAG
CCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTG
GTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCCAGCCTGAAGTCCCGGC
TGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGCTG
ACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTA
CTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCT
ACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAA
GTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCT
GGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCT
GCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT
GGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCT
GCCCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGT
TCCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC
CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA
CCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG
TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAA
CTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCA
AGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACT
GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCC
CTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA
AGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCC
TGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAG
GGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA

[0327]

CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG

编码 SEQ ID NO: 480 的氨基酸序列的 SEQ ID NO:481
人 αCD166 重链(HuCD166_HcC)–Des-HC 核苷酸序列

[0328]

CAGATCACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACC
CACCCAGACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCA
GCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAG
CCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTG
GTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCCAGCCTGAAGTCCCGGC
TGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGCTG
ACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTA
CTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCT
ACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAA
GTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCT
GGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCT
GCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT
GGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCT
GCCCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGT
TCCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACC
CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA
CCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG
TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAA
CTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCA
AGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTG
CCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCT
GACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGT
GGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAG
ACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTG
TACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGG
CAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

[0329]

编码 SEQ ID NO: 246 的氨基酸序列的 SEQ ID NO:247
人 αCD166 轻链(间隔区-MM-LP1-CM-LP2-Ab)
[间隔区(SEQ ID NO:319)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 (SEQ ID

NO:315)]

[0330]

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC][CTGTGTCACCCTGCTGTGC
TGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCT
GGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCT
GTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGA
TGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACTCCTGGCGAG
CCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGCAC
TCCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCC
CGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACC
TGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCC
GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGA
GGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAACTGC
CCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGG
ACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCT
GAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG
GTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGT
CACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCT
CCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG
GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAGCAGCCC
CGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC]

[0331]

编码 SEQ ID NO: 314 的氨基酸序列的 SEQ ID NO:315
人 aCD166 轻链(MM-LP1-CM-LP2-Ab)
huCD166Lcl_7614.6_3001

CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCC
AGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCT
GGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCACG
GCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTG
CCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCC
TCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTGTA
CTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGA
TCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGA
TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATC
TCCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGC
CCAGAACCTGGAACTGCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCA
AGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC
ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGC
CTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGG
CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGG
CAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCC

[0332] GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGG GGCGAGTGC

[0333] **编码 SEQ ID NO: 305 间隔区的核苷酸序列的 SEQ ID NO:319** CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC

[0334] 可活化抗体和缀合的可活化抗体的治疗性用途

[0335] 本公开提供了使用结合CD166的AA，特别是结合并中和或以其它方式抑制CD166和/或CD166介导的信号传导的至少一种生物学活性的AA在受试者中治疗、预防与CD166的异常表达和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状的方法。

[0336] 本公开还提供了使用结合CD166的AA，特别是结合、靶向、中和、杀死或以其它方式抑制正在表达或正在异常表达CD166的细胞的至少一种生物学活性的AA在受试者中治疗、预防与正在表达或正在异常表达CD166的细胞的存在、生长、增殖、转移和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状的方法。

[0337] 本公开还提供了使用结合CD166的AA，特别是结合、靶向、中和、杀死或以其它方式抑制正在表达CD166的细胞的至少一种生物学活性的AA在受试者中治疗、预防与正在表达CD166的细胞的存在、生长、增殖、转移和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状的方法。

[0338] 本公开还提供了使用结合CD166的AA，特别是结合、靶向、中和、杀死或以其它方式抑制正在异常表达CD166的细胞的至少一种生物学活性的AA在受试者中治疗、预防与正在异常表达CD166的细胞的存在、生长、增殖、转移和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状的方法。

[0339] 本公开还提供了通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体来在受试者中预防癌症、延缓癌症的进展、治疗癌症、减轻癌症的症状或以其它方式改善癌症的方法。

[0340] 本公开还提供了结合CD166的AA，特别是结合并中和或以其它方式抑制CD166和/或CD166信号传导的至少一种生物学活性的AA，所述AA用于在受试者中治疗、预防与CD166的异常表达和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状。

[0341] 本公开还提供了结合CD166的AA，特别是结合、靶向、中和、杀死或以其它方式抑制正在表达或正在异常表达CD166的细胞的至少一种生物学活性的AA，所述AA用于在受试者中治疗、预防与正在表达或正在异常表达CD166的细胞的存在、生长、增殖、转移和/或活性相关的症状和/或延缓所述症状的发作或进展或减轻所述症状。

[0342] 本公开还提供了本文所述的抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体，其用于在受试者中预防癌症、延缓癌症的进展、治疗癌症、减轻癌症的症状或以其它方式改善癌症，其中所述抗体以治疗有效量施用。

[0343] 作为非限制性实例，本公开的AA可用于治疗、预防上皮或鳞状细胞癌、类癌和/或神经内分泌癌和/或延缓它们的发作或进展。癌症的实例包括但不限于腺癌；胆管(胆道)癌；膀胱癌；乳腺癌，例如三阴性乳腺癌、Her2阴性乳腺癌、雌激素受体阳性乳腺癌；类癌；宫

颈癌;胆管癌;结肠直肠癌;子宫内膜癌;神经胶质瘤;头颈癌,例如头颈部鳞状细胞癌;白血病;肝癌;肺癌,例如NSCLC;SCLC;淋巴瘤;黑素瘤;口咽癌;卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌,例如转移性去势抵抗性前列腺癌;肾癌;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;以及尿路上皮癌。

[0344] 在一些实施方案中,癌症是任何上皮或鳞状癌。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌、口咽癌和/或头颈癌。

[0345] 在一些实施方案中,癌症是膀胱癌、骨癌、乳腺癌、类癌、宫颈癌、结肠直肠癌、结肠癌、子宫内膜癌、上皮癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、黑素瘤、口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、泌尿生殖系统癌症和/或尿路上皮癌。

[0346] 在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:三阴性乳腺癌(TNBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、Ras突变型结肠直肠癌、罕见上皮癌、口咽癌、宫颈癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和/或前列腺癌。在一些实施方案中,癌症与表达CD166的肿瘤相关。在一些实施方案中,癌症是由于表达CD166的肿瘤所致。

[0347] 在这些方法和用途的任何实施方案中使用的抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体可在疾病的任何阶段施用。例如,可将这种抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有从早期至转移性的任何阶段的癌症的受试者。

[0348] 在示例性实施方案中,所述受试者患有或疑似患有乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌(CPRC)、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0349] 如本文所提供,待治疗的受试者是哺乳动物,如人、非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是伴侣动物。在一些实施方案中,受试者是在兽医护理中的动物。

[0350] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有乳腺癌的受试者具有表达雌激素受体(ER+)的肿瘤,并且在用本公开的AA治疗之前应该已经接受了抗激素疗法并且经历了疾病进展。在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有乳腺癌的受试者患有三阴性乳腺癌(TNBC),并且在用本公开的AA治疗之前已经接受了≥2种先前线疗法。

[0351] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有去势抵抗性前列腺癌的受试者在用本公开的AA治疗之前已经接受了≥1种先前疗法。

[0352] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有胆管癌的受试者已经在用本公开的AA治疗之前≥1种含吉西他滨的方案的先前线中失败。

[0353] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有子宫内膜癌的受试者在用本公开的AA治疗之前已经接受了≥1种用于子宫外或晚期疾病的含铂方案。

[0354] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有上皮性卵巢癌的受试者具有非乳腺癌(BRCA)突变(生殖系或体细胞),或具有未知的BRCA突变状态,并且患有铂耐药性或铂难治性卵巢癌。在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组

合55或组合60)的患有或疑似患有上皮性卵巢癌的受试者具有BRCA突变并且是PARP抑制剂难治性的或在其它方面不适合用PARP抑制剂。

[0355] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有HNSCC的受试者在用本公开的AA治疗之前,已经接受了≥1种含铂方案和PD-1/PD-L1抑制剂(如果批准用于受试者的适应症和地区)。

[0356] 在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有NSCLC的受试者在用本公开的AA治疗之前已经接受了≥1种含铂方案。在一些实施方案中,接受本公开的AA(例如组合55或组合60)的患有或疑似患有NSCLC的受试者在用本公开的AA治疗之前,已经先前施用了检查点抑制剂(如果在受试者的地区批准用于他们的适应症)。

[0357] 在一些实施方案中,患有以下中的任一项的受试者可能不符合接受本公开的AA用于治疗乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌(CPRC)、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、HNSCC以及NSCLC:活动性或慢性角膜病症、角膜移植史、活动性疱疹性角膜炎和需要持续治疗/监测的活动性眼病;严重的并发疾病,包括临床上相关的活动性感染;活动性自身免疫性疾病的病史或当前活动性自身免疫性疾病;重大心脏病,如最近的心肌梗塞;多发性硬化症或其它脱髓鞘疾病的病史,伊顿-兰伯特综合征(副肿瘤综合征)、最近6个月内出血或缺血性中风的病史或酒精性肝病;不愈合的伤口或溃疡,除了由潜在的肿瘤引起的溃疡性病变;对先前单克隆抗体疗法有严重过敏或过敏反应的病史;目前正在接受使用华法林的抗凝疗法;或在给药前3个月内进行大手术(需要全身麻醉)。

[0358] 将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体及其治疗性制剂施用至患有或易患与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。使用本领域中已知的多种方法中的任一种来鉴定患有或易患与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。例如,使用多种临床和/或实验室测试中(例如体格检查以及血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)的任一种来鉴定患有癌症或其它赘生性疾患的受试者。例如,使用多种临床和/或实验室测试(如体格检查和/或体液分析,例如血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)中的任一种来鉴定患有炎症和/或炎性病症的受试者。

[0359] 如果实现了各种实验室或临床目标中的任一个,则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者是成功的。例如,如果与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症的一种或多种症状得以缓解、减轻、抑制或未进展至另一(即,更差的)状态,则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有所述疾病或病症的受试者是成功的。如果与异常CD166表达和/或活性相关的疾病或病症进入缓解期或未进展至另一(即,更差的)状态,则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有所述疾病或病症的受试者是成功的。

[0360] 在一些实施方案中,将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体及其治疗性制剂施用至患有或易患疾病或病症的受试者,如患有癌症或其它赘生性疾患的受试者,其中所述受试者的患病细胞正在表达CD166。在一些实施方案中,所述患病细胞与异常CD166表达和/或活性相关。在一些实施方案中,所述患病细胞与正常CD166表达和/或活性相关。使用本领域中已知的多种方法中的任一种来鉴定患有或易患其中受试者的患病

细胞正在表达CD166的疾病或病症的受试者。例如，使用多种临床和/或实验室测试中(例如体格检查以及血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)的任一种来鉴定患有癌症或其它赘生性疾患的受试者。例如，使用多种临床和/或实验室测试(如体格检查和/或体液分析，例如血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)中的任一种来鉴定患有炎症和/或炎性病症的受试者。

[0361] 在一些实施方案中，将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体及其治疗性制剂施用至患有或易患与表达CD166的细胞或此类细胞的存在、生长、增殖、转移和/或活性相关的疾病或病症的受试者，如患有癌症或其它赘生性疾患的受试者。在一些实施方案中，所述细胞与异常CD166表达和/或活性相关。在一些实施方案中，所述细胞与正常CD166表达和/或活性相关。使用本领域中已知的多种方法中的任一种来鉴定患有或易患与表达CD166的细胞相关的疾病或病症的受试者。例如，使用多种临床和/或实验室测试中(例如体格检查以及血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)的任一种来鉴定患有癌症或其它赘生性疾患的受试者。例如，使用多种临床和/或实验室测试(如体格检查和/或体液分析，例如血液、尿液和/或粪便分析以评估健康状况)中的任一种来鉴定患有炎症和/或炎性病症的受试者。

[0362] 如果实现了各种实验室或临床目标中的任一个，则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有与表达CD166的细胞相关的疾病或病症的受试者是成功的。例如，如果与表达CD166的细胞相关的疾病或病症的一种或多种症状得以缓解、减轻、抑制或未进展至另一(即，更差的)状态，则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有所述疾病或病症的受试者是成功的。如果与表达CD166的细胞相关的疾病或病症进入缓解期或未进展至另一(即，更差的)状态，则认为将抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体施用至患有所述疾病或病症的受试者是成功的。

[0363] 在一些实施方案中，在治疗期间和/或之后与一种或多种另外的剂(例如像化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂)组合施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体。在一些实施方案中，同时施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和一种或多种另外的剂。例如，可将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化抗CD166抗体和一种或多种另外的剂配制在单一组合物中或作为两种或更多种单独组合物施用。在一些实施方案中，可依次施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和一种或多种另外的剂。

[0364] 在一些实施方案中，本文所述的可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体与一种或多种另外的剂或另外的剂的组合结合使用。适合的另外的剂包括用于预期应用例如像癌症的当前药物和/或外科疗法。例如，所述抗CD166抗体、缀合的抗CD166抗体、可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体可与另外的化学治疗剂或抗肿瘤剂结合使用。

[0365] 在一些实施方案中，所述一种或多种另外的剂是化学治疗剂，如选自由以下组成的组的化学治疗剂:多西他赛、紫杉醇、abraxane(即，白蛋白缀合的紫杉醇)、阿霉素、奥沙利铂、卡铂、顺铂、伊立替康以及吉西他滨。

[0366] 在一些实施方案中，一种或多种另外的剂是检查点抑制剂、激酶抑制剂、靶向肿瘤微环境中的抑制剂的剂和/或T细胞或NK激动剂。在一些实施方案中，一种或多种另外的剂是放射疗法，单独或与另一种或多种另外的剂如化学治疗剂或抗肿瘤剂组合。在一些实施方案中，所述一种或多种另外的剂是疫苗、致癌病毒和/或DC活化剂，如作为非限制性实例，toll样受体(TLR)激动剂和/或α-CD40。在一些实施方案中，所述一种或多种另外的剂是被设计成经由ADCC或经由与毒素的直接缀合(例如，抗体药物缀合物(ADC))杀死肿瘤的肿瘤靶向抗体。

[0367] 在一些实施方案中，检查点抑制剂是选自由以下组成的组的靶标的抑制剂：CTLA-4、LAG-3、PD-1、CD166、TIGIT、TIM-3、B7H4和Vista。在一些实施方案中，激酶抑制剂选自由以下组成的组：B-RAFi、MEKi和Btk抑制剂，如依鲁替尼。在一些实施方案中，激酶抑制剂是克唑替尼。在一些实施方案中，肿瘤微环境抑制剂选自由以下组成的组：IDO抑制剂、α-CSF1R抑制剂、α-CCR4抑制剂、TGF-β、骨髓来源的抑制细胞或T调控性细胞。在一些实施方案中，激动剂选自由以下组成的组：Ox40、GITR、CD137、ICOS、CD27和HVEM。

[0368] 在一些实施方案中，所述抑制剂是CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是LAG-3抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是PD-1抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是CD166抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是TIGIT抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是TIM-3抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是B7H4抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是Vista抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是B-RAFi抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是MEKi抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是Btk抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是依鲁替尼。在一些实施方案中，所述抑制剂是克唑替尼。在一些实施方案中，所述抑制剂是IDO抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是α-CSF1R抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是α-CCR4抑制剂。在一些实施方案中，所述抑制剂是TGF-β。在一些实施方案中，所述抑制剂是骨髓来源的抑制细胞。在一些实施方案中，所述抑制剂是T调控性细胞。

[0369] 在一些实施方案中，激动剂是Ox40。在一些实施方案中，激动剂是GITR。在一些实施方案中，激动剂是CD137。在一些实施方案中，激动剂是ICOS。在一些实施方案中，激动剂是CD27。在一些实施方案中，激动剂是HVEM。

[0370] 在一些实施方案中，在治疗期间和/或之后与一种或多种另外的剂例如像化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂组合施用AA和/或缀合的AA。在一些实施方案中，将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂配制成单一治疗性组合物，并且同时施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂。或者，可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂彼此分开，例如，各自配制成单独的治疗性组合物，并且同时施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂，或者在治疗方案期间的不同时间施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂。例如，在施用另外的剂之前施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体，在施用另外的剂之后施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体，或者以交替方式施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂。如本文所述，以单剂量或多剂量施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂。

[0371] 在一些实施方案中，同时施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和一种或多种另外的剂。例如，可将可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化抗CD166抗体和一种或多种另外的剂配制在单一组合物中或作为两种或更多种单独组合物施用。在一些实施方案中，顺序施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和一种或多种另外的剂，或者在治疗方案期间的不同时间施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体和另外的剂。

[0372] 在一些实施方案中，在治疗期间和/或之后与一种或多种另外的剂组合施用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体，所述另外的剂如作为非限制性实例，化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂，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/或任何其它核酸破坏剂抗癌剂。在一些实施方案中，另外的剂是紫杉烷，如紫杉醇(例如Abraxane®)。在一些实施方案中，另外的剂是抗代谢药，如吉西他滨。在一些实施方案中，另外的剂是烷化剂，如基于铂的化学疗法，如卡铂或顺铂。在一些实施方案中，另外的剂是靶向剂，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，另外的剂是靶向剂，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，另外的剂是蛋白酶体抑制剂，如硼替佐米或卡非佐米。在一些实施方案中，另外的剂是免疫调节剂，如来那度胺或IL-2。在一些实施方案中，另外的剂是放射。在一些实施方案中，另外的剂是本领域技术人员认为是标准护理的剂。在一些实施方案中，另外的剂是本领域技术人员众所周知的化学治疗剂。

[0373] 在一些实施方案中，另外的剂是另一种抗体或其抗原结合片段、另一种缀合的抗体或其抗原结合片段、另一种AA或其抗原结合片段和/或另一种缀合的AA或其抗原结合片段。在一些实施方案中，另外的剂是与第一抗体或其抗原结合片段、第一缀合的抗体或其抗原结合片段、AA或其抗原结合片段和/或缀合的AA或其抗原结合片段针对相同靶标(例如针对CD166)的另一种抗体或其抗原结合片段、另一种缀合的抗体或其抗原结合片段、另一种AA或其抗原结合片段和/或另一种缀合的AA或其抗原结合片段。在一些实施方案中，另外的剂是针对与第一抗体或其抗原结合片段、第一缀合的抗体或其抗原结合片段、AA或其抗原结合片段和/或缀合的AA或其抗原结合片段的靶标不同的靶标的另一种抗体或其抗原结合片段、另一种缀合的抗体或其抗原结合片段、另一种AA或其抗原结合片段和/或另一种缀合的AA或其抗原结合片段。

[0374] 在一些实施方案中，另外的抗体或其抗原结合片段、缀合的抗体或其抗原结合片段、AA或其抗原结合片段和/或缀合的AA或其抗原结合片段是单克隆抗体、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，另外的抗体或其抗原结合片段、缀合的抗体或其抗原结合片段、AA或其抗原结合片段和/或缀合的AA或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或完全人单克隆抗体。

[0375] 应了解，根据本公开的治疗性实体的施用将与适合载体、赋形剂和并入制剂中以提供改进的传递、递送、耐受性等的其它剂一起施用。许多适当的制剂可在所有药物化学家已知的处方集：Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版，Mack Publishing Company，Easton，PA(1975))，特别是其中的Blaug，Seymour的第87章中找到。这些制剂包括例如粉末、糊剂、软膏、软冻、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(如

Lipofectin™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液碳蜡(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含碳蜡(carbowax)的半固体混合物。任何前述混合物都可适于根据本公开的治疗和疗法,前提是制剂中的活性成分不因配制而失活且制剂与施用途径生理相容且可耐受。关于与药物化学家众所周知的制剂、赋形剂和载体有关的另外信息,还参见Baldrick P.“Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance.”Regul.Toxicol Pharmacol.32(2):210-8(2000),Wang W.“Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.”Int.J.Pharm.203(1-2):1-60(2000);Charman WN“Lipids,lipophilic drugs,and oral drug delivery-some emerging concepts.”J Pharm Sci.89(8):967-78(2000);Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311(1998)以及其中的引文。

[0376] 包含可活化的抗CD166抗体(如作为非限制性实例,AA和/或缀合的AA)的本公开的治疗性制剂用于预防、治疗或以其它方式改善与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症。例如,包含AA和/或缀合的可活化的抗体的本公开的治疗性制剂用于治疗或以其它方式改善癌症或其它赘生性疾患、炎症、炎性疾病和/或自身免疫性疾病。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的实体瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的实体瘤。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,靶标在实质(例如,在癌症中,经常执行器官或组织的功能的部分)上表达。在一些实施方案中,靶标在细胞、组织或器官上表达。在一些实施方案中,靶标在基质(即细胞、组织或器官的结缔支持框架)上表达。在一些实施方案中,靶标在成骨细胞上表达。在一些实施方案中,靶标在内皮(脉管系统)上表达。在一些实施方案中,靶标在癌症干细胞上表达。在一些实施方案中,与AA缀合的剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,与AA缀合的剂是核酸破坏剂。

[0377] 结合用于诊断或治疗与靶标表达和/或活性(例如像异常靶标表达和/或活性)相关的疾病或病症的任何已知方法来确定预防、改善或治疗的有效性。在受试者中延长受试者的存活或以其它方式延缓与靶标表达和/或活性(例如,异常靶标表达和/或活性)相关的疾病或病症的进展表明AA和/或缀合的AA赋予临床益处。

[0378] AA和/或缀合的AA可以药物组合物的形式施用。制备此类组合物所涉及的原理和考虑因素以及组分选择的指南提供于例如Remington:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro,等人,编辑)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.:1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery(Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York中。

[0379] 在其中使用抗体片段的一些实施方案中,选择特异性地结合至靶蛋白的结合结构域的最小片段。例如,基于抗体的可变区序列,可设计保留结合靶蛋白序列的能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生。(参见例如,Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。所述制剂还可含有多于一种如为所治疗的特定适应症所必需的活性化合物,例如在一些实施方案中,具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。在一些实施方案中或此外,所述组合物可包含增强其功能的剂,例如像细胞毒剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子以对于预期目的有效的量适当地联

合存在。

[0380] 所述活性成分也可截留在例如通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或粗乳液中。

[0381] 有待用于体内施用的制剂必须为无菌的。这易于通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0382] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形物品(例如薄膜或微胶囊)的形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸与γ-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,诸如LUPRON DEPOT ™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸共聚物的聚合物能够释放分子超过100天,而某些水凝胶释放蛋白质持续较短的时间段。

[0383] 诊断用途

[0384] 本发明还提供用于在多种诊断和/或预防适应症中使用可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体的方法和药盒。例如,本发明提供了用于通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂和目标靶标的存在或不存在的方法和药盒:(i)使受试者或样品与抗CD166可活化抗体接触,其中所述抗CD166 AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂裂解的可裂解部分(CM)以及特异性地结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中处于未裂解、非活化状态的所述抗CD166 AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中所述MM是抑制所述AB与CD166的结合的肽,并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列,并且不是所述AB的天然结合配偶体的经修饰的形式;(b)其中,当所述AB处于未裂解、非活化状态时,所述MM干扰所述AB与CD166的特异性结合,并且当所述AB处于裂解、活化的状态时,所述MM不干扰或竞争所述AB与CD166的特异性结合;以及(ii)测量所述受试者或样品中活化的抗CD166 AA的水平,其中所述受试者或样品中可检测水平的活化的抗CD166 AA指示所述受试者或样品中存在裂解剂和CD166,并且其中在所述受试者或样品中无可检测水平的活化的抗CD166 AA表明所述受试者或样品中不存在裂解剂、CD166或裂解剂和CD166两者。

[0385] 在一些实施方案中,所述可活化的抗CD166抗体是与治疗剂缀合的可活化的抗CD166抗体。在一些实施方案中,所述可活化的抗CD166抗体不与剂缀合。在一些实施方案中,所述可活化的抗CD166抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的可活化的抗CD166抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0386] 在这些方法和药盒的一些实施方案中,可活化的抗CD166抗体包含可检测标记。在这些方法和药盒的一些实施方案中,所述可检测标记包括显像剂、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。在这些方法和药盒的一些实施方案中,显像剂包括放射性同位素。在这些方法和药盒的一些实施方案中,放射性同位素是铟或锝。在这些方法和药盒的一些实施方案中,造影剂包括碘、钆或氧化铁。在这些方法和药盒的一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在这些方法和药

盒的一些实施方案中，荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在这些方法和药盒的一些实施方案中，发光标记包括N-甲基吖啶鎓(N-methylacrydium)衍生物。在这些方法的一些实施方式中，标记包括Alexa Fluor® 标记，如Alex Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在这些方法和药盒的一些实施方案中，基于配体的标记包括生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或一种或多种半抗原。

[0387] 在这些方法和药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，如非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物。在一些实施方案中，受试者是啮齿动物。

[0388] 在这些方法和药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。

[0389] 在所述方法和药盒的一些实施方案中，所述方法用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的抗CD166 AA治疗的患者群体，随后通过向有需要的受试者施用所述可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体进行治疗。例如，对靶标(例如CD166)和裂解在这些方法中测试的抗CD166 AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性的患者被鉴定为用包含这种CM的这种抗CD166 AA治疗的候选人抗体，并且然后向患者施用治疗有效量的经测试的可活化的抗CD166抗体和/或缀合的可活化的抗CD166抗体。同样，对于靶标(例如CD166)和裂解使用这些方法所测试的AA中的CM中的底物的蛋白酶中的任一者或两者测试呈阴性的患者可被鉴定为另一种形式的疗法的适合候选者。在一些实施方案中，可用其它抗CD166 AA测试此类患者，直到鉴定出用于治疗的适合抗CD166 AA(例如，包含在疾病部位被患者裂解的CM的抗CD166 AA)。在一些实施方案中，然后向患者施用治疗有效量的患者对其测试呈阳性的可活化的抗CD166抗体和/或缀合的。适合的AB、MM和/或CM包括本文公开的任何AB、MM和/或CM。

[0390] 在一些实施方案中，所述AA和/或缀合的AA含有可检测标记。使用完整抗体或其片段(例如，Fab、scFv或F(ab)$_2$)。关于探针或抗体的术语“标记的”意图涵盖通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体的直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂的反应性的间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的第二抗体进行的第一抗体的检测和具有生物素的DNA探针的末端标记，以使得其可用荧光标记的链霉抗生素蛋白来检测。术语“生物样品”意图包括从受试者分离的组织、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，术语“生物样品”的使用包括血液和血液的级分或组分，包括血清、血浆或淋巴液。即，本公开的检测方法可用于在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，用于检测分析物mRNA的体外技术包括RNA印迹杂交和原位杂交。用于检测分析物蛋白质的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀、免疫化学染色和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括DNA印迹杂交。用于进行免疫测定的程序描述于例如“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology”，第42卷，J.R.Crowther(编辑)Human Press,Totowa,NJ,1995；“Immunoassay”，E.Diamandis和T.Christopoulus,Academic Press,Inc.,San

Diego,CA,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985中。此外,用于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。例如,抗体可用放射性标记物标记,可通过标准成像技术检测所述放射性标记物在受试者中的存在和位置。

[0391] 因此,本公开的AA和缀合的AA也可用于多种诊断和预防制剂中。在一个实施方案中,将AA和/或缀合的AA施用至处于患上一种或多种上述病症的风险的受试者。可使用基因型、血清学或生物化学标记物来确定受试者或器官对一种或多种上述病症的易感性。

[0392] 在本公开的一些实施方案中,将AA和/或缀合的AA施用至被诊断具有与一种或多种上述病症相关的临床适应症的人个体。在诊断后,施用AA和/或缀合的AA以减轻或逆转临床适应症的效应。

[0393] 本公开的可活化的抗体和/或缀合的AA也可用于检测受试者样品中的靶标,并且因此可用作诊断剂。例如,本公开的抗体和/或可活化的抗体及其缀合型式用于体外测定(例如ELISA)中以检测受试者样品中的靶标水平。

[0394] 在一个实施方案中,将本公开的AA和/或缀合的AA固定在固体载体(例如,微量滴定板的孔)上。固定的AA和/或缀合的AA充当测试样品中可能存在的任何靶标的捕获抗体。在使固定的可活化抗体和/或其缀合型式与受试者样品接触之前,冲洗固相载体并用封闭剂如乳蛋白或白蛋白处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0395] 随后,用疑似含有抗原的测试样品或含有标准量的抗原的溶液处理所述孔。这种样品是,例如,来自疑似具有被认为是病理学的诊断的循环抗原水平的受试者的血清样品。在冲洗掉测试样品或标准液后,用可检测标记的第二抗体处理固体载体。标记的第二抗体充当检测抗体。测量可检测标记的水平,并且通过与从标准样品绘制的标准曲线进行比较来确定测试样品中靶抗原的浓度。

[0396] 应了解,基于使用本公开的AA及其缀合型式获得的结果,在体外诊断测定中,有可能基于靶抗原的表达水平在受试者中进行疾病分期。对于给定疾病,从被诊断为处于疾病进展的各个阶段和/或在疾病的治疗性治疗中的各个点的受试者中采集血液样品。使用对于进展或治疗的每个阶段均提供统计学显著结果的样品群体,确定了可被视为每个阶段的特征的抗原浓度范围。

[0397] AA和/或缀合的AA也可用于诊断和/或成像方法中。在一些实施方案中,此类方法是体外方法。在一些实施方案中,此类方法是体内方法。在一些实施方案中,此类方法是原位方法。在一些实施方案中,此类方法是离体方法。例如,具有可酶促裂解的CM的AA可用于检测是否存在能够裂解CM的酶。此类AA可用于诊断中,其可包括通过测量给定宿主生物体的给定细胞或组织中的活化的抗体(即,由可活化抗体的裂解产生的抗体)的累积体内检测(例如,定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,具有增加的还原电位的环境,如可提供二硫键还原的环境)。活化的抗体的这种累积不仅指示所述组织表达酶活性(或取决于CM的性质的还原电位增加),而且表明组织表达活化的抗体所结合的靶标。

[0398] 例如,可选择CM作为在肿瘤部位、在病毒或细菌感染的部位、在生物学上受限的部位(例如,如在脓肿、器官中)等发现的至少一种蛋白酶的底物。AB可以是结合靶抗原的AB。使用如本文公开的方法,或在适当时,使用本领域技术人员熟悉的方法,可将可检测标记(例如,荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合至抗体和/或可活化抗体的AB或其它

区域。在上述筛查方法的背景下讨论了适合的可检测标记，并且在下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的AB以及在目标疾病组织中活性升高的至少一种蛋白酶，AA将表现出相对于CM特异性酶不以可检测水平存在或与患病组织相比以较低水平存在或无活性(例如，以呈酶原形式或与抑制剂复合)的组织，与疾病组织的结合率提高。由于肾脏过滤系统从血液中迅速清除小蛋白质和多肽，并且因为对CM具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，或者以无活性构象存在)，所以相对于非疾病组织，活化的抗体在疾病组织中的累积增强。

[0399] 在另一个实例中，AA可用于检测样品中裂解剂的存在或不存在。例如，在AA含有易于被酶裂解的CM的情况下，可将AA用于检测(定性或定量)样品中酶的存在。在另一个实例中，在AA含有易于被还原剂裂解的CM时，所述AA可用于(定性或定量地)检测样品中还原条件的存在。为了有助于这些方法中的分析，可对AA进行可检测标记，并且可将AA结合至载体(例如固体载体，如载玻片或珠粒)上。可检测的标记可位于裂解后不释放的AA的一部分上，例如，可检测标记可以是淬灭的荧光标记或在裂解发生之前不可检测的其它标记。可通过例如，使固定的、可检测标记的AA与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以进行裂解的时间，然后洗涤以除去过量的样品和污染物来进行测定。然后通过在与样品接触之前通过AA的可检测信号的变化(例如，由于样品中裂解剂裂解AA所致的可检测信号的存在和/或增加)来评估样品中裂解剂(例如酶或还原剂)的存在或不存在。

[0400] 此类检测方法可适于还提供对能够在裂解时结合AA的AB的靶标的存在或不存在的检测。因此，所述测定可适于评估裂解剂的存在或不存在以及目标靶标的存在或不存在。如上所述，可通过AA的可检测标记的存在和/或增加来检测裂解剂的存在或不存在，并且可通过例如使用可检测标记的抗靶标抗体检测靶标-AB复合物来检测靶标的存在或不存在。

[0401] AA还可用于原位成像，以例如通过蛋白酶裂解和与特定靶标的结合来验证AA活化。原位成像是能够在生物样品(如细胞培养物或组织切片)中定位蛋白水解活性和靶标的技术。使用这种技术，有可能基于可检测标记(例如，荧光标记)的存在来确认与给定靶标的结合和蛋白水解活性。

[0402] 这些技术对于来源于疾病部位的任何冷冻细胞或组织(例如肿瘤组织)或健康组织都是有用的。这些技术对于新鲜的细胞或组织样品也有用。

[0403] 在这些技术中，用可检测标记来标记AA。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)、异硫氰酸若丹明(TRITC)、Alexa Fluor®标记)、近红外(NIR)染料(例如，Qdot®纳米晶体)、胶体金属、半抗原、放射性标记、生物素和扩增试剂(如链霉抗生物素蛋白)或酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0404] 在已与标记的AA一起孵育的样品中检测到标记表明所述样品含有靶标且含有对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中，可使用广谱蛋白酶抑制剂(如本文所述的那些)和/或通过使用对蛋白酶具有特异性的剂，例如，诸如A11的抗体(其对蛋白酶蛋白裂解酶具有特异性并且抑制蛋白裂解酶的蛋白水解活性)来确认蛋白酶的存在；参见例如，国际公布号WO 2010/129609，于2010年11月11日公布。使用广谱蛋白酶抑制剂(如本文所述的那些)和/或通过使用选择性更强的抑制剂的相同方法可用于鉴定对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中，可使用对靶标具有特异性的剂(例如另一种抗体)来确认靶标的存在，或者可将可检测标记与未标记的靶标竞争。在一些实施方案

中,可使用未标记的AA,通过标记的第二抗体或更复杂的检测系统进行检测。

[0405] 类似的技术也可用于体内成像,其中在受试者(例如,哺乳动物,包括人)中检测到荧光信号表明疾病部位含有靶标,并且含有对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶。

[0406] 这些技术还可用于药盒和/或作为用于检测的试剂,基于可活化抗体中的蛋白酶特异性CM,鉴定或表征多种细胞、组织和生物体中的蛋白酶活性。

[0407] 本公开提供了在各种诊断和/或预防适应症中使用AA的方法。例如,本公开提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂和目标靶标的存在或不存在的方法:(i)使受试者或样品与可活化抗体接触,其中所述AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如,蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)以及特异性地结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中处于未裂解、非活化状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中所述MM是抑制所述AB与所述靶标的结合的肽,并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列,并且不是所述AB的天然结合配偶体的经修饰的形式;并且(b)其中,处于未裂解、非活化状态时,所述MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合,并且处于裂解、活化的状态时,所述MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合;以及(ii)测量所述受试者或样品中活化的AA的水平,其中所述受试者或样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或样品中存在裂解剂和所述靶标,并且其中在所述受试者或样品中无可检测水平的活化的AA表明裂解剂、所述靶标或裂解剂和所述靶标两者在所述受试者或样品中不存在和/或不充足地存在。在一些实施方案中,所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中,所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中,所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中,所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0408] 本公开还提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法:(i)在目标靶标(例如靶标)存在下使受试者或样品与AA接触,其中所述AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)以及特异性地结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中处于未裂解、非活化状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中所述MM是抑制所述AB与所述靶标的结合的肽,并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列,并且不是所述AB的天然结合配偶体的经修饰的形式;并且(b)其中,处于未裂解、非活化状态时,所述MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合,并且处于裂解、活化的状态时,所述MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合;以及(ii)测量所述受试者或样品中活化的AA的水平,其中所述受试者或样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或样品中存在裂解剂,并且其中在所述受试者或样品中无可检测水平的活化的AA表明裂解剂在所述受试者或样品中不存在和/或不充足地存在。在一些实施方案中,所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中,所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中,所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中,所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0409] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法

中的药盒，其中所述药盒至少包括AA，所述AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如，蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)以及特异性地结合目标靶标的抗原结合结构域或其片段(AB)，其中处于未裂解、非活化状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM；(a)其中所述MM是抑制所述AB与所述靶标的结合的肽，并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列，并且不是所述AB的天然结合配偶体的经修饰的形式；并且(b)其中，处于未裂解、非活化状态时，所述MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合，并且处于裂解、活化的状态时，所述MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合；以及(ii)测量所述受试者或样品中活化的AA的水平，其中所述受试者或样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或样品中存在裂解剂，并且其中在所述受试者或样品中无可检测水平的活化的AA表明裂解剂在所述受试者或样品中不存在和/或不充足地存在。在一些实施方案中，所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中，所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平，其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中，所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0410] 本公开还提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法：(i)使受试者或样品与可活化抗体接触，其中所述AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如，蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)、特异性地结合所述靶标的抗原结合结构域(AB)以及可检测标记，其中处于未裂解、非活化状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM；其中MM是抑制所述AB与所述靶标的结合的肽，并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列，并且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式；其中，处于未裂解、非活化状态时，所述MM干扰AB与靶标的特异性结合，并且处于裂解、活化的状态时，所述MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合；并且其中所述可检测标记位于AA的在CM裂解后释放的一部分上；以及(ii)测量所述受试者或样品中活化的可检测标记的水平，其中所述受试者或样品中可检测水平的所述可检测标记指示裂解剂在所述受试者或样品中存在和/或不充足地存在，并且其中在所述受试者或样品中无可检测水平的所述可检测标记表明在所述受试者或样品中存在裂解剂。在一些实施方案中，所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中，所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平，其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中，所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0411] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中的药盒，其中所述药盒至少包括本文所述的用于接触受试者或生物样品的AA和/或缀合的AA(例如，与治疗剂缀合的AA)和用于检测所述受试者或生物样品中活化的AA和/或缀合的AA的水平的装置，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或生物样品中存在所述裂解剂和所述靶标，并且其中在所述受试者或生物样品中无可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂、所述靶标或所述裂解剂和所述靶标两者在所述受试者或生物样品中均不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的靶标结合和/或蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到。

[0412] 本公开还提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法:(i)在靶标存在下使受试者或生物样品与AA接触,以及(ii)测量所述受试者或生物样品中活化的AA的水平,其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或生物样品中存在所述裂解剂,并且其中所述受试者或生物样品中无可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂在所述受试者或生物样品中在可检测水平下不存在和/或不充足地存在,使得AA的蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到。这种AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)和特异性地结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中处于未裂解(即非活化)状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中所述MM是抑制所述AB与靶标的结合的肽,并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中处于未裂解状态的AA的MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合,并且其中处于裂解(即活化)状态的AA的MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合。在一些实施方案中,所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中,所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中,可检测标记附接至掩蔽部分。在一些实施方案中,可检测标记附接至蛋白酶裂解位点的CM N-末端。在一些实施方案中,所述AB的单一抗原结合位点被掩蔽。在本公开的抗体具有至少两个抗原结合位点的一些实施方案中,至少一个抗原结合位点被掩蔽,并且至少一个抗原结合位点未被掩蔽。在一些实施方案中,所有抗原结合位点均被掩蔽。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。

[0413] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中的药盒,其中所述药盒至少包括用于在靶标存在下使受试者或样品与AA接触的本文所述的AA和/或缀合的AA,以及测量所述受试者或生物样品中活化的AA的水平,其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示所述受试者或生物样品中存在所述裂解剂,并且其中所述受试者或生物样品中无可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂在所述受试者或生物样品中在可检测水平下不存在和/或不充足地存在,使得AA的蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到。这种AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂(例如蛋白酶)裂解的可裂解部分(CM)和特异性地结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中处于未裂解(即非活化)状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM;(a)其中所述MM是抑制所述AB与靶标的结合的肽,并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中处于未裂解状态的AA的MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合,并且其中处于裂解(即活化)状态的AA的MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合。在一些实施方案中,所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中,所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中,可检测标记附接至掩蔽部分。在一些实施方案中,可检测标记附接至蛋白酶裂解位点的CM N-末端。在一些实施方案中,所述AB的单一抗原结合位点被掩蔽。在本公开的抗体具有至少两个抗原结合位点的一些实施方案中,至少一个抗原结合位点被掩蔽,并且至少一个抗原结合位点未被掩蔽。在一些实施方案中,所有抗原结合位点均被掩蔽。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。

[0414] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法中的药盒,其中所述药盒至少包括用于接触受试者或生物样品的本文所述的AA和/或缀合的AA和用于检测所述受试者或生物样品中的活化的AA和/或缀合的AA的水平的装置,其中所述AA

包含位于AA的在CM裂解后释放的一部分上的可检测标记，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示裂解剂在所述受试者或生物样品中不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的靶标结合和/或蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到，并且其中所述受试者或生物样品中无可检测水平的活化的AA指示裂解剂以可检测水平存在于所述受试者或生物样品中。

[0415] 本公开提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法：(i)使受试者或生物样品与可活化抗体接触，其中所述AA包含位于AA的在CM裂解后释放的一部分上的可检测标记，以及(ii)测量所述受试者或生物样品中活化的AA的水平，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂、所述靶标或所述裂解剂和所述靶标两者在所述受试者或生物样品中不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的靶标结合和/或蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到，并且其中所述受试者或生物样品中降低的可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂和所述靶标存在于所述受试者或生物样品中。可检测标记的降低的水平是例如，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％。这种AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂裂解的可裂解部分(CM)和特异性地结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB)，其中处于未裂解(即非活化)状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM；(a)其中所述MM是抑制所述AB与靶标的结合的肽，并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列；并且(b)其中处于未裂解状态的AA的MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合，并且其中处于裂解(即活化)状态的AA的MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合。在一些实施方案中，所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中，所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平，其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中，所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0416] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中的药盒，其中所述药盒至少包括用于接触受试者或生物样品的本文所述的AA和/或缀合的AA以及用于检测所述受试者或生物样品中活化的AA和/或缀合的AA的水平的装置，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的活化的AA指示指示所述裂解剂、所述靶标或所述裂解剂和所述靶标两者在所述受试者或生物样品中不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的靶标结合和/或蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到，并且其中所述受试者或生物样品中降低的可检测水平的活化的AA指示所述裂解剂和所述靶标存在于所述受试者或生物样品中。可检测标记的降低的水平是例如，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％。

[0417] 本公开还提供了通过以下方式来检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法：(i)使受试者或生物样品与可活化抗体接触，其中所述AA包含位于AA的在CM裂解后释放的一部分上的可检测标记；以及(ii)测量所述受试者或生物样品中活化的可检测标记的水平，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记指示所述裂解剂在所述受试

者或生物样品中在可检测水平线不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到，并且其中所述受试者或生物样品中降低的可检测水平的可检测标记指示所述裂解剂存在于所述受试者或生物样品中。可检测标记的降低的水平是例如，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％。这种AA包含掩蔽部分(MM)、通过裂解剂裂解的可裂解部分(CM)和特异性地结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB)，其中处于未裂解(即非活化)状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列：MM-CM-AB或AB-CM-MM；(a)其中所述MM是抑制所述AB与靶标的结合的肽，并且其中所述MM不具有所述AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列；并且(b)其中处于未裂解状态的AA的MM干扰所述AB与所述靶标的特异性结合，并且其中处于裂解(即活化)状态的AA的MM不干扰或竞争所述AB与所述靶标的特异性结合。在一些实施方案中，所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中，所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平，其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中，所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0418] 本公开还提供了用于检测受试者或样品中目标裂解剂的存在或不存在的方法中的药盒，其中所述药盒至少包括用于接触受试者或生物样品的本文所述的AA和/或缀合的AA以及用于检测所述受试者或生物样品中活化的AA和/或缀合的AA的水平的装置，其中所述AA包含位于AA的在CM裂解后释放的一部分上的可检测标记，其中所述受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记指示所述裂解剂、所述靶标或所述裂解剂和所述靶标两者在所述受试者或生物样品中不存在和/或不充足地存在，使得所述AA的靶标结合和/或蛋白酶裂解不能在所述受试者或生物样品中检测到，并且其中所述受试者或生物样品中降低的可检测水平的可检测标记指示所述裂解剂和所述靶标存在于所述受试者或生物样品中。可检测标记的降低的水平是例如，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％。

[0419] 在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述可检测标记包括显像剂、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。在这些方法和药盒的一些实施方案中，显像剂包括放射性同位素。在这些方法和药盒的一些实施方案中，放射性同位素是铟或锝。在这些方法和药盒的一些实施方案中，造影剂包括碘、钆或氧化铁。在这些方法和药盒的一些实施方案中，酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在这些方法和药盒的一些实施方案中，荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在这些方法和药盒的一些实施方案中，发光标记包括N-甲基吖啶鎓衍生物。在这些方法的一些实施方式中，标记包括Alexa Fluor®标记，如Alex Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在这些方法和药盒的一些实施方案中，基于配体的标记包括生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或一种或多种半抗原。

[0420] 在这些方法和药盒的一些实施方案中，受试者是哺乳动物。在这些方法和药盒的

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，如非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物。在一些实施方案中，受试者是啮齿动物。

[0421] 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。

[0422] 在一些实施方案中，原位成像和/或体内成像在鉴定治疗哪些受试者的方法中有用。例如，在原位成像中，AA用于筛查受试者样品，以鉴定在适当位置(例如在肿瘤部位)具有适当蛋白酶和靶标的那些受试者。

[0423] 在一些实施方案中，原位成像用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的AA治疗的受试者群体。例如，对靶标(例如，靶标)和裂解所测试的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性(例如，在疾病部位积聚活化的抗体)的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。同样，对于靶标(例如靶标)和裂解使用这些方法所测试的AA中的CM中的底物的蛋白酶中的任一者或两者测试呈阴性的受试者可被鉴定为另一种形式的疗法的适合候选者。在一些实施方案中，可用包含不同CM的其它AA来测试相对于第一AA测试呈阴性的此类受试者，直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如，包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。在一些实施方案中，然后向所述受试者施用治疗有效量的AA，所述受试者针对所述AA测试呈阳性。

[0424] 在一些实施方案中，体内成像用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的AA治疗的受试者群体。例如，对靶标(例如，靶标)和裂解所测试的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性(例如，在疾病部位积聚活化的抗体)的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。同样，测试呈阴性的受试者可被鉴定为另一种疗法的适合候选者。在一些实施方案中，可用包含不同CM的其它AA来测试相对于第一AA测试呈阴性的此类受试者，直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如，包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。在一些实施方案中，然后向所述受试者施用治疗有效量的AA，所述受试者针对所述AA测试呈阳性。

[0425] 在所述方法和药盒的一些实施方案中，所述方法或药盒用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的AA治疗的受试者群体。例如，对靶标(例如，靶标)和裂解在这些方法中测试的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。同样，对于靶标(例如靶标)和裂解使用这些方法所测试的AA中的CM中的底物的蛋白酶两者测试呈阴性的受试者可被鉴定为另一种形式的疗法的适合候选者。在一些实施方案中，可用其它AA测试此类受试者，直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如，包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。在一些实施方案中，对任一靶标(例如，靶标)测试呈阴性的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。在一些实施方案中，对任一靶标(例如，靶标)测试呈阴性的受试者被鉴定为不是用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。在一些实施方案中，可用其它AA测试此类受试者，直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如，包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。在一些实施方案中，所述AA是与治疗剂缀合的AA。在一些实施方案中，所述AA不与剂缀合。在一些实施方案中，所述AA包含可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记位于AB上。在一些实施方案中，使用特异性地结合至活化的抗体的第二试剂来完成测量受试者或样品中的AA的水平，其中所述试剂包

含可检测标记。在一些实施方案中，所述第二试剂是包含可检测标记的抗体。

[0426] 在一些实施方案中，使用方法或药盒来鉴定或以其它方式细化适合用本公开的抗靶标AA和/或缀合的AA(例如，与治疗剂缀合的AA)治疗的受试者群体，随后通过将所述AA和/或缀合的AA施用至有需要的受试者来进行治疗。例如，对靶标(例如靶标)和裂解在这些方法中测试的AA和/或缀合的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性的受试者被鉴定为用这种抗体和/或包含这种CM的这种缀合的AA治疗的适合候选者，并且然后向所述受试者施用治疗有效量的经测试的AA和/或缀合的AA。同样，对于靶标(例如靶标)和裂解使用这些方法所测试的AA中的CM中的底物的蛋白酶中的任一者或两者测试呈阴性的受试者可被鉴定为另一种形式的疗法的适合候选者。在一些实施方案中，可用其它抗体和/或缀合的AA测试此类受试者，直到鉴定出用于治疗的适合抗体和/或缀合的AA(例如，包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA和/或缀合的AA)。在一些实施方案中，然后向所述受试者施用治疗有效量的AA和/或缀合的AA，所述受试者针对所述AA和/或缀合的AA测试呈阳性。

[0427] 在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述MM是具有约4至40个氨基酸的长度的肽。在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述AA包含接头肽，其中所述接头肽位于MM与CM之间。在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述AA包含接头肽，其中所述接头肽位于AB与CM之间。在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述AA包含第一接头肽(LP1)和第二接头肽(LP2)，其中所述第一接头肽位于MM与CM之间，并且第二接头肽位于AB与CM之间。在这些方法和药盒的一些实施方案中，LP1和LP2各自是长度约1至20个氨基酸的肽，并且其中LP1和LP2各自不必是相同的接头。在这些方法和药盒的一些实施方案中，LP1和LP2中的一者或两者包含甘氨酸-丝氨酸聚合物。在这些方法和药盒的一些实施方案中，LP1和LP2中的至少一者包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：(GS)n、(GSGGS)n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)n(SEQ ID NO:2)，其中n是至少一的整数。在这些方法和药盒的一些实施方案中，LP1和LP2中的至少一者包含具有式(GGS)n的氨基酸序列，其中n是至少一的整数。在这些方法和药盒的一些实施方案中，LP1或LP2中的至少一者包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：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)以及Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:8)。

[0428] 在这些方法和药盒的一些实施方案中，AB包含选自本文提出的交叉反应性抗体序列的抗体或抗体片段序列。在这些方法和药盒的一些实施方案中，AB包含Fab片段、scFv或单链抗体(scAb)。

[0429] 在这些方法和药盒的一些实施方案中，裂解剂是与靶标共定位在受试者或样品中的蛋白酶，并且CM是充当蛋白酶的底物的多肽，其中当AA暴露于蛋白酶时，所述蛋白酶裂解所述AA中的CM。在这些方法和药盒的一些实施方案中，所述CM是长度至多15个氨基酸的多肽。在这些方法和药盒的一些实施方案中，CM偶联至AB的N-末端。在这些方法和药盒的一些实施方案中，CM偶联至AB的C-末端。在这些方法和药盒的一些实施方案中，CM偶联至AB的VL链的N-末端。

[0430] 本公开的抗体、缀合的抗体、AA和缀合的AA用于诊断和预防制剂中。在一个实施方案中，将AA施用至处于患上上述炎症、炎性疾病、癌症或其它病症中的一种或多种的风险的受试者。

[0431] 可使用基因型、血清学或生物化学标记物来确定受试者或器官对一种或多种上述病症的易感性。

[0432] 在本公开的一些实施方案中，将AA和/或缀合的AA施用至被诊断具有与一种或多种上述病症相关的临床适应症的人个体。在诊断后，施用AA和/或缀合的AA以减轻或逆转临床适应症的效应。

[0433] 本公开的抗体、缀合的抗体、AA和缀合的AA也可用于检测受试者样品中的靶标，并且因此可用作诊断剂。例如，本发明的抗体、缀合的抗体、AA和缀合的AA用于体外测定(例如ELISA)以检测受试者样品中的靶标水平。

[0434] 在一个实施方案中，将本公开的抗体和/或AA固定在固体载体(例如，微量滴定板的孔)上。固定的抗体和/或AA充当测试样品中可能存在的任何靶标的捕获抗体。在使固定的抗体和/或AA与受试者样品接触之前，冲洗固相载体并用封闭剂如乳蛋白或白蛋白处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0435] 随后，用疑似含有抗原的测试样品或含有标准量的抗原的溶液处理所述孔。这种样品是，例如，来自疑似具有被认为是病理学的诊断的循环抗原水平的受试者的血清样品。在冲洗掉测试样品或标准液后，用可检测标记的第二抗体处理固体载体。标记的第二抗体充当检测抗体。测量可检测标记的水平，并且通过与从标准样品绘制的标准曲线进行比较来确定测试样品中靶抗原的浓度。

[0436] 应了解，基于使用本公开的抗体和/或AA获得的结果，在体外诊断测定中，有可能基于靶抗原的表达水平在受试者中进行疾病分期。对于给定疾病，从被诊断为处于疾病进展的各个阶段和/或在疾病的治疗性治疗中的各个点的受试者中采集血液样品。使用对于进展或治疗的每个阶段均提供统计学显著结果的样品群体，确定了可被视为每个阶段的特征的抗原浓度范围。

[0437] 抗体、缀合的抗体、AA和缀合的AA也可用于诊断和/或成像方法中。在一些实施方案中，此类方法是体外方法。在一些实施方案中，此类方法是体内方法。在一些实施方案中，此类方法是原位方法。在一些实施方案中，此类方法是离体方法。例如，具有可酶促裂解的CM的AA可用于检测是否存在能够裂解CM的酶。此类AA可用于诊断中，其可包括通过测量给定宿主生物体的给定细胞或组织中的活化的抗体(即，由可活化抗体的裂解产生的抗体)的累积体内检测(例如，定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中，具有增加的还原电位的环境，如可提供二硫键还原的环境)。活化的抗体的这种累积不仅指示所述组织表达酶活性(或取决于CM的性质的还原电位增加)，而且表明组织表达活化的抗体所结合的靶标。

[0438] 例如，可选择CM作为在肿瘤部位、在病毒或细菌感染的部位、在生物学上受限的部位(例如，如在脓肿、器官中)等发现的蛋白酶的蛋白酶底物。AB可以是结合靶抗原的AB。使用本领域技术人员熟悉的方法，可将可检测标记(例如，荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合至可活化抗体的AB或其它区域。在上述筛查方法的背景下讨论了适合的可检测标记，并且在下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的AB以及在目标疾病组织中活性升高的蛋白酶，AA将表现出相对于CM特异性酶不以可检测水平存在或与患病组织相比以较低水平存在或无活性(例如，以呈酶原形式或与抑制剂复合)的组织，与疾病组织的结合率提高。由于肾脏过滤系统从血液中迅速清除小蛋白质和多肽，并且因为对CM具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

者以无活性构象存在)，所以相对于非疾病组织，活化的抗体在疾病组织中的累积增强。

[0439] 在另一个实例中，AA可用于检测样品中裂解剂的存在或不存在。例如，在AA含有易于被酶裂解的CM的情况下，可将AA用于检测(定性或定量)样品中酶的存在。在另一个实例中，在AA含有易于被还原剂裂解的CM时，所述AA可用于(定性或定量地)检测样品中还原条件的存在。为了有助于这些方法中的分析，可对AA进行可检测标记，并且可将AA结合至载体(例如固体载体，如载玻片或珠粒)上。可检测的标记可位于裂解后不释放的AA的一部分上，例如，可检测标记可以是淬灭的荧光标记或在裂解发生之前不可检测的其它标记。可通过例如，使固定的、可检测标记的AA与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以进行裂解的时间，然后洗涤以除去过量的样品和污染物来进行测定。然后通过在与样品接触之前通过AA的可检测信号的变化(例如，由于样品中裂解剂裂解AA所致的可检测信号的存在和/或增加)来评估样品中裂解剂(例如酶或还原剂)的存在或不存在。

[0440] 此类检测方法可适于还提供对能够在裂解时结合AA的AB的靶标的存在或不存在的检测。因此，所述测定可适于评估裂解剂的存在或不存在以及目标靶标的存在或不存在。如上所述，可通过AA的可检测标记的存在和/或增加来检测裂解剂的存在或不存在，并且可通过例如使用可检测标记的抗靶标抗体检测靶标-AB复合物来检测靶标的存在或不存在。

[0441] AA还可用于原位成像，以例如通过蛋白酶裂解和与特定靶标的结合来验证AA活化。原位成像是能够在生物样品(如细胞培养物或组织切片)中定位蛋白水解活性和靶标的技术。使用这种技术，有可能基于可检测标记(例如，荧光标记)的存在来确认与给定靶标的结合和蛋白水解活性。

[0442] 这些技术对于来源于疾病部位的任何冷冻细胞或组织(例如肿瘤组织)或健康组织都是有用的。这些技术对于新鲜的细胞或组织样品也有用。

[0443] 在这些技术中，用可检测标记来标记AA。可检测标记可以是荧光染料(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸若丹明(TRITC))、近红外(NIR)染料(例如，Qdot®纳米晶体)、胶体金属、半抗原、放射性标记、生物素和扩增试剂(如链霉抗生物素蛋白)或酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0444] 在已与标记的AA一起孵育的样品中检测到标记表明所述样品含有靶标且含有对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中，可使用广谱蛋白酶抑制剂(如本文所述的那些)和/或通过使用对蛋白酶具有特异性的剂例如诸如A11的抗体(其对蛋白酶蛋白裂解酶具有特异性并且抑制蛋白裂解酶的蛋白水解活性)来确认蛋白酶的存在;参见例如，国际公布号WO 2010/129609，于2010年11月11日公布。使用广谱蛋白酶抑制剂(如本文所述的那些)和/或通过使用选择性更强的抑制剂的相同方法可用于鉴定对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶或蛋白酶的类别。在一些实施方案中，可使用对靶标具有特异性的剂(例如另一种抗体)来确认靶标的存在，或者可将可检测标记与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中，可使用未标记的AA，通过标记的第二抗体或更复杂的检测系统进行检测。

[0445] 类似的技术也可用于体内成像，其中在受试者(例如，哺乳动物，包括人)中检测到荧光信号表明疾病部位含有靶标，并且含有对可活化抗体的CM具有特异性的蛋白酶。

[0446] 这些技术还可用于药盒和/或作为用于检测的试剂，基于可活化抗体中的蛋白酶特异性CM，鉴定或表征多种细胞、组织和生物体中的蛋白酶活性。

[0447] 在一些实施方案中，原位成像和/或体内成像在鉴定治疗哪些受试者的方法中有

用。例如,在原位成像中,AA用于筛查受试者样品,以鉴定在适当位置(例如在肿瘤部位)具有适当蛋白酶和靶标的那些受试者。

[0448] 在一些实施方案中,原位成像用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的AA治疗的受试者群体。例如,对靶标和裂解所测试的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性(例如,在疾病部位积聚活化的抗体)的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。同样,对于靶标和裂解使用这些方法所测试的AA中的CM中的底物的蛋白酶中的任一者或两者测试呈阴性的受试者被鉴定为另一种形式的疗法的适合候选者(即,不适合于用所测试的AA治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它AA来测试相对于第一AA测试呈阴性的此类受试者,直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如,包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。

[0449] 在一些实施方案中,体内成像用于鉴定或以其它方式细化适合用本公开的AA治疗的受试者群体。例如,对靶标和裂解所测试的AA的CM(CM)中的底物的蛋白酶两者测试呈阳性(例如,在疾病部位积聚活化的抗体)的受试者被鉴定为用包含这种CM的这种AA治疗的适合候选者。同样地,测试为阴性的受试者被鉴定为另一种形式的治疗的合适候选者(即,不适合用所测试的AA治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它AA来测试相对于第一AA测试呈阴性的此类受试者,直到鉴定出用于治疗的适合AA(例如,包含在疾病部位被受试者裂解的CM的AA)。

[0450] 药物组合物

[0451] 本公开的AA和缀合的AA(在本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同系物可并入适于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含AA和/或缀合的AA以及药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”意图包括与药物施用相容的任何以及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸收延缓剂等。本领域中的标准参考文本Remington's Pharmaceutical Sciences的最新版本中描述了合适的载体,该文献以引用的方式并入本文中。此类载体或稀释剂的任适合的实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液以及5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介物,如不挥发性油类。用于药物活性物质的此类介质和剂的使用是本领域中熟知的。除非任何常规的介质或试剂与活性化合物不相容,否则其在组合物中的使用被涵盖在内。辅助活性化合物也可以并入组合物中。

[0452] 本公开的药物组合物被配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括胃肠外,例如静脉内、真皮内、皮下、经口(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜和经直肠施用。在一个示例性实施方案中,施用途径是静脉内。

[0453] 用于肠胃外、皮内或皮下用药的溶液或混悬液可包括以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、生理盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调整张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱,如盐酸或氢氧化钠调节pH。胃肠外制剂可封闭在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0454] 适于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在可溶于水的情况下)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载体包括

生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,所述组合物必须为无菌的且应为流体从而存在容易的可注射性。在制造和储存条件下,所述组合物必须稳定且必须在贮存中防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其合适混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。防止微生物的作用可通过不同的抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在一些实施方案中,将期望在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的剂(例如单硬脂酸铝和明胶)而使可注射组合物的吸收延长。

[0455] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物(根据需要)与以上列举的成分中的一种或其组合一起并入适当溶剂中,随后过滤灭菌来制备。总体上,分散液通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备,所述无菌媒介物含有基本分散介质以及来自以上列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,此举产生活性成分加来自其前述无菌过滤溶液的任何另外所需成分的粉末。

[0456] 经口组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可封闭在明胶胶囊中或压制成片剂。出于经口治疗性施用的目的,活性化合物可与赋形剂合并且以片剂、锭剂或胶囊形式使用。也可使用流体载体制备用作漱口剂的经口组合物,其中于流体载体中的化合物经口施用且漱口并吐出或吞咽。可包含药学上相容的粘合剂和/或佐剂物质作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有任何以下成分或具有类似性质的化合物:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、羟基乙酸淀粉钠(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;增甜剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

[0457] 对于通过吸入施用,化合物是以气雾剂喷雾形式递送,所述气雾剂来自压力容器或含有适合推进剂(例如,气体,如二氧化碳)的分配器,或喷雾器。

[0458] 全身性施用也可通过经粘膜或经皮手段来进行。对于经粘膜或经皮施用,适合于待渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且例如对于经粘膜施用,包括清洁剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。可通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现经粘膜施用。对于经皮施用,将活性化合物配制成本领域中通常已知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂或霜剂。

[0459] 化合物也可被制备成栓剂(例如,利用常规的栓剂基质,如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂形式以用于直肠递送。

[0460] 在一个实施方案中,活性化合物是用将保护化合物免于从身体迅速消除的载体制备,如控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用可生物降解的、生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯以及聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域的技术人员将是清楚的。材料也可从Alza公司和Nova制药公司购买得到,脂质体悬浮液(包括靶向受感染细胞的具有针对病毒抗原的单克隆抗体的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些都可根据本领域技术人员已知的方法,例如像美国专利号

4,522,811中所述的方法来制备。

[0461] 尤其有利的是将经口或胃肠外组合物配制成剂量单位形式,以便于施用和剂量均匀性。如本文使用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;各单位含有经计算在与所需药物载体缔合的情况下可产生所需治疗作用的预定量的活性化合物。本公开的剂量单位形式的规格由以下因素支配且直接取决于以下因素:活性化合物的独特特征以及待实现的特定治疗作用,以及调配这种活性化合物以用于治疗个体的领域中固有的限制。

[0462] 药物组合物可与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0463] 剂量

[0464] 如本文所提供的,向受试者以约1ng/kg至100g/kg的任何剂量施用AA或缀合的AA。在示例性实施方案中,向受试者以约0.25mg/kg至约6mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在一个实施方案中,向受试者以约0.25mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约0.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约1mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约2mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约3mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约4mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约6mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约0.25mg/kg至约0.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约0.5mg/kg至约1mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约0.75mg/kg至约1.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约1mg/kg至约2mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约1.5mg/kg至约2.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约2mg/kg至约3mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约2.5mg/kg至约3.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约3mg/kg至约4mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约3.5mg/kg至约4.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约4mg/kg至约5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约4.5mg/kg至约5.5mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约5mg/kg至约6mg/kg的剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约10mg至约200mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约25mg至约500mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约10mg至约25mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约20mg至约50mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约30mg至约75mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约40mg至约100mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约60mg至约150mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约80mg至约200mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约100mg至约250mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约120mg至约300mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约140mg至约350mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实

施方案中,向受试者以约160mg至约400mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,向受试者以约180mg至约450mg的固定剂量施用AA或缀合的AA。在另一个实施方案中,以约200mg至约500mg的固定剂量向受试者施用AA或缀合的AA。

[0465] 在一些实施方案中,基于受试者的体重向所述受试者施用缀合的AA。

[0466] 在一些实施方案中,向受试者施用缀合的AA,其中当以mg/kg测量时,剂量是基于受试者的实际体重。

[0467] 在一些实施方案中,向受试者施用缀合的AA,其中当以mg/kg测量时,剂量是基于受试者的经调整的理想体重(AIBW)。在一些实施方案中,基于给定受试者的实际体重与对应于所述受试者的男性和女性受试者的预定理想体重(IBW)之间的差异来计算经调整的理想体重。在一些实施方案中,给定受试者的理想体重是基于受试者的身高。在一些实施方案中,以千克计的给定男性受试者的理想体重(IBW)被确定为IBW＝0.9x(身高(cm))-88,并且以千克计的给定女性受试者的IBW被确定为IBW＝0.9x身高(cm))-92。在一些实施方案中,以千克计的给定受试者的经调整的理想体重(AIBW)由AIBW＝IBW+0.4x(实际体重-IBW)确定,其中IBW是基于他们的给定身高和性别。在一些实施方案中,男性和女性受试者是人受试者。在一些实施方案中,人受试者的AIBW是约40kg至约100kg。

[0468] 在一些实施方案中,每天、每2天、每3天、每4天、每5天、每6天、每7天、每8天、每9天、每10天、每11天、每12天、每13天、每14天、每15天、每16天、每17天、每18天、每19天、每20天、每21天或甚至每30天向受试者静脉内施用AA或缀合的AA。在一些实施方案中,向受试者静脉内施用AA或缀合的AA持续AA和/或剂有效的时间。

[0469] 在一些实施方案中,每天一次向受试者施用AA或缀合的AA。在一些实施方案中,每天多次(例如每4小时、每6小时、每4-6小时、每8小时或每12小时)向受试者施用AA或缀合的AA。

[0470] 本发明将在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制权利要求书中所述的本发明范围。

[0471] 实施例

[0472] 实施例1:结合CD166的缀合的可活化抗体的产生和测试

[0473] 在本文中提供在下文阐述的实施例中使用的AA,并且使用PCT公布号WO 2016/179285中公开的方法来产生和表征所述AA,所述PCT公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0474] 可活化的抗CD166抗体药物缀合物(AADC)(描绘于图1中)在具有人异种移植肿瘤的小鼠模型中展示抗肿瘤活性,并且在临床前研究中良好耐受(Weaver等人AACR-NCI-EOTRC International Conference 2015)。如图2、表4和表5所示,CD166在许多癌症和健康组织中广泛表达。

[0475] 表4

[0476]

癌症类型	CD166表达的发生率(IHC≥2+)，%	CD166阴性的发生率(IHC<1+)，%	检查的病例的数量
胆道癌(胆管癌)	56.5	11.9	177
乳腺癌	87.1	1.7	533
子宫内膜癌	75.2	6.0	315
头颈癌	81.1	0.8	122
肺癌	71.0	8.2	465
前列腺癌	98.3	0.8	119
卵巢癌	70.5	3.9	129

[0477] 表5

[0478] 通过IHC得到的健康人组织中的CD166表达

[0479]

组织类型	人CD166表达	组织类型	人CD166表达
肾上腺	-/+	神经	+/++
骨髓	-/+	卵巢	-/++
乳腺	+/++	胰腺	++/+++
脑，大脑	-/+	前列腺	++/+++
脑，小脑	-/+	皮肤	+/++
宫颈	+/++	小肠	+/+++
结肠	++	脾脏	+/++
食道	+/++	胃	+++
眼睛	+	横纹肌/骨骼肌	-/+
心脏	+	睾丸	-/++
肾脏	+/+++	甲状腺	++/+++
喉	+/++	胸腺	+
肝脏	++	子宫	+/+++
肺	+/++		

[0480] 图3-6示出本发明的CD166 AA药物缀合物在人异种移植肿瘤的小鼠模型中以等于或低于预测的人剂量的剂量产生了完全且持久的应答。

[0481] 实施例2:用于确定可活化的抗CD166抗体药物缀合物在患有高表达CD-166的肿瘤的受试者中的安全性的开放标签、多中心剂量递增研究

[0482] 在这项研究中,评估了作为患有高表达CD166的肿瘤(乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、头颈癌和胆道癌)的受试者中的单一疗法施用的可活化的抗CD166抗体药物缀合物的安全性、最大耐受剂量(MTD)、推荐的2期剂量(RP2D)、剂量限制性毒性和初步抗肿瘤活性的主要终点。

[0483] 次要终点包括:(1)根据实体瘤的应答评价标准(RECIST)版本1.1或肿瘤特异性标准(如果适用)测量客观应答率;(2)应答时间;(3)应答的持续时间;(4)无进展存活期;(5)总体存活期;(6)AADC的药代动力学概况,包括分析完整AADC、总AADC、总AADC缀合的DM4、游

离DM4和S-甲基DM4;以及(7)抗药物抗体形成的发生率。

[0484] 另外的终点包括(1)在接受治疗前和接受治疗时在肿瘤标本中鉴定与AADC的临床活性相关的预测性生物标志物,如CD166表达和有丝分裂标志物(例如Ki-67);和(2)分别表征治疗中肿瘤活检样品和外周血中的蛋白酶活性和ADCC的活化。

[0485] 此实施例中的研究是抗CD166 AADC的开放标签、多中心剂量递增和概念验证1/2期研究,其中抗CD166 AADC包含抗CD166可活化抗体的DM4缀合的可活化抗体,在本文中称为组合55,其包含SEQ ID NO:480的重链序列和SEQ ID NO:246的轻链序列。

[0486] 所述研究包括患有乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌(CPRC)、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和非小细胞肺癌(NSCLC)的受试者。每21天用可活化的抗CD166抗体药物缀合物对受试者进行静脉内治疗,并且研究在以下两个部分(A部分和B部分)中进行。研究设计也在图6中示出。

[0487] 在A部分(剂量递增)(n≤50)中,所施用的抗CD166 ADCC的加速剂量滴定之后是传统的3+3设计。3+3设计描述如下:用第一剂量的抗CD166 AADC治疗3名受试者,并且注意不良反应。如果未观察到毒性,则增加剂量并且治疗另外三名受试者。如果3名受试者中的1名表现出毒性,则以所述第一剂量招募3名另外受试者。如果第2至3名受试者显示毒性,则将所述剂量表示为最大耐受剂量(描述于https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684552/)中。进行这项研究来确定MTD,并且以在MTD下处理的经修改的毒性概率区间2(mTPI-2)-设计群组结束以确定RP2D。

[0488] 所述研究的B部分(剂量扩展)是在7种肿瘤类型中(各自至多14名受试者,n≤98)在RP2D下施用的抗CD166 AADC的剂量扩展期测试。

[0489] 处理受试者直到进展;治疗持续时间是约6个月,每3至6个月或持续另外1或2年或只要受试者活着就进行随访接触。

[0490] 在剂量递增和扩展群组中,在所述研究中招募至多150名受试者。表6中示出所述受试者的关键资格标准。

[0491] 表6

[0492]

部分 A	• 年龄≥18 岁 • 东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态 0-1 • 任何活动性转移性或局部晚期不可切除的实体瘤的组织学上确认的诊断 • 同意在开始抗 CD166 AADC 之前提供肿瘤组织(存档、新的或最近获取) • ≥3 个月的预期寿命
部分 B	• 至少 7 名受试者(每种肿瘤类型至少 1 名)同意，以提供基线和研究中肿瘤活检样品(如果可安全地进行活检)和外周血样品
乳腺癌	• 患有表达雌激素受体(ER+)的乳腺癌的受试者应已经接受抗激素疗法并经历疾病进展 • TNBC 接受了≥2 种先前线疗法
去势抵抗性前列腺癌	• 接受了≥1 种先前疗法
胆管癌	• ≥1 种先前线的含吉西他滨的方案失败
子宫内膜癌	• 接受了≥1 种用于子宫外或晚期疾病的含铂方案
上皮性卵巢癌	• 非乳腺癌(BRCA)突变(种系或体细胞)受试者或具有未知 BRCA 突变状态的受试者必须患有铂耐药性或铂难治性卵巢癌 • 具有 BRCA 突变的受试者必须是 PARP 抑制剂难治性的或在其它方面不适合用 PARP 抑制剂
HNSCC	• 如果批准用于受试者的适应症和地区，则接受了≥1 种含铂方案和 PD-1/PD-L1 抑制剂
NSCLC	• 接受了≥1 种含铂方案 • 如果在受试者的地区批准用于受试者的适应症，则应施用了检查点抑制剂
排除标准	• 活动性或慢性角膜病症、角膜移植史、活动性疱疹性角膜炎和需要持续治疗/监测的活动性眼病疾患 • 严重的并发疾病，包括临床上相关的活动性感染 • 活动性自身免疫疾病的病史或当前活动性

[0493]

	自身免疫疾病 • 重大心脏病，如最近的心肌梗塞 • 多发性硬化症或其它脱髓鞘疾病的病史，伊顿-兰伯特综合征(副肿瘤综合征)，最近6个月内出血或缺血性中风的病史或酒精性肝病； • 不愈合的伤口或溃疡，除了由潜在的肿瘤引起的溃疡性病变； • 对先前单克隆抗体疗法有严重过敏或过敏反应的病史； • 目前正在接受使用华法林的抗凝疗法； • 在给药前 3 个月内进行大手术(需要全身麻醉)。

[0494] 在剂量递增和扩展群组中，在所述研究中招募至多150名受试者。在抗CD166 AADC周期1的第1天、第8天和第15天评估不良事件和伴随用药，然后在治疗结束时在每个后续治疗周期的第一天进行评价。在筛查、每个治疗周期的第一天和治疗结束时进行眼部症状和ECOG体能评分的评估。在筛查和研究的某些点期间，对所有受试者进行全面的眼科检查。报告视力或其它眼部症状的治疗突然变化的受试者将在每隔一个周期并按照临床指示在输注之前进行重复检查。在每次治疗访问评价血液学和血清化学。在基线处为参加A部分的受试者提供存档组织或新鲜活检样品。在B部分中，治疗前和治疗中活检以及外周血样品的收集(部分是为了确定可活化抗体的完整性)对于至少7名受试者将是强制性的，每种肿瘤类型1名。在一些情况下，收集来自每种肿瘤类型的多于1名受试者的活检，例如，对于每种肿瘤类型收集2、3、4、5、6、7或更多名受试者的活检。在预先指定的时间点获得用于药代动力学、药效学和生物标志物分析的血液样品。从抗CD166 AADC的第一剂量开始，每8周进行成像用于肿瘤应答评估。在最后一个剂量的研究药物后，第一年每3个月评价受试者，且然后每6个月评价受试者或直到死亡。

[0495] 表7和图7A、7B中列出用于评价药物可活化抗CD166抗体药物缀合物活化和活性的若干另外方法。

[0496] 表7

[0497]

目标	样品	测定	方法
确定可活化的抗CD166 抗体药物缀合物的活化	活检，血浆	WES™测定	毛细管电泳与免疫检测以鉴定掩蔽的和活化的AADC
	活检	QZ™测定	蛋白酶活性检测
标志物与可活化的抗 CD166 抗体药物缀合物活性的相关性	活检	IHC	CD166表达，Ki-67

[0498] 实施例3.生物样品中活化的和完整的抗CD166可活化抗体的定量

[0499] 此实施例描述在施用7614.6-3001-HuCD166的小鼠的血浆和异种移植肿瘤样品中检测活化的和完整的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166的能力。

[0500] 本文提出的研究使用本文称为7614.6-3001-HuCD166(也称为HuCD166-7614.6-3001)的抗CD166可活化抗体,其包含SEQ ID NO:480的重链序列和SEQ ID NO:246的轻链序列。

[0501] 使用抗人IgG抗体(抗人IgG(H&L),American Qualex目录号A110UK)通过Wes系统评估活化的和完整的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166的定量。将裸鼠皮下植入在与Matrigel™ 1:1混合的无血清培养基中的5x10e6 H292细胞。向携带200-500mm2 H292异种移植物的小鼠给予5mpk的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166。在处理后一天,收集肿瘤和血浆(肝素)并在分析前储存在-80℃。使用Barocycler(Pressure Biosciences)在添加有Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合物试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP溶解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。如本文所述,通过Wes系统分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP溶解缓冲液中的1mg/mL蛋白质溶解产物和在PBS中以1:20稀释的血浆样品。图7A和图7B展示与血浆(图7A)相比,在肿瘤中的优先活化(图7B)。

[0502] 实施例4.生物样品中活化的和完整的抗CD166缀合的可活化抗体的定量

[0503] 此实施例描述检测通过SPDB接头缀合至美登木素生物碱毒素DM4的活化的和完整的抗CD166可活化抗体(组合55)的能力。

[0504] 所述实施例使用抗CD166可活化抗体的DM4缀合的可活化抗体(在本文中称为组合55),其包含经由spdb接头缀合至DM4的SEQ ID NO:480的重链序列和SEQ ID NO:246的轻链序列。

[0505] 将抗CD166缀合的可活化抗体在37C下用80ug/ml的蛋白裂解酶(R&D Systems目录号3946-SE)或80ug/ml的MMP14(R&D Systems目录号918-MP)活化2小时,并且与完整的缀合的可活化抗体混合。然后使用抗人IgG(H&L)(American Qualex目录号A110UK)如上所述通过Wes系统分析所述混合物。图8A和8B示出使蛋白裂解酶活化的(图8A)或MMP14活化的(图8B)缀合的可活化抗体与完整缀合的可活化抗体分离的能力。

[0506] 虽然已结合其详细说明描述了本发明,但是前述描述意图阐释而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围来界定。其它方面、优点和修改在以下权利要求书的范围内。

[0507] 实施例5.在用抗CD166可活化抗体治疗后受试者的部分应答的证据

[0508] 此实施例证实施用通过SPDB接头缀合至美登木素生物碱毒素DM4的完整抗CD166可活化抗体(组合55)导致受试者的部分应答。

[0509] 在此实施例中,受试者表现出头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),在初次筛查时仅表现出靶标病变而没有非靶标病变。在研究中时未观察到受试者患上任何新肿瘤。每三(3)周,用5mg/kg通过SPDB接头缀合至美登木素生物碱毒素DM4的完整抗CD166可活化抗体(组合55)治疗受试者。缀合的可活化抗体的施用剂量是基于受试者的经调整的理想体重。

[0510] 从初始筛查(41mm)至第3周期访问(28mm),即首次施用后9周,受试者经历肿瘤负荷的-31.7%变化。在第6周期访问,即首次施用后18周,受试者的肿瘤负荷为(31.5mm)。因此,自基于RECIST v1.1分类的初始筛查以来,受试者经历了部分应答。

[0511] 实施例6.治疗后人受试者中总抗CD166可活化抗体和完整抗CD166可活化抗体的药代动力学和代谢产物

[0512] 此实施例证实在施用至人受试者后,通过SPDB接头缀合至美登木素生物碱毒素DM4的总抗CD166可活化抗体和完整抗CD166可活化抗体(组合55)的药代动力学。

[0513] 在上述试验的剂量递增阶段,研究旨在评估接受0.25mg/kg至4.0mg/kg剂量(基于受试者的经调整的理想体重)的缀合的抗CD166可活化抗体(组合55)的受试者的药代动力学(PK)和ADA。对于PK研究,使用多种分析来确定以下各项的血清水平(1)具有和没有缀合的DM4的完整可活化抗CD166抗体,(2)具有和没有缀合的DM4的总(即完整的和裂解的)抗CD166可活化抗体,(3)具有缀合的DM4的总(即完整的和裂解的)抗CD166可活化抗体,(4)游离DM4,以及(5)S-甲基DM4(一种细胞毒性DM4代谢物)。

[0514] 通过测定从接受完整缀合的抗CD166可活化抗体(组合55)的人受试者抽取的血液样品来进行研究。在第1周期(即第1轮药物施用)中,研究被设计成使得在输注前、在输注结束时以及在受试者访问期间的第2、3、4、8和15天从评估的受试者抽取血液样品。在随后的第2、4、6、8周期以及此后的每8个周期中,研究被设计为使得对于每个周期在输注前抽取血液样品。在第3周期中,研究被设计成使得在输注前、输注结束时以及在受试者访问期间的第8天和第15天抽取血液样品。所述研究旨在在受试者访问期间的试验结束时抽取最终的血液样品。

[0515] 如图9A-9E中所示,描绘了在施用指示剂量的组合55之后PK分析的示例性结果。在每张图中,虚线表示相应测定的较低定量水平(LLOQ),并且在此线下方的点分配LLOQ/2的值。在图9A中,所述图示出在以指定剂量(基于AIBW)向人受试者施用组合55之后,未缀合或缀合至DM4的完整(即未裂解的)抗CD166可活化抗体随时间推移的血清浓度。在图9B中,所述图示出在向人受试者以指定剂量(基于AIBW)施用组合物55后,缀合至DM4的总(即未裂解和裂解的)抗CD166可活化抗体随时间推移的血清浓度。在图9C中,所述图示出在向人受试者以指定剂量(基于AIBW)施用组合物55后,游离DM4随时间推移的血清浓度。在图9D中,所述图示出在向人受试者以指定剂量(基于AIBW)施用组合55后,S-甲基DM4(DM4-Me)随时间推移的血清浓度。在图9E中,所述图示出在向人受试者以指定剂量(基于AIBW)施用组合55之后,未缀合或缀合至DM4的总(即未裂解的和裂解的)抗CD166可活化抗体随时间推移的血清浓度。

[0516] 示例性PK数据显示,抗CD166可活化抗体在血清中主要以完整形式循环。游离DM4和DM4-Me两者均以总抗CD166可活化抗体的<1.9mol%循环。中值完整抗CD166可活化抗体$t_{1/2}$在3.71至8.57天的范围内。在多次给药后,完整抗CD166可活化抗体的最小血浆浓度(C_{min})(剂量3:剂量1)的累积比率不超过1.34,并且不随剂量变化。

[0517] 示例性数据还显示对于剂量1AUC_{0-tau}(直至给药间隔结束时评价的曲线下面积)和C_{max}(最大血浆浓度)完整抗CD166可活化抗体与总抗CD166可活化抗体的比率似乎大约一致。如通过AUC_{0-tau}和C_{max}所测量,在单剂量的缀合的抗CD166可活化抗体后完整抗CD166可活化抗体和总抗CD166可活化抗体暴露通常随剂量增加而增加。

[0518] 说明性实施方案

[0519] 可通过参考以下说明性列举的实施方案来定义本发明。

[0520] 实施方案1.一种治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的方法,

所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA),其中所述AA包含:

[0521] a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;

[0522] b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及

[0523] c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;

[0524] 和/或,换言之,实施方案1是用于治疗受试者的癌症、减轻癌症的症状或延缓癌症的进展的缀合至剂的可活化抗体(AA),其中所述AA包含:

[0525] a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;

[0526] b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及

[0527] c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;并且其中AA以治疗有效量施用至有需要的受试者。

[0528] 实施方案2.如实施方案1所述的方法或用途,其中所述癌症是乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0529] 实施方案3.一种抑制或减少受试者中表达CD166的细胞的生长、增殖或转移的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的缀合至剂的可活化抗体(AA),其中所述AA包含:

[0530] a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;

[0531] b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及

[0532] c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

[0533] 和/或,换言之,实施例3是用于抑制或减少受试者中表达CD166的细胞的生长、增殖或转移例如以治疗癌症的缀合至剂的可活化抗体(AA),其中所述AA包含:

[0534] a.特异性地结合至哺乳动物CD166的抗体或其抗原结合片段(AB),其中所述AB包含含有SEQ ID NO:480的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链;

[0535] b.偶联至所述AB的掩蔽部分(MM),其中当所述AA处于未裂解状态时,所述MM抑制所述AB与所述哺乳动物CD166的结合,其中所述MM包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列;以及

[0536] c.偶联至所述AB的可裂解部分(CM),其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽,并且其中所述CM包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;并且

[0537] 其中所述AA以治疗有效量施用至有需要的受试者。

[0538] 实施方案4.如实施方案3所述的方法或用途,其中所述受试者患有乳腺癌、去势抵抗性前列腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、上皮性卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0539] 实施方案5.如实施方案3所述的方法,其中所述细胞是乳腺细胞、前列腺细胞、子宫内膜细胞、卵巢细胞、头部或颈部鳞状细胞、胆管细胞或肺细胞。

[0540] 实施方案6.如实施方案1-5中任一项所述的方法,其中所述剂是美登木素生物碱或其衍生物。

[0541] 实施方案7.如实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述剂是DM4。

[0542] 实施方案8.如实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述DM4经由接头缀合至所述AA。

[0543] 实施方案9.如实施方案8所述的方法或用途,其中所述接头包含SPBD部分。

[0544] 实施方案10.如实施方案1-9中任一项所述的方法或用途,其中所述AB连接至所述CM。

[0545] 实施方案11.如实施方案1-10中任一项所述的方法或用途,其中所述MM连接至所述CM,以使得所述处于未裂解状态的AA从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

[0546] 实施方案12.如实施方案1-11中任一项所述的方法或用途,其中所述AA包含在所述MM与所述CM之间的连接肽。

[0547] 实施方案13.如实施方案1-12中任一项所述的方法或用途,其中所述AA包含在所述CM与AB之间的连接肽。

[0548] 实施方案14.如实施方案12所述的方法或用途,其中连接肽包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列,

[0549] 实施方案15.如实施方案1-14中任一项所述的方法或用途,其中所述AA包含在所述CM与所述AB之间的连接肽。

[0550] 实施方案16.如实施方案15所述的方法或用途,其中连接肽包含15的氨基酸序列。

[0551] 实施方案17.如实施方案1-16中任一项所述的方法或用途,其中所述AA包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且其中所述处于所述未裂解状态的AA从N-末端至C-末端具有如下的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。

[0552] 实施方案18.如实施方案1-17中任一项所述的方法或用途,其中所述轻链在其N-末端连接至间隔区。

[0553] 实施方案19.如实施方案18所述的方法或用途,其中所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列。

[0554] 实施方案20.如实施方案1-19中任一项所述的方法或用途,其中所述MM和所述CM连接至所述轻链。

[0555] 实施方案21.如实施方案20所述的方法或用途,其中所述MM连接至所述CM,以使得所述处于未裂解状态的AA在其轻链上从N-末端至C-末端包含如下的结构排列:间隔区-MM-LP1-CM-LP2-轻链。

[0556] 实施方案22.如实施方案21所述的方法或用途,其中所述间隔区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列,LP1包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列,并且LP2包含GGS的氨基酸序列。

[0557] 实施方案23.如实施方案1-22中任一项所述的方法或用途,其中所述AA的轻链包含SEQ ID NO:314的序列。

[0558] 实施方案24.如实施方案1-23中任一项所述的方法或用途,其中所述AA的轻链包

含SEQ ID NO:246的序列。

[0559] 实施方案25.如实施方案1-24中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者是至少18岁。

[0560] 实施方案26.如实施方案1-25中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者具有0-1的ECOG体能状态。

[0561] 实施方案27.如实施方案1-26中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者具有活动性转移性癌症的组织学上确认的诊断。

[0562] 实施方案28.如实施方案1-26中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者具有局部晚期不可切除的实体瘤的组织学上确认的诊断。

[0563] 实施方案29.如实施方案1-28中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者在施用或使用时具有至少3个月的预期寿命。

[0564] 实施方案30.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有乳腺癌。

[0565] 实施方案31.如实施方案30所述的方法或用途,其中所述乳腺癌是ER+。

[0566] 实施方案32.如实施方案30-31中任一项所述的方法或用途,并且已经接受了先前的抗激素疗法并且经历了疾病进展。

[0567] 实施方案33.如实施方案30所述的方法或用途,其中所述受试者患有三阴性乳腺癌并且已经经历了至少两种先前线疗法。

[0568] 实施方案34.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有去势抵抗性前列腺癌。

[0569] 实施方案35.如实施方案34所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种先前疗法。

[0570] 实施方案36.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有胆管癌。

[0571] 实施方案37.如实施方案36所述的方法或用途,其中所述受试者已经在含吉西他滨方案的至少一个先前线中失败。

[0572] 实施方案38.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有子宫内膜癌。

[0573] 实施方案39.如实施方案38所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种用于子宫外或晚期疾病的含铂方案。

[0574] 实施方案40.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有上皮性卵巢癌。

[0575] 实施方案41.如实施方案40所述的方法或用途,其中所述受试者患有铂耐药性癌。

[0576] 实施方案42.如实施方案40所述的方法或用途,其中所述受试者患有铂难治性卵巢癌。

[0577] 实施方案43.如实施方案40所述的方法或用途,其中所述受试者具有BRCA突变并且是PARP抑制剂难治性的或在其它方面不适合用PARP抑制剂。

[0578] 实施方案44.如实施方案40所述的方法或用途,其中所述受试者具有非BRCA突变。

[0579] 实施方案45.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有

头颈部小细胞癌(HNSCC)。

[0580] 实施方案46.如实施方案45所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种含铂方案。

[0581] 实施方案47.如实施方案45所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种PD-1/PD-L1抑制剂。

[0582] 实施方案48.如实施方案1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0583] 实施方案49.如实施方案48所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种含铂方案。

[0584] 实施方案50.如实施方案48所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种检查点抑制剂。

[0585] 实施方案51.如实施方案48所述的方法或用途,其中所述受试者已经接受了至少一种PD-1/PD-L1抑制剂。

[0586] 实施方案52.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途,其中所述缀合至剂的AA的剂量是约0.25mg/kg至约6mg/kg。

[0587] 实施方案53.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约0.25mg/kg。

[0588] 实施方案54.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约0.5mg/kg。

[0589] 实施方案55.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约1mg/kg。

[0590] 实施方案56.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约2mg/kg。

[0591] 实施方案57.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约4mg/kg。

[0592] 实施方案58.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约5mg/kg。

[0593] 实施方案59.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约6mg/kg。

[0594] 实施方案60.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约0.25mg/kg至0.5mg/kg。

[0595] 实施方案61.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约0.5mg/kg至1mg/kg。

[0596] 实施方案62.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约1mg/kg至2mg/kg。

[0597] 实施方案63.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约2mg/kg至4mg/kg。

[0598] 实施方案64.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约4mg/kg至5mg/kg。

[0599] 实施方案65.如实施方案52所述的方法或用途,其中所述剂量是约5mg/kg至6mg/kg。

[0600] 实施方案66.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途,其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约10mg至约200mg。

[0601] 实施方案67.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途,其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约25mg至约500mg。

[0602] 实施方案68.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途,其中所述缀合至剂的

AA的固定剂量是约10mg至约25mg。

[0603] 实施方案69.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约20mg至约50mg。

[0604] 实施方案70.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约30mg至约75mg。

[0605] 实施方案71.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约40mg至约100mg。

[0606] 实施方案72.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约50mg至约125mg。

[0607] 实施方案73.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约60mg至约150mg。

[0608] 实施方案74.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约80mg至约200mg。

[0609] 实施方案75.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约100mg至约250mg。

[0610] 实施方案76.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约120mg至约300mg。

[0611] 实施方案77.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约140mg至约350mg。

[0612] 实施方案78.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约160mg至约400mg。

[0613] 实施方案79.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约180mg至约450mg。

[0614] 实施方案80.如实施方案1-51中任一项所述的方法或用途，其中所述缀合至剂的AA的固定剂量是约200mg至约500mg。

[0615] 实施方案81.如实施方案1-80中任一项所述的方法或用途，其中向所述受试者静脉内施用所述缀合至剂的AA，或所述AA被配制用于静脉内使用。

[0616] 实施方案82.如实施方案1-81中任一项所述的方法或用途，其中每21天向所述受试者静脉内施用所述缀合至剂的AA，或所述AA被配制用于每21天使用。

[0617] 实施方案83.如实施方案52-65、81和82中任一项所述的方法或用途，其中所述AA以基于所述受试者的实际体重的剂量缀合至剂。

[0618] 实施方案84.如实施方案52-65、81和82中任一项所述的方法或用途，其中所述AA以基于所述受试者的经调整的理想体重的剂量缀合至剂。

[0619] 其它实施方案

[0620] 虽然已结合其详细说明描述了本发明，但是前述描述意图阐释而非限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求书的范围来界定。其它方面、优点和修改在以下权利要求书的范围内。

序列表
<110> CYTOMX治疗公司(CYTOMX THERAPEUTICS, INC.)
<120> 可活化的抗CD166抗体及其使用方法
<130> CYTM-054_004WO (322001-2509)
<150> US 62/552,345
<151> 2017-08-30
<150> US 62/553,098
<151> 2017-08-31
<150> US 62/554,919
<151> 2017-09-06
<160> 481
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 1
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 2
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 3
Gly Gly Ser Gly

1

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接肽

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接肽

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接肽

<400> 6

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接肽

<400> 7

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 8
Gly Ser Ser Ser Gly
1 5
<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 9
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 10
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10
<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 11
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 连接肽
<400> 12
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 13
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 14
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 15
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 16
Gly Ser Ser Gly Thr

1 5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接肽

<400> 17

Gly Ser Ser Gly

1

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<400> 23

000

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<400> 37

000

<210> 38

<400> 38

000

<210> 39

<400> 39

000

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<400> 46

000

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52

<400> 52

000

<210> 53

<400> 53

000

<210> 54

<400> 54

000

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<400> 56

000

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<400> 74

000

<210> 75

<400> 75

000

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可裂解部分

<400> 76

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp

1 5 10 15

Asn His

<210> 77

<400> 77
000
<210> 78
<400> 78
000
<210> 79
<400> 79
000
<210> 80
<400> 80
000
<210> 81
<400> 81
000
<210> 82
<400> 82
000
<210> 83
<400> 83
000
<210> 84
<400> 84
000
<210> 85
<400> 85
000
<210> 86
<400> 86
000
<210> 87
<400> 87
000
<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 88

Gln Gly Gln Ser Gly Gln
1 5
<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 89
Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
1 5
<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 90
Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
1 5
<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 91
Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
1 5
<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 92
Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu
1 5 10
<210> 93

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 93
Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15
<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纤溶酶可裂解序列
<400> 94
Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15
<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 因子Xa可裂解序列
<400> 95
Ile Glu Gly Arg
1
<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 因子Xa可裂解序列
<400> 96
Ile Asp Gly Arg
1
<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 因子Xa可裂解序列
<400> 97
Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg
1 5
<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> MMP可裂解序列
<400> 98
Pro Leu Gly Leu Trp Ala
1 5
<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 99
Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
1 5
<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 100
Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
1 5
<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 101

Gly Ile Ala Gly Gln
1 5
<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 102
Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile
1 5
<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 103
Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly
1 5
<210> 104
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 104
Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val
1 5
<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 105
Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
1 5
<210> 106

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 106
Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
1 5
<210> 107
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 107
Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
1 5
<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 108
Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
1 5
<210> 109
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 109
Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
1 5
<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 110
Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
1 5
<210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 111
Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val
1 5
<210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 胶原酶可裂解序列
<400> 112
Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu
1 5
<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人成纤维细胞胶原酶
<400> 113
Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
1 5
<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 自溶裂解
<400> 114

Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu
1 5

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 自溶裂解
<400> 115
Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 自溶裂解
<400> 116
Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln
1 5

<210> 117
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 抗CTLA-4 scFv
<400> 117
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
20 25 30
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
35 40 45
Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
65 70 75 80
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr
130 135 140
Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Thr
145 150 155 160
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
165 170 175
Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
180 185 190
Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly
195 200 205
Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
210 215 220
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
225 230 235 240
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu Tyr Trp
245 250 255
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
260 265 270
Ser

<210> 118
<211> 264
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 抗CD3-ε scFv
<400> 118
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
20 25 30
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
35 40 45
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
50 55 60
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr

65 70 75 80
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
85 90 95
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
100 105 110
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
115 120 125
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val
145 150 155 160
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
165 170 175
Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
180 185 190
Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
195 200 205
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
225 230 235 240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
245 250 255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
260

<210> 119
<400> 119
000
<210> 120
<400> 120
000
<210> 121
<400> 121
000
<210> 122
<400> 122
000
<210> 123
<400> 123

000

<210> 124

<400> 124

000

<210> 125

<400> 125

000

<210> 126

<400> 126

000

<210> 127

<400> 127

000

<210> 128

<400> 128

000

<210> 129

<400> 129

000

<210> 130

<400> 130

000

<210> 131

<400> 131

000

<210> 132

<400> 132

000

<210> 133

<400> 133

000

<210> 134

<400> 134

000

<210> 135

<400> 135

000

<210> 136

<400> 136

000

<210> 137

<400> 137

000

<210> 138

<400> 138

000

<210> 139

<400> 139

000

<210> 140

<400> 140

000

<210> 141

<400> 141

000

<210> 142

<400> 142

000

<210> 143

<400> 143

000

<210> 144

<400> 144

000

<210> 145

<400> 145

000

<210> 146

<400> 146

000

<210> 147

<400> 147

000

<210> 148

<400> 148

000

<210> 149

<400> 149

000

<210> 150

<400> 150

000

<210> 151

<400> 151

000

<210> 152

<400> 152

000

<210> 153

<400> 153

000

<210> 154

<400> 154

000

<210> 155

<400> 155

000

<210> 156

<400> 156

000

<210> 157

<400> 157

000

<210> 158

<400> 158

000

<210> 159

<400> 159

000

<210> 160

<400> 160

000

<210> 161

<400> 161

000

<210> 162

<400> 162

000

<210> 163

<400> 163

000

<210> 164

<400> 164

000

<210> 165

<400> 165

000

<210> 166

<400> 166

000

<210> 167

<400> 167

000

<210> 168

<400> 168

000

<210> 169

<400> 169

000

<210> 170

<400> 170

000

<210> 171

<400> 171

000

<210> 172

<400> 172

000

<210> 173

<400> 173

000

<210> 174

<400> 174

000

<210> 175

<400> 175

000

<210> 176

<400> 176

000

<210> 177

<400> 177

000

<210> 178

<400> 178

000

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<400> 189

000

<210> 190

<400> 190

000

<210> 191

<400> 191

000

<210> 192

<400> 192

000

<210> 193

<400> 193

000

<210> 194

<400> 194

000

<210> 195

<400> 195

000

<210> 196

<400> 196

000

<210> 197

<400> 197

000

<210> 198

<400> 198

000

<210> 199

<400> 199

000

<210> 200

<400> 200

000

<210> 201

<400> 201

000

<210> 202

<400> 202

000

<210> 203

<400> 203

000

<210> 204

<400> 204

000

<210> 205

<400> 205

000

<210> 206

<400> 206

000

<210> 207

<400> 207

000

<210> 208

<400> 208

000

<210> 209

<400> 209

000

<210> 210

<400> 210

000

<210> 211

<400> 211

000

<210> 212

<400> 212

000

<210> 213

<400> 213

000

<210> 214

<400> 214

000
<210> 215
<400> 215
000
<210> 216
<400> 216
000
<210> 217
<400> 217
000
<210> 218
<400> 218
000
<210> 219
<400> 219
000
<210> 220
<400> 220
000
<210> 221
<400> 221
000
<210> 222
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 掩蔽部分
<400> 222

Leu	Cys	His	Pro	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Trp	Glu	Ser	Cys	Ser	Ser
1				5				10					15	

<210> 223
<400> 223
000
<210> 224
<400> 224
000
<210> 225
<400> 225

000

<210> 226

<400> 226

000

<210> 227

<400> 227

000

<210> 228

<400> 228

000

<210> 229

<400> 229

000

<210> 230

<400> 230

000

<210> 231

<400> 231

000

<210> 232

<400> 232

000

<210> 233

<400> 233

000

<210> 234

<400> 234

000

<210> 235

<400> 235

000

<210> 236

<400> 236

000

<210> 237

<400> 237

000

<210> 238

<400> 238

000

<210> 239

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人α-CD166重链

<400> 239

```
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1               5                  10                  15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
        35                  40                  45
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Ser Glu Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser
    50                  55                  60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65                  70                  75                  80
Val Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Val Gln Ile Asp Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Thr Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
```

245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 240
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166轻链VL结构域
<400> 240
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 241

<211> 1353

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人α-CD166重链

<400> 241

cagatcaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtgaaac ccacccagac cctgaccctg 60

acatgcacct tctccggctt cagcctgtcc acctacggca tgggcgtggg ctggatcagg 120

cagcctcctg gcaaggccct ggaatggctg gccaacatct ggtggtccga ggacaagcac 180

tactccccca gcctgaagtc ccggctgacc atcaccaagg acacctccaa gaaccaggtg 240

gtgctgacaa tcacaaacgt ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgtgcagatc 300

gactacggca acgactacgc cttcacctac tggggccagg gcacactggt gacagtgtcc 360

tccgcctcca ccaagggccc ctccgtgttc cctctggccc cttccagcaa gtccacctct 420

ggcggcacag ctgccctggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaact ctggcgccct gaccagcgga gtgcacacct tccctgccgt gctgcagtcc 540

tccggcctgt actccctgtc ctccgtggtg accgtgccct ccagctctct gggcacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 660
cccaagtcct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ctgcccctga actgctgggc 720
ggaccttccg tgtttctgtt cccccccaaag cctaaggaca ccctgatgat ctcccggacc 780
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagtac 900
aactccacct accgggtggt gtctgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccccatcga aaagaccatc 1020
tccaaggcca agggccagcc ccgcgagcct caggtgtaca cactgccccc tagccgggaa 1080
gagatgacca agaatcaggt gtccctgacc tgtctggtga aaggcttcta cccctccgat 1140
atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag cccgagaaca actacaagac cacccccccct 1200
gtgctggact ccgacggctc attcttcctg tactccaagc tgaccgtgga caagtcccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt ctcctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
acccagaagt ccctgtccct gagccccggc aag 1353

<210> 242
<400> 242
000
<210> 243
<400> 243
000
<210> 244
<400> 244
000
<210> 245
<400> 245
000
<210> 246
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166轻链
<400> 246

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Leu Cys His Pro Ala Val Leu Ser Ala
1 5 10 15
Trp Glu Ser Cys Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
20 25 30
Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
35 40 45

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

<210> 247
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166轻链
<400> 247

cagggacagt ctggccaggg cctgtgtcac cctgctgtgc tgtctgcctg ggagtcctgt 60
tccagcggcg gaggctcctc tggcggctct gctgtgggcc tgctggctcc acctggcggc 120
ctgtccggca gatctgacaa ccacggcggc tccgacatcg tgatgaccca gtccccctg 180
tccctgcccg tgactcctgg cgagcctgcc tccatctcct gccggtcctc caagtccctg 240

ctgcactcca acggcatcac ctacctgtac tggtatctgc agaagcccgg ccagtcccct 300
cagctgctga tctaccagat gtccaacctg gcctccggcg tgcccgacag attctccggc 360
tctggctccg gcaccgactt caccctgaag atctcccggg tggaagccga ggacgtgggc 420
gtgtactact gcgcccagaa cctggaactg ccctacacct tcggccaggg caccaagctg 480
gaaatcaagc ggaccgtggc cgctccctcc gtgttcatct tcccaccctc cgacgagcag 540
ctgaagtccg gcaccgcctc cgtggtctgc ctgctgaaca acttctaccc ccgcgaggcc 600
aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg cagtccggca actcccagga atccgtcacc 660
gagcaggact ccaaggacag cacctactcc ctgtcctcca ccctgaccct gtccaaggcc 720
gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc gaagtgaccc accagggact gagcagcccc 780
gtgaccaagt ccttcaaccg gggcgagtgc 810

<210> 248
<400> 248
000
<210> 249
<400> 249
000
<210> 250
<400> 250
000
<210> 251
<400> 251
000
<210> 252
<400> 252
000
<210> 253
<400> 253
000
<210> 254
<400> 254
000
<210> 255
<400> 255
000
<210> 256
<400> 256
000
<210> 257
<400> 257

000

<210> 258

<400> 258

000

<210> 259

<400> 259

000

<210> 260

<400> 260

000

<210> 261

<400> 261

000

<210> 262

<400> 262

000

<210> 263

<400> 263

000

<210> 264

<400> 264

000

<210> 265

<400> 265

000

<210> 266

<400> 266

000

<210> 267

<400> 267

000

<210> 268

<400> 268

000

<210> 269

<400> 269

000

<210> 270

<400> 270

000

<210> 271

<400> 271

000

<210> 272

<400> 272

000

<210> 273

<400> 273

000

<210> 274

<400> 274

000

<210> 275

<400> 275

000

<210> 276

<400> 276

000

<210> 277

<400> 277

000

<210> 278

<400> 278

000

<210> 279

<400> 279

000

<210> 280

<400> 280

000

<210> 281

<400> 281

000

<210> 282

<400> 282

000

<210> 283

<400> 283

000

<210> 284

<400> 284

000

<210> 285

<400> 285

000

<210> 286

<400> 286

000

<210> 287

<400> 287

000

<210> 288

<400> 288

000

<210> 289

<400> 289

000

<210> 290

<400> 290

000

<210> 291

<400> 291

000

<210> 292

<400> 292

000

<210> 293

<400> 293

000

<210> 294

<400> 294

000

<210> 295

<400> 295

000

<210> 296

<400> 296

000
<210> 297
<400> 297
000
<210> 298
<400> 298
000
<210> 299
<400> 299
000
<210> 300
<400> 300
000
<210> 301
<400> 301
000
<210> 302
<400> 302
000
<210> 303
<400> 303
000
<210> 304
<400> 304
000
<210> 305
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 305
Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly
1 5
<210> 306
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 间隔区
<400> 306
Gln Gly Gln Ser Gly
1 5
<210> 307
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 307
Gln Gly Gln Ser
1
<210> 308
<400> 308
000
<210> 309
<400> 309
000
<210> 310
<400> 310
000
<210> 311
<400> 311
000
<210> 312
<400> 312
000
<210> 313
<400> 313
000
<210> 314
<211> 263
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166轻链
<400> 314
Leu Cys His Pro Ala Val Leu Ser Ala Trp Glu Ser Cys Ser Ser Gly

1 5 10 15
Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly
20 25 30
Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
35 40 45
Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser
50 55 60
Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr
65 70 75 80
Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
85 90 95
Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
100 105 110
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
115 120 125
Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro
130 135 140
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
145 150 155 160
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
165 170 175
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
180 185 190
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
195 200 205
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
210 215 220
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
225 230 235 240
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
245 250 255
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260

<210> 315
<211> 789
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166轻链

<400> 315

ctgtgtcacc ctgctgtgct gtctgcctgg gagtcctgtt ccagcggcgg aggctcctct 60
ggcggctctg ctgtgggcct gctggctcca cctggcggcc tgtccggcag atctgacaac 120
cacggcggct ccgacatcgt gatgacccag tccccctgt ccctgcccgt gactcctggc 180
gagcctgcct ccatctcctg ccggtcctcc aagtccctgc tgcactccaa cggcatcacc 240
tacctgtact ggtatctgca gaagcccggc cagtcccctc agctgctgat ctaccagatg 300
tccaacctgg cctccggcgt gcccgacaga ttctccggct ctggctccgg caccgacttc 360
accctgaaga tctcccgggt ggaagccgag gacgtgggcg tgtactactg cgcccagaac 420
ctggaactgc cctacacctt cggccagggc accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc 480
gctccctccg tgttcatctt cccaccctcc gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc 540
gtggtctgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 600
aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc 660
acctactccc tgtcctccac cctgaccctg tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 720
tacgcctgcg aagtgaccca ccagggactg agcagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg 780
ggcgagtgc 789

<210> 316

<400> 316

000

<210> 317

<400> 317

000

<210> 318

<400> 318

000

<210> 319

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 间隔区

<400> 319

cagggacagt ctggccaggg c 21

<210> 320

<400> 320

000

<210> 321

<400> 321

000

<210> 322

<400> 322
000
<210> 323
<400> 323
000
<210> 324
<400> 324
000
<210> 325
<400> 325
000
<210> 326
<400> 326
000
<210> 327
<400> 327
000
<210> 328
<400> 328
000
<210> 329
<400> 329
000
<210> 330
<400> 330
000
<210> 331
<400> 331
000
<210> 332
<400> 332
000
<210> 333
<400> 333
000
<210> 334
<400> 334
000
<210> 335

<400> 335
000
<210> 336
<400> 336
000
<210> 337
<400> 337
000
<210> 338
<400> 338
000
<210> 339
<400> 339
000
<210> 340
<400> 340
000
<210> 341
<400> 341
000
<210> 342
<400> 342
000
<210> 343
<400> 343
000
<210> 344
<400> 344
000
<210> 345
<400> 345
000
<210> 346
<400> 346
000
<210> 347
<400> 347
000
<210> 348

<400> 348
000
<210> 349
<400> 349
000
<210> 350
<400> 350
000
<210> 351
<400> 351
000
<210> 352
<400> 352
000
<210> 353
<400> 353
000
<210> 354
<400> 354
000
<210> 355
<400> 355
000
<210> 356
<400> 356
000
<210> 357
<400> 357
000
<210> 358
<400> 358
000
<210> 359
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 359

Gly Gln Ser Gly Gln Gly
1 5
<210> 360
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 360
Gln Ser Gly Gln Gly
1 5
<210> 361
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 间隔区
<400> 361
Ser Gly Gln Gly
1
<210> 362
<400> 362
000
<210> 363
<400> 363
000
<210> 364
<400> 364
000
<210> 365
<400> 365
000
<210> 366
<400> 366
000
<210> 367
<400> 367
000
<210> 368

<400> 368
000
<210> 369
<400> 369
000
<210> 370
<400> 370
000
<210> 371
<400> 371
000
<210> 372
<400> 372
000
<210> 373
<400> 373
000
<210> 374
<400> 374
000
<210> 375
<400> 375
000
<210> 376
<400> 376
000
<210> 377
<400> 377
000
<210> 378
<400> 378
000
<210> 379
<400> 379
000
<210> 380
<400> 380
000
<210> 381

<400> 381
000
<210> 382
<400> 382
000
<210> 383
<400> 383
000
<210> 384
<400> 384
000
<210> 385
<400> 385
000
<210> 386
<400> 386
000
<210> 387
<400> 387
000
<210> 388
<400> 388
000
<210> 389
<400> 389
000
<210> 390
<400> 390
000
<210> 391
<400> 391
000
<210> 392
<400> 392
000
<210> 393
<400> 393
000
<210> 394

<400> 394
000
<210> 395
<400> 395
000
<210> 396
<400> 396
000
<210> 397
<400> 397
000
<210> 398
<400> 398
000
<210> 399
<400> 399
000
<210> 400
<400> 400
000
<210> 401
<400> 401
000
<210> 402
<400> 402
000
<210> 403
<400> 403
000
<210> 404
<400> 404
000
<210> 405
<400> 405
000
<210> 406
<400> 406
000
<210> 407

<400> 407
000
<210> 408
<400> 408
000
<210> 409
<400> 409
000
<210> 410
<400> 410
000
<210> 411
<400> 411
000
<210> 412
<400> 412
000
<210> 413
<400> 413
000
<210> 414
<400> 414
000
<210> 415
<400> 415
000
<210> 416
<400> 416
000
<210> 417
<400> 417
000
<210> 418
<400> 418
000
<210> 419
<400> 419
000
<210> 420

<400> 420
000
<210> 421
<400> 421
000
<210> 422
<400> 422
000
<210> 423
<400> 423
000
<210> 424
<400> 424
000
<210> 425
<400> 425
000
<210> 426
<400> 426
000
<210> 427
<400> 427
000
<210> 428
<400> 428
000
<210> 429
<400> 429
000
<210> 430
<400> 430
000
<210> 431
<400> 431
000
<210> 432
<400> 432
000
<210> 433

<400> 433
000
<210> 434
<400> 434
000
<210> 435
<400> 435
000
<210> 436
<400> 436
000
<210> 437
<400> 437
000
<210> 438
<400> 438
000
<210> 439
<400> 439
000
<210> 440
<400> 440
000
<210> 441
<400> 441
000
<210> 442
<400> 442
000
<210> 443
<400> 443
000
<210> 444
<400> 444
000
<210> 445
<400> 445
000
<210> 446

<400> 446
000
<210> 447
<400> 447
000
<210> 448
<400> 448
000
<210> 449
<400> 449
000
<210> 450
<400> 450
000
<210> 451
<400> 451
000
<210> 452
<400> 452
000
<210> 453
<400> 453
000
<210> 454
<400> 454
000
<210> 455
<400> 455
000
<210> 456
<400> 456
000
<210> 457
<400> 457
000
<210> 458
<400> 458
000
<210> 459

<400> 459
000
<210> 460
<400> 460
000
<210> 461
<400> 461
000
<210> 462
<400> 462
000
<210> 463
<400> 463
000
<210> 464
<400> 464
000
<210> 465
<400> 465
000
<210> 466
<400> 466
000
<210> 467
<400> 467
000
<210> 468
<400> 468
000
<210> 469
<400> 469
000
<210> 470
<400> 470
000
<210> 471
<400> 471
000
<210> 472

<400> 472
000
<210> 473
<400> 473
000
<210> 474
<400> 474
000
<210> 475
<400> 475
000
<210> 476
<400> 476
000
<210> 477
<400> 477
000
<210> 478
<400> 478
000
<210> 479
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接肽
<400> 479
Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 480
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166重链
<400> 480
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Ser Glu Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Gln Ile Asp Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Thr Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly
450

<210> 481
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人α-CD166重链
<400> 481

cagatcaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtgaaac ccacccagac cctgaccctg 60
acatgcacct tctccggctt cagcctgtcc acctacggca tgggcgtggg ctggatcagg 120
cagcctcctg gcaaggccct ggaatggctg gccaacatct ggtggtccga ggacaagcac 180
tactccccca gcctgaagtc ccggctgacc atcaccaagg acacctccaa gaaccaggtg 240
gtgctgacaa tcacaaacgt ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgtgcagatc 300
gactacggca acgactacgc cttcacctac tggggccagg gcacactggt gacagtgtcc 360
tccgcctcca ccaagggccc ctccgtgttc cctctggccc cttccagcaa gtccacctct 420
ggcggcacag ctgccctggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggcgccct gaccagcgga gtgcacacct tccctgccgt gctgcagtcc 540
tccggcctgt actccctgtc ctccgtggtg accgtgccct ccagctctct gggcacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 660
cccaagtcct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ctgcccctga actgctgggc 720
ggaccttccg tgtttctgtt ccccccaaag cctaaggaca ccctgatgat ctcccggacc 780
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagtac 900
aactccacct accgggtggt gtctgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960

aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccccatcga aaagaccatc 1020
tccaaggcca agggccagcc ccgcgagcct caggtgtaca cactgccccc tagccgggaa 1080
gagatgacca agaatcaggt gtccctgacc tgtctggtga aaggcttcta cccctccgat 1140
atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag cccgagaaca actacaagac cacccccccc 1200
gtgctggact ccgacggctc attcttcctg tactccaagc tgaccgtgga caagtcccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt ctcctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
acccagaagt ccctgtccct gagccccggc 1350

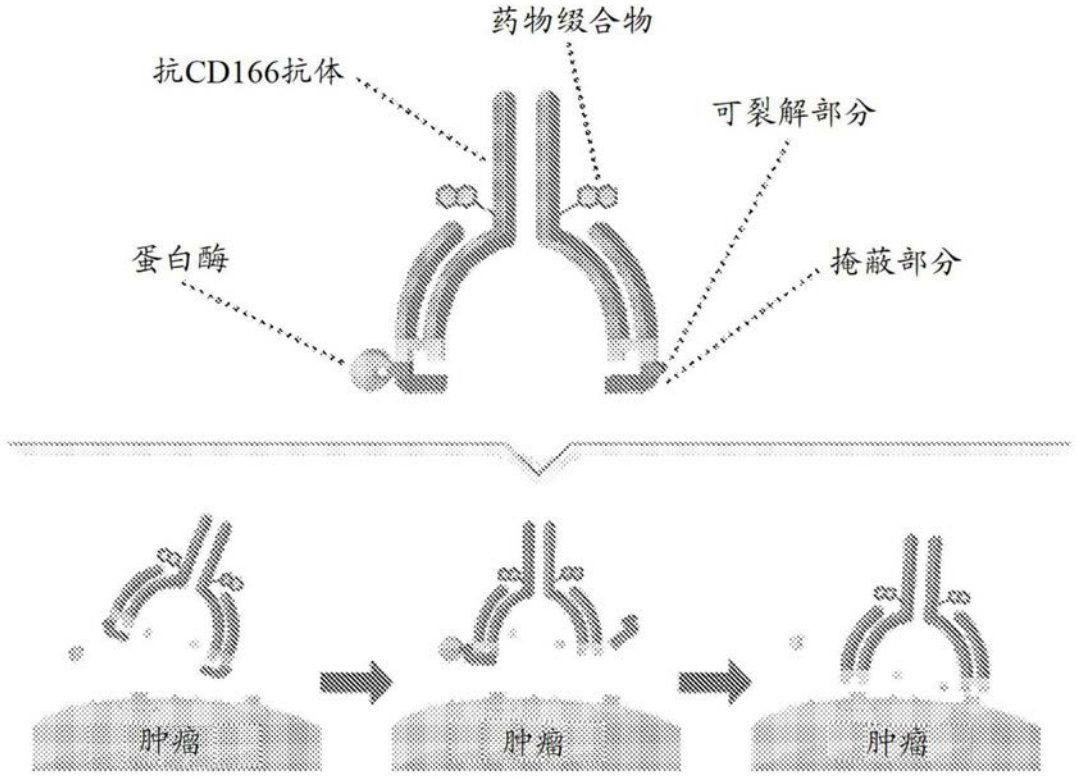

药物缀合物
抗CD166抗体
可裂解部分
蛋白酶
掩蔽部分
肿瘤
肿瘤
肿瘤

图1

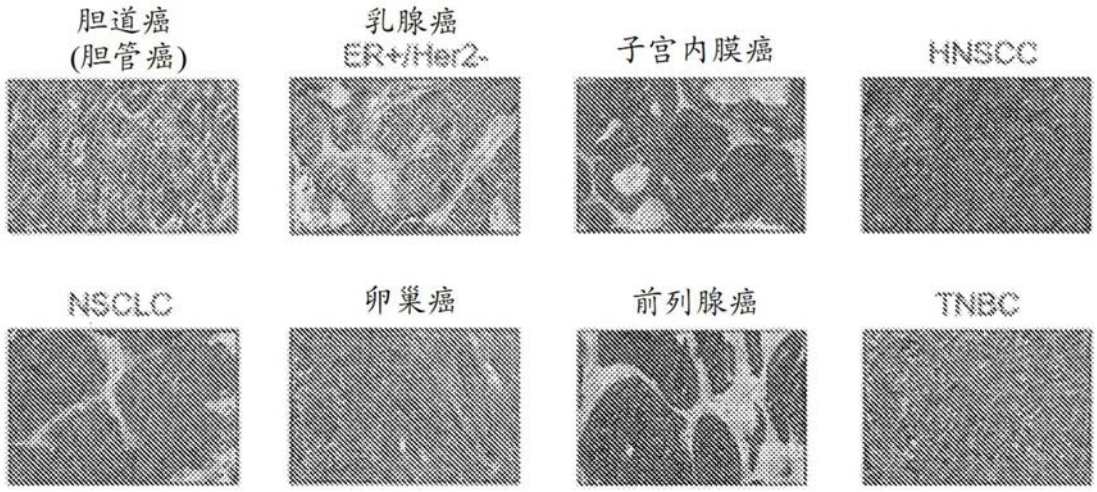
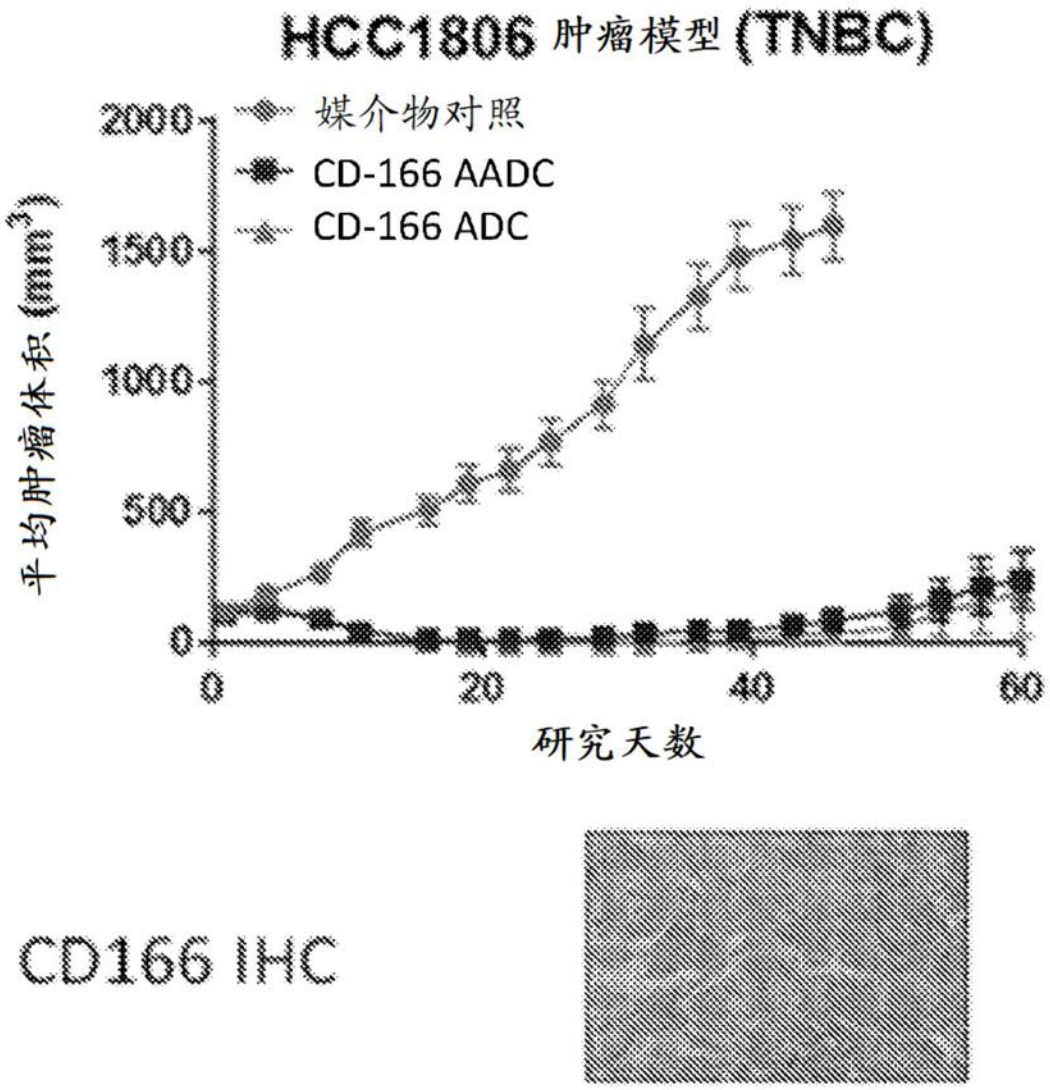

胆道癌
(胆管癌)
乳腺癌
ER+/Her2-
子宫内膜癌
HNSCC
NSCLC
卵巢癌
前列腺癌
TNBC

图2


HCC1806 肿瘤模型 (TNBC)
媒介物对照
CD-166 AADC
CD-166 ADC
平均肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
研究天数

CD166 IHC

图3

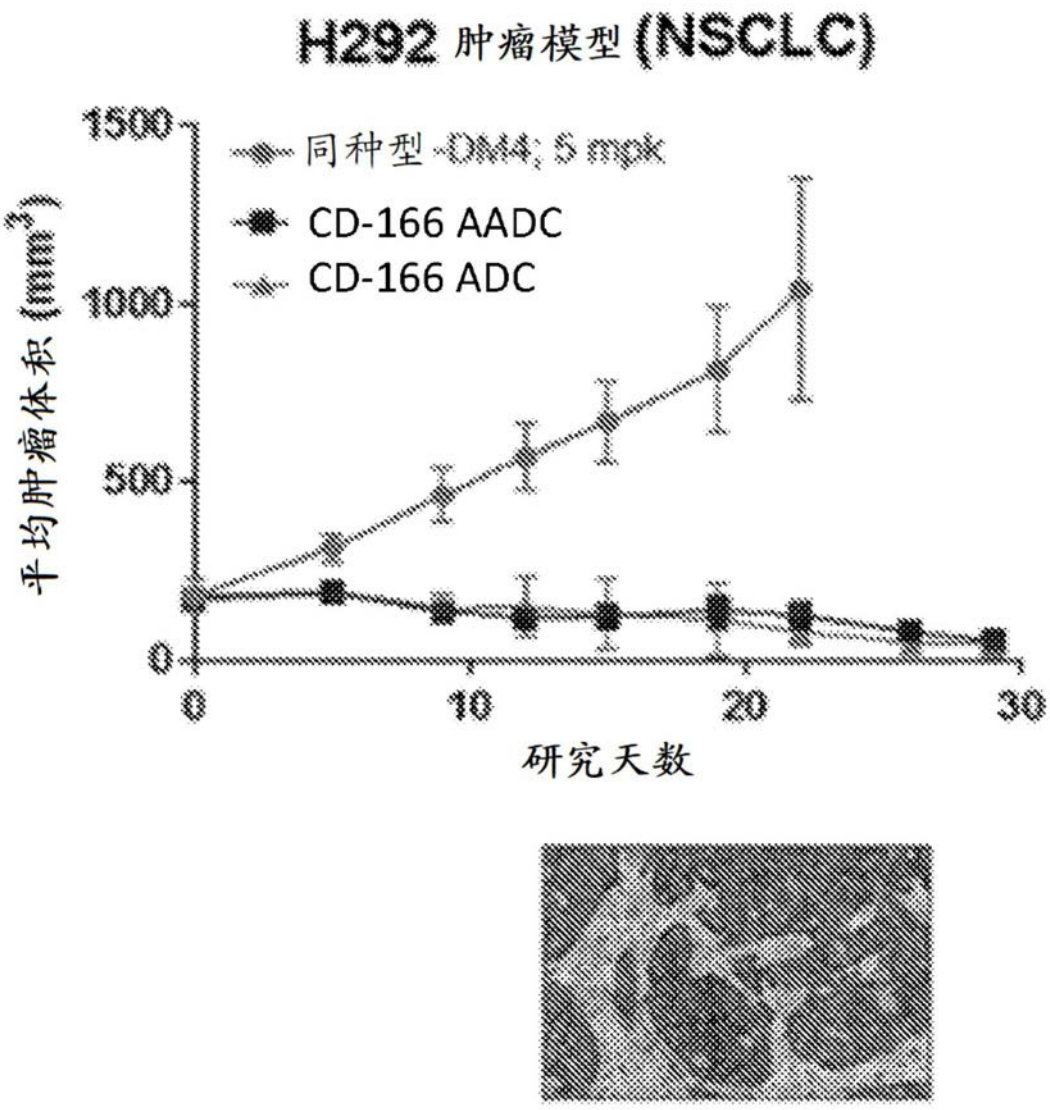

H292 肿瘤模型 (NSCLC)
同种型-DM4; 5 mpk
CD-166 AADC
CD-166 ADC
平均肿瘤体积 (mm^3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
研究天数

图4

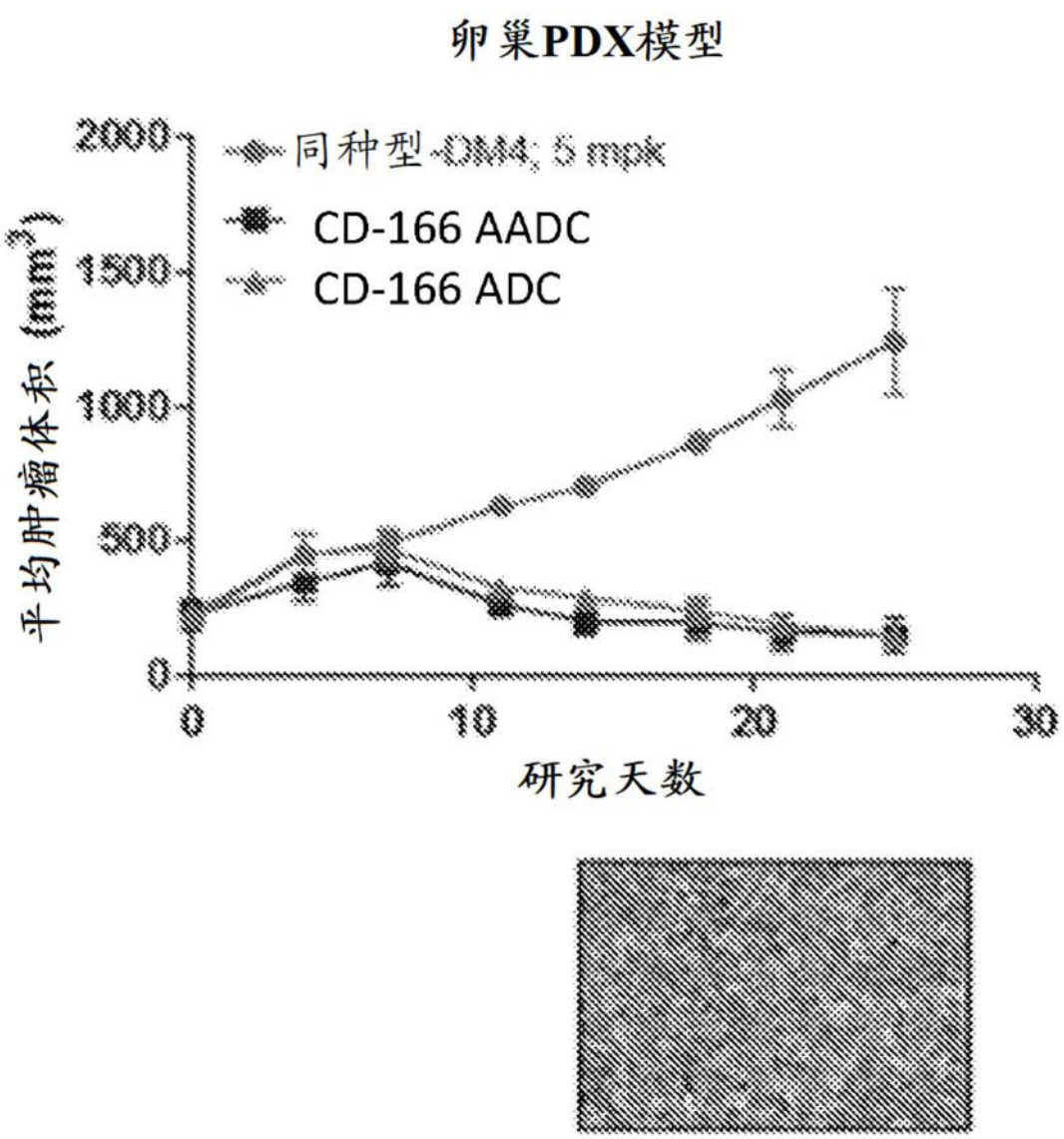

卵巢PDX模型
同种型-0M4; 5 mpk
CD-166 AADC
CD-166 ADC
平均肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
研究天数

图5

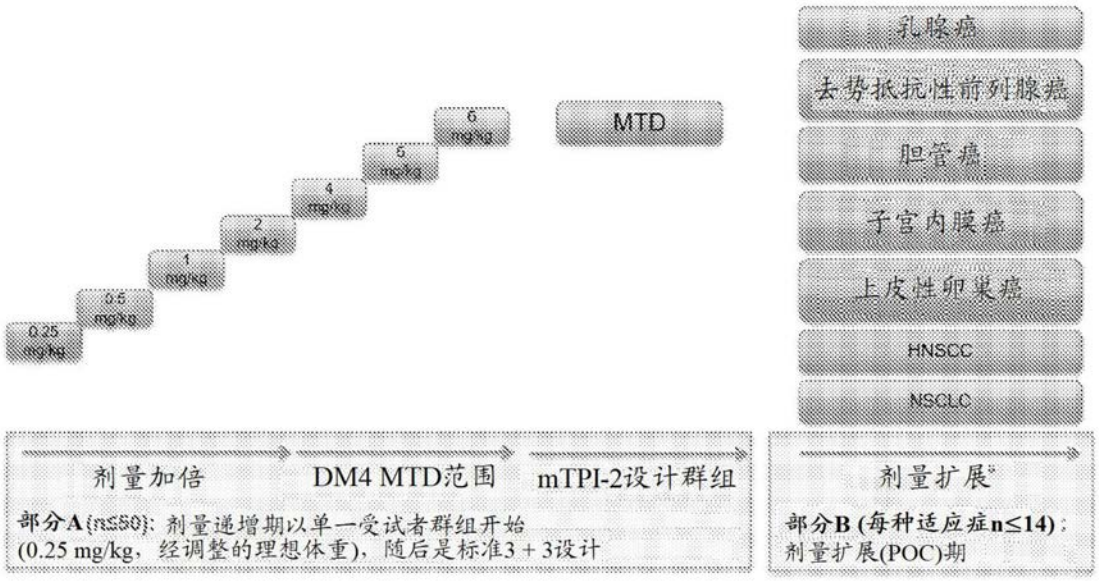

0.25 mg/kg
0.5 mg/kg
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
5 mg/kg
6 mg/kg
MTD
乳腺癌
去势抵抗性前列腺癌
胆管癌
子宫内膜癌
上皮性卵巢癌
HNSCC
NSCLC
剂量加倍
DM4 MTD范围
mTPI-2设计群组
剂量扩展*
部分A(n≤30): 剂量递增期以单一受试者群组开始
(0.25 mg/kg，经调整的理想体重)，随后是标准3＋3设计
部分B (每种适应症n≤14):
剂量扩展(POC)期

图6

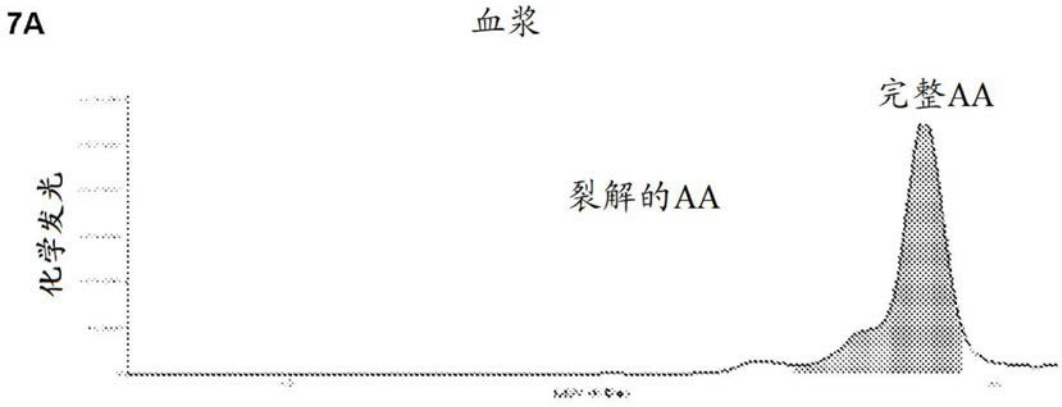

7A
血浆
完整AA
裂解的AA
化学发光

图7A

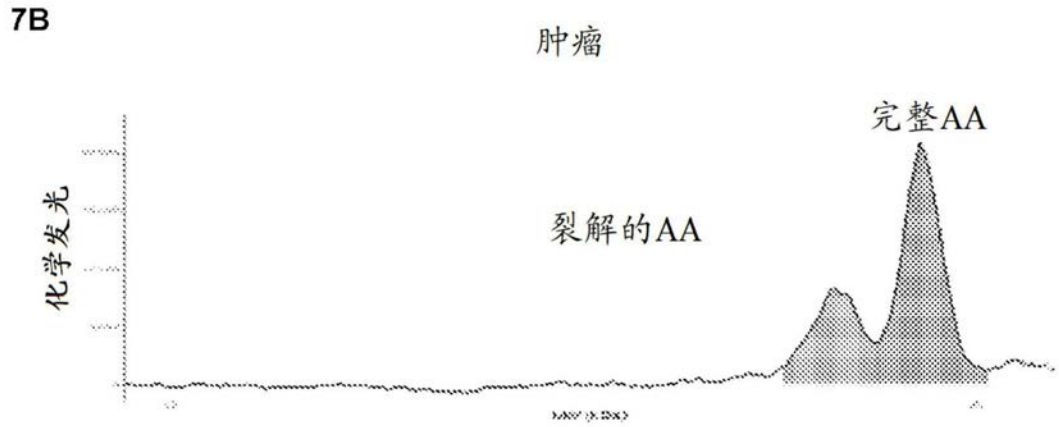

7B
肿瘤
完整AA
裂解的AA
化学发光

图7B

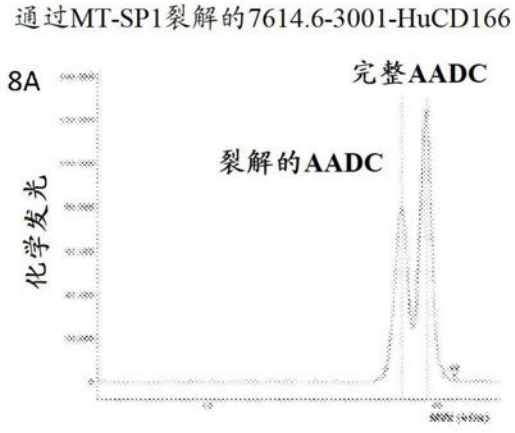

通过MT-SP1裂解的7614.6-3001-HuCD166
8A
完整AADC
裂解的AADC
化学发光

图8A

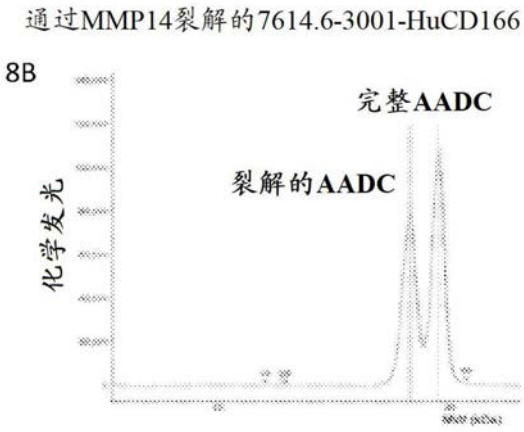

通过MMP14裂解的7614.6-3001-HuCD166
8B
完整AADC
裂解的AADC
化学发光

图8B

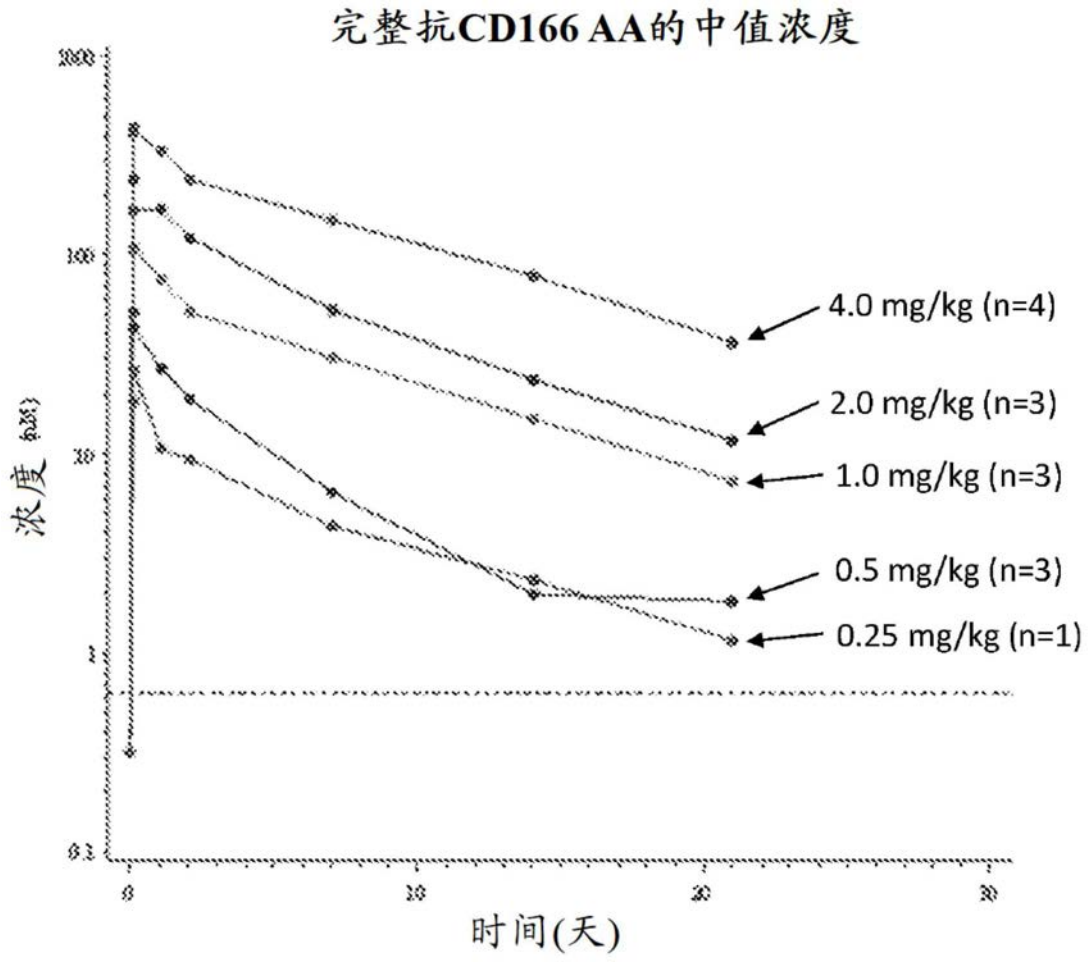

完整抗CD166 AA的中值浓度
浓度
时间(天)
4.0 mg/kg (n=4)
2.0 mg/kg (n=3)
1.0 mg/kg (n=3)
0.5 mg/kg (n=3)
0.25 mg/kg (n=1)

图9A

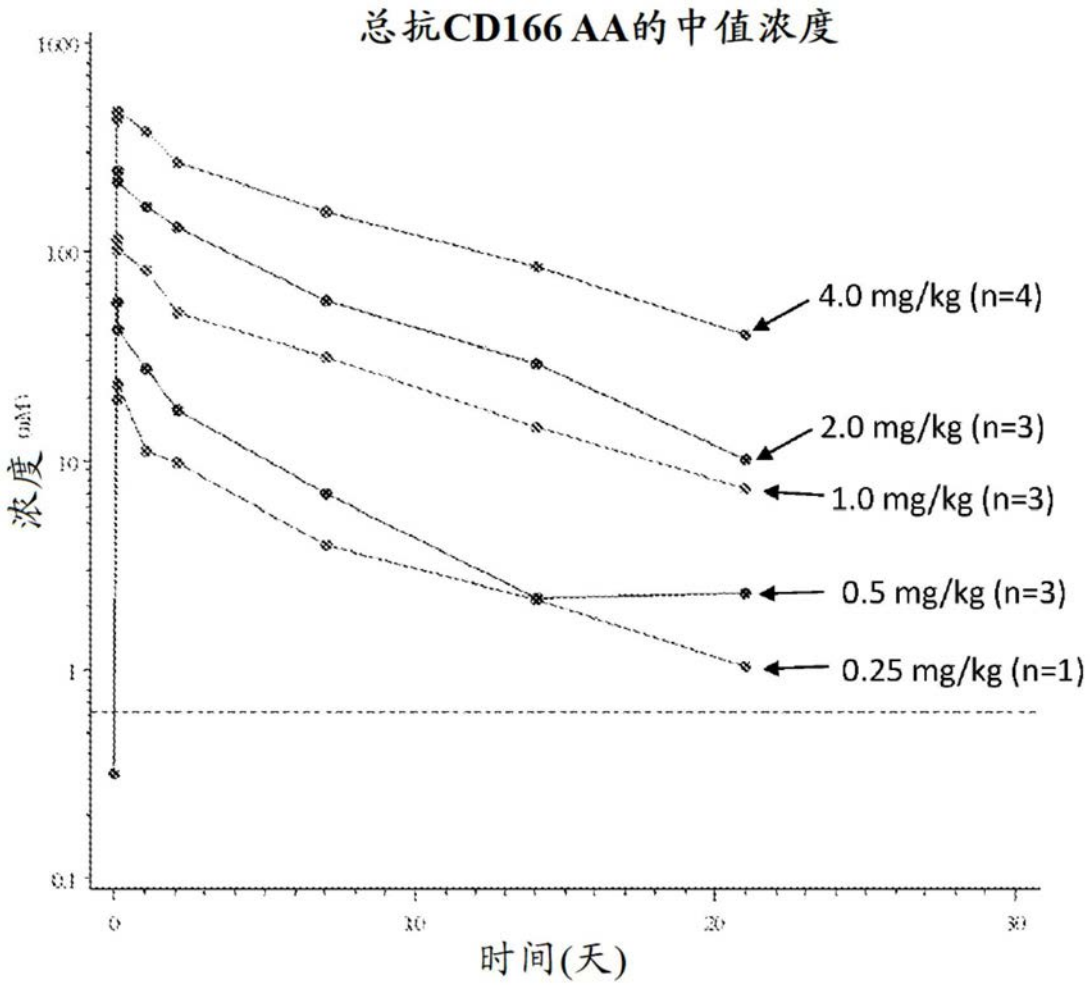

总抗CD166 AA的中值浓度
浓度 (nM)
时间(天)
4.0 mg/kg (n=4)
2.0 mg/kg (n=3)
1.0 mg/kg (n=3)
0.5 mg/kg (n=3)
0.25 mg/kg (n=1)

图9B

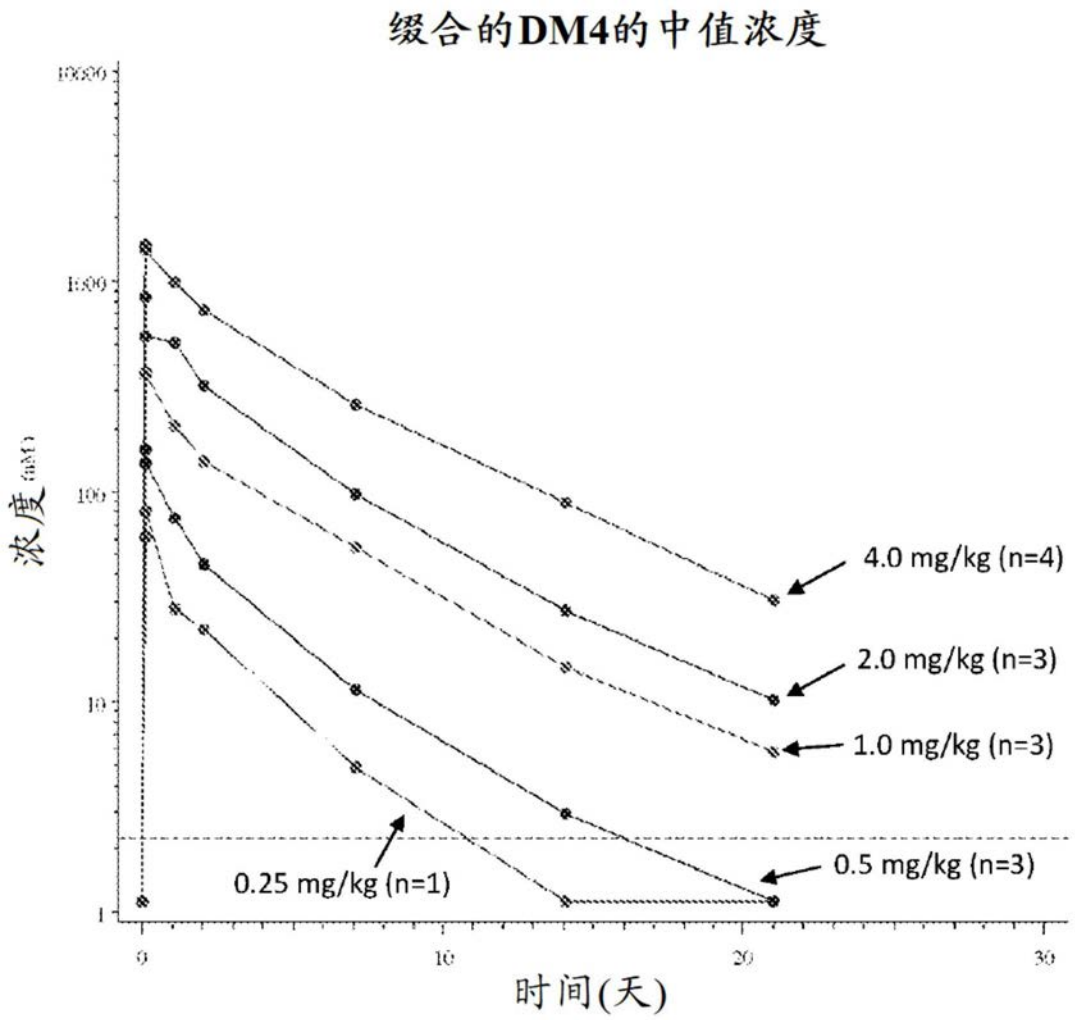

缀合的DM4的中值浓度
浓度(ng/ml)
时间(天)
4.0 mg/kg (n=4)
2.0 mg/kg (n=3)
1.0 mg/kg (n=3)
0.5 mg/kg (n=3)
0.25 mg/kg (n=1)

图9C

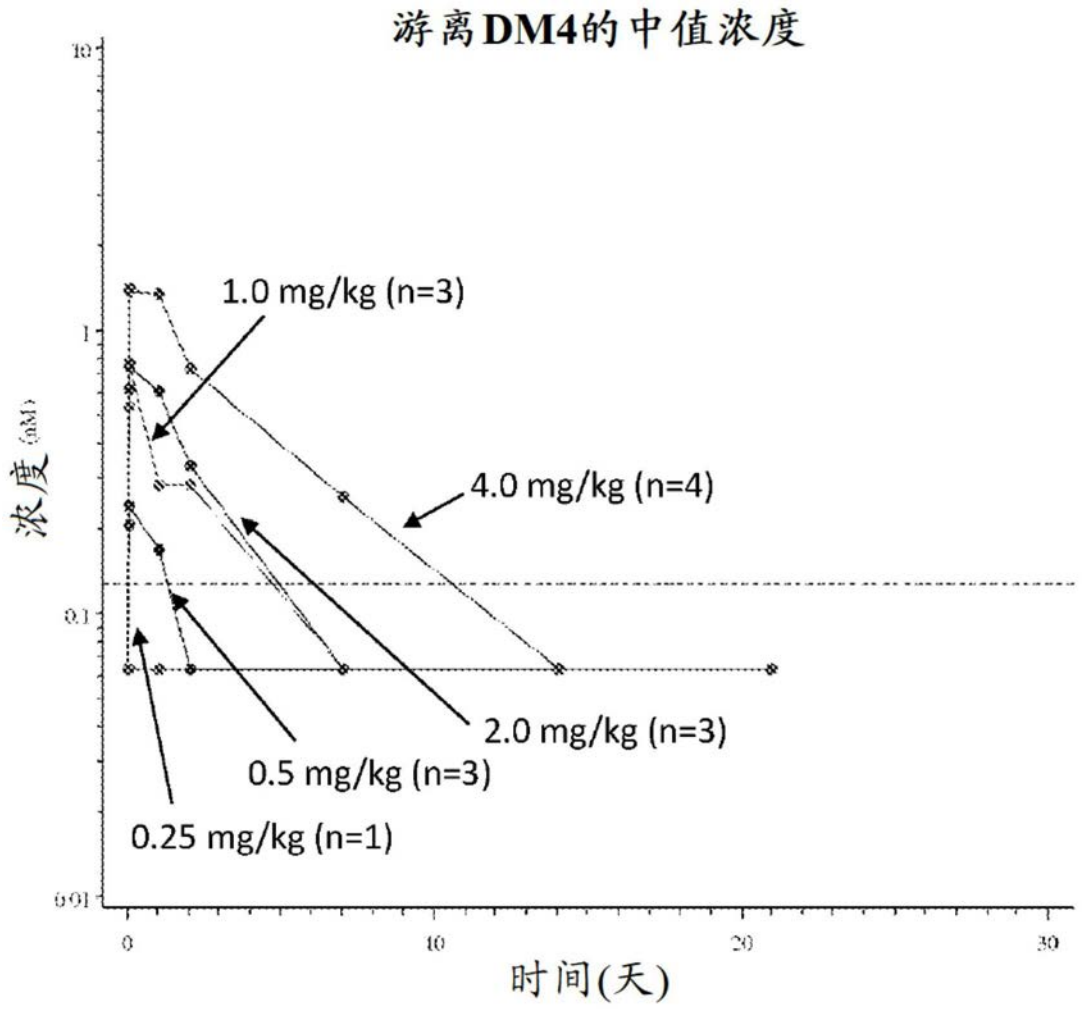

游离DM4的中值浓度
浓度(nM)
10
1
0.1
0.01
1.0 mg/kg (n=3)
4.0 mg/kg (n=4)
2.0 mg/kg (n=3)
0.5 mg/kg (n=3)
0.25 mg/kg (n=1)
0
10
20
30
时间(天)

图9D

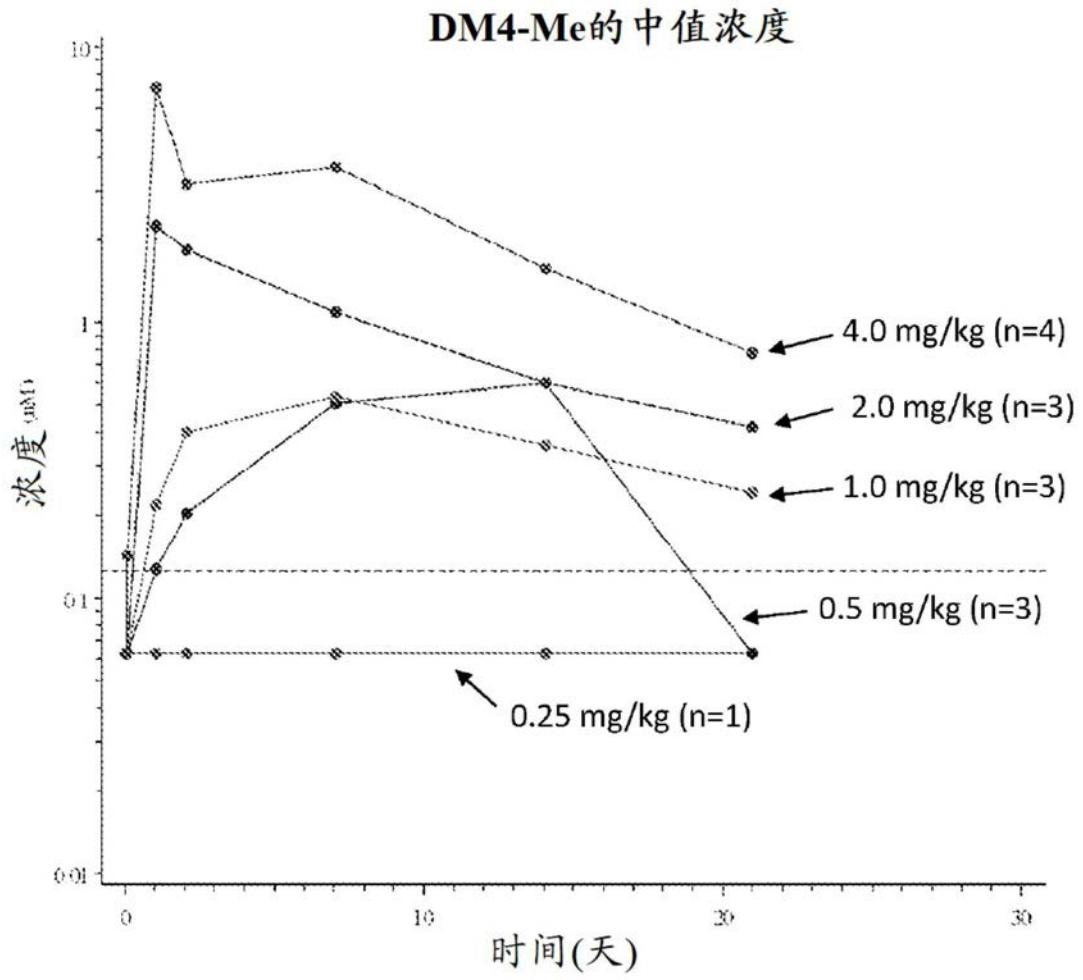

DM4-Me的中值浓度
浓度(uM)
10
1
0.1
0.01
0
10
30
30
时间(天)
4.0 mg/kg (n=4)
2.0 mg/kg (n=3)
1.0 mg/kg (n=3)
0.5 mg/kg (n=3)
0.25 mg/kg (n=1)

图9E