



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110998329 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880050708.4

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

(22)申请日 2018.07.20

11313

代理人 郝名悦 刘文娜

(30)优先权数据

62/534,931 2017.07.20 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28(2006.01)

2020.02.04

G01N 33/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/043190 2018.07.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/018828 EN 2019.01.24

(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 O.瓦西尔杰瓦 S.J.摩尔

B·豪恩 S·K·莱曼

L·R·德斯诺耶斯

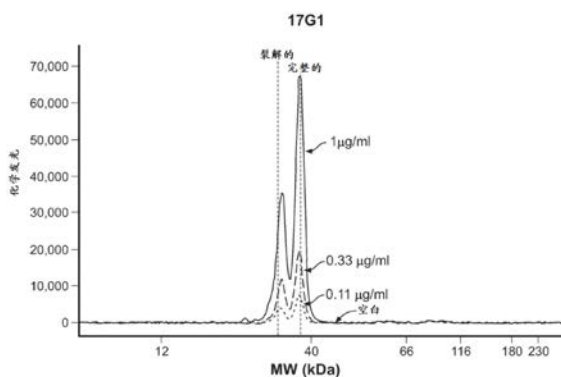
权利要求书3页 说明书71页 附图22页

(54)发明名称

定性和/或定量分析可活化抗体的特性的方法及其用途

(57)摘要

本发明提供了用于定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中可活化抗体治疗剂的活化和其它特性的方法和试剂盒。本发明还涉及使用基于毛细管的免疫测定平台定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中的活化水平的方法。



1. 一种定量可活化抗体的活化水平的方法,所述方法包括:
 - i) 使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与包含一种或多种选自可活化抗体、已活化的可活化抗体及其组合组成的组的组分的生物样品接触;
其中所述已装填的毛细管或已装填的毛细管群体预装填有堆积基质和分离基质;
 - ii) 将每根毛细管内所述生物样品的一种或多种高分子量 (MW) 组分与所述生物样品的一种或多种低分子量 (MW) 组分分离;
 - iii) 固定每根毛细管内的所述高MW组分和所述低MW组分;
 - iv) 用对至少一种可活化抗体具有特异性的至少第一试剂免疫探测每根毛细管;以及
 - v) 检测并定量每根毛细管或每个毛细管群体中所述第一试剂的水平。
2. 如权利要求1所述的方法,其还包括,在步骤i)之前,向至少一根毛细管或毛细管群体装填堆积基质和分离基质以产生所述至少一根已装填的毛细管或已装填的毛细管群体。
3. 如权利要求1至2中任一项所述的方法,其中所述生物样品包含至少一种包含可活化抗体的高分子量组分和至少一种包含已活化的可活化抗体的低分子量组分。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中步骤ii)包括通过毛细管电泳将每根毛细管内所述生物样品的高分子量组分与所述生物样品的低分子量组分分离。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述分离步骤进行至少约35分钟、至少约36分钟、至少约37分钟、或至少约38分钟的分离时间。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中步骤iii)包括使用紫外光固定所述生物样品的所述高MW组分和所述低MW组分。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述可活化抗体选自缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体和缀合的多特异性可活化抗体组成的组。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中步骤iv)中的所述第一试剂包含与所述至少一种可活化抗体特异性结合的抗体或其抗原结合片段。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述第一试剂包含抗独特型抗体或其抗原结合片段。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述抗独特型抗体或其抗原结合片段与所述至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的可变轻链 (VL) CDR结合,其中所述VL CDR选自VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3组成的组。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述第一试剂是可检测试剂。
12. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中步骤iv)还包括向每根毛细管装填与所述第一试剂特异性结合的第二试剂。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述第二试剂包含二抗。
14. 如权利要求12所述的方法,其中所述二级试剂包含可检测标记。
15. 如权利要求13所述的方法,其中所述第二试剂包含与可检测标记缀合的二抗。
16. 如权利要求15所述的方法,其中所述可检测标记是荧光标记。
17. 如权利要求15所述的方法,其中所述可检测标记是选自辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶组成的组的报告酶。
18. 如权利要求17所述的方法,其中所述报告酶是辣根过氧化物酶。
19. 如权利要求13所述的方法,其中所述二抗未与可检测标记缀合。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述二抗与第一结合标签和第二结合标签的集合中的第一结合标签缀合,其中所述第一结合标签能够与所述第二结合标签结合。

21. 如权利要求19至20中任一项所述的方法,其中步骤iv)还包括向每根毛细管装填与所述第二试剂特异性结合的第三试剂。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述第三试剂包含与所述第二结合标签缀合的报告酶。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述报告酶选自由辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶组成的组。

24. 如权利要求22至23中任一项所述的方法,其中所述第一和第二结合标签分别选自由以下组成的组:生物素和链霉亲和素;链霉亲和素和生物素;生物素和抗生物素蛋白;以及抗生物素蛋白和生物素。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述第二试剂是与生物素缀合的二抗,并且所述第三试剂是与链霉亲和素缀合的报告酶。

26. 如权利要求24所述的方法,其中所述第二试剂是与链霉亲和素缀合的二抗,并且所述第三试剂是与生物素缀合的报告酶。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述报告酶选自由辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶组成的组。

28. 如权利要求21所述的方法,其中所述第三试剂包含可检测的三抗。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中步骤iv)还包括向每根毛细管装填选自由化学发光底物和比色底物组成的组的底物。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述底物是化学发光底物,并且步骤v)包括检测每根毛细管或毛细管群体中的化学发光水平。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述化学发光底物是鲁米诺,并且其中步骤iv)还包括向每根毛细管装填过氧化物。

32. 如权利要求1至31中任一项所述的方法,其中步骤i)包括装填大约1-500ng生物样品。

33. 如权利要求32所述的方法,其中步骤i)包括装填大约5-40ng生物样品。

34. 如权利要求1至33中任一项所述的方法,其中使用足以引起分子量分离的量的一种或多种含SDS的缓冲液制备所述生物样品。

35. 如权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述生物样品是体液。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述体液选自由血液、血浆和血清组成的组。

37. 如权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述生物样品是患病组织。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述患病组织是裂解物。

39. 如权利要求38所述的方法,其中,所述患病组织是肿瘤组织。

40. 如权利要求1至37中任一项所述的方法,其中v)定量每根毛细管或毛细管群体中所述第一试剂的水平包括将直接或间接检测的所述第一试剂的水平与可活化抗体的标准曲线和已活化的可活化抗体的标准曲线进行比较。

41. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO: 438)的可变重链互补决定区1(CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTVKG (SEQ ID NO:

439)的可变重链互补决定区2(CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTYLYIDY(SEQ ID NO:440)的可变重链互补决定区3(CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA(SEQ ID NO:441)的可变轻链互补决定区1(CDRL1);含有氨基酸序列WAFTRES(SEQ ID NO:442)的可变轻链互补决定区2(CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT(SEQ ID NO:443)的可变轻链互补决定区3(CDRL3)。

42.如权利要求41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

43.如权利要求41或权利要求42所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

44.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

45.如权利要求44所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

46.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

47.如权利要求44所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

48.一种试剂盒,其包括:

(i)可活化抗体标准曲线试剂;

(ii)已活化的可活化抗体标准曲线试剂;和

(iii)对所述可活化抗体具有结合特异性的抗独特型一抗。

定性和/或定量分析可活化抗体的特性的方法及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据《美国法典》第35篇第119条第(e)项要求2017年7月20日提交的美国临时专利申请第62/534,931号的权益,该申请的内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及用于定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中可活化抗体治疗剂的活化和其它特性的方法。本发明还涉及使用基于毛细管的免疫测定平台定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中的活化水平的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 基于抗体的疗法已证明是针对若干疾病的有效治疗,但在一些情况下,由于广泛的靶标表达引起的毒性限制了其疗效。另外,基于抗体的治疗剂还表现出其它局限性,诸如施用后从循环中快速清除。在小分子治疗剂的领域,已开发出提供活性化学实体的前药的策略。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。此类前药策略可以提高药物对其预期靶标的选择性并且减少副作用。

[0006] 为了克服基于抗体的治疗剂的局限性,已经设计了基于可活化抗体的治疗剂。

[0007] 需要能够监测和定量分析此类基于可活化抗体的治疗剂的活化。

发明内容

[0008] 本发明涉及一种定量可活化抗体的活化水平的方法,所述方法包括:

[0009] i) 使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与包含一种或多种选自可活化抗体、已活化的可活化抗体及其组合组成的组的组分的生物样品接触;

[0010] 其中所述已装填的毛细管或已装填的毛细管群体预装填有堆积基质和分离基质;

[0011] ii) 将每根毛细管内所述生物样品的一种或多种高分子量(MW)组分与所述生物样品的一种或多种低分子量(MW)组分分离;

[0012] iii) 固定每根毛细管内的所述高MW组分和所述低MW组分;

[0013] iv) 用对至少一种可活化抗体具有特异性的至少第一试剂免疫探测每根毛细管;并且

[0014] v) 检测和定量每根毛细管或每个毛细管群体中所述第一试剂的水平。

[0015] 在一个实施方案中,步骤ii)包括通过毛细管电泳将每根毛细管内所述生物样品的高分子量组分与所述生物样品的低分子量组分分离。

[0016] 在另一个实施方案中,所述可活化抗体选自自由缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体和缀合的多特异性可活化抗体组成的组。

[0017] 在一些实施方案中,第一试剂包含抗独特型抗体或其抗原结合片段。

[0018] 在另一个实施方案中,步骤iv)还包括向每根毛细管装填与第一试剂特异性结合的第二试剂。在一些实施方案中,第二试剂经可检测地标记。在其它实施方案中,第二试剂

未经可检测地标记,并且步骤iv)还包括向每根毛细管装填与第二试剂特异性结合的第三试剂。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包括:

[0020] (i) 可活化抗体标准曲线试剂;

[0021] (ii) 已活化的可活化抗体标准曲线试剂;和

[0022] (iii) 对可活化抗体具有结合特异性的抗独特型一抗。

附图说明

[0023] 图1A和1B是一系列图表,其描绘了用在1:100人血浆中的0.11、0.33和1ug/ml的37%单臂活化的可活化抗体筛选PL07-2001-C5H9v2抗独特型(抗id)克隆物。图1A为电泳图,其显示浓度递减的单臂活化的PL07-2001-C5H9v2(1、0.33和0.11ug/ml,在图中称为AAMIX)的17G1检测。图1B展示了单臂活化的可活化抗体的前6种克隆物的相对活化百分比。相对活化率在不同浓度下得以保持。21H10和27C1克隆物的亲和力较低,导致没有关于0.11ug/ml浓度的数据。

[0024] 图2A、2B、2C和2D是一系列图表,其描绘了本文中称为17G1的抗体对可活化抗体(AA) PL07-2001-C5H9v2具有高度特异性。通过将160ng/ml单臂活化的PL07-2001-C5H9v2(已活化的AA)掺入到人血浆(图2C)或肺肿瘤裂解物(图2D)中,在Wes上评估17G1的特异性。

[0025] 图3A和3B是一系列图表,其描绘通过选择性抗独特型抗体对可活化抗体(AA)治疗剂的特异性检测。图3A展示了使用来自American Qualex的商购A110UK(未贴标签的猴子吸附的山羊抗人IgG(H&L))(可在网站aqsp.com/上找到)来检测用10mg/kg的PL07-2001-C5H9v2处理的小鼠血浆中的本文称为PL07-2001-C5H9v2的抗PDL1可活化抗体。图3B展示了使用抗独特型17G1抗体来检测用0.1mg/kg的PL07-2001-C5H9v2处理的小鼠血浆中的PL07-2001-C5H9v2。

[0026] 图4A和图4B是一系列图表,其描绘了在异种移植肿瘤模型中检测到相对于血浆,肿瘤中的可活化抗体(AA)治疗剂优先活化。用1mg/ml抗PDL1可活化抗体(本文称为PL07-2001-C5H9v2)处理MDA-MB-231异种移植小鼠。在第4天收集肿瘤和血浆样品。图4A和4B展示了通过本发明的毛细管电泳免疫测定方法对肿瘤匀浆和血浆样品的分析。

[0027] 图5A和图5B是一系列图表,其描绘了在另一异种移植肿瘤模型中检测到相对于血浆,肿瘤中的可活化抗体治疗剂优先活化。用0.1mg/kg抗PDL1可活化抗体(本文称为PL07-2001-C5H9v2)处理SAS异种移植小鼠。图5A和5B展示了通过本发明的毛细管电泳免疫测定方法对肿瘤匀浆和血浆样品的分析。

[0028] 图6A和图6B是一系列图表,其描绘了使用本文称为7614.6-3001-HuCD166的抗CD166可活化抗体,在异种移植肿瘤模型中检测到相对于血浆,肿瘤中的可活化抗体治疗剂的优先活化。用5mg/kg的7614.6-3001-HuCD166处理H292异种移植小鼠。在第1天收集肿瘤和血浆样品。图6A和6B展示了通过本发明的毛细管电泳免疫测定方法对肿瘤匀浆和血浆样品的分析。

[0029] 图7A和图7B是一系列图表,其描绘了使用含不同底物的EGFR可活化抗体,在异种移植肿瘤模型中检测到相对于血浆,肿瘤中的可活化抗体治疗剂优先活化。用25mg/kg的C225-3954-2001或C225-3954-3001可活化抗体治疗剂处理H292异种移植小鼠。在第4天收

集肿瘤和血浆样品。图7A和7B展示了通过本发明的毛细管电泳免疫测定方法对肿瘤匀浆和血浆样品的分析。

[0030] 图8是从本发明的毛细管电泳免疫测定方法获得的结果的图表,所述方法用于评估生物样品中已活化的和非活化的抗CD71可活化抗体(本文称为TF02.13-2011-21.12)之间的比率。该方法用于分离在人血浆存在下与非活化的(即完整的)可活化抗体混合的预活化的可活化抗体。

[0031] 图9是描绘使用本公开的毛细管电泳免疫测定方法获得的结果的图表,所述方法用于评估生物样品中已活化的和非活化的抗PD1可活化抗体(本文称为PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P)之间的比率。该方法用于分离在人血浆存在下与非活化的(即完整的)可活化抗体混合的预活化的可活化抗体。

[0032] 图10A和10B是描绘使用本公开的毛细管电泳免疫测定方法获得的结果的一系列图表,所述方法用于使用抗CD166可活化抗体(本文称为7614.6-3001-HuCD166)评估已活化的和完整的(即非活化的)可活化抗体(AA)治疗剂(AA Tx)。本发明的毛细管免疫测定方法用于将已被间质蛋白酶(matriptase)(图10A)或MMP-14(图10B)部分活化的7614.6-3001-HuCD166可活化抗体与完整的7614.6-3001-HuCD166可活化抗体分离。

[0033] 图11A和11B分别描绘使用两步检测方案和三级检测方案检测到的已活化的可活化抗体(7614.6-3001-HuCD166的裂解产物)和完整/活化的可活化抗体(完整的7614.6-3001-HuCD166)的化学发光信号,如实施例11中所述。

[0034] 图12描绘了在肿瘤组织中针对抗Jagged(完整的)可活化抗体5342-3001-4D11和相应已活化的可活化抗体检测到的化学发光信号。

具体实施方式

[0035] 本公开提供了使用基于毛细管的免疫测定平台,定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中可活化抗体活化剂的活化和其它特性的方法和试剂盒。

[0036] 可活化抗体通常至少包括以下:(i)特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);(ii)与AB偶联,使得当可活化抗体处于未裂解或完整状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);(iii)与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。可活化抗体通常当CM的底物在其充当底物的蛋白酶存在时活化,并且蛋白酶裂解CM的底物,从而产生“活化的”(或“裂解的”)可活化抗体。可活化抗体也可以呈以下形式:缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体等。下文将更详细地描述可活化抗体。

[0037] 有用的是能够定性和/或定量测量生物样品中可活化抗体的特性,例如生物样品中可活化抗体的活化水平,生物样品中已活化(即裂解)的可活化抗体和/或完整(即失活)的可活化抗体的总量,或其任何组合或相关性。此类方法可用于在开发和/或治疗性治疗的任何阶段监测可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的功效。例如,在一些实施方案中,本文提供的方法和试剂盒可用于在向有需要的受试者施用之前和/或在治疗方案期间测试可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的功效以监测可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂在整个施用期间和/或在施用期之后的功效。在一些实施方案中,本文提供的方法和试剂盒可用于提供对可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的回顾性分析。

[0038] 在一些实施方案中,本公开提供了定量可活化抗体的活化水平的方法,该方法包括:

[0039] i) 使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与包含一种或多种选自自由可活化抗体、已活化的可活化抗体及其组合组成的组的组分的生物样品接触;

[0040] 其中所述已装填的毛细管或已装填的毛细管群体预装填有堆积基质和分离基质;

[0041] ii) 将每根毛细管内所述生物样品的一种或多种高分子量 (MW) 组分与所述生物样品的一种或多种低分子量 (MW) 组分分离;

[0042] iii) 固定每根毛细管内的所述高MW组分和所述低MW组分;

[0043] iv) 用对至少一种可活化抗体具有特异性的至少第一(一级)试剂免疫探测每根毛细管;并且

[0044] v) 检测和定量每根毛细管或每个毛细管群体中所述第一(一级)试剂的水平。

[0045] 在一些实施方案中,该方法还包括,在步骤i)之前,向至少一根毛细管或一个毛细管群体装填堆积基质和分离基质以产生所述至少一根已装填的毛细管或已装填的毛细管群体。

[0046] 如本文所用,术语“堆积基质”是指高度多孔(相对于分离基质而言)的材料,其作用是浓缩存在于生物样品中的蛋白质,并使其“堆积”在与分离基质的界面处,使得蛋白质在电泳条件下开始从相同的物理起点迁移。可以由用于制备用于蛋白质印迹法(Western blotting method)的堆积凝胶的相同材料和组合物(例如,丙烯酰胺、0.5M Tris-HCl (pH 6.8)、SDS、水、过硫酸铵和N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)等)制备在本发明实践中采用的合适堆积基质。术语“分离基质”在本文中是指在电泳条件下基于蛋白质的分子量促进蛋白质分离的材料。可以由用于制备用于蛋白质印迹法的分离凝胶的相同材料和组合物(例如,水、丙烯酰胺、Tris-HCl (pH 8.8)、SDS、TMED、过硫酸铵等)制备在本发明实践中采用的合适分离基质。预装填有堆积基质和分离基质的毛细管可以从例如ProteinSimple (Wes™分离模块毛细管盒以及在Wes™毛细管电泳免疫测定系统上使用的有关试剂的供应商)商购获得。

[0047] 然后使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与生物样品接触,以开始将生物样品装填到每根已装填的毛细管中。生物样品通常包含至少一种相对高分子量的组分和至少一种相对低分子量的组分,相对高分子量的组分是(完整或未裂解的)可活化抗体(包括,例如缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体等),相对低分子量的组分是(裂解)已活化的可活化抗体。通常,生物样品包含(完整或未裂解的)可活化抗体和(裂解)已活化的可活化抗体两者。在一些实施方案中,生物样品包含来自受试者的体液。在一些实施方案中,体液分离自受试者体内的任何部位。在一些实施方案中,体液是血液或血液组分诸如血浆或血清。在一些实施方案中,生物样品包含细胞培养上清液。在一些实施方案中,生物样品包含来自受试者的组织样品。组织样品可以分离自受试者体内的任何部位。在一些实施方案中,组织样品是肿瘤样品。

[0048] 在一些实施方案中,生物样品来自哺乳动物,诸如人、非人灵长类、伴侣动物(例如,猫、狗、马)、农场动物、役用动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是伴侣动物。在一些实施方案中,受试者是兽医照料的动物。

[0049] 在一些实施方案中,步骤i)包括装填大约1-500ng生物样品或介于大约1-500ng生

物样品之间的任何值和/或范围。在一些实施方案中,步骤i)包括装填大约5-40ng生物样品。在一些实施方案中,使用一种或多种缓冲液制备生物样品,所述缓冲液的量足以引起分子量分离。在一些实施方案中,使用一种或多种含SDS的缓冲液制备生物样品,所述缓冲液的量足以引起分子量分离。

[0050] 将每根毛细管中生物样品的所述一种或多种高分子量组分(例如,(完整的可活化抗体)与所述一种或多种低分子量组分(例如,(裂解)已活化的可活化抗体)分离可以通过使每根毛细管进行电泳来实现。电泳使生物样品中的化合物根据分子大小(例如,分子量)以不同速率迁移通过分离凝胶。在一些实施方案中,分离进行小于约35分钟的时间段(即,“分离时间”)。分离时间通常为至少约35分钟,或至少约36分钟,或至少约37分钟,或至少约38分钟。

[0051] 可以使用任何合适的固定方法和试剂来固定每根毛细管内的高分子量和低分子量组分(例如,固定到每根毛细管的内表面)。在一些实施方案中,步骤iii)包括使用紫外光固定生物样品的高MW组分(例如(完整)的可活化抗体)和低MW组分(例如(裂解)已活化的可活化抗体)。该步骤引起生物样品中存在的任何(完整)的可活化抗体和(裂解)已活化的可活化抗体固定化。用于进行毛细管电泳和固定步骤的合适系统是Wes™毛细管电泳免疫测定系统(ProteinSimple)。

[0052] 在实施本发明的方法时,使用对至少一种可活化抗体具有结合特异性的第一试剂来免疫探测每根毛细管。通常,第一试剂是一抗。通常,第一试剂包含抗独特型(id)抗体或其抗原结合片段。当将可活化抗体的MM和CM缀合至可活化抗体的轻链时,通常会采用与可活化抗体的可变轻链(VL)区结合的抗独特型抗体或其抗原结合片段。通常在这些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合片段对选自自由VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3组成的组的VL CDR具有结合特异性。当将可活化抗体的MM和CM缀合至可活化抗体的重链时,通常会采用与可活化抗体的可变重链(VH)区结合的抗独特型抗体或其抗原结合片段。在这些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合片段通常对选自自由VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3组成的组的VH CDR具有结合特异性。在一些实施方案中,可能期望使用两种或更多种抗独特型抗体物质(或其抗原结合片段)的组合。在下文的实施例中描述了示例性的抗-id抗体及其在本发明方法中的用途。

[0053] 第一试剂的检测可以多种方式完成。例如,在一个实施方案中,步骤v)还包括用另外的第二试剂免疫探测每根毛细管,所述第二试剂特异性结合或识别第一试剂。在该实施方案中,每根毛细管都装填有第二试剂。通常,第二试剂包含与第一试剂特异性结合的二抗。

[0054] 在一些实施方案中,第一和/或第二试剂经可检测地标记。如本文所用,术语“可检测标记”是指可以直接或间接检测到的部分,例如,荧光标记、报告酶(与例如化学发光底物、比色底物等组合使用),等等。示例性报告酶包括,例如,过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶(HRP)等)、碱性磷酸酶等。适合用于本发明实践中的示例性的可检测标记的第二试剂包括HRP缀合的抗小鼠二抗、HRP缀合的抗山羊二抗、HRP缀合的抗人二抗等。通常,添加化学发光底物以提供最终被检测到的信号。合适的化学发光底物系统是本领域已知的,并且包括例如鲁米诺(luminol)+过氧化物等。

[0055] 在其它实施方案中,第二试剂未经可检测地标记(例如,未与任何可检测标记(例

如,报告酶)缀合)。在该实施方案中,第二试剂通常是与第一和第二结合标签集合中的第一结合标签缀合的二抗,其中所述第一结合标签能够与所述第二结合标签结合。进行该方法,其中步骤v)还包括向每根毛细管装填与第二试剂特异结合的第三(三级)试剂。第三试剂通常包含第二结合标签和可检测标记,例如报告酶或荧光标记。示例性的第一和第二结合标签分别包括生物素和链霉亲和素;链霉亲和素和生物素;生物素和抗生物素蛋白;以及抗生物素蛋白和生物素;等等。这种“三级检测方法”似乎增强了与可活化抗体和可活化抗体物质相关的信号,从而使检测和定量步骤变得容易。在该实施方案中采用的示例性第二和第三试剂包括是与链霉亲和素缀合的二抗的第二试剂和是与生物素(例如,HRP-缀合的生物素)缀合的报告酶的第三试剂。化学发光系统通常用于生成最终检测到的信号(例如,鲁米诺+过氧化物)。在本文的实施例11中说明了该方法。

[0056] 在一些实施方案中,步骤v)中的所述至少一种可检测试剂至少包括对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合具有特异性的第一试剂和特异性结合或识别第一试剂的第二试剂,其中第二试剂包含可检测标记。

[0057] 在一些实施方案中,步骤v)包括定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测标记的水平。

[0058] 在一些实施方案中,步骤iv)中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,步骤iv)中的第二试剂是与第一试剂特异性结合的可检测标记的二抗。在一些实施方案中,步骤iv)中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的一抗或其抗原结合片段,并且步骤iv)中的第二试剂是特异性结合一抗或其抗原结合片段的可检测标记的二抗。在一些实施方案中,可检测标记与第二试剂缀合。在一些实施方案中,可检测标记是辣根过氧化物酶(HRP)。

[0059] 在一些实施方案中,一级试剂、二级试剂和/或三级试剂,或一级试剂、二级试剂和三级试剂中的每一种是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、结构域抗体、单链抗体、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,此类结合靶标的抗体或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或全人单克隆抗体。

[0060] 在一些实施方案中,使用本文例如实施例1中描述的方法,生成与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗。

[0061] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO:438)的可变重链互补决定区1(CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTKG (SEQ ID NO:439)的可变重链互补决定区2(CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTLYYIDY (SEQ ID NO:440)的可变重链互补决定区3(CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA (SEQ ID NO:441)的可变轻链互补决定区1(CDRL1);含有氨基酸序列WAFTRRES (SEQ ID NO:442)的可变轻链互补决定区2(CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT (SEQ ID NO:443)的可变轻链互

补决定区3 (CDRL3)。

[0062] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0063] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0064] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链和含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0065] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0066] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,和与包含SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0068] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链。

[0069] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:445的氨基酸序列的轻链。

[0070] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含含有SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:445的氨基酸序列的轻链。

[0071] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0072] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:445

的氨基酸序列的轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0073] 在一些实施方案中,与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一抗包含与包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,和与包含SEQ ID NO:445的氨基酸序列的轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0074] 在一些实施方案中,可检测标记与第二试剂缀合。在一些实施方案中,可检测标记是荧光标记,例如HRP,并且步骤v)包括检测每根毛细管或每个毛细管群体中的化学发光水平。

[0075] 在一些实施方案中,本文提供的方法用于定量生物样品中一种或多种可活化抗体的活化。例如,可以基于检测到的可活化抗体和已活化的可活化抗体物质的总和来将活化计算为百分比。在一些实施方案中,本文提供的方法用于比较生物样品中已活化的和完整的可活化抗体或基于可活化抗体的治疗剂的量。在一些实施方案中,本文提供的方法用于对生物样品中体内蛋白酶活性进行分析、分层或以其它方式分类。由检测步骤产生的信号峰的属性(即,对应于随分子量变化检测到的信号)可以用作定量第一试剂水平(即,直接检测到的水平或通过可检测标记的二级试剂或可检测标记的三级试剂间接检测到的水平)的基础。例如,可以利用峰高或曲线下面积以及其它类似方法。通常,步骤v)包括定量每根毛细管或每个毛细管群体中第一试剂的水平,包括将直接或间接检测的第一试剂的水平与可活化抗体和已活化的可活化抗体的标准曲线进行比较。在下文的实施例13中说明了标准曲线的制备。

[0076] 如本文所述,在一些实施方案中,基于可活化抗体的治疗剂是缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。

[0077] 在一些实施方案中,一级试剂、二级试剂,或一级试剂和二级试剂两者是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、结构域抗体、单链抗体、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,此类结合靶标的抗体或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或全人单克隆抗体。

[0078] 本发明的方法可用于检测和定量具有多种结构中的任一种的可活化抗体的活化。完整的可活化抗体结构的结构与已活化/裂解的可活化抗体结构的结构之间的一般差异是相对较小的分子量差异。即使是最复杂的生物样品,也可以实现检测和定量。例如,在一些实施方案中,本公开提供了使用基于毛细管的免疫测定平台定性和/或定量分析生物样品(包括组织和/或血浆样品)中的可活化抗体治疗剂活化的方法。本文提供的方法可与任何基于可活化抗体的治疗剂一起使用,所述基于可活化抗体的治疗剂包括例如可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。除非另外明确定义,否则关于在本文提供的方法中使用的合适的可活化抗体的所有公开内容也适用于并且适合其它基于可活化抗体的治疗剂,包括但不限于可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。

[0079] 在一些实施方案中,本公开提供了用于定性和/或定量分析可活化抗体治疗剂的

活化的方法,所述可活化抗体治疗剂具有:特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);与AB的轻链偶联,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);以及与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。在一些实施方案中,所述方法用于定量或以其它方式至少比较(i)其中CM已被裂解并且MM未与AB的轻链偶联的已活化的可活化抗体的水平;和(ii)其中MM和CM与AB的轻链偶联的完整的可活化抗体的水平。

[0080] 在一些实施方案中,特异性结合靶标的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的AB是抗体。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、结构域抗体、单链抗体、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,此类结合靶标的抗体或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或全人单克隆抗体。

[0081] 处于活化状态的可活化抗体结合靶标,并且包括(i)特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);(ii)与AB偶联,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);和(iii)与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。

[0082] 在一些实施方案中,处于未裂解状态的可活化抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。

[0083] 在一些实施方案中,可活化抗体包含介于MM和CM之间的连接肽。

[0084] 在一些实施方案中,可活化抗体包含介于CM和AB之间的连接肽。

[0085] 在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且其中处于未裂解状态的可活化抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-LP1-CM-LP2-AB或AB-LP2-CM-LP1-MM。在一些实施方案中,两个连接肽不需要彼此具有同一性。

[0086] 在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:339)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:340),其中n是至少为1并且在一些实施方案中不大于20的整数。

[0087] 在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:341)、GGSGG(SEQ ID NO:342)、GSGSG(SEQ ID NO:343)、GSGGG(SEQ ID NO:344)、GGGSG(SEQ ID NO:345)、GSSSG(SEQ ID NO:346)和GGGSSGGS(SEQ ID NO:449)。

[0088] 在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGSGGSG(SEQ ID NO:347)、GSSGGSGGSGG(SEQ ID NO:348)、GSSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:349)、GSSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:350)、GSSGGSGGSG(SEQ ID NO:351)、GGGSSGGS(SEQ ID NO:449)或GSSGGSGGSGS(SEQ ID NO:352)。

[0089] 在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS(SEQ ID NO:353)、GSSGT(SEQ ID NO:354)或GSSG(SEQ ID NO:355)。

[0090] 在一些实施方案中,可活化抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其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,此类结合靶标的抗体或其抗原结合片段是小鼠、其它啮齿动物、嵌合、人源化或全人单克隆抗体。

- [0091] 在一些实施方案中,MM与AB结合的解离常数大于AB与靶标的解离常数。
- [0092] 在一些实施方案中,MM与AB结合的解离常数不超过AB与靶标的解离常数。
- [0093] 在一些实施方案中,MM与AB结合的解离常数等于AB与靶标的解离常数。
- [0094] 在一些实施方案中,MM与AB结合的解离常数小于AB与靶标的解离常数。
- [0095] 在一些实施方案中,MM对AB的解离常数(K_d)不超过AB对靶标的解离常数的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倍或更高,或是AB对靶标的解离常数的1-5、5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍或更高。
- [0096] 在一些实施方案中,当可活化抗体处于裂解状态时,MM不干扰AB或不与AB竞争结合靶标。
- [0097] 在一些实施方案中,MM是长度为约2至40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,MM是长度最多为约40个氨基酸的多肽。
- [0098] 在一些实施方案中,MM多肽序列与靶标的多肽序列不同。在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过50%。在一些实施方案中,MM多肽序列与靶标的多肽序列不同,并且与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过40%、30%、25%、20%、15%或10%。
- [0099] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少两倍。
- [0100] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少五倍。
- [0101] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少10倍。
- [0102] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少20倍。
- [0103] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少40倍。
- [0104] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少100倍。
- [0105] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少1000倍。
- [0106] 在一些实施方案中,MM与AB的偶联降低了AB结合靶标的能力,使得AB在与MM偶联时对靶标的解离常数(K_d)为AB未与MM偶联时对靶标的 K_d 的至少10,000倍。
- [0107] 在一些实施方案中,在靶标的存在下,当使用靶标位移测定法,例如PCT公开第W0 2010/081173号(其内容特此通过引用整体并入)中描述的测定法在体外进行测定时,CM未裂解时与CM被裂解时相比,MM使AB结合靶标的能力降低至少90%。
- [0108] 在一些实施方案中,裂解CM的蛋白酶在患病组织中有活性,例如,上调或以其它方

式不受调控,并且当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。

[0109] 在一些实施方案中,蛋白酶与靶标共定位于组织中,并且当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM。

[0110] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少两倍,而处于裂解状态时(即,当可活化抗体处于裂解状态时),AB结合靶标。

[0111] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少五倍,而处于裂解状态时(即,当可活化抗体处于裂解状态时),AB结合靶标。

[0112] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少10倍,而处于裂解状态时(即,当可活化抗体处于裂解状态时),AB结合靶标。

[0113] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少20倍,而处于裂解状态时(即,当可活化抗体处于裂解状态时),AB结合靶标。

[0114] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少40倍,而处于裂解状态时,AB结合靶标。

[0115] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少50倍,而处于裂解状态时,AB结合靶标。

[0116] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少100倍,而处于裂解状态时,AB结合靶标。

[0117] 在一些实施方案中,CM位于可活化抗体中,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,可活化抗体与靶标的结合减少,出现解离常数为未修饰的AB与靶标结合的解离常数的至少200倍,而处于裂解状态时,AB结合靶标。

[0118] 在一些实施方案中,CM是长度最多为15个氨基酸的多肽。

[0119] 在一些实施方案中,CM是包括第一可裂解部分(CM1)和第二可裂解部分(CM2)的多肽,所述第一可裂解部分是至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物,所述第二可裂解部分是至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)的底物。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最多为15个氨基酸的多肽。

[0120] 在一些实施方案中,CM是至少一种蛋白酶的底物,所述至少一种蛋白酶是或被认为是癌症中上调或以其它方式不受调控。

[0121] 在一些实施方案中,CM是选自基质金属蛋白酶(MMP)、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、豆蔻蛋白酶(legumain)和丝氨酸蛋白酶(诸如,间质蛋白酶(MT-SP1)和尿激酶(uPA))组成的组的至少一种蛋白酶的底物。不受理论的约束,据信这些蛋白酶在至少一种癌症中上调或以其它方式不受调控。

[0122] 示例性底物包括但不限于可由表4中所列的一种或多种以下酶或蛋白酶裂解的底

物。

[0123] 在一些实施方案中,选择CM与特定蛋白酶一起使用,例如已知与可活化抗体的靶标共定位的蛋白酶。

[0124] 在一些实施方案中,CM是至少一种MMP的底物。MMP的实例包括表4中所列的MMP。在一些实施方案中,CM是选自由MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11和MMP19组成的组的蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是MMP9的底物。在一些实施方案中,CM是MMP14的底物。

[0125] 在一些实施方案中,CM是包括以下序列的底物:TGRGPSWV (SEQ ID NO:356); SARGPSRW (SEQ ID NO:357); TARGPSFK (SEQ ID NO:358); LSGRSDNH (SEQ ID NO:359); GGWHTGRN (SEQ ID NO:360); HTGRSGAL (SEQ ID NO:361); PLTGRSGG (SEQ ID NO:362); AARGPAIH (SEQ ID NO:363); RGP AFNPM (SEQ ID NO:364); SSRGPAYL (SEQ ID NO:365); RGPATPIM (SEQ ID NO:366); RGPA (SEQ ID NO:367); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:368); FPRPLGITGL (SEQ ID NO:369); VHMPGLFLGP (SEQ ID NO:370); SPLTGRSG (SEQ ID NO:371); SAGFSLPA (SEQ ID NO:372); LAPLGLQRR (SEQ ID NO:373); SGGPLGVR (SEQ ID NO:374); PLGL (SEQ ID NO:375); LSGRSGNH (SEQ ID NO:789); SGRSANPRG (SEQ ID NO:790); LSGRSDDH (SEQ ID NO:791); LSGRSDIH (SEQ ID NO:792); LSGRSDQH (SEQ ID NO:793); LSGRSDTH (SEQ ID NO:794); LSGRSDYH (SEQ ID NO:795); LSGRSDNP (SEQ ID NO:796); LSGRSANP (SEQ ID NO:797); LSGRSANI (SEQ ID NO:798); LSGRSDNI (SEQ ID NO:799); MIAPVAYR (SEQ ID NO:800); RPSPMWAY (SEQ ID NO:801); WATPRPMR (SEQ ID NO:802); FRLLDWQW (SEQ ID NO:803); ISSGL (SEQ ID NO:804); ISSGLLS (SEQ ID NO:805); 和/或ISSGLL (SEQ ID NO:806)。

[0126] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDNH (SEQ ID NO:359)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列TGRGPSWV (SEQ ID NO:356)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PLTGRSGG (SEQ ID NO:362)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GGQPSGMWGW (SEQ ID NO:368)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列FPRPLGITGL (SEQ ID NO:369)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列VHMPGLFLGP (SEQ ID NO:370)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PLGL (SEQ ID NO:375)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SARGPSRW (SEQ ID NO:357)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列TARGPSFK (SEQ ID NO:358)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GGWHTGRN (SEQ ID NO:360)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列HTGRSGAL (SEQ ID NO:361)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AARGPAIH (SEQ ID NO:363)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RGP AFNPM (SEQ ID NO:364)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SSRGPAYL (SEQ ID NO:365)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RGPATPIM (SEQ ID NO:366)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RGPA (SEQ ID NO:367)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSGNH (SEQ ID NO:789)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SGRSANPRG (SEQ ID NO:790)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDDH (SEQ ID NO:791)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDIH (SEQ ID NO:792)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDQH (SEQ ID NO:793)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDTH (SEQ ID NO:794)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDYH (SEQ ID NO:795)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDNP (SEQ ID NO:796)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSANP (SEQ ID NO:797)。在一些实施方案

中,CM包含氨基酸序列LSGRSANI (SEQ ID NO:798)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LSGRSDNI (SEQ ID NO:799)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MIAPVAYR (SEQ ID NO:800)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RPSPMWAY (SEQ ID NO:801)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列WATPRPMR (SEQ ID NO:802)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列FRLLDWQW (SEQ ID NO:803)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGL (SEQ ID NO:804)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLLS (SEQ ID NO:805)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列和/或ISSGLL (SEQ ID NO:806)。

[0127] 在一些实施方案中,CM是MMP的底物,并且包括以下序列:ISSGLSS (SEQ ID NO:376);QNQALRMA (SEQ ID NO:377);AQNLLGMV (SEQ ID NO:378);STFPFGMF (SEQ ID NO:379);PVGYTSSL (SEQ ID NO:380);DWLYWPGI (SEQ ID NO:381),ISSGLLSS (SEQ ID NO:382),LKAAPRWA (SEQ ID NO:383);GPSHLVLT (SEQ ID NO:384);LPGGLSPW (SEQ ID NO:385);MGLFSEAG (SEQ ID NO:386);SPLPLRVP (SEQ ID NO:387);RMHLRSLG (SEQ ID NO:388);LAAPLGLL (SEQ ID NO:389);AVGLLAPP (SEQ ID NO:390);LLAPSHRA (SEQ ID NO:391);和/或PAGLWLDP (SEQ ID NO:392)。

[0128] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLSS (SEQ ID NO:376)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列QNQALRMA (SEQ ID NO:377)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AQNLLGMV (SEQ ID NO:378)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列STFPFGMF (SEQ ID NO:379)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PVGYTSSL (SEQ ID NO:380)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列DWLYWPGI (SEQ ID NO:381)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ISSGLLSS (SEQ ID NO:382)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LKAAPRWA (SEQ ID NO:383)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPSHLVLT (SEQ ID NO:384)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LPGGLSPW (SEQ ID NO:385)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MGLFSEAG (SEQ ID NO:386)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SPLPLRVP (SEQ ID NO:387)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列RMHLRSLG (SEQ ID NO:388)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LAAPLGLL (SEQ ID NO:389)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列AVGLLAPP (SEQ ID NO:390)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列LLAPSHRA (SEQ ID NO:391)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列PAGLWLDP (SEQ ID NO:392)。

[0129] 在一些实施方案中,CM是凝血酶的底物。在一些实施方案中,CM是凝血酶的底物,并且包括序列GPRSFGL (SEQ ID NO:393)或GPRSFG (SEQ ID NO:394)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPRSFGL (SEQ ID NO:393)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列GPRSFG (SEQ ID NO:394)。

[0130] 在一些实施方案中,CM包含选自以下组成的组的氨基酸序列:NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO:395);NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO:396);TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:397);TSGRSANP (SEQ ID NO:398);VAGRSMRP (SEQ ID NO:399);VVPEGRRS (SEQ ID NO:400);ILPRSPAF (SEQ ID NO:401);MVLGRSLL (SEQ ID NO:402);QGRAITFI (SEQ ID NO:403);SPRSIMLA (SEQ ID NO:404);和SMLRSMPL (SEQ ID NO:405)。

[0131] 在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO:395)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO:396)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:397)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列

TSGRSANP (SEQ ID NO:398)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列VAGRSMRP (SEQ ID NO:399)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列VVPEGRRS (SEQ ID NO:400)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列ILPRSPAF (SEQ ID NO:401)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列MVLGRSLL (SEQ ID NO:402)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列QGRAITFI (SEQ ID NO:403)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SPRSIMLA (SEQ ID NO:404)。在一些实施方案中,CM包含氨基酸序列SMLRSMPL (SEQ ID NO:405)。

[0132] 在一些实施方案中,CM是中性粒细胞弹性蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是丝氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是uPA的底物。在一些实施方案中,CM是豆蔻蛋白酶 (legumain) 的底物。在一些实施方案中,CM是蛋白裂解酶 (matriptase) 的底物。在一些实施方案中,CM是半胱氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM是半胱氨酸蛋白酶如组织蛋白酶的底物。

[0133] 在一些实施方案中,CM是CM1-CM2底物,并且包括以下序列:ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:406);ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO:407);AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:408);TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:409);VHMPLGFLPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:410);TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO:411);AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:412);LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:413);VHMPLGFLPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:414);LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO:415);LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO:416);LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO:417);ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO:418);LSGRSDNHGGSGGSQNLALRMA (SEQ ID NO:419);QNLALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO:420);LSGRSGNHGGSGGSQNLALRMA (SEQ ID NO:421);QNLALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO:422);ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO:423);ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO:680);AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO:681);AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO:682);ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO:683);ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO:684);ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO:685);ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO:686);ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO:687);ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO:688);ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO:689);ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO:690);AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO:691);AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO:692);AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO:693);AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO:694);AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO:695);AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO:696);AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO:697);AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO:698);ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO:713);AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO:714);GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:807);和/或GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO:808)。

[0134] 在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:406),其在本文中也称为底物2001。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO:407),其在本文中也称为底物1001/LP'/0001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:408),其在本文中也称为底物2015和/或底物1004/LP'/0003,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:409),其在本文中也称为底物0003/LP'/1004,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序

列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列VHMLPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 410),其在本文中也称为底物1003/LP'/0003,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列TSTSGRSANPRGGVHMLPLGFLGP (SEQ ID NO: 411),其在本文中也称为底物0003/LP'/1003,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:412),其在本文中也称为底物3001和/或底物1004/LP'/0001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 413),其在本文中也称为底物0001/LP'/1004,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列VHMLPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 414),其在本文中也称为底物1003/LP'/0001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSDNHGGVHMLPLGFLGP (SEQ ID NO: 415),其在本文中也称为底物0001/LP'/1003,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 416),其在本文中也称为底物0001/LP'/1001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO:417),其在本文中也称为底物0002/LP'/1001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO:418),其在本文中也称为底物1001/LP'/0002,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO: 1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO:419),其在本文中也称为底物0001/LP'/1002,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO:420),其在本文中也称为底物1002/LP'/0001,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO:421),其在本文中也称为底物0002/LP'/1002,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO: 1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO:422),其在本文中也称为底物1002/LP'/0002,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列GGSGGS (SEQ ID NO:1037)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423),其在本文中也称为底物2002。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO:680),其在本文中也称为底物2003。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO:681),其在本文中也称为底物2004。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO:682),其在本文中也称为底物2005。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO:683),其在本文中也称为底物2006。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO:684),其在本文中也称为底物2007。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO:685),其在本文中也称为底物2008。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO:686),其在本文中也称为底物2009。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO:687),其在本文中也称为底物2010。

在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO:688),其在本文中也称为底物2011。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO:689),其在本文中也称为底物2012。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO:690),其在本文中也称为底物2013。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO:691),其在本文中也称为底物3006。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO:692),其在本文中也称为底物3007。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO:693),其在本文中也称为底物3008。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO:694),其在本文中也称为底物3009。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO:695),其在本文中也称为底物3010。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO:696),其在本文中也称为底物3011。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO:697),其在本文中也称为底物3012。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO:698),其在本文中也称为底物3013。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO:713),其在本文中也称为底物2014。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO:714),其在本文中也称为底物3014。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:807),其在本文中也称为底物0001/LP'/1004,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。在一些实施方案中,CM1-CM2底物包括序列GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO:808),其在本文中也称为底物0001/LP'/1003,其中如这种CM1-CM2底物中使用的LP'是氨基酸序列是GG。

[0135] 在一些实施方案中,CM是至少两种蛋白酶的底物。在一些实施方案中,每种蛋白酶选自由表4中所示的那些组成的组。在一些实施方案中,CM是至少两种蛋白酶的底物,其中一种蛋白酶选自由MMP、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、uPA、豆类蛋白酶和间质蛋白酶组成的组,而另一种蛋白酶选自由表4中所示的那些组成的组。在一些实施方案中,CM是选自由MMP、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、uPA、豆类蛋白酶和间质蛋白酶组成的组的至少两种蛋白酶的底物。

[0136] 在一些实施方案中,可活化抗体至少包括第一CM和第二CM。在一些实施方案中,第一CM和第二CM各自是长度不超过15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,处于未裂解状态的可活化抗体中的第一CM和第二CM具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB或AB-CM2-CM1-MM。在一些实施方案中,第一CM和第二CM中的至少一个是充当蛋白酶的底物的多肽,所述蛋白酶选自由MMP、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、uPA、豆类蛋白酶和间质蛋白酶组成的组。在一些实施方案中,第一CM受靶组织中选自由MMP、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、uPA、豆类蛋白酶和间质蛋白酶组成的组的第一裂解剂裂解,而第二CM受靶组织中的第二裂解剂裂解。在一些实施方案中,另一种蛋白酶选自由表4中所示的那些组成的组。在一些实施方案中,第一裂解剂和第二裂解剂是选自由以下组成的组的相同蛋白酶:MMP、凝血酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、uPA、豆类蛋白酶和间质蛋白酶,并且第一CM和第二CM是酶的不同底物。在一些实施方案中,第一裂解剂和第二裂解剂是选自由表4中所示的那些组成的组的相同蛋白酶。在一些实施方案中,第一裂解剂和第二裂解剂是不同的蛋白酶。在一些实施方案中,第一裂解剂和第二裂解剂在

靶组织中共定位。在一些实施方案中,第一CM和第二CM受靶组织中的至少一种裂解剂裂解。

[0137] 在一些实施方案中,可活化抗体暴露于蛋白酶并受蛋白酶裂解,使得在蛋白酶裂解了CM之后,处于活化或裂解状态时,活化抗体包括包含LP2和/或CM序列的至少一部分的轻链氨基酸序列。

[0138] 在一些实施方案中,可活化抗体与一种或多种剂缀合。

[0139] 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,所述剂是微管抑制剂。在一些实施方案中,所述剂是核酸损伤剂。在一些实施方案中,所述剂选自自由以下组成的组:多拉司他汀(dolastatin)或其衍生物、澳瑞他汀(auristatin)或其衍生物、美登木素生物碱(maytansinoid)或其衍生物、倍癌霉素(duocarmycin)或其衍生物、加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物以及吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine)或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述剂是选自由DM1和DM4组成的组的美登木素生物碱。在一些实施方案中,所述剂是美登木素生物碱DM4。在一些实施方案中,所述剂是倍癌霉素。在一些实施方案中,所述剂经由接头缀合至AB。在一些实施方案中,所述剂经其与AB缀合的接头包含SPDB部分、vc部分或PEG2-vc部分。在一些实施方案中,缀合至AB的接头和毒素包含SPDB-DM4部分、vc-MMAD部分、vc-MMAE部分、vc-倍癌霉素或PEG2-vc-MMAD部分。在一些实施方案中,接头是可裂解接头。在一些实施方案中,接头是不可裂解接头。在一些实施方案中,所述剂是可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0140] 在一些实施方案中,缀合至AB或可活化抗体的AB的剂是治疗剂。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。如本文所用,毒素的片段是保持毒活性的片段。在一些实施方案中,所述剂经由可裂解接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述剂经由包括至少一个CM1-CM2底物序列的接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述剂经由不可裂解的接头与AB缀合。在一些实施方案中,所述剂经由在细胞内或溶酶体环境中可裂解的接头与AB缀合。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,所述剂是核酸损伤剂,诸如DNA烷化剂、DNA裂解剂、DNA交联剂、DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,所述剂是选自表5中所列的组的剂。在一些实施方案中,所述剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀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,所述剂是加利车霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓二聚体。

[0141] 在一些实施方案中,可活化抗体与一个或多个当量的剂缀合。在一些实施方案中,可活化抗体与一个当量的剂缀合。在一些实施方案中,可活化抗体与两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或大于十个当量的剂缀合。在一些实施方案中,可活化抗体是具有均等当量数的缀合剂的可活化抗体混合物的一部分。在一些实施方案中,可活化抗体是具有不均等当量数的缀合剂的可活化抗体混合物的一部分。在一些实施方案中,可活

化抗体的混合物是这样的,与每个可活化抗体缀合的剂的平均数目为0至1,1至2,2至3,3至4,4至5,5至6,6至7,7至8,8至9,9至10,和10及以上。在一些实施方案中,可活化抗体的混合物是这样的,与每个可活化抗体缀合的剂的平均数目为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0142] 在一些实施方案中,可活化抗体包含一个或多个位点特异性氨基酸序列修饰,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了可以与可活化抗体缀合的剂的数目,或在一些实施方案中,以位点特异性方式限制了剂与可活化抗体的缀合。在一些实施方案中,经修饰的可活化抗体以位点特异性方式经一种或多种非天然氨基酸修饰,因此在一些实施方案中,将剂的缀合仅限制于非天然氨基酸的位点。

[0143] 在一些实施方案中,所述剂是抗炎剂。

[0144] 在一些实施方案中,可活化抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0145] 在一些实施方案中,可活化抗体是与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不与剂缀合。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记位于AB上。在一些实施方案中,使用与活化抗体特异性结合的二级试剂来完成测量受试者或样品中的可活化抗体水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂是包含可检测标记的抗体。

[0146] 在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,显像剂包括放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素是铟或镅。在一些实施方案中,造影剂包括氧化碘、氧化钆或氧化铁。在一些实施方案中,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)、经修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或钬衍生物。在一些实施方案中,发光标记包含N-甲基吡啶鎓衍生物。在这些方法的一些实施方案中,所述标记包含Alexa Fluor[®]标记,诸如Alex Fluor[®] 680或Alexa Fluor[®] 750。在一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0147] 在一些实施方案中,可活化抗体还包括信号肽。在一些实施方案中,信号肽经由间隔区与可活化抗体缀合。在一些实施方案中,间隔区在不存在信号肽的情况下与可活化抗体缀合。在一些实施方案中,间隔区直接接合至可活化抗体的MM。在一些实施方案中,间隔区以从N端至C端间隔区-MM-CM-AB的结构排列直接接合至可活化抗体的MM。直接接合至可活化抗体的MM的N端的间隔区的实例为QGQSGQ (SEQ ID NO:424)。直接接合至可活化抗体的MM的N端的间隔区的其它实例包括QGQSGQG (SEQ ID NO:645)、QGQSG (SEQ ID NO:646)、QGQS (SEQ ID NO:647)、QGQ (SEQ ID NO:648)、QG (SEQ ID NO:649)和Q。直接接合至可活化抗体的MM的N端的间隔区的其它实例包括GQSGQG (SEQ ID NO:666)、QSGQG (SEQ ID NO:667)、SGQG (SEQ ID NO:668)、GQG (SEQ ID NO:669)和G。在一些实施方案中,没有间隔区接合至MM的N端。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQSGQ (SEQ ID NO:424)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQSGQG (SEQ ID NO:645)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQSG (SEQ ID NO:646)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQS (SEQ ID NO:647)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QGQ (SEQ ID NO:648)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QG (SEQ ID NO:649)。在一些实施

方案中,间隔区至少包括氨基酸残基Q。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列GQSGQG (SEQ ID NO:666)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列QSGQG (SEQ ID NO:667)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列SGQG (SEQ ID NO:668)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列GQG (SEQ ID NO:669)。在一些实施方案中,间隔区至少包括氨基酸序列G。在一些实施方案中,间隔区不存在。

[0148] 在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体是单特异性的。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体是多特异性的,例如以非限制性实例来说,是双特异性或三官能的。在一些实施方案中,将可活化抗体和/或缀合的可活化抗体配制为原双特异性T细胞衔接子 (BITE) 分子的一部分。在一些实施方案中,将可活化抗体和/或缀合的可活化抗体配制为原嵌合抗原受体 (CAR) 修饰的T细胞或其它工程改造的受体的一部分。

[0149] 在一些实施方案中,将可活化抗体或其抗原结合片段并入多特异性可活化抗体或其抗原结合片段中,其中多特异性可活化抗体的至少一条臂特异性结合靶标。在一些实施方案中,将可活化抗体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,其中双特异性可活化抗体的至少一条臂特异性结合靶标。

[0150] 在一些实施方案中,可活化抗体是多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体。多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体至少包括 (i) 第一抗体或其抗原结合片段 (AB1), 其特异性结合与第一掩蔽部分 (MM1) 偶联的第一靶标, 使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力, 以及 (ii) 第二抗体或其抗原结合片段 (AB2), 其特异性结合与第二掩蔽部分 (MM2) 偶联的第二靶标, 使得MM2的偶联降低了AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中, MM1和/或MM2经由包括蛋白酶的底物的序列与相应的抗体或其抗原结合片段 (AB1或AB2) 偶联, 所述蛋白酶例如是与第一靶标、第二靶标或第一靶标和第二靶标两者共定位在受试者的治疗位点的蛋白酶。在一些实施方案中, 第一靶标、第二靶标或第一靶标和第二靶标两者都是哺乳动物靶标, 例如人靶标。合适的MM1、MM2、CM1和/或CM2包括以上连同本公开的组合物和方法中使用的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体一起描述的任何MM和/或CM。

[0151] 作为非限制性实例, 可活化抗体的AB是表1所列任何靶标的结合配偶体。作为非限制性实例, 多特异性可活化抗体的AB1、AB2或AB1和AB2两者都是表1所列任何靶标的结合配偶体。

[0152] 表1: 示例性靶标

[0153]

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
α -4 整联蛋白	CD56	DLK1	透明质酸酶	Lewis X	STEAP2
α -V 整联蛋白	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
α 4 β 1 整联蛋白	CD70	DPP-4	IFN α	LRP4	TAPA1
α 4 β 7 整联蛋白	靶标	DSG1	IFN β	LRRC26	TGF β
AGR2	CD74	EGFR	IFN γ	MCSP	TIGIT
抗 Lewis-Y		EGFRviii	IgE	间皮素	TIM-3
Apelin J 受体	CD80	内皮素 B 受体 (ETBR)	IgE 受体 (Fc ϵ RI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	粘蛋白 -16(MUC16, CA-125)	TLR6

[0154]

BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K ATP 酶	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	中心粒细胞弹性蛋白酶	TLR8
C5 补体	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2R G)	RSV 的 F 蛋白	IL11	Nicastrin	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Notch 受体	TNF α
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
碳酸酐酶 9	CD138	FGF8	IL-12R、IL-12R β 1	Notch 2	TNFRS12 A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172 A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	转铁蛋白
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	转铁蛋白受体
CD11a	CEAC AM5 (CEA)	叶酸受体	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEAC AM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAU DIN-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	CLAU DIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFR α	VCAM-1
CD25	胶原蛋白	GITR	IL29	PDGFR β	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	磷脂酰丝氨酸	VEGF-D
CD38	CTGF	GP IIb/IIIa 受体	IL4R	P1GF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6、IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/III A	胰岛素受体	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPNMB	Jagged 配体	RAAG12	VISTA

[0155]	CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
	CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
	CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	磷酸鞘氨醇 1	WISP-3
	CD51	CYR61	hGH			

[0156] 作为非限制性实例,抗体或可活化抗体的抗原结合片段和/或AB是或源自表2中所列的抗体。作为非限制性实例,可活化抗体的AB,多特异性可活化抗体的AB1和/或多特异性可活化抗体的AB2是或源自表2中所列的抗体。

[0157] 表2:抗体的示例性来源

	抗体商品名(抗体名称)	靶标
[0158]	Avastin™ (贝伐单抗(bevacizumab))	VEGF
	Lucentis™ (兰尼单抗(ranibizumab))	VEGF
	Erbix™ (西妥昔单抗(cetuximab))	EGFR
	Vectibix™ (帕尼单抗(panitumumab))	EGFR
	Remicade™ (英夫利昔单抗(infliximab))	TNF α
	Humira™ (阿达木单抗(adalimumab))	TNF α
	Tysabri™ (那他珠单抗(natalizumab))	整联蛋白 $\alpha 4$
	Simulect™ (巴利昔单抗(basiliximab))	IL2R
	Soliris™ (依库珠单抗(eculizumab))	补体 C5
	Raptiva™ (依法珠单抗(efalizumab))	CD11a
	Bexxar™ (托西莫单抗(tositumomab))	CD20
	Zevalin™ (替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan))	CD20
	Rituxan™ (利妥昔单抗(rituximab))	CD20
	奥瑞珠单抗(Ocrelizumab)	CD20
	Arzerra™ (奥法木单抗(ofatumumab))	CD20
	Gazyva™ (奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab))	CD20
	Zenapax™ (达利珠单抗(daclizumab))	CD25
	Adcetris™ (本妥昔单抗(brentuximab vedotin))	CD30
	Myelotarg™ (吉妥珠单抗(gemtuzumab))	CD33
	Myelotarg™ (吉妥珠单抗奥佐咪星(gemtuzumab ozogamicin))	CD33
	Campath™ (阿仑单抗(alemtuzumab))	CD52
	ReoPro™ (阿昔单抗(abciximab))	糖蛋白受体 IIb/IIIa
	Xolair™ (奥马珠单抗(omalizumab))	IgE
	Herceptin™ (曲妥珠单抗(trastuzumab))	Her2
	Kadcyla™ (曲妥珠单抗美坦新(trastuzumab emtansine))	Her2

[0159]	Synagis™ (帕利珠单抗(palivizumab))	RSV 的 F 蛋白
	(伊匹单抗(ipilimumab))	CTLA-4
	(曲美木单抗(tremelimumab))	CTLA-4
	Hu5c8	CD40L
	(帕妥珠单抗(pertuzumab))	Her2-neu
	(厄马索单抗(ertumaxomab))	CD3/Her2-neu
	Orencia™(阿巴西普(abatacept))	CTLA-4
	(他尼珠单抗(tanezumab))	NGF
	(巴维昔单抗(bavituximab))	磷脂酰丝氨酸
	(扎鲁木单抗(zalutumumab))	EGFR
	(马帕木单抗(mapatumumab))	EGFR
	(马妥珠单抗(matuzumab))	EGFR
	(尼妥珠单抗(nimotuzumab))	EGFR
	ICR62	EGFR
	mAb 528	EGFR
	CH806	EGFR
	MDX-447	EGFR/CD64
	(依决洛单抗(edrecolomab))	EpCAM
	RAV12	RAAG12
	huJ591	PSMA
	Enbrel™ (依那西普(etanercept))	TNF-R
	Amevive™(阿法西普(alefacept))	1-92-LFA-3
	Antril™、Kineret™ (ankinra)	IL-1Ra
	GC1008	TGFβ
		Notch, 例如 Notch 1
		Jagged 1 或 Jagged 2
	(阿德木单抗(adecatumumab))	EpCAM
	(芬妥木单抗(figitumumab))	IGF1R
	(托珠单抗(tocilizumab))	IL-6 受体
	Stelara™ (优特克单抗(ustekinumab))	IL-12/IL-23
Prolia™ (地诺单抗(denosumab))	RANKL	

[0160] 本公开还提供了与至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合特异性结合的一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO:438)的可变重链互补决定区1 (CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTVKG (SEQ ID NO:439)的可变重链互补决定区2 (CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTYLYIDY (SEQ ID NO:440)的可变重链互补决定区3 (CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA (SEQ ID NO:441)的可变轻链互补决定区1 (CDRL1);含有氨基酸序列WAFTRRES (SEQ ID NO:442)的可变轻链互补决定区2 (CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT (SEQ ID NO:443)的可变轻链互补决定区3 (CDRL3)。

[0161] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0162] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:431的氨基

酸序列的可变轻链。

[0163] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链和含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0164] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含与包含SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0165] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含与包含SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0166] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含与包含SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列;和与包含SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0167] 本公开还提供了用于实践本文提供的任何方法的试剂盒。

[0168] 本公开提供了用于定性和/或定量分析包括组织和/或生物流体样品在内的生物样品中可活化抗体治疗剂活化的活化和其它特性的方法和试剂盒。

[0169] 在一个实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包括:

[0170] (i) 可活化抗体标准曲线试剂;

[0171] (ii) 已活化的可活化抗体标准曲线试剂;和

[0172] (iii) 对可活化抗体具有结合特异性的抗id一抗或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗独特型(id)抗体或其抗原结合片段对选自由VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3组成的组的VL CDR具有结合特异性。在其它实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合片段对选自由VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3组成的组的VH CDR具有结合特异性。在一些实施方案中,所述试剂盒包括两种或更多种抗独特型抗体物质(或其抗原结合片段)的组合。标准曲线试剂是呈准备稀释的溶液或固体形式的相对纯的可活化抗体和已活化的可活化抗体。

[0173] 可活化抗体通常至少包括以下:(i) 特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);(ii) 与AB偶联,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);和(iii) 与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。可活化抗体通常当CM的底物在其充当底物的蛋白酶存在时活化,并且蛋白酶裂解CM的底物。有用的是能够定性和/或定量测量生物样品中可活化抗体的特性,例如生物样品中可活化抗体的活化水平,生物样品中已活化(即裂解)的可活化抗体和/或完整(即失活)的可活化抗体的总量,或其任何组合或相关性。此类方法可用于在开发和/或治疗性治疗的任何阶段监测可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的功效。例如,在一些实施方案中,本文提供的方法和试剂盒可用于在向有需要的受试者施用之前和/或在治疗方案期间测试可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的功效以监测可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂在整个施用期间和/或在施用期之后的功效。在一些实施方案中,本文提供的方法和试剂盒可用于提供对可活化抗体和基于可活化抗体的治疗剂的回顾性分析。

[0174] 在一些实施方案中,本公开提供了使用基于毛细管的免疫测定平台定性和/或定量分析生物样品(包括组织和/或血浆样品)中的可活化抗体治疗剂活化的方法。在一些实

实施方案中,本文提供的方法用于定量生物样品中一种或多种可活化抗体的活化。在一些实施方案中,本文提供的方法用于对生物样品中体内蛋白酶活性进行分析、分层或以其它方式分类。

[0175] 在一些实施方案中,本公开提供了用于定性和/或定量分析可活化抗体治疗剂的活化的方法,所述可活化抗体治疗剂具有:特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);与AB的轻链偶联,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);以及与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。在一些实施方案中,所述方法用于定量或以其它方式至少比较(i)其中CM已被裂解并且MM未与AB的轻链偶联的已活化的可活化抗体的水平;和(ii)其中MM和CM与AB的轻链偶联的完整的可活化抗体的水平。

[0176] 在一些实施方案中,本公开提供了用于定性和/或定量分析可活化抗体治疗剂的活化的方法,所述可活化抗体治疗剂具有:特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);与AB的重链偶联,使得当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合的掩蔽部分(MM);以及与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶底物的多肽。在一些实施方案中,所述方法用于定量或以其它方式至少比较(i)其中CM已被裂解并且MM未与AB的重链偶联的已活化的可活化抗体的水平;和(ii)其中MM和CM与AB的重链偶联的完整的可活化抗体的水平。

[0177] 在一些实施方案中,本公开提供了用于定性和/或定量分析可活化抗体治疗剂的活化的方法,所述可活化抗体治疗剂具有特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);与AB的轻链偶联的第一掩蔽部分(MM1),使得当可活化抗体处于未裂解状态时,MM1抑制AB与靶标结合;与轻链AB偶联的第一可裂解部分(CM1),其中CM1是充当蛋白酶底物的多肽;与AB的重链偶联的第二掩蔽部分(MM2),使得当可活化抗体处于未裂解状态时,MM2抑制AB与靶标结合;和与轻链AB偶联的第二可裂解部分(CM2),其中CM2是充当蛋白酶底物的多肽。在一些实施方案中,所述方法用于定量或以其它方式至少比较(i)其中CM1和/或CM2中的至少一个已裂解使得MM1和/或MM2中的至少一个不与AB偶联的已活化的可活化抗体的水平;和(ii)其中MM1和CM1和/或MM2和CM2中的至少一个与AB偶联的完整的可活化抗体的水平。

[0178] 在一些实施方案中,本公开提供了定量基于可活化抗体的治疗剂的活化水平的方法,所述方法包括:i)向至少一根毛细管或一个毛细管群体装填堆积基质和分离基质;ii)使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与生物样品接触;iii)将每根毛细管内生物样品中完整的可活化抗体或基于完整的可活化抗体的治疗剂与已活化的可活化抗体或基于已活化的可活化抗体的治疗剂分离;iv)固定每根毛细管内完整的可活化抗体或基于完整的可活化抗体的治疗剂和已活化的可活化抗体或基于完整的可活化抗体的治疗剂;v)用对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合有特异性的至少一种可检测试剂免疫探测每根毛细管;并且vi)定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测试剂的水平。

[0179] 在一些实施方案中,本公开提供了定量基于可活化抗体的治疗剂的活化水平的方法,所述方法包括:i)向至少一根毛细管或一个毛细管群体装填堆积基质和分离基质;ii)使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与生物样品接触;iii)将每根毛细管内生物样品的高分子量(MW)组分与生物样品的低分子量(MW)组分分离;iv)固定每根毛细管内的高MW

组分和低MW组分；v) 用对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合有特异性的至少一种可检测试剂免疫探测每根毛细管；并且vi) 定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测试剂的水平。

[0180] 在一些实施方案中，步骤v) 中的所述至少一种可检测试剂至少包括对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合具有特异性的第一试剂和特异性结合或识别第一试剂的第二试剂，其中第二试剂包含可检测标记。

[0181] 在一些实施方案中，步骤vi) 包括定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测标记的水平。

[0182] 在一些实施方案中，步骤ii) 包括装填大约1-500ng生物样品或介于大约1-500ng生物样品之间的任何值和/或范围。在一些实施方案中，步骤ii) 包括装填大约5-40ng生物样品。本领域的普通技术人员将认识到，生物样品的装填剂量可以根据所述方法中使用的可检测试剂或第一试剂的亲合力而变化，其中可检测试剂或第一试剂的亲合力越高，生物样品的装填剂量越低。

[0183] 在一些实施方案中，使用一种或多种缓冲液制备生物样品，所述缓冲液的量足以引起分子量分离。在一些实施方案中，使用一种或多种含SDS的缓冲液制备生物样品，所述缓冲液的量足以引起分子量分离。在一些实施方案中，使用一种或多种缓冲液制备生物样品，所述缓冲液的量足以引起天然蛋白质，包括生物样品中的可活化抗体和/或基于可活化抗体的治疗剂的分离。在一些实施方案中，使用一种或多种缓冲液制备生物样品，所述缓冲液的量足以使用任何合适的分离试剂来分离还原样品。

[0184] 在一些实施方案中，步骤iii) 包括使用紫外光固定生物样品的高MW组分和低MW组分。在一些实施方案中，在本文提供的方法的步骤iii) 中使用任何合适的固定剂。

[0185] 在一些实施方案中，步骤iv) 中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的抗体或其抗原结合片段。

[0186] 在一些实施方案中，步骤iv) 中的第二试剂是与第一试剂特异性结合的可检测标记的二抗。

[0187] 在一些实施方案中，步骤iv) 中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的一抗或其抗原结合片段，并且步骤v) 中的第二试剂是特异性结合一抗或其抗原结合片段的可检测标记的二抗。

[0188] 在一些实施方案中，可检测标记与第二试剂缀合。

[0189] 在一些实施方案中，可检测标记是荧光标记，并且步骤vi) 包括检测每根毛细管或每个毛细管群体中的化学发光水平。

[0190] 在一些实施方案中，可检测标记是辣根过氧化物酶 (HRP)。

[0191] 在一些实施方案中，生物样品是生物流体。在一些实施方案中，生物流体是血液、血浆或血清。在一些实施方案中，生物样品是患病组织。在一些实施方案中，患病组织是裂解物。在一些实施方案中，患病组织是肿瘤组织。

[0192] 在一些实施方案中，本文提供的方法用于比较生物样品中已活化的和完整的可活

化抗体或基于可活化抗体的治疗剂的量。在一些实施方案中,基于可活化抗体的治疗剂是缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。

[0193] 本公开还提供了特异性结合可活化抗体和/或基于可活化抗体的治疗剂的抗体或其抗原结合片段,例如,是缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。

[0194] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO:438)的可变重链互补决定区1(CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTVKG (SEQ ID NO:439)的可变重链互补决定区2(CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTYLYIDY (SEQ ID NO:440)的可变重链互补决定区3(CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA (SEQ ID NO:441)的可变轻链互补决定区1(CDRL1);含有氨基酸序列WAFTRES (SEQ ID NO:442)的可变轻链互补决定区2(CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT (SEQ ID NO:443)的可变轻链互补决定区3(CDRL3)。

[0195] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0196] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0197] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链和含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0198] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链。

[0199] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:445的氨基酸序列的轻链。

[0200] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:444的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:445的氨基酸序列的轻链。

[0201] 本文提供的方法可用于定量可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体。

[0202] 可活化抗体和/或缀合的可活化抗体包括特异性结合缀合至掩蔽部分(MM)的靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),使得MM的偶联降低了抗体或其抗原结合片段结合靶标的能力。在一些实施方案中,MM经由包括蛋白酶底物的序列偶联,所述蛋白酶例如是与靶标共定位于受试者的治疗位点的蛋白酶。在一些实施方案中,靶标是哺乳动物靶标,例如人靶标。

[0203] 多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体至少包括(i)第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合与第一掩蔽部分(MM1)偶联的第一靶标,使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力,以及(ii)第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其特异性结合与第二掩蔽部分(MM2)偶联的第二靶标,使得MM2的偶联降低了AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,MM1和/或MM2经由包括蛋白酶的底物的序列与相应的抗体或其抗原结合片段(AB1或AB2)偶联,所述蛋白酶例如是与第一靶标、第二靶标或第一靶标和第二靶标两者共定位在受试者的治疗位点的蛋白酶。在一些实施方案中,第一靶标、第二靶标或第一靶标和第二靶标两者都是哺乳动物靶标,例如人靶标。

[0204] 本文提供的可活化抗体包括掩蔽部分。在一些实施方案中,掩蔽部分是偶联或以

其它方式附接至抗体的氨基酸序列,并且位于可活化抗体构建体内,从而掩蔽部分降低了抗体特异性结合靶标的能力。使用多种已知技术中的任何一种来鉴定合适的掩蔽部分。例如,使用Daugherty等人的PCT公开第W0 2009/025846号中描述的方法鉴定肽掩蔽部分,该PCT公开的内容特此通过引用整体并入。

[0205] 本文提供的可活化抗体包括可裂解部分。在一些实施方案中,可裂解部分包括是蛋白酶(通常是细胞外蛋白酶)的底物的氨基酸序列。使用多种已知技术中的任何一种来鉴定合适的底物。例如,使用Daugherty等人的美国专利第7,666,817号;Stagliano等人的美国专利第8,563,269号;以及La Porte等人的PCT公开第W0 2014/026136号中描述的方法鉴定肽底物,所述文献的各自的内容特此通过引用整体并入。(还请参见Boulware等人“Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics.”*Biotechnol Bioeng.*106.3(2010):339-46)。

[0206] 示例性底物包括但不限于可由表4中所列的一种或多种以下酶或蛋白酶裂解的底物。

[0207] 表4:示例性的蛋白酶和/或酶

[0208]

ADAMS ADAMTS, 例如 ADAM8	半胱氨酸蛋白酶, 例如 克氏锥虫蛋白酶 (Cruzipain) 豆荚蛋白酶	丝氨酸蛋白酶, 例如 活化蛋白 C
ADAM9		组织蛋白酶 A(Cathepsin A)
ADAM10	去泛素化酶 -2(Otubain-2)	组织蛋白酶 G
ADAM12		胃促胰酶
ADAM15	KLK, 例如	凝血因子蛋白酶
ADAM17/TACE	KLK4	(例如, FVIIa、FIXa、 FXa、FXIa、 FXIIa)
ADAMDEC1	KLK5	弹性蛋白酶
ADAMTS1	KLK6	颗粒酶 B
ADAMTS4	KLK7	胍基苯甲酸酶
ADAMTS5	KLK8	HtrA1
	KLK10	人中性粒细胞弹性蛋白酶
天冬氨酸蛋白酶, 例如	KLK11	乳铁蛋白
BACE	KLK13	Marapsin
肾素	KLK14	NS3/4A
		PACE4
天冬氨酸组织蛋白酶, 例如	金属蛋白酶, 例如	纤溶酶
组织蛋白酶 D	穿膜肽酶(Meprin)	PSA
组织蛋白酶 E	脑啡肽酶	tPA
	PSMA	凝血酶
半胱天冬酶, 例如	BMP-1	类胰蛋白酶
半胱天冬酶 1		uPA
半胱天冬酶 2	MMP, 例如	
半胱天冬酶 3	MMP1	
半胱天冬酶 4	MMP2	II 型跨膜

[0209]	半胱天冬酶 5	MMP3	丝氨酸蛋白酶(TTSP), 例如 DESC1 DPP-4 FAP Hepsin 间质蛋白酶-2 MT-SP1/间质蛋白酶 TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4
	半胱天冬酶 6	MMP7	
	半胱天冬酶 7	MMP8	
	半胱天冬酶 8	MMP9	
	半胱天冬酶 9	MMP10	
	半胱天冬酶 10	MMP11	
	半胱天冬酶 14	MMP12	
		MMP13	
	半胱氨酸组织蛋白酶, 例如	MMP14	
	组织蛋白酶 B	MMP15	
	组织蛋白酶 C	MMP16	
	组织蛋白酶 K	MMP17	
	组织蛋白酶 L	MMP19	
	组织蛋白酶 S	MMP20	
	组织蛋白酶 V/L2	MMP23	
	组织蛋白酶 X/Z/P	MMP24	
		MMP26	
		MMP27	

[0210] 本文提供的方法可用于定量可活化抗体的活化,所述可活化抗体包括充当蛋白酶的底物的可裂解部分。已将本文所述的可活化抗体设计为克服了抗体治疗剂,尤其是已知在体内至少在某种程度上有毒的抗体治疗剂的局限性。靶标介导的毒性构成开发治疗性抗体的主要限制。设计本文提供的可活化抗体以解决与传统治疗性抗体抑制正常组织中的靶标相关的毒性。这些可活化抗体保持屏蔽状态,直到在疾病位点经蛋白水解活化。从作为亲本治疗性抗体的抗体开始,通过并入蛋白酶底物的接头使抗体偶联至抑制性掩蔽物,对本发明的可活化抗体进行了工程改造。

[0211] 与未经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AB经MM修饰且在靶标的存在下时,AB与其靶标的特异性结合减少或受到抑制。

[0212] 经MM修饰的AB对靶标的 K_d 比未经MM修饰的AB或亲本AB对靶标的 K_d 高至少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倍或更高倍,或5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。相反,经MM修饰的AB对靶标的结合亲和力比未经MM修饰的AB或亲本AB对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倍或更高倍,或5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、

10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。

[0213] MM对AB的解离常数 (K_d) 通常高于AB对靶标的 K_d 。MM对AB的 K_d 可以比AB对靶标的 K_d 高至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反,MM对AB的结合亲和力通常低于AB对靶标的结合亲和力。MM对AB的结合亲和力可以比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或甚至10,000,000倍。

[0214] 在一些实施方案中,MM对AB的解离常数 (K_d) 大致等于AB对靶标的 K_d 。在一些实施方案中,MM对AB的解离常数 (K_d) 不超过AB对靶标的解离常数。在一些实施方案中,MM对AB的解离常数 (K_d) 等于AB对靶标的解离常数。

[0215] 在一些实施方案中,MM对AB的解离常数 (K_d) 小于AB对靶标的解离常数。

[0216] 在一些实施方案中,MM对AB的解离常数 (K_d) 大于AB对靶标的解离常数。

[0217] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 不超过AB与靶标结合的 K_d 。

[0218] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 不小于AB与靶标结合的 K_d 。

[0219] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 大致等于AB与靶标结合的 K_d 。

[0220] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 小于AB与靶标结合的 K_d 。

[0221] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 大于AB与靶标结合的 K_d 。

[0222] 在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 比AB与靶标结合的 K_d 大不超过2、3、4、5、10、25、50、100、250、500或1,000倍。在一些实施方案中,MM与AB结合的 K_d 比AB与靶标结合的 K_d 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倍。

[0223] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力低于AB与靶标结合的亲和力。

[0224] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力不超过AB与靶标结合的亲和力。

[0225] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力大致等于AB与靶标结合的亲和力。

[0226] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力不低于AB与靶标结合的亲和力。

[0227] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力高于AB与靶标结合的亲和力。

[0228] 在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力比AB与靶标结合的亲和力低2、3、4、5、10、25、50、100、250、500或1,000。在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力比AB与靶标结合的亲和力低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倍。在一些实施方案中,MM与AB结合的亲和力比AB与靶标结合的亲和力低2至20倍。在一些实施方案中,未与AB共价连接且与AB等摩尔浓度的MM不会抑制AB与靶标的结合。

[0229] 与未经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AB经MM修饰且在靶标的存在下时,AB与其靶标的特异性结合减少或受到抑制。当与未经MM修饰的AB与靶标的结合或亲本AB与靶标的结合相比时,在体内或体外测定中测量时,经MM修饰时AB结合靶标的的能力可降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%,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。

[0230] MM抑制AB与靶标的结合。MM结合AB的抗原结合结构域并抑制AB与靶标的结合。MM可以在空间上抑制AB与靶标的结合。MM可以变构抑制AB与其靶标的结合。在这些实施方案

中,当AB经修饰或与MM偶联并且在靶标的存在下时,在体内或体外测定中测量时,该AB与靶标不结合或基本上不结合,或该AB与靶标的结合与未经MM修饰的AB、亲本AB或未与MM偶联的AB与靶标的结合相比,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%,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。

[0231] 当AB与MM偶联或经MM修饰时,MM‘掩蔽’或减少或以其它方式抑制AB与靶标的特异性结合。当AB与MM偶联或经MM修饰时,此类偶联或修饰可引起降低或抑制AB特异性结合其靶标的能力的结构变化。

[0232] 与MM偶联或经MM修饰的AB可以用下式表示(按照从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序):

[0233] (MM) - (AB)

[0234] (AB) - (MM)

[0235] (MM) -L- (AB)

[0236] (AB) -L- (MM)

[0237] 其中MM是掩蔽部分,AB是抗体或其抗体片段,L是接头。在许多实施方案中,可能希望向组合物中插入一个或多个接头,例如柔性接头,以便提供柔性。

[0238] 在某些实施方案中,MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体均没有或基本上没有同源性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的相似性不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过25%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过50%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过20%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过10%。

[0239] 在一些实施方案中,可活化抗体包括经MM修饰的AB,并且还包含一个或多个可裂解部分(CM)。此类可活化抗体表现出与AB靶标的可活化/可转换结合。可活化抗体通常包括经掩蔽部分(MM)和可修饰或可裂解部分(CM)修饰或与上述两者偶联的抗体或抗体片段(AB)。在一些实施方案中,CM含有用作至少一种蛋白酶的底物的氨基酸序列。

[0240] 可活化抗体的元件排列成使得MM和CM定位成使得处于裂解(或相对活性)状态并且在靶标的存在下时,AB结合靶标,而可活化抗体处于未裂解(或相对无活性)状态时,在靶标的存在下,AB与其靶标的特异性结合减少或受到抑制。由于MM抑制或掩蔽AB特异性结合其靶标的能力,可以降低AB与其靶标的特异性结合。

[0241] 经MM和CM修饰的AB对靶标的 K_d 比未经MM和CM修饰的AB或亲本AB对靶标的 K_d 高至少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倍或更高倍,或5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-

10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。相反,经MM和CM修饰的AB对靶标的结合亲和力比未经MM和CM修饰的AB或亲本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、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更高倍,或5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。

[0242] 与未经MM和CM修饰的AB或亲本AB与靶标的特异性结合相比,当AB经MM和CM修饰且在靶标的存在下,但不存在改性剂(例如至少一种蛋白酶)时,AB与其靶标的特异性结合减少或受到抑制。当与亲本AB与其靶标的结合或未经MM和CM修饰的AB与其靶标的结合相比时,在体内或体外测定中测量时,经MM和CM修饰时AB结合靶标的能力可降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%,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。

[0243] 如本文所用,术语裂解状态是指在CM通过至少一种蛋白酶改性之后可活化抗体的状态。如本文所用,术语未裂解状态是指在不存在蛋白酶裂解CM的情况下可活化抗体的状态。如以上所讨论的,术语“可活化抗体”在本文中用于指处于其未裂解(天然)状态以及处于其裂解状态的可活化抗体。对于普通技术人员而言显而易见的是,在一些实施方案中,由于蛋白酶裂解CM,裂解的可活化抗体可能缺乏MM,导致至少MM释放(例如,其中MM未通过共价键(例如,半胱氨酸残基之间的二硫键)接合至可活化抗体。

[0244] 可活化或可转换意指当可活化抗体处于抑制、掩蔽或未裂解状态(即,第一构象)时,可活化抗体表现出与靶标的第一结合水平,并且在处于未抑制、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,其中第二靶标结合水平高于第一结合水平。通常,与不存在此类裂解剂的情况相比,在能够裂解CM的裂解剂即蛋白酶的存在下,靶标对可活化抗体的AB的可及性更大。因此,当可活化抗体处于未裂解状态时,抑制AB与靶标结合,并且可以掩蔽AB不与靶标结合(即,第一构象使AB不能结合靶标),而在裂解状态下,不抑制或不掩蔽AB与靶标结合。

[0245] 选择可活化抗体的CM和AB,使得AB代表给定靶标的结合部分,而CM代表蛋白酶的底物。在一些实施方案中,蛋白酶与靶标共定位在受试者的治疗位点或诊断位点。如本文所用,共定位是指处于相同位点或相对靠近附近。在一些实施方案中,蛋白酶裂解CM,产生与定位在裂解位点附近的靶标结合的活化抗体。本文公开的可活化抗体在例如能够裂解CM中的位点的蛋白酶(即,蛋白酶)在治疗位点或诊断位点的含靶组织中以相对高于非治疗位点组织中(例如健康组织中)的水平存在时特别有用。在一些实施方案中,本公开的CM也被一种或多种其它蛋白酶裂解。在一些实施方案中,是一种或多种与靶标共定位并且负责体内CM裂解的其它蛋白酶。

[0246] 在一些实施方案中,可活化抗体提供降低的毒性和/或不良副作用,如果AB未受掩蔽或未以其它方式被抑制与靶标结合,则可由非治疗位点的AB的结合产生所述毒性和/或不良副作用。

[0247] 一般而言,可以通过选择目标AB并构建可活化抗体的其余部分来设计可活化抗体,从而当受到构象限制时,MM提供对AB的掩蔽或降低AB与其靶标的结合。可以考虑结构设计标准来提供这种功能特征。

[0248] 提供了与未抑制的构象相比,呈抑制构象时表现出对靶标结合的所需动态范围的可转换表型的可活化抗体。动态范围通常是指(a)在第一组条件下参数的最大检测水平与(b)在第二组条件下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可活化抗体CM的蛋白酶的存在下,与可活化抗体结合的靶蛋白的最大检测水平与(b)在不存在蛋白酶的情况下,与可活化抗体结合的靶蛋白的最小检测水平的比率。可活化抗体的动态范围可以按照可活化抗体裂解剂(例如,酶)处理的解离常数与可活化抗体裂解剂处理的解离常数的比率来计算。可活化抗体的动态范围越大,可活化抗体的可转换表型越佳。具有相对较高动态范围值(例如,大于1)的可活化抗体表现出更理想的转换表型,使得可活化抗体与靶蛋白的结合在能够裂解可活化抗体CM的裂解剂(例如,酶)的存在下发生的程度(例如,主要发生)比不存在裂解剂的情况更高。

[0249] 可以以多种结构构型提供可活化抗体。下面提供了可活化抗体的示例性式。特别考虑到,在可活化抗体中,AB、MM和CM的N端至C端顺序可以颠倒。还特别考虑到CM和MM在氨基酸序列上可以重叠,例如使得CM含在MM中。

[0250] 例如,可活化抗体可用下式表示(按照从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序:

[0251] (MM) - (CM) - (AB)

[0252] (AB) - (CM) - (MM)

[0253] 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。应当注意,尽管在上式中将MM和CM表示为不同的组分,但是在本文公开的所有示例性实施方案(包括化学式)中,考虑到MM和CM的氨基酸序列可以重叠,例如使得CM完全或部分含在MM中。另外,上式提供了可位于可活化抗体元件的N-端或C-端的其它氨基酸序列。

[0254] 在某些实施方案中,MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体均没有或基本上没有同源性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的相似性不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过50%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过25%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过20%。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体的同一性不超过10%。

[0255] 在一些实施方案中,可活化抗体包括进入可活化抗体构建体中的一个或多个接头,例如柔性接头,以便在MM-CM接合点、CM-AB接合点中的一处或多处或这两个接合点处提供柔性。例如,AB、MM和/或CM可能不含足够数量的残基(例如,Gly、Ser、Asp、Asn,特别是Gly和Ser,尤其是Gly)来提供所需柔性。这样,此类可活化抗体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。另外,如下所述,在将可活化抗体作为构象受限的构建体提供的情况下,可以将柔性接头可操作地插入以促进未裂解的可活化抗体中环状结构的形成和保持。

[0256] 例如,在某些实施方案中,可活化抗体包含下式之一(其中下式表示N-至C-端方向或C-至N-端方向的氨基酸序列):

[0257] (MM)-L1-(CM)-(AB)

[0258] (MM)-(CM)-L2-(AB)

[0259] (MM)-L1-(CM)-L2-(AB)

[0260] 其中MM、CM和AB如上所述;其中L1和L2各自独立且任选存在或不存,是包括至少1个柔性氨基酸(例如,Gly)的相同或不同柔性接头。另外,上式提供了可位于可活化抗体元件的N-端或C-端的其它氨基酸序列。实例包括但不限于靶向部分(例如,靶组织中存在的细胞的受体的配体)和延长血清半衰期的部分(例如,结合血清蛋白诸如免疫球蛋白(例如,IgG)或血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HAS)的多肽)。

[0261] CM受至少一种蛋白酶特异性裂解,速率为约 $0.001-1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 或至少0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250或 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。在一些实施方案中,CM受特异性裂解,速率为约100,000 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。在一些实施方案中,CM受特异性裂解,速率为约 1×10^2 至约 $1 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (即,约 1×10^2 至约 $1 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$)。

[0262] 为了受酶特异性裂解,使酶和CM之间进行接触。当包含与MM和CM偶联的AB的可活化抗体在靶标和足够酶活性的存在下时,可以裂解CM。足够酶活性可以指该酶与CM接触并实现裂解的能力。可以容易地预见到,酶可在CM附近,但是由于其它细胞因子或酶的蛋白质修饰而无法裂解。

[0263] 适合用于本文所述组合物中的接头通常是提供经修饰的AB或可活化抗体的柔性以促进抑制AB与靶标结合的接头。此类接头通常称为柔性接头。合适的接头可以容易地选择,并且可以具有任何合适的不同长度,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,并且长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

[0264] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:339)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:340),其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对是非结构化的,因此可能能够用作组分之间的中性系链(tether)。甚至与丙氨酸相比,甘氨酸进入显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受限小得多(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性的柔性接头包括但不限于Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:341)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:342)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:343)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:344)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:345)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:346)等。普通技术人员将认识到,可活化抗体的设计可包括全部或部分柔性的接头,使得接头可包括柔性接头以及一个或多个赋予柔性较低的结构的部分以提供所需的可活化抗体结构。

[0265] 本公开还提供了用于定量可活化抗体的组合物和方法,可活化抗体已经修饰以使得一种或多种剂能够附接到AB中的一个或多个半胱氨酸残基上而不损害可活化抗体的活性(例如,掩蔽、活化或结合活性)。在一些实施方案中,可活化抗体已经修饰以使得一种或

多种剂能够附接到AB中的一个或多个半胱氨酸残基上而不会减少或以其它方式扰乱MM内的一个或多个二硫键。本文提供的组合物和方法可以使用与一种或多种剂(例如,多种治疗剂、诊断剂和/或预防剂中的任何一种)缀合的可活化抗体运行,例如在一些实施方案中,任何剂均未与可活化抗体的MM缀合。本文提供的组合物和方法与缀合的可活化抗体一起使用,其中MM保持了有效且高效地掩蔽处于未裂解状态的可活化抗体的AB的能力。本文提供的组合物和方法与缀合的可活化抗体一起使用,其中在可以裂解CM的蛋白酶的存在下,可活化抗体仍被活化,即裂解。

[0266] 可活化抗体具有至少一个与剂缀合的点,但是在本文提供的方法和组合物中,不是所有可能的缀合点均可用于与剂缀合。在一些实施方案中,所述一个或多个缀合点是二硫键中涉及的硫原子。在一些实施方案中,所述一个或多个缀合点是链间二硫键中涉及的硫原子。在一些实施方案中,所述一个或多个缀合点是链间硫键中涉及的硫原子,而不是链内二硫键中涉及的硫原子。在一些实施方案中,所述一个或多个缀合点是半胱氨酸或其它含有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。

[0267] 本文提供的组合物和方法也可以使用在AB中具有一个或多个链间二硫键和在MM中具有一个或多个链内二硫键的可活化抗体的缀合物,其中提供了与游离硫醇具有反应性的药物。在这些实施方案中,所述方法通常包括用还原剂例如TCEP部分还原可活化抗体中的链间二硫键;并且使与游离硫醇具有反应性的药物与部分还原的可活化抗体缀合。如本文所用,术语部分还原是指其中可活化抗体与还原剂接触且并非所有二硫键,例如并非所有可能的缀合位点均被还原的情形。在一些实施方案中,所有可能的缀合位点的少于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%被还原。

[0268] 在其它实施方案中,本文提供的组合物和方法连同还原可活化抗体并将剂(例如,药物)缀合至可活化抗体的方法一起使用,从而提供了剂放置的选择性。在这些实施方案中,所述方法通常包括用还原剂部分还原可活化抗体,使得可活化抗体的掩蔽部分或其它非AB部分中的任何缀合位点不被还原,并且使剂缀合至AB中的链间硫醇。选择缀合位点,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,例如还原剂与可活化抗体的比率,孵育时间长度,孵育期间的温度,还原反应溶液的pH等,是通过鉴定产生缀合的可活化抗体的条件来确定的,在缀合的可活化抗体中MM保持了有效且高效地掩蔽处于未裂解状态的可活化抗体的AB的能力。还原剂与可活化抗体的比率将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,该比率在约5:1至1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约5:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约4:1至1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约4:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约8:1至约1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约2.5:1至1:1的范围内。

[0269] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法连同还原可活化抗体的AB中的链间二硫键并且使剂,例如含硫醇的剂(诸如药物)缀合至所产生的链间硫醇的方法一起使用,以选择性地使剂定位在AB上。在这些实施方案中,所述方法通常包括用还原剂部分还原AB以形成至少两个链间硫醇而不在可活化抗体中形成所有可能的链间硫醇;并且使剂缀合至部分还原的AB的链间硫醇。例如,在所需的还原剂:可活化抗体比率下,可活化抗体的AB在约37°C下部分还原约1小时。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率将在约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,该比率在约5:1至1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约5:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约4:1至1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约4:1至1.5:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约8:1至约1:1的范围内。在一些实施方案中,该比率在约2.5:1至1:1的范围内。

[0270] 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,可以在缀合之前,使用例如柱色谱法、透析或渗滤来纯化还原的可活化抗体。可替代地,在部分还原后和缀合之前未纯化还原的抗体。

[0271] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与部分还原的可活化抗体一起使用,其中可活化抗体中的至少一个链间二硫键已经被还原剂还原而未扰乱可活化抗体中的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括:特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),抑制处于未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM),以及与AB偶联的可裂解部分(CM),其中CM是充当蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中,MM经由CM与AB偶联。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不受还原剂扰乱。在一些实施方案中,可活化抗体内MM的一个或多个链内二硫键不受还原剂扰乱。在一些实施方案中,处于未裂解状态的可活化抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0272] 在其它实施方案中,本文提供的组合物和方法连同还原可活化抗体并将剂(例如,药物)缀合至可活化抗体的方法一起使用,从而通过为可活化抗体提供限定数量和位置的赖氨酸和/或半胱氨酸残基而产生剂放置的选择性。在一些实施方案中,限定的赖氨酸和/或半胱氨酸残基的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/或半胱氨酸残基可以导致限定数量的可以与抗体或可活化抗体缀合的剂当量。在一些实施方案中,限定数量的赖氨酸和/或半胱氨酸残基可以导致限定数量的可以位点特异性方式与抗体或可活化抗体缀合的剂当量。在一些实施方案中,经修饰的可活化抗体以位点特异性方式经一种或多种非天然氨基酸修饰,因此在一些实施方案中,将剂的缀合仅限制于非天然氨基酸的位点。在一些实施方案中,具有限定数量和位置的赖氨酸和/或半胱氨酸残基的抗体或可活化抗体可以用本文所讨论的还原剂部分还原,使得可活化抗体的掩蔽部分或其它非AB部分中的任何缀合位点不被还原,并且使剂与AB中的链间硫醇缀合。

[0273] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与部分还原的可活化抗体一起使

用,其中可活化抗体中的至少一个链间二硫键已经被还原剂还原而未扰乱可活化抗体中的任何链内二硫键,其中可活化抗体包括:与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段(AB),抑制处于未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分(MM),以及与AB偶联的可裂解部分(CM),其中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,MM经由CM与AB偶联。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不受还原剂扰乱。在一些实施方案中,可活化抗体内MM的一个或多个链内二硫键不受还原剂扰乱。在一些实施方案中,处于未裂解状态的可活化抗体具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM-AB或AB-CM-MM。在一些实施方案中,还原剂是TCEP。

[0274] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与可活化抗体一起使用,所述可活化抗体还包括与可活化抗体缀合的剂。在一些实施方案中,缀合的剂是治疗剂,诸如抗炎剂和/或抗肿瘤剂。在此类实施方案中,所述剂与可活化抗体的碳水化合物部分缀合,例如,在一些实施方案中,其中碳水化合物部分定位在可活化抗体中的抗体或抗原结合片段的抗原结合区外部。在一些实施方案中,所述剂与可活化抗体中的抗体或抗原结合片段的巯基缀合。

[0275] 在一些实施方案中,所述剂是细胞毒性剂,诸如毒素(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)。

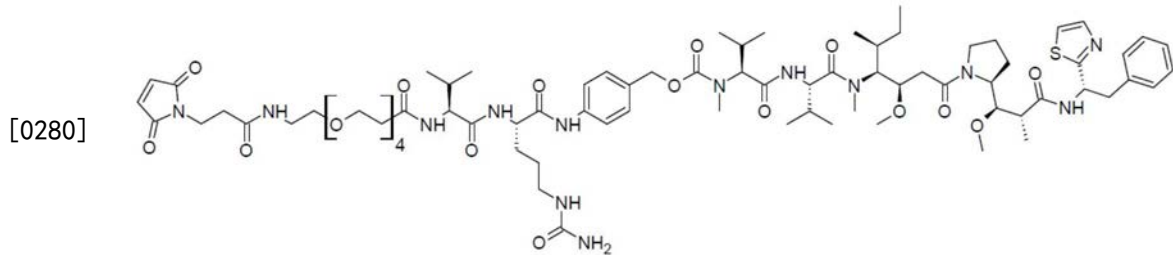
[0276] 在一些实施方案中,所述剂是可检测部分,例如标记或其它标志物。例如,该剂是或包括放射性标记的氨基酸,可以通过带标志的抗生物素蛋白检测到的一个或多个生物素基部分(例如,含有可通过光学或量热法检测到的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素),一种或多种放射性同位素或放射性核素,一种或多种荧光标记,一种或多种酶标记,和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中,可检测部分通过间隔区分子衔接。

[0277] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与免疫缀合物一起使用,所述免疫缀合物包含与细胞毒性剂,诸如毒素(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)缀合的抗体。合适的细胞毒性剂包括,例如,多拉司他汀及其衍生物(例如澳瑞他汀E、AFP、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE)。例如,所述剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀D(MMAD)。在一些实施方案中,所述剂是选自表5中所列的组的剂。在一些实施方案中,所述剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀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,所述剂是加利车霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓二聚体。

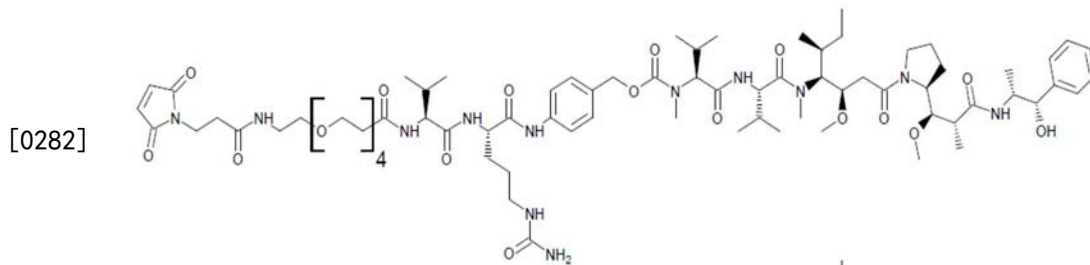
[0278] 在一些实施方案中,使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头或马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头使所述剂与AB连接。在一些实施方案中,使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头使所述剂与AB连接。在一些实施方案中,使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头使所述剂与AB连接。在一些实施方案中,所述剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头与AB连接的单甲基澳瑞他汀D(MMAD),并且该接头有效载荷构建体在本文中称为“vc-MMAD”。在一些实施方案中,所述剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸

酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头与AB连接的单甲基澳瑞他汀E (MMAE), 并且该接头有效载荷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-瓜氨酸接头使所述剂与AB连接。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与AB连接的单甲基澳瑞他汀D (MMAD), 并且该接头有效载荷构建体在本文中称为“PEG2-vc-MMAD”。下面示出了vc-MMAD、vc-MMAE和PEG2-vc-MMAD的结构:

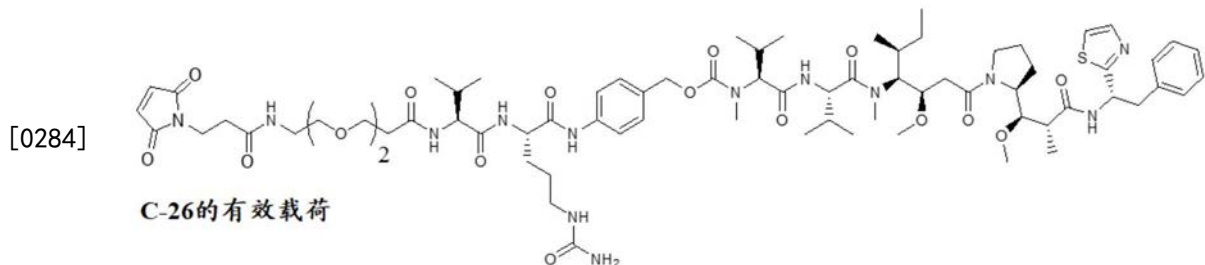
[0279] vc-MMAD:



[0281] vc-MMAE:



[0283] PEG2-vc-MMAD:



[0285] 在一些实施方案中, 本文提供的组合物和方法与缀合的可活化抗体一起使用, 所述缀合的可活化抗体包括与单甲基澳瑞他汀D (MMAD) 有效载荷连接的可活化抗体, 其中可活化抗体包括: 与靶标特异性结合的抗体或其抗原结合片段 (AB), 抑制处于未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标结合的掩蔽部分 (MM), 以及与AB偶联的可裂解部分 (CM), 并且CM是充当至少一种MMP蛋白酶的底物的多肽。

[0286] 在一些实施方案中, 可以使用以下几种用于将剂附接到AB上的方法中的任一种来缀合MMAD缀合的可活化抗体: (a) 附接到AB的碳水化合物部分上, 或 (b) 附接到AB的巯基上, 或 (c) 附接到AB的氨基上, 或 (d) 附接到AB的羧基上。

[0287] 在一些实施方案中, MMAD有效载荷经由接头与AB缀合。在一些实施方案中, MMAD有效载荷经由接头与AB中的半胱氨酸缀合。在一些实施方案中, MMAD有效载荷经由接头与AB中的赖氨酸缀合。在一些实施方案中, MMAD有效载荷经由接头与AB的另一残基, 诸如本文公开的那些残基缀合。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

可裂解接头。在一些实施方案中,接头是不可裂解接头。在一些实施方案中,接头选自自由表6和7中所示的接头组成的组。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷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,可活化抗体和MMAD有效载荷经由马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷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,可活化抗体和MMAD有效载荷经由马来酰亚胺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使MMAD有效载荷与AB缀合。

[0288] 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组分是无支链的聚合物。在一些实施方案中,PEG聚合物组分经氨基或其衍生物、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。

[0289] 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与它所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与它所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与它所缀合的羟基之间形成酯键。

[0290] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲素A链、 α -八叠球菌、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白质、垂序商陆(*Phytolaca americana*)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(tricothecenes)。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 和 ^{186}Re 。

[0291] 使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,所述双功能蛋白质偶联剂诸如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(诸如己二亚胺酸二甲酯盐酸盐)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)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)中所述的那样制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合至抗体的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0292] 表5列出了可以在本文描述的公开内容中采用的一些示例性药剂,但绝不意味着是详尽无遗的列表。

[0293] 表5:用于缀合的示例性药剂

细胞毒剂

- 溴瑞他汀
 溴瑞他汀 E
 单甲基溴瑞他汀 D (MMAD)
 单甲基溴瑞他汀 E (MMAE)
 去甲基溴瑞他汀 E (DMAE)
 溴瑞他汀 F
 单甲基溴瑞他汀 F (MMAF)
 去甲基溴瑞他汀 F (DMAF)
 溴瑞他汀衍生物, 例如其酰胺
 溴瑞他汀酰胺
 溴瑞他汀喹啉
 多拉司他汀
 多拉司他汀衍生物
 多拉司他汀 16 DmJ
 多拉司他汀 16 Dpv
 美登木素生物碱, 例如 DM-1;
 DM-4
 [0294] 美登木素生物碱衍生物
 倍癌霉素
 倍癌霉素衍生物
 α -鹅膏蕈碱
 蒽环霉素
 多柔比星

 柔红霉素
 苔藓抑素
 喜树碱
 喜树碱衍生物
 7-取代的喜树碱

 10,11-二氟亚甲基二氧基喜树碱
 康普瑞汀(Combretastatin)
 脱溴海兔毒素(Debromoaplysiatoxin)

 Kahalalide-F
 圆皮海绵内酯(Discodermolide)
- 涡轮他汀(Turbostatin)
 苯他汀(Phenstatin)
 羟苯他汀
 海绵抑制素 5
 海绵抑制素 7
 哈里司汀 1 (Halistatin 1)
 哈里司汀 2
 哈里司汀 3
 经修饰的苔藓抑素(Bryostatin)
 Halocomstatin
 吡咯并苯并咪唑(PBI)
 Cibrostatin6
 Doxaliform
 蒽环霉素类似物

 西马多丁(Cemadotin)类似物
 (CemCH2-SH)
 假单胞菌毒素 A (PE38)变体
 假单胞菌毒素 A (ZZ-PE38)变体
 ZJ-101
 OSW-1
 O6-苄基鸟嘌呤的 4-硝基苄氧羰
 基衍生物
 拓扑异构酶抑制剂
 半星芒体(Hemiasterlin)
 三尖杉碱
 高三尖杉酯碱
 吡咯并苯并二氮杂卓二聚体
 (PBD)
 吡咯并苯并二氮杂卓
 官能化吡咯并苯并二氮杂卓
 官能化吡咯并苯并二氮杂卓二
 聚体
 加利车霉素
 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)

海鞘素(Ecteinascidin)

抗病毒剂

阿昔洛韦(Acyclovir)

Vira A

Symmetrel

抗真菌剂

制霉菌素(Nystatin)

其它抗肿瘤药

阿霉素

Cerubidine

博来霉素(Bleomycin)

爱克兰(Alkeran)

Velban

Oncovin

氟尿嘧啶

甲氨蝶呤

噻替派(Thiotepa)

[0295]

比生群(Bisantrene)

能灭瘤(Novantrone)

硫鸟嘌呤

丙卡巴肼(Procarabazine)

阿糖胞苷(Cytarabine)

抗细菌剂

氨基糖苷

链霉素

新霉素(Neomycin)

卡那霉素(Kanamycin)

阿米卡星(Amikacin)

庆大霉素(Gentamicin)

妥布霉素(Tobramycin)

链霉素 B

壮观霉素

氨苄青霉素(Ampicillin)

磺胺

多粘菌素(Polymyxin)

氯霉素(Chloramphenicol)

紫杉烷类

长春花生物碱

可缀合的检测试剂

荧光素及其衍生物

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

^{99m}Tc

^{201}Tl

^{133}Xe

^{11}C

^{62}Cu

^{18}F

^{68}Ga

^{13}N

^{15}O

^{38}K

^{82}Rb

^{99m}Tc (锝)

重金属

钡

金

铂

抗支原体药

泰乐菌素(Tylosine)

壮观霉素(Spectinomycin)

[0296] 本领域的普通技术人员将认识到,多种可能的部分可以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),其全部内容通过引用并入本文)。

[0297] 可以通过任何会使两个分子结合的化学反应来完成偶联,只要抗体和另一部分保持其各自的活性即可。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,所述结合是共价结合。共价结合可以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,诸如本公开的抗体,偶联至其它分子。例如,代表性的偶联剂可包括有机化合物,诸如硫酸酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。该列表并非旨在为本领域已知各个类别的偶联剂的详尽列表,而是更常见的偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen等人, *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); 和Vitetta等人, *Science* 238:1098 (1987)。

[0298] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与缀合的可活化抗体一起使用,所述缀合的可活化抗体已经被修饰,以通过插入或以其它方式包含在可活化抗体序列中的经修饰的氨基酸序列进行位点特异性缀合。这些经修饰的氨基酸序列经设计为允许缀合的剂在缀合的可活化抗体内的受控放置和/或剂量。例如,可以将可活化抗体工程改造为在轻链和重链上的位置处包括半胱氨酸取代,半胱氨酸取代提供反应性硫醇基团而不会对蛋白质折叠和组装产生负面影响,也不会改变抗原结合。在一些实施方案中,可以将可活化抗体工程改造为在可活化抗体内包括或以其它方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供合适的缀合位点。在一些实施方案中,可以将可活化抗体工程改造为在可活化抗体序列内包括或以其它方式引入酶可活化的肽序列。

[0299] 合适的接头在文献中有描述。(参见,例如Ramakrishnan, S.等人, *Cancer Res.* 44: 201-208 (1984), 其描述了MBS (M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯的用途)。还请参见,美国专利第5,030,719号,其描述了通过寡肽接头与抗体偶联的卤代乙酰基酰肼衍生物的用途。在一些实施方案中,合适的接头包括:(i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐); (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-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 (磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺]己酸酯 (Pierce Chem.Co. 目录号2165-G); 和(v) 与EDC缀合的磺基-NHS (N-羟基磺基-琥珀酰亚胺: Pierce Chem.Co., 目录号#24510)。其它接头包括但不限于SMCC ((4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基琥珀酰亚胺酯)、磺基SMCC (4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基磺基琥珀酰亚胺酯)、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)。

[0300] 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,烷基羧酸的磺基-NHS酯比芳族羧酸的磺基-NHS酯更稳定。含NHS酯的接头溶解性低于磺基-NHS酯。此外,接头SMPT含有位阻二硫键,并且可以形成稳定性增加的缀合物。通常,二硫键联不如其它键联稳定,因为二硫键联在体外裂解,导致更少的缀合物可用。尤其是,磺基-NHS可以增强碳二亚胺偶联的稳定性。当连同磺基-NHS一起使用时,碳二亚胺偶联(诸如EDC)形成的酯比单独的碳二亚胺偶联反应对水解的抗性更强。

[0301] 在一些实施方案中,接头是可裂解的。在一些实施方案中,接头是不可裂解的。在一些实施方案中,存在两个或更多个接头。所述两个或更多个接头全部相同,即,可裂解或

不可裂解,或所述两个或更多个接头不同,即,至少一个可裂解的和至少一个不可裂解。

[0302] 可以使用以下几种用于将剂附接到AB上的方法中的任一种将剂附接到Ab上:(a) 附接到AB的碳水化合物部分上,或(b) 附接到AB的巯基上,或(c) 附接到AB的氨基上,或(d) 附接到AB的羧基上。在一些实施方案中,AB可以通过具有至少两个反应性基团的中间接头共价附接到剂上,一个基团与AB反应和一个基团与剂反应。可以选择可以包括任何相容性有机化合物的接头,使得与AB(或剂)的反应不会对AB的反应性和选择性产生不利影响。此外,接头与剂的附接可能不会破坏剂的活性。用于与氧化抗体或氧化抗体片段反应的合适接头包括含有选自伯胺、仲胺、胍、酰胍、羟胺、苯胍、氨基脒和硫代氨基脒基团组成的组的胺的那些接头。此类反应性官能团可以作为接头结构的一部分存在,或者可以通过不含此类基团的接头的适当化学修饰而引入。

[0303] 根据本公开,用于附接至还原AB的合适接头包括具有能够与还原抗体或片段的巯基反应的某些反应性基团的那些接头。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)、对巯基苯甲酸酯基团和能够进行迈克尔式加成反应的基团(包括,例如马来酰亚胺以及Mitra和Lawton,1979,J.Amer.Chem.Soc.101:3097-3110描述的类型基团)。

[0304] 根据本公开,不附接至氧化和还原Ab的合适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羧酸酯或碳酸酯、磺基-NHS羧酸酯或碳酸酯、4-硝基苯基羧酸酯或碳酸酯、五氟苯基羧酸酯或碳酸酯、酰基咪唑、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0305] 根据本公开,不附接至氧化和还原Ab的合适接头包括具有能够与已经用合适的试剂活化的Ab中的天冬氨酸或谷氨酸残基中存在的羧基反应的某些官能团的那些接头。合适的活化剂包括有或没有添加的NHS或磺基-NHS的EDC,以及用于形成羧酰胺的其它脱水剂。在这些情况下,合适接头中存在的官能团将包括伯胺和仲胺、胍、羟胺和酰胍。

[0306] 可以在将接头附接到AB之前或之后将剂附接到接头上。在某些应用中,可能希望先产生AB-接头中间体,其中所述接头不含缔合的剂。根据具体应用,然后将特定剂共价附接到接头上。在一些实施方案中,先将AB附接到MM、CM和相关接头上,然后附接到用于缀合目的的接头上。

[0307] 支链接头:在特定实施方案中,利用了具有多个剂附接位点的支链接头。对于多位点接头,与AB的单一共价附接将产生能够在许多位点结合剂的AB接头中间体。所述位点可以是醛基或巯基,或是剂可以附接的任何化学位点。

[0308] 在一些实施方案中,可以通过在AB上的多个位点处附接单个位点接头来实现更高的比活性(或更高的剂与AB比率)。可以通过两种方法中的任一种将该多个位点引入AB中。首先,可以在同一AB中生成多个醛基和/或巯基。其次,可以将具有多个功能位点的“支链接头”附接到AB的醛或巯基上,以便随后附接到接头上。支链接头或多位点接头的功能位点可以是醛基或巯基,或者可以是接头可以附接的任何化学位点。通过组合这两种方法,即在AB上的几个位点附接多位点接头,可以获得更高的比活性。

[0309] 可裂解接头:对补体系统的酶裂解敏感的肽接头可用于本公开的一个实施方案中,所述酶诸如但不限于尿激酶型纤溶酶原激活物、组织纤溶酶原激活物、胰蛋白酶、纤溶酶或具有蛋白水解活性的另一种酶。根据本公开的一种方法,剂经由对补体裂解敏感的接

头附接。抗体选自可以活化补体的类别。因此,抗体-剂缀合物活化补体级联并在靶位点释放剂。根据本公开的另一种方法,剂经由对具有蛋白水解活性的酶诸如尿激酶型纤溶酶原激活物、组织纤溶酶原激活物、纤溶酶或胰蛋白酶的裂解敏感的接头附接。这些可裂解接头可用于包含细胞外毒素(例如作为非限制性实例,表5中所示的任何细胞外毒素)的缀合的可活化抗体中。

[0310] 表6中提供了可裂解接头序列的非限制性实例。

[0311] 表6:用于缀合的示例性接头序列

可裂解序列的类型	氨基酸序列
<u>纤溶酶可裂解序列</u>	
尿激酶原	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 615)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 616)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 617)
纤溶酶原	RKSSIIHRMRDVVL (SEQ ID NO: 618)
葡萄球菌激酶	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 619)
	SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 620)
<u>Xa 因子可裂解序列</u>	
	IEGR (SEQ ID NO: 621)
	IDGR (SEQ ID NO: 622)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 623)
<u>MMP 可裂解序列</u>	
明胶酶 A	PLGLWA (SEQ ID NO: 624)
<u>胶原酶可裂解序列</u>	
小牛皮胶原蛋白(α1(I)链)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 625)
[0312] 小牛皮胶原蛋白(α2(I)链)	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 626)
牛软骨胶原蛋白(α1(II)链)	GIAGQ (SEQ ID NO: 627)
人肝胶原蛋白(α1(III)链)	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 628)
人 α ₂ M	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 629)
人 PZP	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 630)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 631)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 632)
大鼠 α ₁ M	EPQALAMS (SEQ ID NO: 633)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 634)
大鼠 α ₂ M	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 635)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 636)
大鼠 α ₁ I ₃ (2J)	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 637)
大鼠 α ₁ I ₃ (27J)	SAPAVESE (SEQ ID NO: 638)
人成纤维细胞胶原酶	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 639)
<u>(自溶裂解)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 640)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 641)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 642)

[0313] 另外,剂可以通过二硫键(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出高水平的谷胱甘肽(一种还原剂),因此这可以还原二硫键,随后在递送位点释放该剂。在一些实施方案中,将会修饰CM的还原剂也会修饰缀合的可活化抗体的接头。

[0314] 间隔区和可裂解元件:在一些实施方案中,可能必须以优化剂和可活化抗体AB之

间的间隔的方式构建接头。这可以通过使用以下通用结构的接头来完成：

[0315] $W-(CH_2)_n-Q$

[0316] 其中

[0317] W是 $--NH--CH_2--$ 或 $--CH_2--$ ；

[0318] Q是氨基酸、肽；以及

[0319] n是0至20的整数。

[0320] 在一些实施方案中，接头可包含间隔区元件和可裂解元件。间隔区元件用于使可裂解元件远离AB的核心定位，使得负责裂解的酶更易于接近可裂解元件。上述某些支链接头可以用作间隔区元件。

[0321] 在整个讨论中，应当理解，接头与剂(或间隔区元件与可裂解元件，或可裂解元件与剂)的附接不需要是特定的附接或反应模式。提供具有合适稳定性和生物相容性的产物的任何反应都是可接受的。

[0322] 血清补体和接头选择：根据本公开的一种方法，当需要剂释放时，使用是可以活化补体的类别的抗体的AB。所得的缀合物保持了结合抗原和活化补体级联的能力。因此，根据本公开的该实施方案，将剂接合至可裂解接头或可裂解元件的一端，并且将接头基团的另一端附接至AB上的特定位点。例如，如果该剂具有羟基或氨基，则可以分别经由酯键或酰胺键将剂附接至肽、氨基酸或其它合适选择的接头的羧基端。例如，此类剂可经由碳二亚胺反应附接至接头肽。如果该剂含有会干扰与接头附接的官能团，则可在附接之前阻断这些干扰性官能团，一旦制成产物缀合物或中间体就去阻断。然后直接或在进一步修饰后使用接头的相对端或氨基端，以与能够活化补体的AB结合。

[0323] 接头(或接头的间隔区元件)可以具有任何所需长度，其一端可以共价附接至可活化抗体的AB上的特定位点。接头或间隔区元件的另一端可以附接至氨基酸或肽接头。

[0324] 因此，当这些缀合物在补体的存在下与抗原结合时，使剂附接至接头的酰胺键或酯键将会裂解，导致剂以其活性形式释放。这些缀合物，当施用于受试者时，将在靶位点完成剂的递送和释放，并且对于体内递送药剂、抗生素、抗代谢物、抗增殖剂等(如表5中呈现的但不限于表5中的那些)特别有效。

[0325] 无需补体活化即可释放的接头：在另一种靶向递送的应用中，由于补体级联的活化最终将裂解靶细胞，因此需要释放没有补体活化的剂。因此，当应在不杀伤靶细胞的情况下完成剂的递送和释放时，这种方法很有用。当需要将细胞介质诸如激素、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。这些缀合物可以通过经由对血清蛋白酶裂解轻度敏感的接头将剂附接至不能活化补体的AB来制备。当将该缀合物施用于个体时，将快速形成抗原-抗体复合物，而剂的裂解将缓慢发生，从而导致化合物在靶位点处释放。

[0326] 生化交联剂：在一些实施方案中，可以使用某些生化交联剂使可活化抗体与一种或多种治疗剂缀合。交联试剂形成将两个不同分子的官能团拴系在一起的分子桥。为了以逐步的方式连接两种不同的蛋白质，可以使用消除不需要的均聚物形成的异双官能交联剂。

[0327] 溶酶体蛋白酶可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，可以使用在溶酶体的低pH环境中可裂解的酸不稳定性接头，例如：双唾液酸醚。其它合适的接头包括组织蛋白酶不稳定性底物，尤其是那些在酸性pH下显示出最佳功能的底

物。

[0328] 表7中提到了示例性的异双官能交联剂。

[0329] 表7:示例性的异双官能交联剂

异双官能交联剂			
接头	反应对象	优势与应用	交联后的 间隔区臂长 (埃)
SMPT	伯胺 巯基	更高的稳定性	11.2 Å
SPDP	伯胺 巯基	硫醇化 可裂解交联	6.8 Å
LC-SPDP	伯胺 巯基	延长的间隔区 臂	15.6 Å
磺基-LC-SPDP	伯胺 巯基	延长的间隔区 臂	15.6 Å
SMCC	伯胺 巯基	水溶性 稳定的马来酰 亚胺反应基	11.6 Å
磺基-SMCC	伯胺 巯基	酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋 白缀合	11.6 Å
[0330] MBS	伯胺 巯基	水溶性 酶-抗体缀合 酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋 白缀合	9.9 Å
磺基-MBS	伯胺 巯基	水溶性	9.9 Å
SIAB	伯胺 巯基	酶-抗体缀合	10.6 Å
磺基-SIAB	伯胺 巯基	水溶性	10.6 Å
PB	伯胺 巯基	延长的间隔区 臂	14.5 Å
磺基-SMPB	伯胺 巯基	酶-抗体缀合 延长的间隔区 臂	14.5 Å
EDE/磺基-NHS	伯胺 巯基	水溶性 半抗原-载体缀 合	0
ABH	羧基 碳水化合物 非选择性	与糖基反应	11.9 Å

[0331] 不可裂解的接头或直接附接:在本公开的一些实施方案中,可以设计缀合物,使得

将剂递送至靶标但不释放。这可以通过直接地或经由不可裂解的接头将剂附接至AB来完成。

[0332] 这些不可裂解的接头可以包括氨基酸、肽、D-氨基酸或其它可以修饰为包括随后可以用于通过本文所述的方法与AB附接的官能团的有机化合物。此类有机接头的通式可以是

[0333] $W-(CH_2)_n-Q$

[0334] 其中

[0335] W是 $--NH--CH_2--$ 或 $--CH_2--$;

[0336] Q是氨基酸、肽;以及

[0337] n是0至20的整数。

[0338] 不可裂解的缀合物: 在一些实施方案中, 化合物可以附接至不活化补体的AB。当使用不能进行补体活化的AB时, 可以使用对活化补体达成的裂解敏感的接头或使用对活化补体达成的裂解不敏感的接头来完成这种附接。

[0339] 本文公开的抗体也可以配制为免疫脂质体。含抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备, 诸如Epstein等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 和美国专利第4,485,045和4,544,545号中所述。美国专利第5,013,556号中公开了循环时间增加的脂质体。

[0340] 特别有用的脂质体可通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG来源的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。挤压脂质体通过限定孔径的过滤器以产生具有所需直径的脂质体。本公开抗体的Fab'片段可以经由二硫键交换反应与如Martin等人, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)中所述的脂质体缀合。

[0341] 定义:

[0342] 除非另有定义, 否则结合本公开使用的科学术语和技术术语应具有本领域的普通技术人员通常所理解的含义。术语“一”实体或“一个(种)”实体是指一个或多个该实体。例如, 化合物是指一种或多种化合物。因而, 术语“一”、“一个(种)”、“一个或多个”和“至少一个”可互换使用。此外, 除非上下文另外要求, 否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。通常, 结合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和杂交所使用的命名法以及其技术为本领域中熟知和常用的。使用标准技术来进行重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如电穿孔、脂质体转染)。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酶反应和纯化技术。通常根据本领域中熟知的常规方法并且如本说明书全文中所引用和讨论的各种通用和更具体的参考文献所述那样来进行前述技术和程序。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疗和药物化学所使用的命名法以及其实验室程序和技术为本领域中熟知和常用的那些。使用标准技术来进行化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0343] 如根据本公开所用, 除非另有说明, 否则以下术语应理解为具有以下含义:

[0344] 如本文所用, 术语“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分, 即含有特异性结合抗原(与其免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或

“与……免疫反应”或“免疫特异性结合”意指抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应,而不与其他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和Fab表达文库。

[0345] 已知基础抗体结构单元构成四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括具有约100至110个或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的可变区。每条链的羧基端部分限定主要负责效应功能的恒定区。一般而言,从人获得的抗体分子与IgG、IgM、IgA、IgE以及IgD类别中的任一种有关,这些类别彼此的不同之处在于分子中存在的重链的性质。某些类别也有亚类,诸如IgG₁、IgG₂等。此外,在人中,轻链可为κ链或λ链。

[0346] 如本文所用,术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指仅含有一种分子种类的抗体分子的抗体分子群体,所述抗体分子由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。具体而言,在所述群体的所有分子中单克隆抗体的互补决定区(CDR)相同。MAb含有能够与以其具独特结合亲和力为特征的抗原的特定表位发生免疫反应的抗原结合位点。

[0347] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子中参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重(“H”)链和轻(“L”)链的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区内的三个高度趋异性区段(称为“高变区”)间插在称为“框架区”或“FR”的更保守的侧接区段之间。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其相邻的氨基酸序列。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布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,并且重链和轻链中的每一条的三个高变区称为“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每个结构域。

[0348] 如本文所用,术语“表位”包括能够与免疫球蛋白、scFv或T细胞受体特异性结合的任何蛋白决定簇。术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子(诸如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团(groupings)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,可以产生针对多肽的N端或C端肽的抗体。当解离常数 $\leq 1\mu\text{M}$;在一些实施方案中 $\leq 100\text{nM}$ 并且在一些实施方案中 $\leq 10\text{nM}$ 时,将抗体称为特异性结合抗原。

[0349] 如本文所用,术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指免疫球蛋白分子与免疫球蛋白对其具特异性的抗原之间发生的一类非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以用相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中 K_d 越小表示亲和力越高。可使用本领域中熟知的方法来定量所选多肽的免疫结合性质。一种此类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物配偶体的浓度、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_{缔合})与“解离速率常数”(k_{解离})。(参见Nature 361:185-87(1993))。k_{解离}/k_{缔合}的比率能够消去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)。正如通过测定法诸如放射性配体结合测定法或本领域技术人员已知的类似测定法测量的,当结合常数(K_d)为 $\leq 1\mu\text{M}$,在一些实施方案中为 $\leq 100\text{nM}$,在一些实施方案中为 $\leq 10\text{nM}$,并且在一些实施方案中为 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM 时,本公开的抗体称为与靶标特异性结合。

[0350] 如本文所用,术语“分离的多核苷酸”应指基因组、cDNA或合成来源的多核苷酸或其某种组合,由于其来源,“分离的多核苷酸”(1)未与在自然界中在其中发现“分离的多核苷酸”的多核苷酸的全部或部分缔合,(2)与在自然界中未与之连接的多核苷酸可操作地连接,或(3)在自然界中不作为较大序列的一部分存在。根据本公开的多核苷酸包括编码本文所示的重链免疫球蛋白分子的核酸分子,以及编码本文所示的轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0351] 本文提到的术语“分离的蛋白质”意指cDNA、重组RNA或合成来源的蛋白质或其某种组合,由于其来源或衍生来源,“分离的蛋白质”(1)未与自然界中发现的蛋白质缔合,(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)是由来自不同物种的细胞表达的,或(4)在自然界中不存在。

[0352] 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类的物质。根据本公开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,以及由包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子(诸如 κ 轻链免疫球蛋白分子且反之亦然)及其片段和类似物的组合形成的抗体分子。

[0353] 如本文所用,术语“天然存在”应用于对象时是指可以在自然界中找到对象的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中,可以从自然界中的来源分离,而尚未人为在实验室中或以其它方式有意进行修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0354] 如本文中所述的术语“可操作地连接”是指这样描述的组分的位置呈容许它们以其预期方式起作用的关系。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以这样的方式连接,使得在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。

[0355] 如本文所用,术语“控制序列”是指实现与它们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根据原核生物中的宿主生物而不同,在真核生物中此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列,通常,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在对于表达和加工所必需的所有组分,并且还可以包括其存在是有利的其它组分,例如前导序列和融合配偶体序列。如本文所提到的术语“多核苷酸”意指长度至少为10个碱基的核苷酸,是核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或是任何一种核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0356] 本文所提到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连接在一起的天然存在的和经修饰的核苷酸。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组。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为10至60个碱基,并且在一些实施方案中,长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基。寡核苷酸通常为单链,例如对于探针而言,但是寡核苷酸可为双链,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。

[0357] 本文所提到的术语“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

所提到的术语“经修饰的核苷酸”包括具有经修饰或取代的糖基等的核苷酸。本文所提到的术语“寡核苷酸键联”包括寡核苷酸键联,诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯、氨基磷酸酯等。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, 美国专利第5,151,510号; Uhlmann和Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990)。如果需要,寡核苷酸可以包括用于检测的标记。

[0358] 如本文所用,二十种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 *Immunology-A Synthesis* (第2版, E. S. Golub和DRGreen编辑, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。二十种常规氨基酸的立体异构体(例如, D-氨基酸)、非天然氨基酸(例如 α -、 α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸)和其它非常规氨基酸也可以是本公开多肽的合适组分。非常规氨基酸的实例包括: 4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸, 以及其它类似的氨基酸和亚氨基酸(例如, 4-羟基脯氨酸)。在本文使用的多肽符号中, 根据标准用法和惯例, 左手方向是氨基端方向, 并且右手方向是羧基端方向。

[0359] 类似地, 除非另有说明, 否则单链多核苷酸序列的左手末端是5'端, 双链多核苷酸序列的左手方向称为5'方向。新生RNA转录产物的5'至3'的添加方向称为转录方向, DNA链上具有与RNA相同序列并且在RNA转录产物5'末端的5'处的序列区域称为“上游序列”, DNA链上具有与RNA相同序列并且在RNA转录产物3'末端的3'处的序列区域称为“下游序列”。

[0360] 当应用于多肽时, 术语“基本同一性”是指两个肽序列在诸如通过使用默认空位权重的GAP或BESTFIT程序最佳比对时, 具有至少80%的序列同一性, 在一些实施方案中, 具有至少90%的序列同一性, 在一些实施方案中, 具有至少95%的序列同一性, 并且在一些实施方案中, 具有至少99%的序列同一性。

[0361] 在一些实施方案中, 不具有同一性的残基位置因保守氨基酸取代而不同。

[0362] 如本文所讨论的, 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由本公开涵盖, 条件是氨基酸序列中的变化保持至少75%, 在一些实施方案中保持至少80%、90%、95%, 并且在一些实施方案中保持99%。具体而言, 涵盖保守性氨基酸置换。保守性置换是那些在其侧链相关的氨基酸家族内发生的置换。通常将基因编码的氨基酸分为以下家族: (1) 酸性氨基酸为天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3) 非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸, 以及 (4) 不带电荷的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水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, 它们是含酰胺的家族; (iii) 丙氨酸、缬氨

酸、亮氨酸以及异亮氨酸,它们是脂肪族家族;以及(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,它们是芳香族家族。例如,有理由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相关的氨基酸进行的类似氨基酸置换将不会对所得分子的结合或性质有重大影响,特别是如果置换不涉及框架位点内的氨基酸时。可通过测定多肽衍生物的比活性容易地确定氨基酸变化是否会产生功能肽。本文对测定进行了详细描述。本领域的普通技术人员可容易地制备抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物。片段或类似物的合适氨基端和羧基端出现在功能结构域的边界附近。可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专有序列数据库进行比较来鉴定结构和功能结构域。在一些实施方案中,使用计算机化比较方法来鉴定序列基序或所预测的存在于具有已知结构和/或功能的其它蛋白质中的蛋白质构象结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。Bowie等人, *Science* 253:164 (1991)。因此,上述实例证明,本领域技术人员可根据本公开识别可用于限定结构和功能结构域的序列基序和结构构象。

[0363] 合适的氨基酸取代是:(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他物理化学或功能性质的那些氨基酸取代。类似物可以包括具有除天然存在的肽序列以外的序列的各种突变蛋白。例如,可以在天然存在的序列中(例如,在形成分子间接触点的结构域以外的多肽部分中)进行单个或多个氨基酸取代(例如,保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代不应基本上改变亲本序列的结构特征(例如,氨基酸置换不应倾向于断裂存在于亲本序列中的螺旋,或破坏表征亲本序列的其它类型的二级结构)。Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton编辑, W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden和J. Tooze编辑, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 以及Thornton等人 *Nature* 354:105 (1991) 中描述了本领域公认的多肽二级和三级结构的实例。

[0364] 如本文所用的术语“多肽片段”是指具有氨基端和/或羧基端缺失和/或一个或多个内部缺失的多肽,但其中剩余的氨基酸序列与例如从全长cDNA序列所推断的天然存在的序列中的相应位置相同。片段通常为至少5、6、8或10个氨基酸长,在一些实施方案中为至少14个氨基酸长,在一些实施方案中为至少20个氨基酸长,通常为至少50个氨基酸长,并且在一些实施方案中为至少70个氨基酸长。如本文所用的术语“类似物”是指由具有至少25个氨基酸的区段组成的多肽,所述区段与推断的氨基酸序列的一部分具有基本同一性,并且在合适的结合条件下对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)。类似物通常为至少20个氨基酸长,在一些实施方案中为至少50个氨基酸长或更长,并且常常可与天然存在的全长多肽一样长。

[0365] 术语“剂”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制得的提取物。

[0366] 如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指并入可检测标记,例如通过并入放射性标记的氨基酸或附接到可以通过带标志的抗生物素蛋白检测到的生物素基部分(例如,含有可通过光学或量热法检测到的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)的多肽。在某些情形下,标记或标志物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法为本领域已知的并且可以使用。多肽的标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如,³H、

^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如,FITC、若丹明、镧系磷光体)、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,二级报告因子(例如,亮氨酸拉链对序列、二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标签)识别的预定多肽表位。在一些实施方案中,通过各种长度的间隔臂来附接标记以减少潜在的空间位阻。如本文所用的术语“药剂或药物”是指当适当施用给患者时能够引起所需疗效的化学化合物或组合物。

[0367] 本文中的其它化学术语根据本领域中的常规用法来使用,如由The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)) 所举例说明的那样。

[0368] 如本文所用,“基本上纯的”意指目标物质是存在的主要物质(即,按摩尔计,它比组合物中的任何其它单独物质更丰富),并且在一些实施方案中,基本上纯化的级分是其中目标物质占存在的所有大分子物质的至少约50%(按摩尔计)的组合物。

[0369] 通常,基本上纯的组合物将占组合物中存在的所有大分子物质的约80%以上,在一些实施方案中,占约85%、90%、95%和99%以上。在一些实施方案中,将目标物质纯化至必要的均一性(通过常规方法无法在组合物中检测出污染物质),其中组合物基本上由单一大分子物质组成。

[0370] 术语患者包括人和兽医受试者。

[0371] 本公开的抗体和/或可活化抗体特异性结合给定靶标,例如人靶蛋白。本公开中还包括与本文所述的抗体和/或可活化抗体结合相同表位的抗体和/或可活化抗体。本公开中还包括与本文所述的抗体和/或可活化抗体竞争结合靶标的抗体和/或抗体可活化抗体。本公开中还包括与本文所述的抗体和/或可活化抗体交叉竞争结合靶标的抗体和/或抗体可活化抗体。

[0372] 本领域的技术人员将认识到,无需过度实验即可确定单克隆抗体(例如,鼠类单克隆抗体或人源化抗体)是否具有与本文所述方法中使用的单克隆抗体相同的特异性,这是通过确定前者是否阻止后者与靶标结合来确定的。如果所测试的单克隆抗体与本公开的单克隆抗体竞争,如本公开的单克隆抗体的结合减少所示,则这两种单克隆抗体与相同或紧密相关的表位结合。确定单克隆抗体是否具有本公开的单克隆抗体的特异性的替代方法是将本公开的单克隆抗体与靶标一起预孵育,然后添加所测试的单克隆抗体以确定所测试的单克隆抗体在结合靶标的能力方面是否受到抑制。如果所测试的单克隆抗体受到抑制,则极有可能具有与本公开的单克隆抗体相同或在功能上等效的表位特异性。

[0373] 多特异性可活化抗体

[0374] 本公开还提供了使用多特异性可活化抗体的方法和组合物。本文提供的多特异性可活化抗体是识别靶标和至少一种或多种不同抗原或表位,并且包括与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),使得MM的偶联降低了抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的多特异性抗体。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)与多特异性抗体的抗原或表位结合结构域偶联。本文提供的可活化多特异性抗体在循环中是稳定的,在预期的治疗和/或诊断位点被活化,但在正常(即,健康)组织中则不活化,并且当活化时表现出与靶标结合,这种结合与相应未修饰的多特异性抗体至少相当。

[0375] 在一些实施方案中,将多特异性可活化抗体设计为接合免疫效应细胞,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,将多特异性可活化抗体设计为接合白细胞,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,将多特异性可活化抗体设计为接合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,多特异性可活化抗体接合白细胞诸如T细胞、自然杀伤(NK)细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/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,例如髓样单核细胞。在一些实施方案中,将多特异性可活化抗体设计为与多于一个靶标和/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。

[0376] 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可活化抗体包括结合靶标的靶向抗体或其抗原结合片段以及接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合部分,其中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种被掩蔽。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括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AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。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括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AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。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。

[0377] 在一些实施方案中,本公开的接合T细胞的多特异性可活化抗体包括靶向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,其中靶向抗体或其抗原结合片段和/或接合T细胞的抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。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括结合第一T细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。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括结合第一T细胞接合靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合第一靶标的能力,并且靶向抗体或其抗原结合

片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。

[0378] 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,一种抗原是靶标,而另一种抗原通常是存在于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的刺激或抑制性受体,诸如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。在一些实施方案中,抗原是存在于T细胞或NK细胞表面的刺激性受体;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,抗原是存在于T细胞表面的抑制性受体;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KIRs。赋予T细胞表面抗原特异性的抗体结构域也可以被与T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其它免疫效应细胞受体(诸如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PDL1、PDL2或TNFSF9)结合的配体或配体结构域取代。

[0379] 在一些实施方案中,接合T细胞的多特异性可活化抗体包括抗CD3(CD3 ϵ ,在本文中也称为CD3 ϵ 和CD3) scFv和靶向抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或靶向抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包括结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶联降低了AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包括第二抗体或其片段,第二抗体或其片段包括结合靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶联降低了AB2结合靶标的能力。

[0380] 在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体至少包括结合第一靶标和/或第一表位的第一抗体或抗原结合片段以及结合第二靶标和/或第二表位的第二抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合两个或更多个不同的靶标。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合相同靶标上的两个或更多个不同的表位。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合两个或更多个不同靶标与相同靶标上的两个或更多个不同表位的组合。

[0381] 在一些实施方案中,包含IgG的多特异性可活化抗体具有被掩蔽的IgG可变结构域。在一些实施方案中,包含scFv的多特异性可活化抗体具有被掩蔽的scFv结构域。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中至少一个IgG可变结构域与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中至少一个scFv结构域与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中至少一个IgG可变结构域与掩蔽部分偶联,并且至少一个scFv结构域与掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域两者,其中每个IgG可变结构域和scFv结构域均

与其自身的掩蔽部分偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,而另一抗体结构域对T细胞表面抗原具有特异性。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,而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,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原的一个表位具有特异性,而另一抗体结构域对该靶抗原的另一表位具有特异性。

[0382] 在多特异性可活化抗体中,scFv可与IgG可活化抗体的重链的羧基端,IgG可活化抗体的轻链的羧基端或IgG可活化抗体的重链和轻链两者的羧基端融合。在多特异性可活化抗体中,scFv可与IgG可活化抗体的重链的氨基端,IgG可活化抗体的轻链的氨基端或IgG可活化抗体的重链和轻链两者的氨基端融合。在多特异性可活化抗体中,scFv可与IgG可活化抗体的一个或多个羧基端与一个或多个氨基端的任何组合融合。在一些实施方案中,与可裂解部分(CM)连接的掩蔽部分(MM)附接并掩蔽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)附接并掩蔽至少一个scFv的抗原结合结构域。

[0383] 本公开提供了多特异性可活化抗体结构的实例,包括但不限于以下:(VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂; (VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂; (VL-CL)₂:(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL)₂:(MM-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-VL-CL)₂:(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (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-CM-L1-MM)₂:(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂:(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂:(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-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-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂:(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂:(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)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-VL*-L3-VH*)₂:(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-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:(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; 或(VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂,其中:VL和VH表示IgG中所含的具有第一特异性的轻链和重链可变结构域;VL*和VH*表示scFv中所含的具有第二特异性的可变结构域;L1是连接掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM)的接头肽;L2是连接可裂解部分(CM)和抗体的接头肽;L3是连接scFv的可变结构域的接头肽;L4是连接具有第一特异性的抗体与具有第二特异性

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。第一和第二特异性可以是针对任何抗原或表位的。

[0384] 在接合T细胞的多特异性可活化抗体的一些实施方案中,一种抗原是靶标,而另一种抗原通常是存在于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的刺激性(本文也称为活化性)或抑制性受体,诸如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137(本文也称为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以被与T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其它免疫效应细胞受体结合的配体或配体结构域取代。

[0385] 在一些实施方案中,靶向抗体是本文公开的抗体。在一些实施方案中,靶向抗体可以是可活化抗体的形式。在一些实施方案中,scFv可以是Pro-scFv的形式(参见,例如,WO 2009/025846、WO 2010/081173)。

[0386] 在一些实施方案中,scFv对结合CD3 ϵ 具有特异性,并且包含或源自结合CD3 ϵ 的抗体或其片段,例如CH2527、FN18、H2C、OKT3、2C11、UCHT1或V9。在一些实施方案中,scFv对结合CTLA-4(在本文中也称为CTLA和CTLA4)具有特异性。

[0387] 在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含氨基酸序列:

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGG
```

[0388] GTKVEIKRSGGSTITSYNYYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSRLRSCAASGSTFSSYA
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 643)

[0389] 在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含与SEQ ID NO:643的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0390] 在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包含氨基酸序列:

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQ
RPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYD
```

[0391] DHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSV
SYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWS
SNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 644)

[0392] 在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包含与SEQ ID NO:644的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0393] 在一些实施方案中,scFv对结合一个或多个T细胞、一个或多个NK细胞和/或一个或多个巨噬细胞具有特异性。在一些实施方案中,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。

[0394] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体还包括与AB缀合的剂。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,所述剂经由接头与多特异性可活化抗体缀合。在一些实施方案中,所述剂经由可裂解接头与AB缀合。在一些实施方案中,接头是不可裂解接头。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,所述剂是核酸损伤剂,诸如DNA烷化剂或DNA嵌入剂或其它DNA损伤剂。在一些实施方案中,接头是可裂解接头。在一些实施方案中,所述剂是选自表5中所列的组的剂。在一些实施方案中,所述剂是多拉司他汀。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是澳瑞他汀E或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀E (MMAE)。在一些实施方案中,所述剂是单甲基澳瑞他汀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,所述剂是加利车霉素或其衍生物。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓。在一些实施方案中,所述剂是吡咯并苯并二氮杂卓二聚体。

[0395] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体还包括可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分是诊断剂。

[0396] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,可以将多特异性可活化抗体工程改造为包括一个或多个二硫键。

[0397] 本公开还提供了编码本文所述的多特异性可活化抗体的分离的核酸分子,以及包括这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了通过在引起可活化抗体表达的条件下培养细胞来产生多特异性可活化抗体的方法,其中所述细胞包含此类核酸分子。在一些实施方案中,所述细胞包含此类载体。

[0398] 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可活化抗体的方法:(a) 在引起多特异性可活化表达的条件下培养包含编码该多特异性可活化抗体的核酸构建体的细胞,并且 (b) 回收该多特异性可活化抗体。合适的AB、MM和/或CM包括本文公开的AB、MM和/或CM中的任一者。

[0399] 本公开还提供了多特异性可活化抗体和/或多特异性可活化抗体组合物,其至少包含特异性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), 使得MM1的偶联降低了AB1结合其靶标的的能力。在一些实施方案中,MM1经由第一可裂解部分 (CM1) 序列与AB1偶联,所述第一可裂解部分序列包括蛋白酶的底物,所述蛋白酶例如是与AB1靶标共定位于受试者的治疗位点或诊断位点的蛋白酶。本文提供的多特异性可活化抗体在循环中是稳定的,在预期的治疗和/或诊断位点被活化,但在正常(即,健康)组织中则不活化,并且当活化时表现出与AB1靶标结合,这种结合与相应未修饰的多特异性抗体至少相当。合适的AB、MM和/或CM包括本文公开的AB、MM和/或CM中的任一者。

[0400] 本公开还提供了包括多特异性可活化抗体的组合物和方法,所述多特异性可活化抗体至少包括特异性结合靶标的第一抗体或抗体片段 (AB1) 和第二抗体或抗体片段 (AB2), 其中所述多特异性可活化抗体中的至少第一AB与降低AB1结合其靶标的的能力的掩蔽部分 (MM1) 偶联。在一些实施方案中,每个AB均与降低其相应AB结合每个靶标的的能力的MM偶联。例如,在双特异性可活化抗体的实施方案中,AB1与降低AB1结合其靶标的的能力的第一掩蔽部分 (MM1) 偶联,并且AB2与降低AB2结合其靶标的的能力的第二掩蔽部分 (MM2) 偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体包含多于两个AB区域;在此类实施方案中,AB1与降低AB1结合其靶标的的能力的第一掩蔽部分 (MM1) 偶联,AB2与降低AB2结合其靶标的的能力的第二掩蔽部分 (MM2) 偶联,AB3与降低AB3结合其靶标的的能力的第三掩蔽部分 (MM3) 偶联,并且对于

多特异性可活化抗体中的每个AB依此类推。合适的AB、MM和/或CM包括本文公开的AB、MM和/或CM中的任一者。

[0401] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体还包括至少一个是蛋白酶的底物的可裂解部分(CM),其中CM将MM连接至AB。例如,在一些实施方案中,多特异性可活化抗体至少包括特异性结合靶标的第一抗体或抗体片段(AB1)和第二抗体或抗体片段(AB2),其中所述多特异性可活化抗体中的至少第一AB经由第一可裂解部分(CM1)与降低AB1结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM1)偶联。在一些双特异性可活化抗体的实施方案中,AB1经由CM1与MM1偶联,并且AB2经由第二可裂解部分(CM2)与降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分(MM2)偶联。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体包含多于两个AB区域;在这些实施方案的一些中,AB1经由CM1与MM1偶联,AB2经由CM2与MM2偶联,并且AB3经由第三可裂解部分(CM3)与降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分(MM3)偶联,并且对于多特异性可活化抗体中的每个AB依此类推。合适的AB、MM和/或CM包括本文公开的AB、MM和/或CM中的任一者。

[0402] 具有非结合性空间部分或非结合性空间部分的结合配偶体的可活化抗体

[0403] 在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法与可活化抗体一起使用,所述可活化抗体包括非结合性空间部分(NB)或非结合性空间部分的结合配偶体(BP),其中BP将NB募集或以其它方式吸引至可活化抗体。本文提供的可活化抗体包括例如,包括非结合性空间部分(NB)、可裂解接头(CL)和结合靶标的抗体或抗体片段(AB)的可活化抗体;包括非结合性空间部分的结合配偶体(BP)、CL和AB的可活化抗体;以及包括已募集了NB的BP、CL和结合靶标的AB的可活化抗体。其中NB共价连接至可活化抗体的CL和AB或通过与共价连接至可活化抗体的CL和AB的BP的相互作用而缔合的可活化抗体在本文中称为“含NB的可活化抗体”。可活化或可转换意指当可活化抗体处于抑制、掩蔽或未裂解状态(即,第一构象)时,可活化抗体表现出与靶标的第一结合水平,当可活化抗体处于未抑制、未掩蔽和/或裂解状态(即,第二构象,即活化抗体)时表现出与靶标的第二结合水平,其中第二靶标结合水平高于第一靶标结合水平。与常规抗体治疗剂相比,可活化抗体组合物可表现出增加的生物利用率和更有利的生物分布。

[0404] 在一些实施方案中,可活化抗体提供降低的毒性和/或不良副作用,如果AB未受掩蔽或未以其它方式抑制与非治疗位点和/或非诊断位点结合,则可由此类位点的结合产生所述毒性和/或不良副作用。

[0405] 可以使用PCT公开第W0 2013/192546号中阐述的方法制备包括非结合性空间部分(NB)的可活化抗体,所述PCT公开的内容通过引用特此整体并入。

[0406] 本发明的实施方案包括以下各项:

[0407] 1. 一种定量基于可活化抗体的治疗剂的活化水平的方法,所述方法包括:

[0408] i) 向至少一根毛细管或一个毛细管群体装填堆积基质和分离基质;

[0409] ii) 使已装填的毛细管或已装填的毛细管群体与生物样品接触;

[0410] iii) 将每根毛细管内所述生物样品的高分子量(MW)组分与所述生物样品的低分子量(MW)组分分离;

[0411] iv) 固定每根毛细管内的高MW组分和低MW组分;

[0412] v) 用对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合具有特异性的至少一种可检测试剂免疫探测每根毛细管;并且

- [0413] vi) 定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测试剂的水平。
- [0414] 2. 根据实施方案1所述的方法, 其中步骤v) 中的所述至少一种可检测试剂至少包括对至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合具有特异性的第一试剂和特异性结合或识别第一试剂的第二试剂, 其中第二试剂包含可检测标记。
- [0415] 3. 根据实施方案2所述的方法, 其中步骤vi) 包括定量每根毛细管或每个毛细管群体中可检测标记的水平。
- [0416] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的方法, 其中步骤ii) 包括装填大约1-500ng生物样品。
- [0417] 5. 根据实施方案1至4中任一项所述的方法, 其中步骤ii) 包括装填大约5-40ng生物样品。
- [0418] 6. 根据实施方案1至5中任一项所述的方法, 其中使用足以引起分子量分离的量的的一种或多种含SDS的缓冲液制备所述生物样品。
- [0419] 7. 根据实施方案1至6中任一项所述的方法, 其中步骤iv) 包括使用紫外光固定所述生物样品的所述高MW组分和所述低MW组分。
- [0420] 8. 根据实施方案1至7中任一项所述的方法, 其中步骤v) 中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的抗体或其抗原结合片段。
- [0421] 9. 根据实施方案1至8中任一项所述的方法, 其中步骤v) 中的第二试剂是与第一试剂特异性结合的可检测标记的二抗。
- [0422] 10. 根据实施方案1至7中任一项所述的方法, 其中步骤v) 中的第一试剂是特异性结合至少一种可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其组合的一抗或其抗原结合片段, 并且步骤v) 中的第二试剂是特异性结合一抗或其抗原结合片段的可检测标记的二抗。
- [0423] 11. 根据实施方案1至10中任一项所述的方法, 其中所述可检测标记与所述第二试剂缀合。
- [0424] 12. 根据实施方案11所述的方法, 其中所述可检测标记是荧光标记, 并且步骤vi) 包括检测每根毛细管或每个毛细管群体中的化学发光水平。
- [0425] 13. 根据实施方案12所述的方法, 其中所述可检测标记是辣根过氧化物酶 (HRP)。
- [0426] 14. 根据实施方案1至13中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是体液。
- [0427] 15. 根据实施方案14所述的方法, 其中所述体液是血液、血浆或血清。
- [0428] 16. 根据实施方案1至13中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是患病组织。
- [0429] 17. 根据实施方案16所述的方法, 其中所述患病组织是裂解物。
- [0430] 18. 根据实施方案16或实施方案17所述的方法, 其中所述患病组织是肿瘤组织。
- [0431] 19. 根据实施方案1至18中任一项所述的方法, 其中所述方法比较了已活化的和完整的可活化抗体或基于可活化抗体的治疗剂的量。
- [0432] 20. 根据实施方案19所述的方法, 其中所述基于可活化抗体的治疗剂是缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体、缀合的多特异性可活化抗体或其任何组合。
- [0433] 21. 一种分离的抗体或其抗原结合片段, 其包含含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID

NO:438)的可变重链互补决定区1(CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTVKG(SEQ ID NO:439)的可变重链互补决定区2(CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTYLYYIDY(SEQ ID NO:440)的可变重链互补决定区3(CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA(SEQ ID NO:441)的可变轻链互补决定区1(CDRL1);含有氨基酸序列WAFTRRES(SEQ ID NO:442)的可变轻链互补决定区2(CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT(SEQ ID NO:443)的可变轻链互补决定区3(CDRL3)。

[0434] 22.根据实施方案21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0435] 23.根据实施方案21或实施方案22所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0436] 24.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0437] 25.根据实施方案24所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0438] 26.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:431的氨基酸序列的可变轻链。

[0439] 27.根据实施方案26所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:429的氨基酸序列的可变重链。

[0440] 在以下实施例中将进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中所描述的本发明的范围。

[0441] 实施例

[0442] 实施例1.结合活化的和完整的抗PDL1可活化抗体的抗体的产生

[0443] 本文提供的研究被设计为产生和评价结合本公开的抗PDL1可活化抗体的抗体。

[0444] 本文提出的研究使用本文中称为PL07-2001-C5H9v2的抗PDL1可活化抗体,其包含SEQ ID NO:425的重链序列和SEQ ID NO:426的轻链序列,如下所示。

[0445] PL07-2001-C5H9v2重链氨基酸序列(SEQ ID NO:425)

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFWDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPDK
[0446] PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR
EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
```

[0447] PL07-2001-C5H9v2轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:426)

```
QQQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDV
VTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
[0448] YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[0449] 由GenScript Biotech公司用肽抗原CQQDNGYPSTFGGGT(SEQ ID NO:427)对小鼠进行免疫,该肽抗原包含抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的VL CDR3,使用下面表3所示

的程序将VL CDR3与载体蛋白即钥孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合。根据下面列出的方案对六只三月龄的小鼠 (3只Balb/c和3只C56) 进行免疫。在每次注射时,将抗原等分试样解冻并与完全弗氏佐剂 (CFA) 组合用于第一次注射,或与不完全弗氏佐剂 (IFA) 组合用于后续注射。

[0450] 表3. 免疫计划

程序	计划	剂量和途径
免疫前放血	T=-4天	
初次免疫	T=0天	50 μ g/只动物,皮下
加强1	T=14天	25 μ g/只动物,皮下
试验放血1	T=21天	
加强2	T=28天	25 μ g/只动物,皮下
试验放血2	T=35天	
最终加强	T=50 \pm 7天	25 μ g/只动物,静脉
细胞融合	最终加强后4天	

[0452] 使用标准的ELISA程序评价试验放血中针对游离肽以及反筛抗原 (人IgG) 的血清滴度。通过蛋白质印迹 (Western blot) 针对人血浆中的全长可活化抗体评价前导序列。结果表明,所有小鼠对相应免疫原的滴度均相当。在WesTM系统 (ProteinSimple) 上针对抗活化抗体PL07-2001-C5H9v2测试抗血清,并选择两只小鼠进行细胞融合。

[0453] 如下产生小鼠单克隆抗体:将来自两只小鼠的淋巴细胞用于杂交瘤融合,并接种在40块96孔板上 (每只小鼠4亿个淋巴细胞)。将板在标准条件下保存在组织培养箱中。

[0454] 实施例2. 杂交瘤克隆物的筛选和抗体表征

[0455] 该实施例描述了杂交瘤克隆物和针对抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2产生的所得抗体的筛选和表征。

[0456] 由GenScript通过间接ELISA,用含有可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的VL CDR3的短肽筛选来自亲本克隆物的杂交瘤上清液。简言之,用肽-BSA以1 μ g/mL的浓度、100 μ L/孔涂覆GenScript高结合板。使用未稀释的上清液。将1:1000稀释的抗血清用作阳性对照。使用过氧化物酶亲和纯化山羊抗小鼠IgG、Fc γ 片段特异性抗体 (与人、牛或马血清白蛋白具有最低交叉反应性,也称为min X Hu、Bov、Hrs Sr Prot) 作为二抗。用抗PDL1抗体C5H9v2、可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的亲本抗体和5 μ g/mL的人IgG进一步筛选具有阳性信号的20种克隆物。将抗PDL1抗体C5H9v2以1 μ g/mL的浓度、100 μ L/孔涂覆到高结合板上。将人IgG以5 μ g/mL的浓度、100 μ L/孔涂覆到高结合板上。还使用200ng变性和还原的抗PDL1抗体C5H9v2作为靶标,对这20种克隆物进行蛋白质印迹分析。作为最终筛选,还在WesTM系统 (ProteinSimple) 上对20种克隆物的上清液进行了评估。简言之,用1 μ g/mL在0.1X样品缓冲液中的单臂活化的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2和1 μ g/mL在1:100人血浆中的单臂活化的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2对20种克隆物进行了试验。还用在1:100人血浆中浓度为0.11和0.33 μ g/mL的单臂活化的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2进一步筛选了如通过与可活化抗体PL07-2001-C5H9v2结合的强度和特异性评估的前6种克隆物 (称为17G1、18F1、19H12和23H6、21H10和27C1)。结果示于图1A和图1B中,其显示了用在1:100人血浆中的0.11、0.33和1 μ g/mL的37%单臂活化的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2筛选可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的抗独特型 (anti-id) 克隆物。图1A是电泳图,其显示浓度递减的单臂活化的可活化抗

体PL07-2001-C5H9v2 (1、0.33和0.11ug/ml)的17G1检测。图1B描绘了单臂活化的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的前6种克隆物的相对活化百分比。相对活化率在不同浓度下得以保持。克隆物21H10和27C1的亲合力较低,导致没有关于0.11ug/ml浓度的数据。

[0457] 选择克隆物17G1、18F1、19H12和23H6进行亚克隆和表征。使用以下方法进行分子克隆。按照 **TRIzol®** 试剂技术手册 (ThermoFisher) 中描述的技术,从由GenScript回收的新鲜杂交瘤细胞中分离总RNA。然后按照PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒 (Clontech) 中描述的技术,使用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA逆转录为cDNA。根据GenScript的cDNA末端快速扩增 (RACE) 方案扩增了可变重链 (VH)、可变轻链 (VL)、重链 (HC) 和轻链 (LC) 抗体片段。将扩增的每个抗体片段克隆到单独的标准克隆载体中。进行集落PCR以筛选具有恰当大小的插入片段的克隆物。对于每个片段,对不少于五个具有恰当大小的插入片段的集落进行测序。比对不同克隆物的序列并确定共有序列。

[0458] 下面提供了抗体17G1的核酸和氨基酸序列。17G1抗体包括含有氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO:438) 的可变重链互补决定区1 (CDRH1);含有氨基酸序列TISPSGIYTYYPVTVKG (SEQ ID NO:439) 的可变重链互补决定区2 (CDRH2);含有氨基酸序列HHPNYGSTLYYIDY (SEQ ID NO:440) 的可变重链互补决定区3 (CDRH3);含有氨基酸序列KSSQSVFSSSNQKNYLA (SEQ ID NO:441) 的可变轻链互补决定区1 (CDRL1);含有氨基酸序列WAFTR (SEQ ID NO:442) 的可变轻链互补决定区2 (CDRL2);和含有氨基酸序列YQYLSSLT (SEQ ID NO:443) 的可变轻链互补决定区3 (CDRL3)。

[0459] 成熟可变重链区:DNA序列

[FR1]-[CDR1]-[FR2]-[CDR2]-[FR3]-[CDR3]-[FR4]
[GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAGTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACTTTCAGT] [AGTTATGGCATGTCT] [TGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAAAG

[0460] GCTGGAGTGGGTGCGA] [ACCATTAGTCTAGTGGTATATACACCTACTATCCAGTCACTGTGAAGGG
G] [CGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTTCTGTGCAAGA] [CACCATCCAAACTATGGTAGTACGTACCTGTATTA
TATTGATTAC] [TGGGGCCAAGGCACCGCTCTCACAGTCTCCTCA] (SEQ ID NO: 428)

[0461] 成熟可变重链区:氨基酸序列

[FR1]-[CDR1]-[FR2]-[CDR2]-[FR3]-[CDR3]-[FR4]
[EVQLVESGGDLVKPGGSLKVSACAASGFTFS] [SYGMS] [WVRQTPDKRLEWVA] [TISPSGIYTYYP

[0462] VTVKG] [RFTISRDNKNTLYLQMSLKSSED TAMYFCAR] [HHPNYGSTLYYIDY] [WGQGTALTVS
S] (SEQ ID NO: 429)

[0463] 成熟重链:氨基酸序列:17G1_Hc mIgG2a

EVQLVESGGDLVKPGGSLKVSACAASGFTFSSYGMSSWVRQTPDKRLEWVATISPSGIYTYYPVTVKGRF
TISRDNKNTLYLQMSLKSSED TAMYFCARHHPNYGSTLYYIDYWGQGTALTVSSAKTTAPSVYPLA
PVCGDITGSSVTLGLCLVKGYFPEPVTLTWNSSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI
[0464] TCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVD
VSEDDFDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE
RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 444)

[0465] 成熟可变轻链区:DNA序列

[FR1]-[CDR1]-[FR2]-[CDR2]-[FR3]-[CDR3]-[FR4]
 [AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAAGGTCACCTATGGCCT
 GT] [AAGTCCAGTCAAAGTGTTTTTTCCAGTTCAAATCAGAAGAAGTACTTGGCC] [TGGTACCAGCA
 [0466] GAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAATACTGATCTAC] [TGGGCTTTCCTAGGGAATCT] [GGTGTCCCT
 GACCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAAGCTGAAGA
 CCTGGCAGTTTATTACTGT] [TATCAATACCTCTCCTCACTCACG] [TTCGGTGCTGGGACCAAGCTG
 GAGGTGAAA] (SEQ ID NO: 430)

[0467] 成熟可变轻链区:氨基酸序列

[FR1]-[CDR1]-[FR2]-[CDR2]-[FR3]-[CDR3]-[FR4]
 [NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMAC] [KSSQSVFSSSNQKNYLA] [WYQQKPGQSPKILIIY] [WAFTR
 [0468] S] [GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC] [YQYLSSLT] [FGAGTKLEVK] (SEQ ID
 NO: 431)

[0469] 成熟的轻链:氨基酸序列:17G1_Lc mk

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMACKSSQSVFSSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKILIIYWAFTR
 [0470] SSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCYQYLSSLTFGAGTKLEVKADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASV
 VCFLNNFYPKIDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKT
 STSPIVKSEFNRNEC (SEQ ID NO: 445)

[0471] 实施例3. 结合抗PDL1可活化抗体的抗体的结合特异性

[0472] 该实施例描述了本公开的抗体结合抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的能力。
 [0473] 为了测试抗体17G1与抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2结合的特异性,将
 160ng/mL单臂活化的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2掺入人血浆中(在PBS中1:100稀
 释)或肺肿瘤裂解物中。简言之,使用Barocycler (Pressure Biosciences) 在添加了Thermo
 Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific
 Pierce™IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。还用未掺入单臂活化的抗PDL1可活
 化抗体PL07-2001-C5H9v2的相同血浆和肿瘤测试了抗id抗体17G1。将HRP缀合的抗小鼠二
 抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。然后在Wes™毛细管电泳免疫测定系
 统(ProteinSimple)上分析试验样品,其中分离是通过基于SDS的电泳(也称为Wes™系统)进
 行的。图2A-2D展示了抗体17G1与掺入人血浆(图2C)和肺肿瘤裂解物样品(图2D)中的抗
 PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的高结合特异性。图2A和2B分别展示了在抗PDL1可活
 化抗体PL07-2001-C5H9v2不存在的情况下,人血浆和肺肿瘤裂解物样品中抗体17G1的本底结
 合。

[0474] 实施例4. 生物样品中活化的和完整的抗PDL1可活化抗体的定量。

[0475] 该实施例描述了抗-id抗体17G1用于检测施用了抗PDL1可活化抗体PL07-2001-
 C5H9v2的小鼠的血浆和异种移植肿瘤样品中活化的和完整的抗PDL1可活化抗体PL07-
 2001-C5H9v2的能力。

[0476] 抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2被设计为被多种丝氨酸蛋白酶和基质金属
 蛋白酶(MMP)裂解(即活化),所述丝氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶通常与人肿瘤相关
 (LeBeau等人, Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed
 epithelium. Proc Natl Acad Sci 2013; 110:93-98; Overall和Kleinfeld, 2006, Validating
 Matrix Metalloproteinases as Drug Targets and Anti-Targets for Cancer

Therapy. Nature Review Cancer, 6, 227-239), 并且在血液或正常组织中的活性较低。为了评价和测量肿瘤和血浆样品中的可活化抗体活化, 通过能够以本文所述的方法检测完整的和活化的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的Wes™系统分析样品。使用该系统, 显示可活化抗体在循环中大部分保持完整(即失活), 但是在小鼠异种移植肿瘤中被活化。

[0477] 通常, 使用以下方案: 通过向7-8周龄的雌性裸鼠皮下植入在30 μ L含有基质胶(1:1)的无血清培养基中的 3×10^6 个MDA-MB-231-luc2-4D3LN细胞来发展小鼠异种移植肿瘤模型。在研究持续期间每周两次测量并记录体重和肿瘤测量值。在肿瘤达到200-500mm³的体积后, 将小鼠随机分为具有相等平均肿瘤体积的3组, 并给予抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2。治疗后四天, 收集肿瘤和血浆(肝素)并在分析前储存在-80°C下。使用Barocycler (Pressure Biosciences) 在添加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆(即, 裂解物)。通过如本文所述的Wes™系统分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的大约0.8mg/mL的蛋白质裂解物和1:100稀释于PBS中的血浆样品。

[0478] 根据本文所述的方法, 使用Wes™毛细管电泳平台 (ProteinSimple) 进行样品分析。参见《简单的西方尺寸测定开发指南》(Simple Western Size Assay Development Guide) (万维网proteinsimple.com/documents/042-889_Rev1_Size_Assay_Development_Guide.pdf)。在一些实施方案中, 使用该方法改变以下任何一种或更多种可以用于促进完整的和活化的物质的分离: 改变(例如增加或减少)堆积时间, 改变(例如增加或减少)采样时间和/或改变(例如增加或减少)分离时间。

[0479] 通常, 将一份(例如, 1 μ L) 5X荧光主混合物 (ProteinSimple) 与4份(例如, 4 μ L) 裂解物组合, 以在微量离心管中进行测试。使用1ng至5 μ g范围的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2进行抗体筛选和表征。对于包含肿瘤组织的生物样品, 使用在含有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的0.8mg/mL的蛋白质裂解物。将血浆样品1:100稀释于PBS中。使用浓度为1.7ng/mL的一抗(稀释于抗体稀释剂2 (ProteinSimple目录号042-203) 中。将纯的HRP缀合的小鼠二抗 (ProteinSimple) 连同鲁米诺和过氧化物一起使用, 并测量化学发光。在室温下以2500rpm(约1000x g) 离心具有根据《简单的西方尺寸测定开发指南》制备的样品的板5分钟, 之后在Wes™系统 (ProteinSimple) 上分析。

[0480] 图3A和3B比较了用本公开的抗独特型抗体17G1和来自美国Qualex的商购抗人IgG A110UK(食蟹猴吸附的山羊抗人IgG) 对完整的和活化的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的特异性检测。本公开的抗-id抗体17G1能够检测出仅用0.1mg/kg抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2处理的小鼠血浆中的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2(图3B), 相比而言商购的人IgG抗体只能够最低限度地检测出用10mg/kg抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2处理的小鼠血浆中的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2(图3A)。

[0481] 图4A和图4B显示相对于血浆样品, 肿瘤中的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2优先活化。在这项研究中, 用1mg/kg抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2处理MDA-MB-231异种移植小鼠。在第4天(96小时)收集肿瘤和血浆样品。在Wes™系统中使用用于检测的抗id 17G1抗体分析肿瘤匀浆和血浆样品。血浆样品表现出完整的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2(图4B), 而肿瘤微环境使抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2的至少一部分活化(图4A)。

[0482] 实施例5.生物样品中活化的和完整的抗PDL1可活化抗体的定量。

[0483] 该实施例证明,本发明的方法可适用于不同的异种移植肿瘤类型和不同的剂量浓度。

[0484] 简言之,通过向7-8周龄的雌性裸鼠皮下植入在100uL无血清培养基中的 5×10^6 个SAS细胞来发展小鼠异种移植肿瘤模型。在研究持续期间每周两次测量并记录体重和肿瘤测量值。在肿瘤达到 $450-550\text{mm}^3$ 的体积后,将小鼠随机分为具有相等平均肿瘤体积的3组,并给予 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 的抗PDL1可活化抗体PL07-2001-C5H9v2。治疗后四天,收集肿瘤和血浆(肝素)样品并在分析前储存在 -80°C 下。使用Barocycler (Pressure Biosciences)在添加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆(即,裂解物)。根据本发明的方法使用Wes™系统和用于检测的17G1抗体分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的大约 $0.8\text{mg}/\text{mL}$ 的蛋白质裂解物和1:250稀释于PBS中的血浆样品。将HRP缀合的抗小鼠二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图5A和5B表明相对于血浆样品,肿瘤中的可活化抗体治疗剂优先活化。

[0485] 实施例6.生物样品中活化的和完整的抗CD166可活化抗体的定量。

[0486] 该实施例描述了检测施用了7614.6-3001-HuCD166的小鼠的血浆和异种移植肿瘤样品中活化的和完整的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166的能力。

[0487] 本文提出的研究使用本文中称为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:432的重链序列和SEQ ID NO:433的轻链序列,如下所示。

[0488] 抗CD166可活化抗体序列:

[0489] 重链氨基酸序列

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDKHYSPSLKSR
 LITKDTSKNQVVLTIITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 [0490] NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 432)

[0491] 轻链氨基酸序列

LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR
 SSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYY
 [0492] CAQNLLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO: 433)

[0493] 使用抗人IgG抗体(抗人IgG(H&L),美国Qualalex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。为裸鼠皮下植入在与Matrigel™ 1:1混合的无血清培养基中的 5×10^6 个H292细胞。给予携带 $200-500\text{mm}^2$ H292异种植物的小鼠 5mpk 的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166。治疗后一天,收集肿瘤和血浆(肝素)并在分析前储存在 -80°C 下。使用Barocycler (Pressure Biosciences)在添

加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。通过如本文所述的Wes™分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的1mg/mL的蛋白质裂解物和1:20稀释于PBS中的血浆样品。将HRP缀合的抗小鼠二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图6A和6B证明与血浆(图6A)相比,在肿瘤中优先活化(图6B)。

[0494] 实施例7. 生物样品中活化的和完整的抗EGFR可活化抗体的定量。

[0495] 该实施例描述了检测施用了抗EGFR可活化抗体3954-2001-C225v5或3954-3001-C225v5的小鼠的血浆和异种移植肿瘤样品中活化的和完整的抗EGFR可活化抗体3954-2001-C225v5和3954-3001-C225v5的能力。

[0496] 本文提出的研究使用本文称为3954-2001-C225v5和3954-3001-C225v5的抗EGFR可活化抗体。抗EGFR可活化抗体3954-2001-C225v5包含以下所示SEQ ID NO:446的C225v5重链氨基酸序列以及下述轻链,所述轻链包含含有氨基酸序列CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO:448)的掩蔽部分,含有氨基酸序列ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:406)的可裂解部分,和含有以下所示SEQ ID NO:447的C225v5轻链抗体序列。抗EGFR可活化抗体3954-3001-C225v5包含以下所示SEQ ID NO:446的重链序列以及下述轻链,所述轻链包含含有氨基酸序列CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO:448)的掩蔽部分,含有氨基酸序列AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:412)的可裂解部分,和以下所示SEQ ID NO:447的轻链序列。

[0497] C225v5重链抗体氨基酸序列:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLS
INKDNSKSKVFFKMNLSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV

[0498]

NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 446)

[0499] C225v5轻链抗体氨基酸序列:

QILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRNTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG
TDFTLSINSVESEDIADYICQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL

[0500]

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 447)

[0501] 使用抗人IgG抗体(抗人IgG(H&L),美国Quallex目录号A110UK),通过Wes™系统评估活化的和完整的抗EGFR可活化抗体3954-2001-C225v5和3954-3001-C225v5的定量。为裸鼠皮下植入在与Matrigel™ 1:1混合的无血清培养基中的5x10e6个H292细胞。给予携带200-500mm2 H292异种移植物的鼠25mg/kg的3954-2001-C225v5或3954-3001-C225v5。治疗后4天收集肿瘤和血浆(肝素),并在分析之前储存在-80℃下。使用Barocycler (Pressure Biosciences)在添加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。通过如本文所述的Wes™系统分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的0.4mg/mL的蛋白质裂解物和1:500稀释于PBS中的血浆样品。将HRP缀合的抗山羊二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图7A和7B证明与血浆(图7B)相比,在肿瘤中

优先活化(图7A)。

[0502] 实施例8. 生物样品中活化的和完整的抗CD71可活化抗体的定量。

[0503] 该实施例描述了检测活化的和完整的抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12的能力。

[0504] 本文提出的研究使用本文中称为TF02.13-2011-21.12,也称为21.12-TF02.13-2011和huCD71-TF02.13-2011的抗CD71可活化抗体,其包含SEQ ID NO:434的重链序列和SEQ ID NO:435的轻链序列,如下所示。

[0505] 抗CD71可活化抗体序列:

[0506] 重链氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRA
TLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAPFWGQGTLLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
[0507] HKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 434)

[0508] 轻链氨基酸序列

NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSS
VYYMYWFQKPKGAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYT
[0509] FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 435)

[0510] 将抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12用200nM间质蛋白酶(R&D Systems目录号3946-SE)在37°C下活化过夜并与完整的抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12在人血浆(Bioreclamation)中混合。然后通过如本文所述的Wes™系统,使用来自杂交瘤克隆物的上清液分析混合物,所述杂交瘤克隆物源自用包含抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12的轻链的CDR1和CDR3的肽免疫的小鼠,并且该上清液特异性识别抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12。将HRP缀合的抗小鼠二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图8显示了将血浆中预先活化的与完整的抗CD71可活化抗体TF02.13-2011-21.12分离的能力。

[0511] 实施例9. 活化的和完整的抗PD1可活化抗体的定量

[0512] 该实施例描述了检测活化的和完整的抗PD1可活化抗体PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P的能力。

[0513] 本文提出的研究使用本文中称为PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P,也称为A1.5-PD34-2011和1.5-PD34-2011的抗PD1可活化抗体,其包含SEQ ID NO:436的重链序列和SEQ ID NO:437的轻链序列,如下所示。

[0514] 抗CD71可活化抗体序列:

[0515] 重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVAYISNSGGNAHYADSVKGRF
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREDYGTSPFVYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
 TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV
 [0516] DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKG
 QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 436)

[0517] 轻链氨基酸序列

TSYCSIEHYPCNTHHGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASES
 VDAYGISFMNWFQKPKGKAPKLLIYAASNQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISMQPEDFATYYCQQSK

[0518] DVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
 437)

[0519] 将抗PD1可活化抗体PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P用200nM MMP14 (R&D Systems 目录号918-MP) 在37°C下活化过夜并与完整的抗PD1可活化抗体PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P混合。然后使用抗人IgG (H&L) (美国Qualex目录号A110UK), 通过本文所述的Wes™系统 (ProteinSimple) 分析混合物。将HRP缀合的抗山羊二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用, 并测量化学发光。图9显示了将完整的抗PD1可活化抗体PD34-2011-A1.5 hIgG4 S228P与相应活化(裂解)的可活化抗体分离的能力。

[0520] 实施例10. 活化的和完整的抗CD166缀合的可活化抗体的定量

[0521] 该实施例描述了检测通过SPDB接头与美登木素生物碱毒素DM4缀合的活化的和完整的抗CD166可活化抗体7614.6-3001-HuCD166的能力。

[0522] 本文提出的研究使用本文中称为7614.6-3001-HuCD166, 也称为HuCD166-7614.6-3001的抗CD166可活化抗体的DM4缀合的可活化抗体, 其包含SEQ ID NO: 432的重链序列和SEQ ID NO: 433的轻链序列, 如下所示。

[0523] 抗CD166可活化抗体序列:

[0524] 重链氨基酸序列

QITLKESGPTLVKPTQTTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDKHYSPSLKSR
 LITKDTSKNQVVLTIITNVPVDTATYYCVQIDYGNDAFTYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 [0525] NVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQGNVFCVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 432)

[0526] 轻链氨基酸序列

LCHPAVLSAWESCSGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGSDIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCR
 SSKSLLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYY

[0527] CAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO: 433)

[0528] 将抗CD166缀合的可活化抗体用80ug/ml间质蛋白酶(R&D Systems目录号3946-SE)或80ug/ml的MMP14(R&D Systems目录号918-MP)在37°C下活化2小时并与完整的缀合的可活化抗体混合。然后使用抗人IgG(H&L)(美国Quallex目录号A110UK),通过如上所述的Wes™系统分析混合物。将HRP缀合的抗山羊二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图10A和10B显示了将间质蛋白酶活化的(图10A)或MMP14活化的(图10B)的缀合的可活化抗体与完整的缀合的可活化抗体分离的能力。

[0529] 实施例11. 三级检测方案

[0530] 可以使用附加抗体检测步骤来放大与(完整的)可活化抗体和/或活化的(裂解的)可活化抗体相关的信号。在该方案中,使用未与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗来检测一抗,然后使用与HRP缀合的三级检测抗体放大信号。在该实施例中,通过用抗id抗体克隆物22B8(未与HRP缀合),接着用生物素化的抗大鼠IgG FC γ (Jackson Immunology 112-035-008)探测,然后用链霉亲和素HRP(043-459-2)(即,三级检测方案的实例)或克隆物22B8,接着用HRP缀合的抗大鼠IgG FC γ (Jackson Immunology 112-065-008)(即,两步方案的实例)探测来检测可活化的抗CD166即7614.6-3001-HuCD166。使用鲁米诺和过氧化物试剂,并测量化学发光。为裸鼠皮下植入在与Matrigel™ 1:1混合的无血清培养基中的H292细胞。用5mg/kg的7614.6-3001-HuCD166处理携带H292异种移植物的老鼠。给药后第4天收集组织。使用Barocycler(Pressure Biosciences)在添加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。如本文所述,在Wes™毛细管电泳免疫测定系统上对1.5mg/mL的蛋白质进行分析。

[0531] 图11A描绘了使用两步检测方案检测到的与生物样品中具有不同分子量的分子物质相关的化学发光信号的幅度。该图显示了针对活化的可活化抗体(7614.6-3001-HuCD166的裂解产物)和针对完整/活化的可活化抗体(完整的7614.6-3001-HuCD166)检测到的峰。图11B描绘了使用三级检测方案检测到的与生物样品中具有不同分子量的分子物质相关的化学发光信号的幅度。使用三级检测方案对于7614.6-3001-HuCD166(完整可活化抗体)及其裂解产物(活化的可活化抗体)产生了强得多的信号。结果说明与使用两步方案获得的信号相比,使用三级方案获得的信号放大,从而利于检测每种物质。

[0532] 实施例12. 生物样品中活化的和完整的抗Jagged可活化抗体的定量。

[0533] 该实施例描述了检测施用了抗Jagged可活化抗体5342-3001-4D11的老鼠的肿瘤样品中活化的和完整的抗Jagged可活化抗体5342-3001-4D11的能力。

[0534] 本文提出的研究使用本文称为5342-3001-4D11的抗Jagged可活化抗体。抗Jagged可活化抗体5342-3001-4D11包含SEQ ID NO:950的重链序列和SEQ ID NO:951的轻链序列。两组序列如下所示:

[0535] 4D11-重链:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYIAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLLVTVSSASTKG
PSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLS
LSPGK*

(SEQ ID NO:950)

[0537] 4D11-5342-8504-轻链

QQGSGQCNIWLVGGDCRGWQGSSGGSSGGGAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGGSDIQMTQSP
SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD

[0538] FTLTISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:951)

[0539] 根据本发明的方法,使用Wes™系统(简单蛋白质和抗人IgG抗体(抗人IgG(H&L),美国Qualex目录号A110UK)评估活化的和完整的抗Jagged可活化抗体5342-3001-4D11的定量。为裸鼠皮下植入在与Matrigel™ 1:1混合的无血清培养基中的BxPC3细胞。给予携带200-500mm² BxPC3异种移植物的鼠10mg/kg的5342-3001-4D11。治疗后4天收集肿瘤组织,并在分析之前储存在-80℃下。使用Barocycler(Pressure Biosciences)在添加了Thermo Scientific Halt™蛋白酶抑制剂一次性混合试剂盒(目录号78430)的Thermo Scientific Pierce™ IP裂解缓冲液(目录号87788)中制备肿瘤匀浆。在Wes™系统上分析在具有HALT蛋白酶抑制剂/EDTA的IP裂解缓冲液中的1.5mg/mL的蛋白质裂解物和1:100稀释于PBS中的血浆样品。将HRP缀合的抗山羊二抗连同鲁米诺和过氧化物一起使用,并测量化学发光。图12描绘了针对每种物质检测到的化学发光信号,从而证明在肿瘤组织中检测到5342-3001-4D11抗Jagged可活化抗体的活化。

[0540] 实施例13. 使用标准曲线定量生物样品中活化的和完整的抗PDL1可活化抗体

[0541] 该实施例说明了通过生成和使用标准曲线定量生物样品中完整的可活化抗体和已活化的可活化抗体的方案。

[0542] 制备认为含有可活化抗体和/或已活化的可活化抗体的肿瘤裂解物或血浆样品。在如本文所述的Wes™系统(ProteinSimple)上对样品进行评价,并将结果与纯化的重组完整可活化抗体PL07-2001-C5H9v2和相应的活化抗体的标准曲线进行比较。使用标准曲线测定可活化抗体和已活化的可活化抗体的浓度。

[0543] 将血浆按1:10至1:100的范围稀释,并将肿瘤裂解物按1:1至1:10的范围稀释。保留毛细管用于标准曲线材料,并与载有生物样品的样品平行进行电泳和免疫印迹。使用(1)血浆样品的正常K2-EDTA混合血浆(见下文)或(2)Pierce IP裂解缓冲液(见下文)制备标准曲线的样品。用于标准曲线的一组毛细管含有用于测试样品的相同稀释度的完整的可活化

抗体和已活化的可活化抗体。正常供体K2-EDTA血浆库 (Bioreclamation) 用于血浆样品的标准曲线制备。

[0544] 收集来自7名人供体的K2-EDTA血浆,并以等体积组合得到正常供体库。来自一名受试者的样品由于血浆呈乳白色外观而未包括在库中。制备肿瘤裂解物。

[0545] 材料:10.7mg/ml完整的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2,缓冲液:8%蔗糖、30mM NaCl、0.02%吐温80、25mM琥珀酸盐pH 6;11.35mg/ml相应活化的可活化抗体,PBS缓冲液,pH 7.2。

[0546] 在全裙边PCR板 (Axygen PCR96FSC;约100ul的孔)或450ul V型底板 (Axygen P-96-450V-C-S;约500ul的孔)中,根据体积从17,500ng/ml开始下降到8ng/ml (以3倍的增量)制备稀释系列,每条曲线有一份零/空白样品。将稀释液在装填到Wes™系统毛细管盒 (ProteinSimple)中之前储存在冰上。抗id抗体17G1 (1.3mg/ml) (参见实施例2)以1:1200的稀释度用作一抗。抗小鼠二抗-HRP缀合物 (纯的,ProteinSimple),10ul/孔,如同供应商的板布局 (部分#042-205)中规定的。

[0547] 样品一经制备并在Wes™盒 (ProteinSimple)中装填了测定所需的试剂,就将样品 (生物样品 (4个重复)和标准曲线样品 (2个重复,包括2个零/空白)以及来自Wes™试剂盒 (ProteinSimple)的生物素化分子量标准品试剂)装填到Wes™盒 (ProteinSimple)中。

[0548] Wes™系统的操作根据制造商的说明进行。结果显示,样品在Wes™平台上分离为完整 (约38kD)或“活化” (约35kD)峰。然后相对于为完整的可活化抗体PL07-2001-C5H9v2和相应的活化抗体制备的标准曲线对完整和活性峰进行定量,并以ng/ml为单位测定各自的浓度。

[0549] 其它实施方案

[0550] 虽然已结合其详细说明来描述了本发明,但是前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围来限定。其它方面、优势和修改在以下权利要求的范围内。

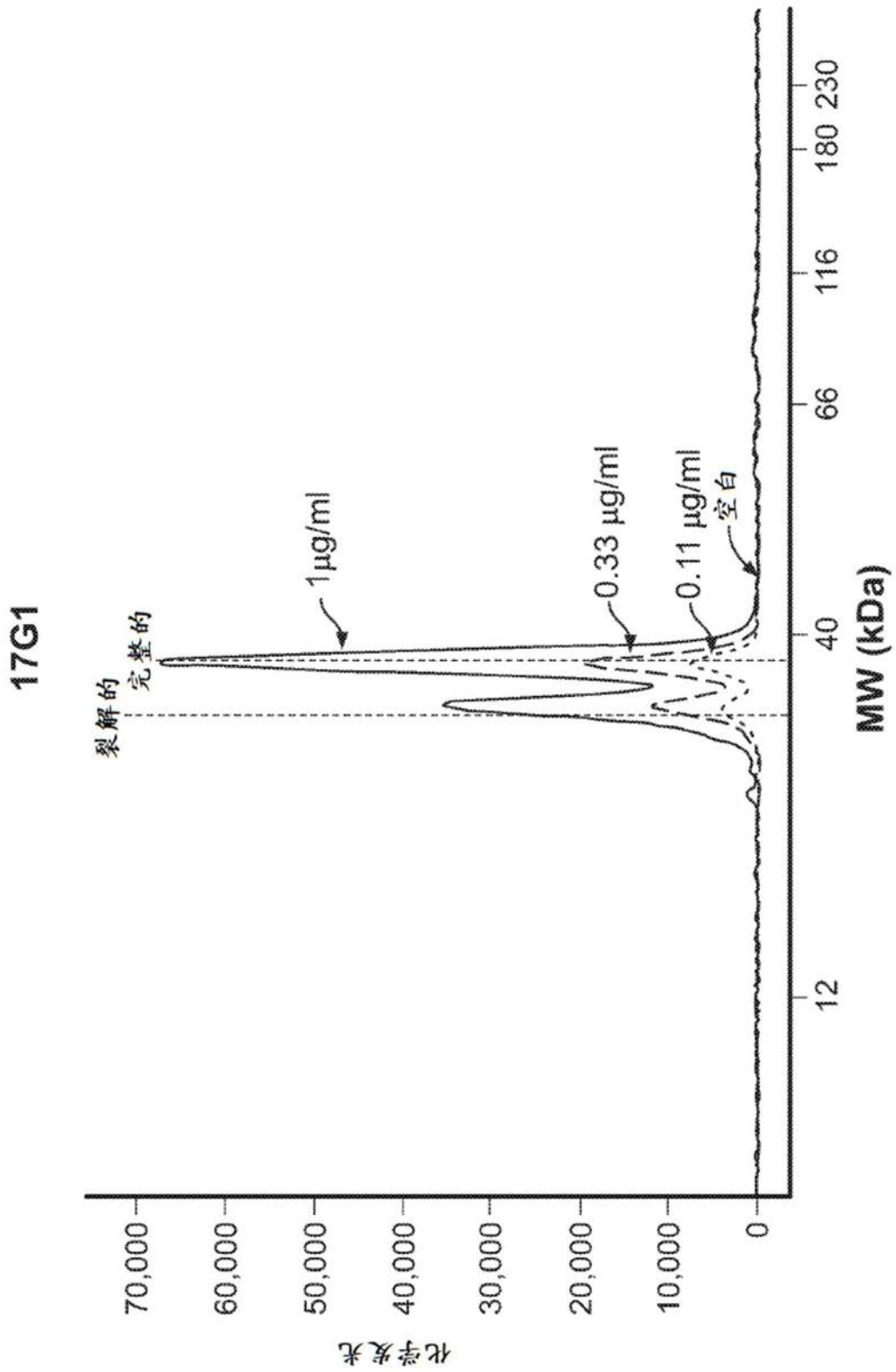


图1A

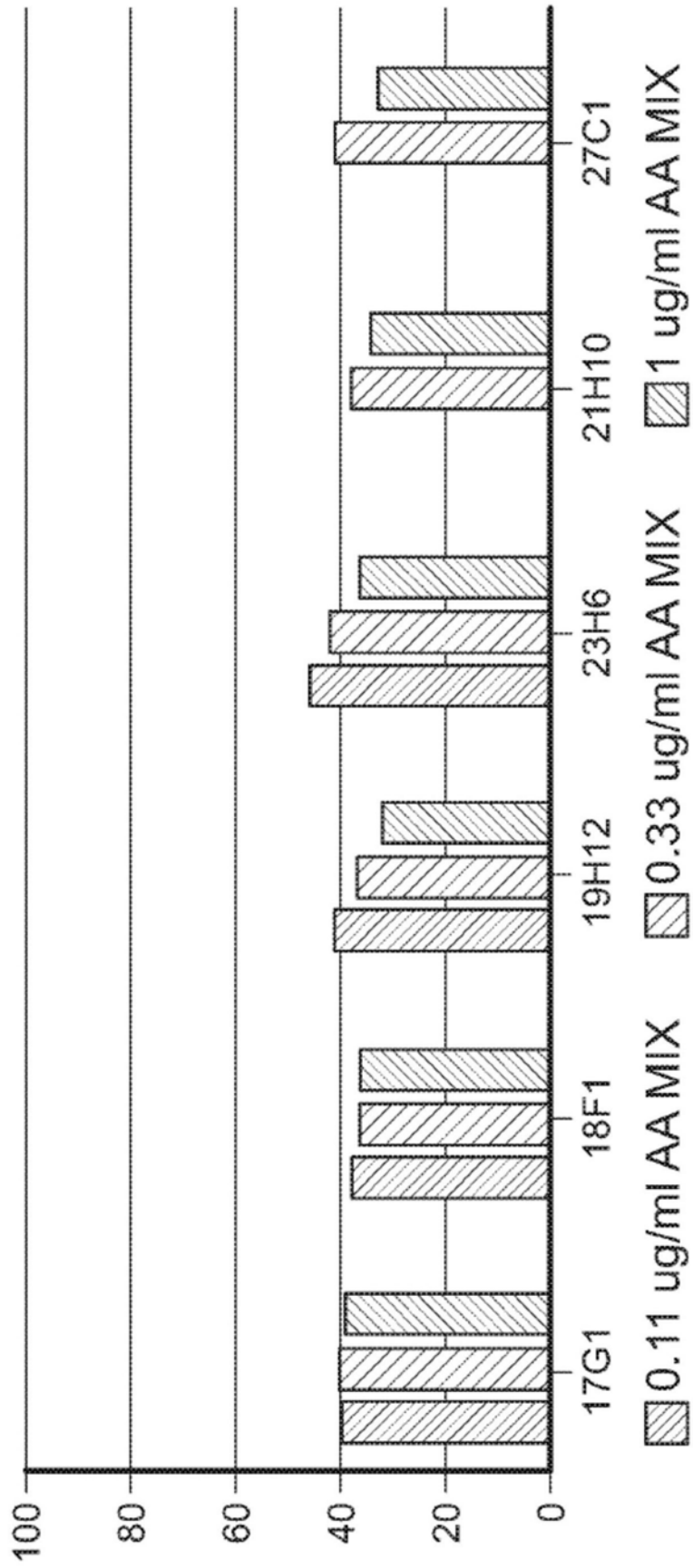


图1B

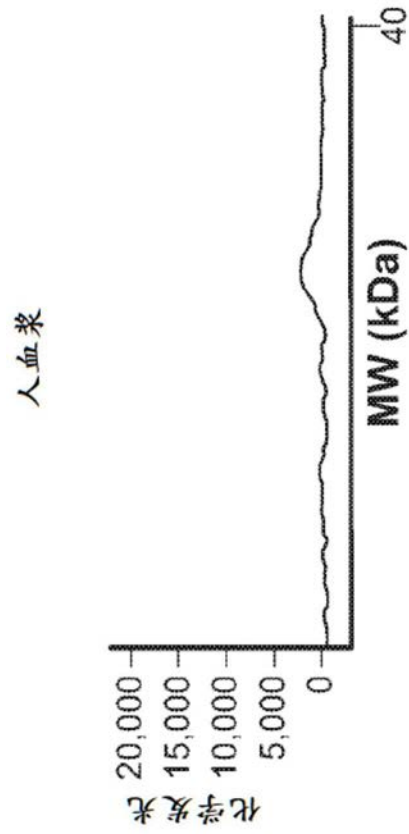


图2A

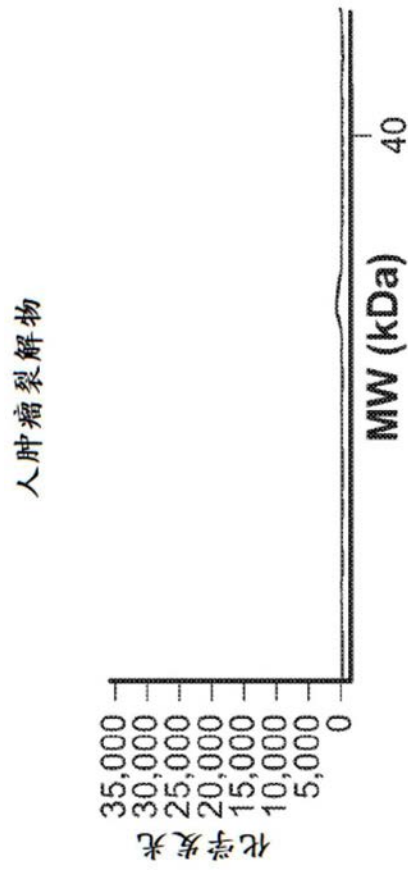


图2B

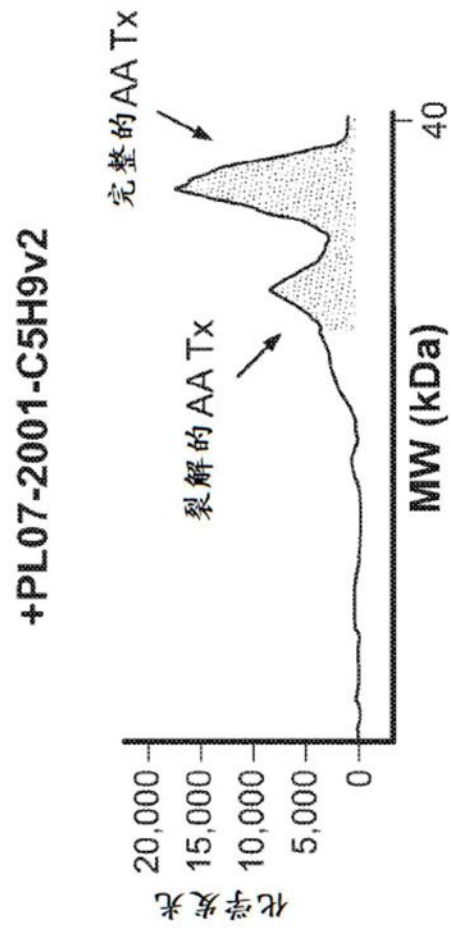


图2C

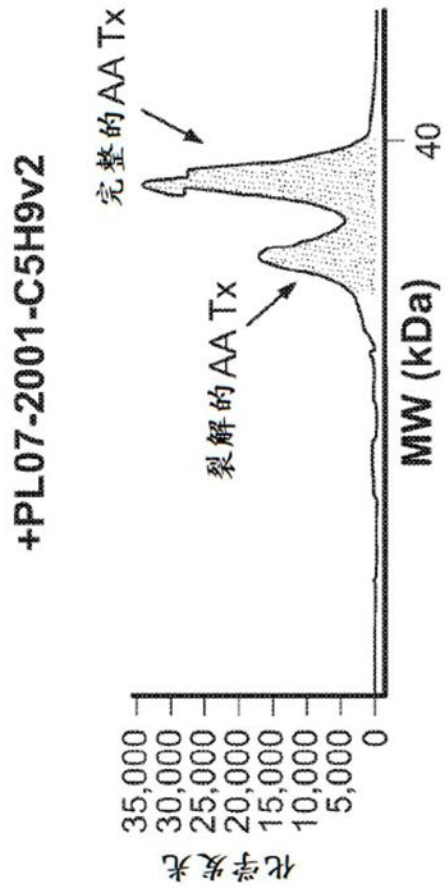


图2D

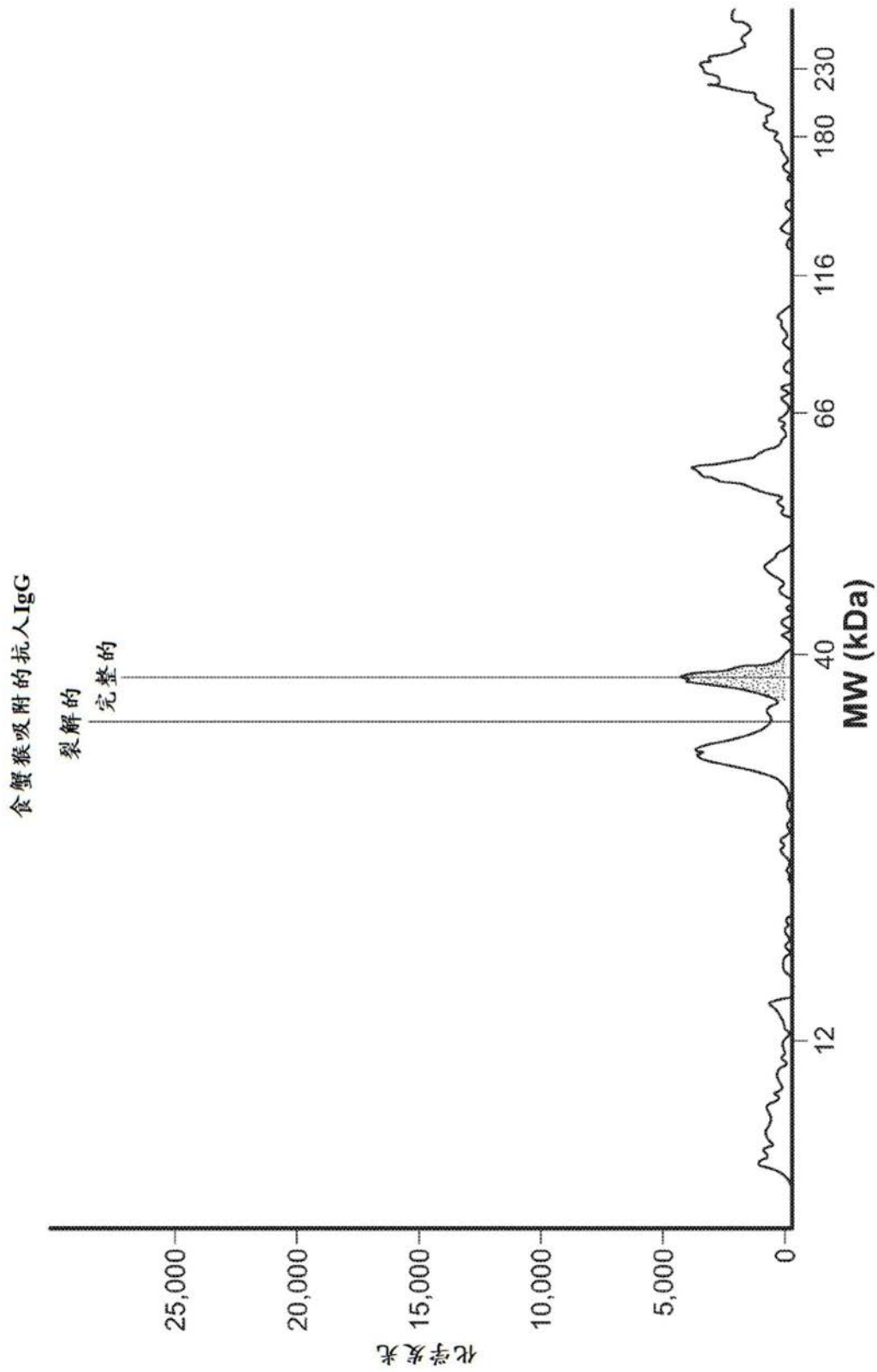


图3A

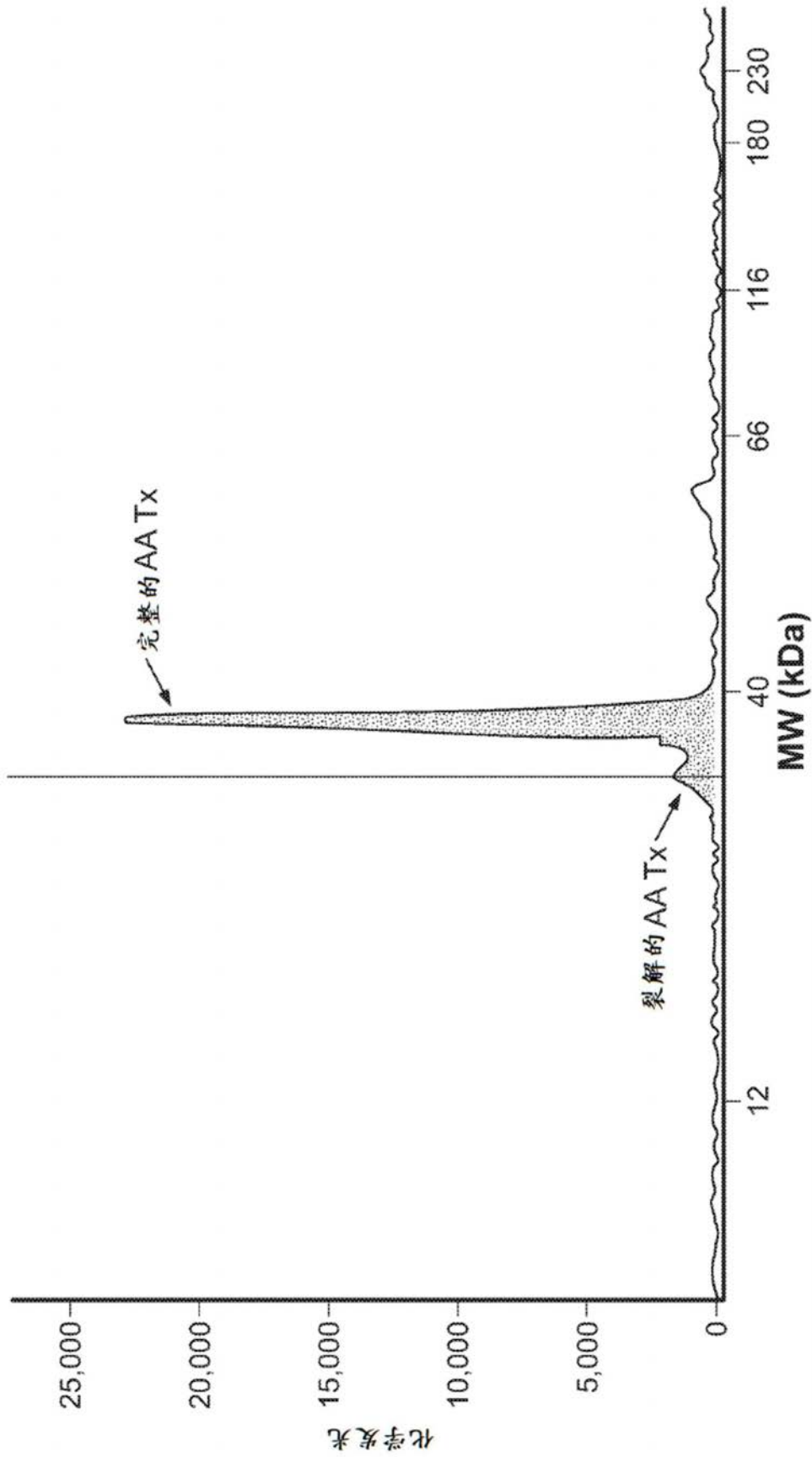


图3B

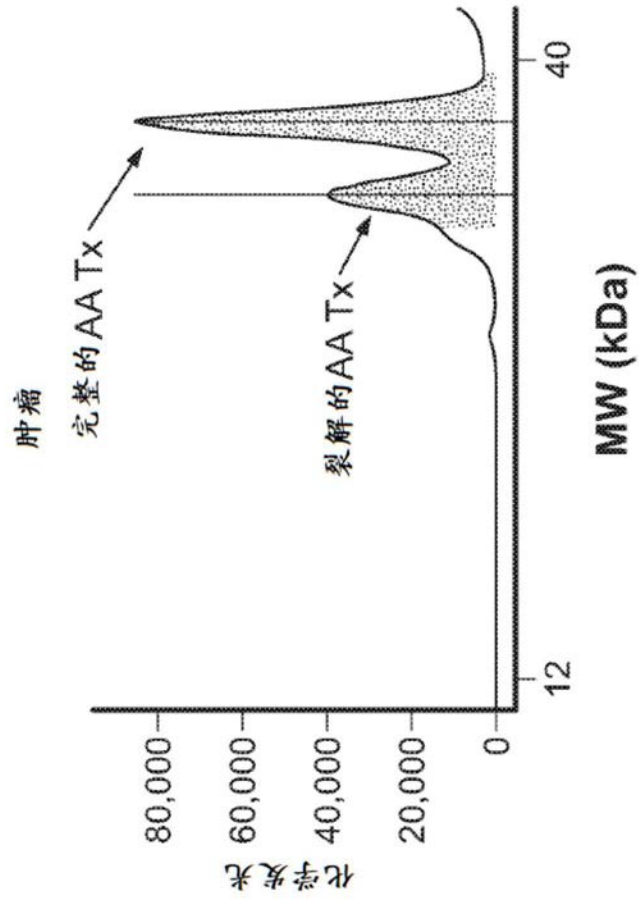


图4A

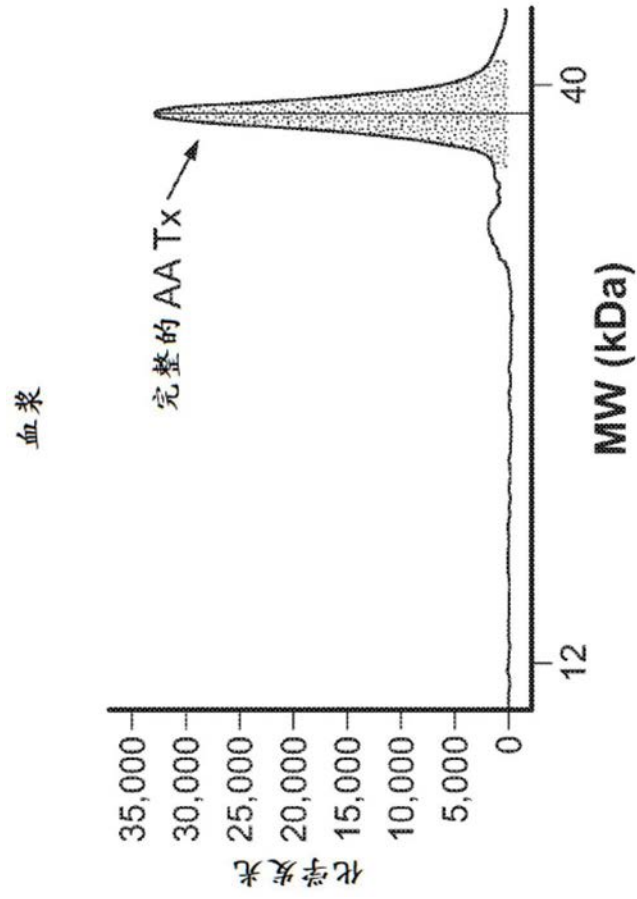


图4B

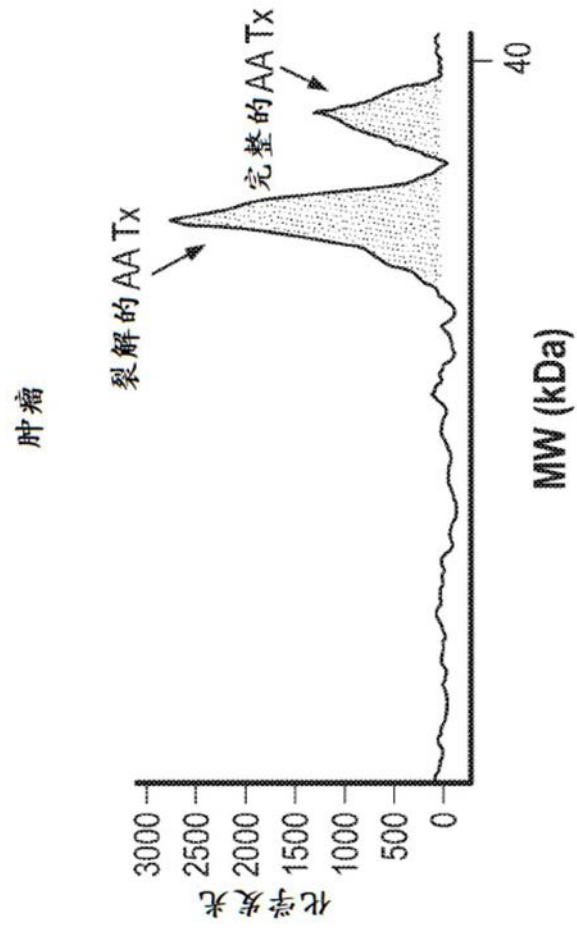


图5A

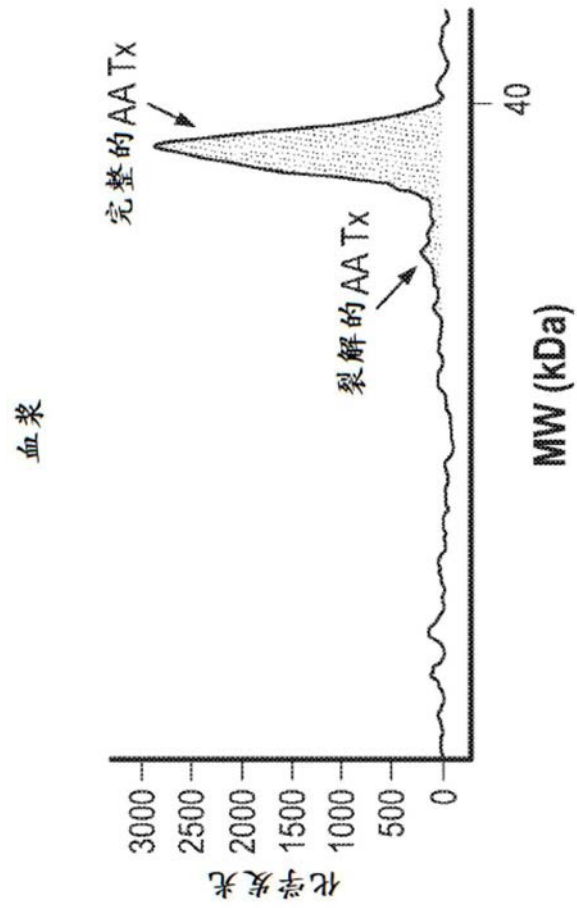


图5B

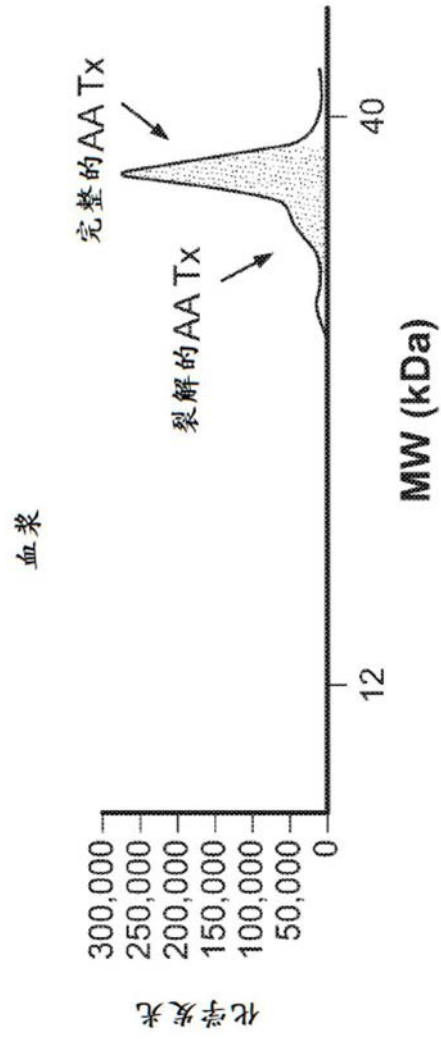


图6A

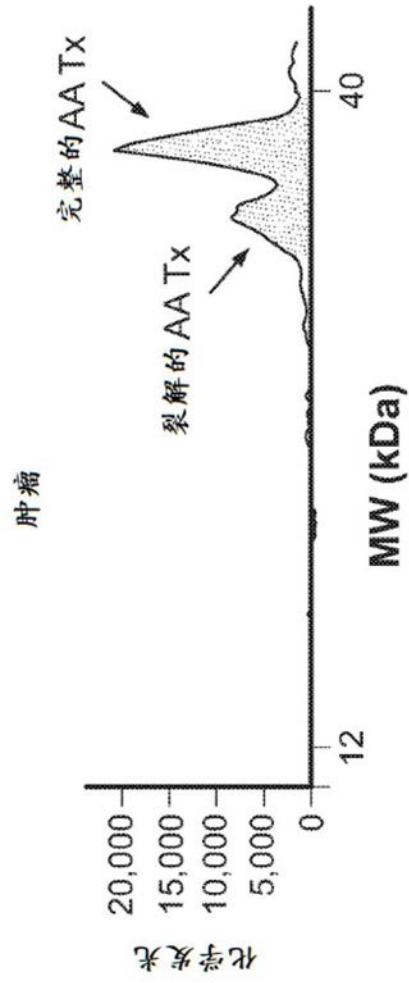


图6B

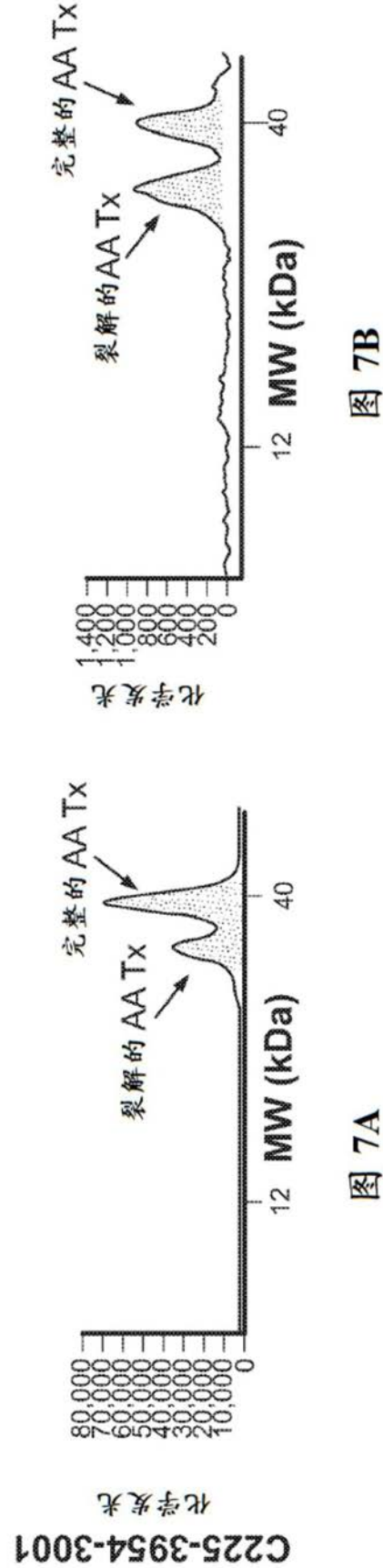
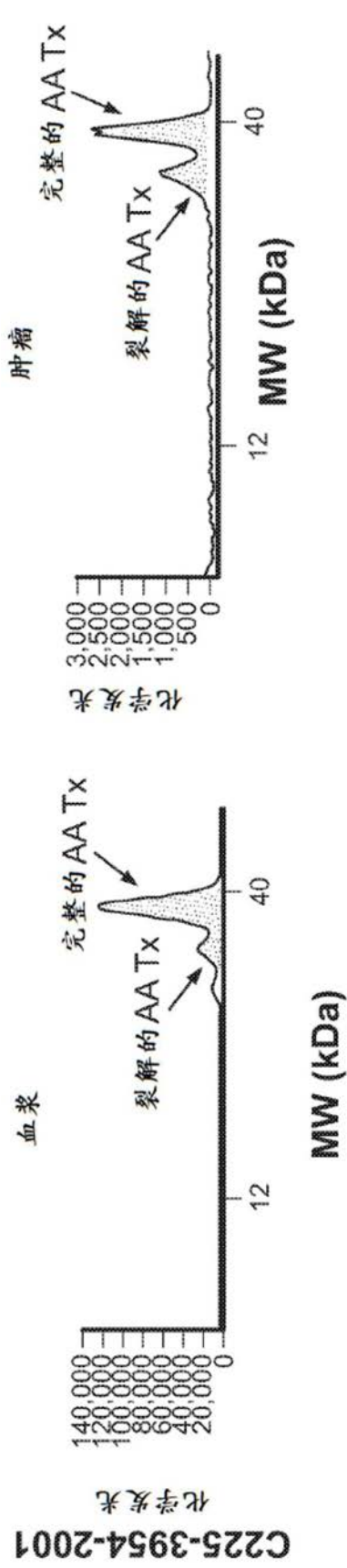


图 7A

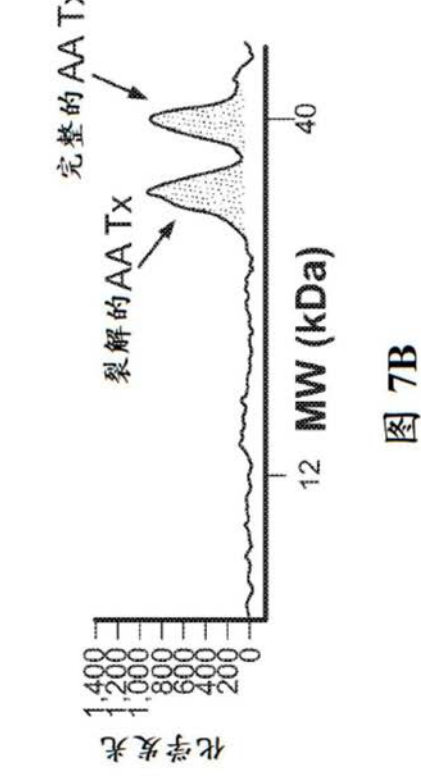
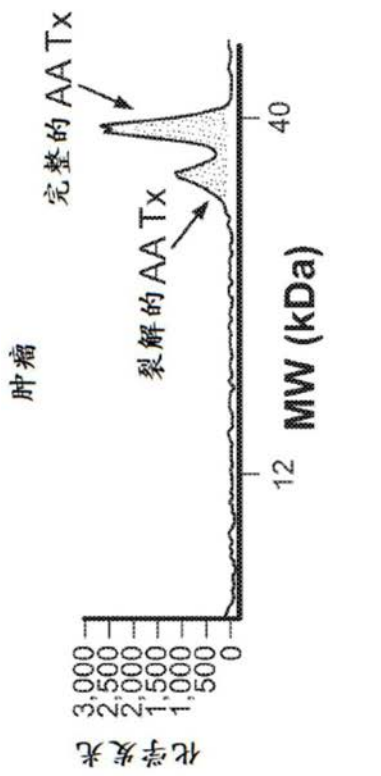


图 7B

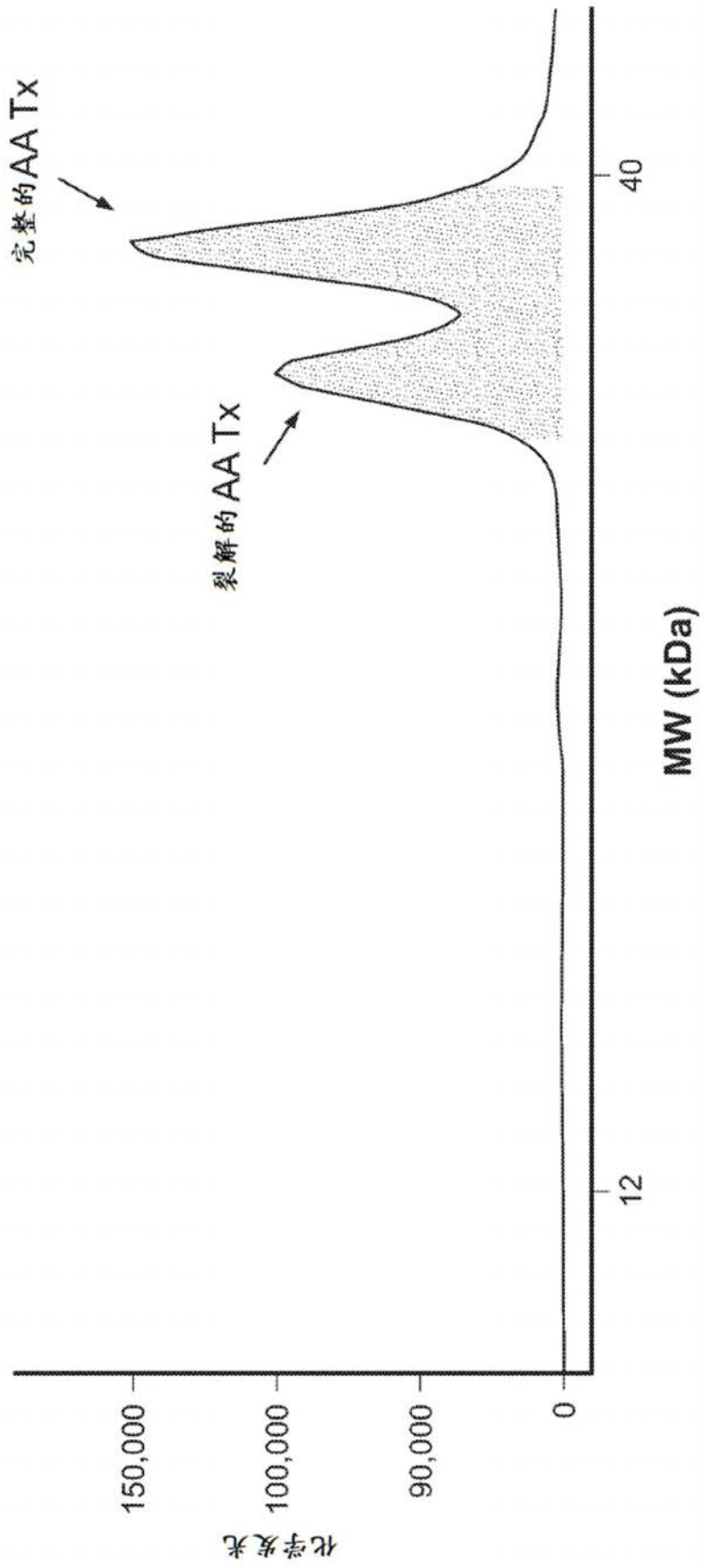


图8

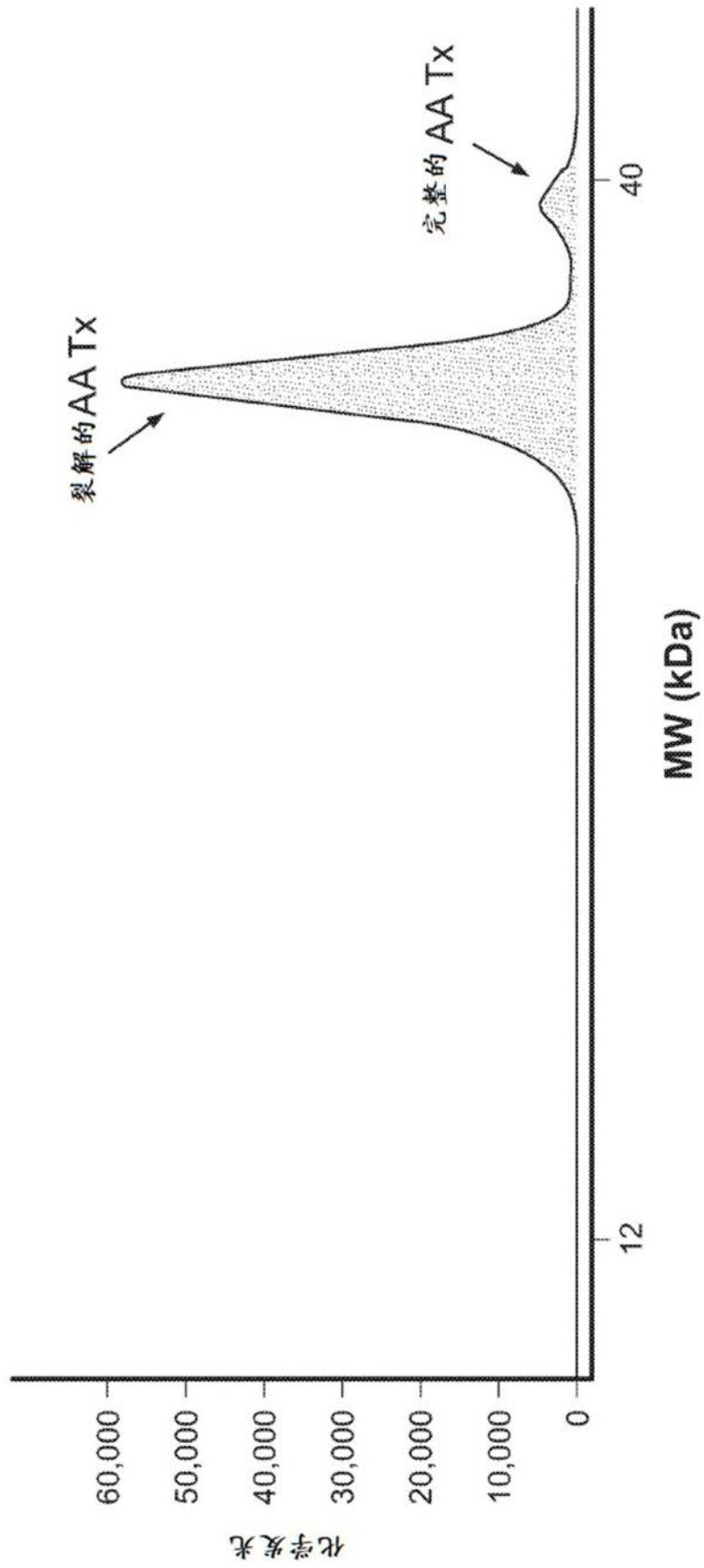


图9

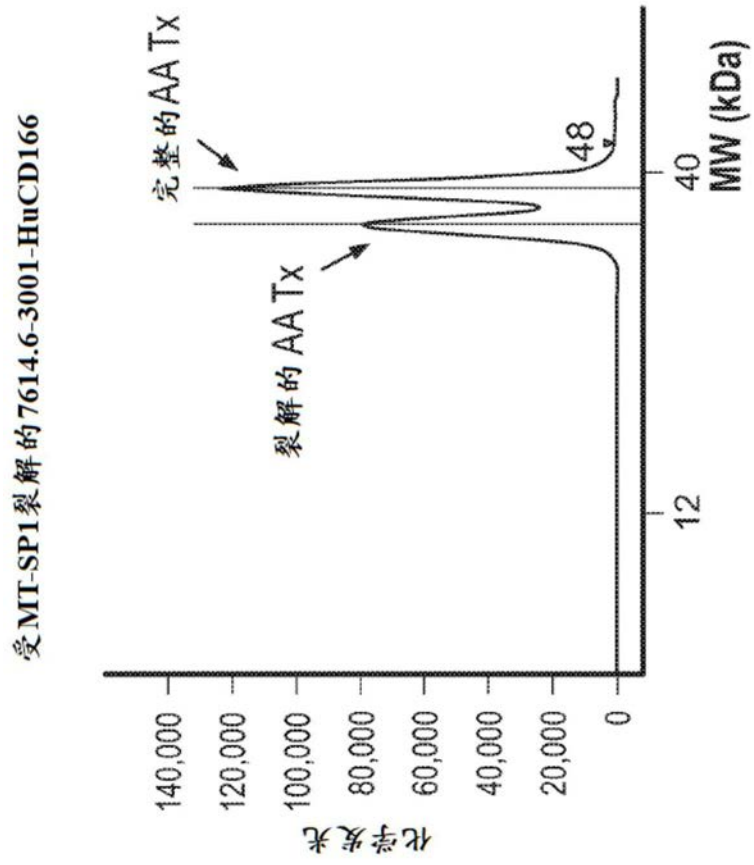


图10A

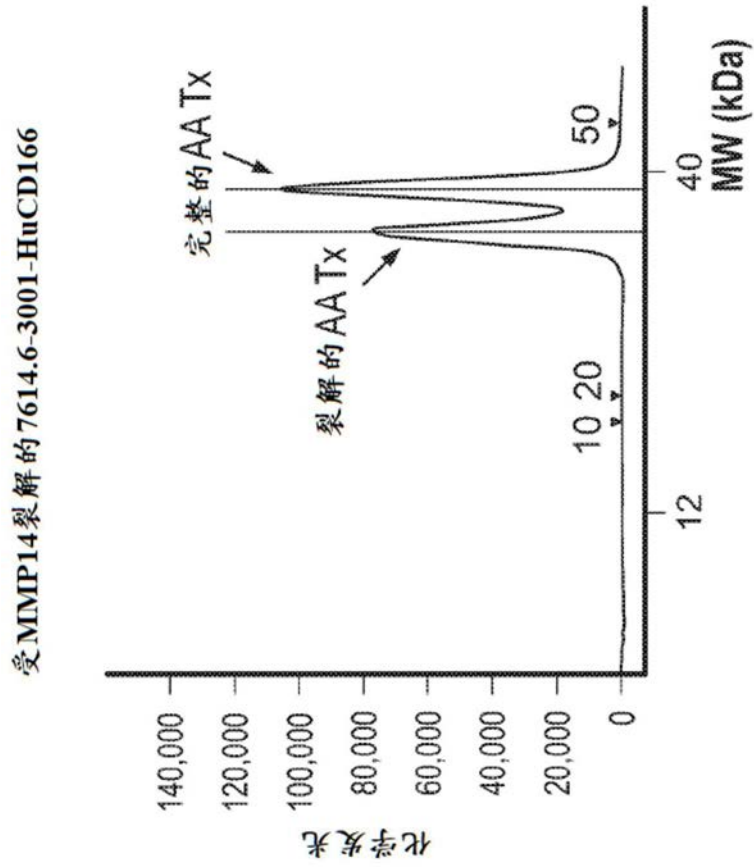


图10B

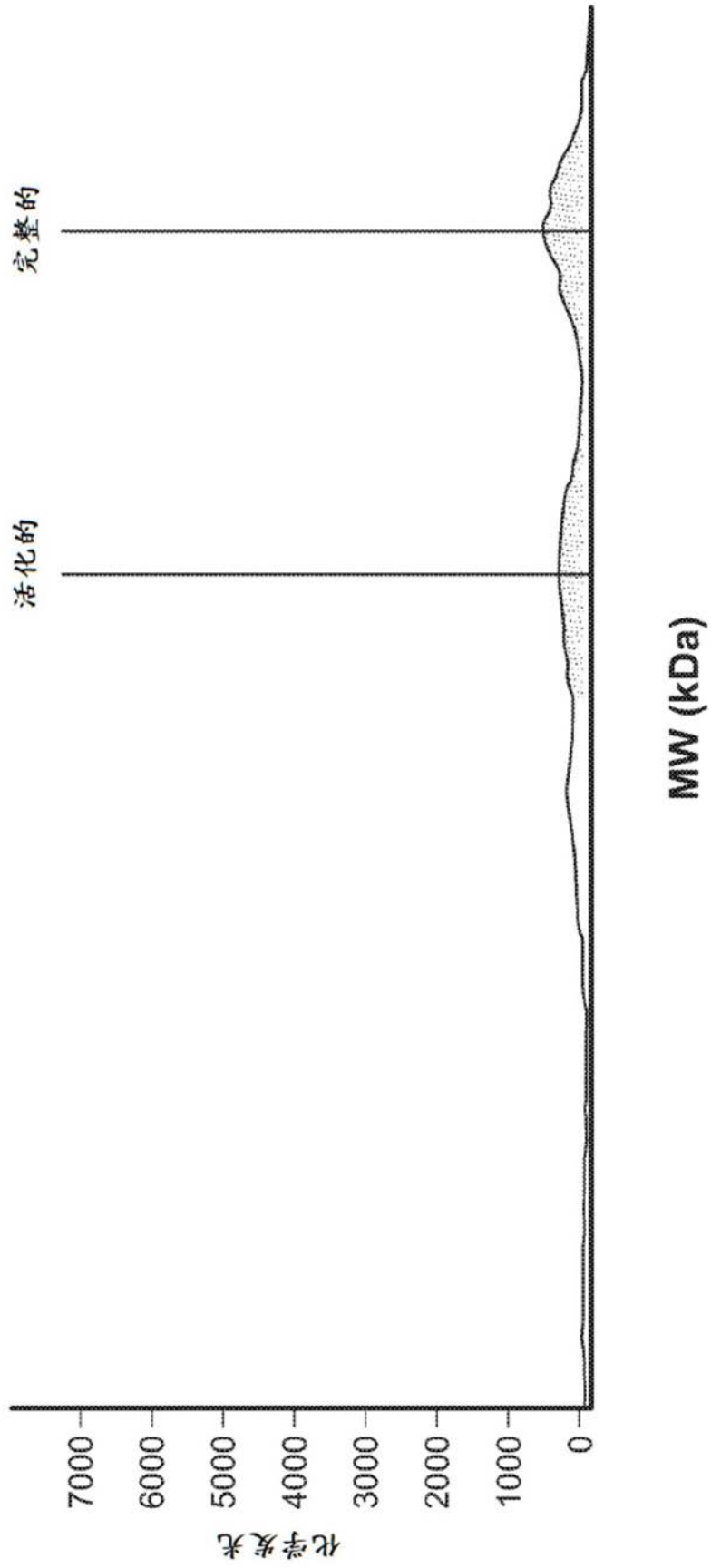


图11A

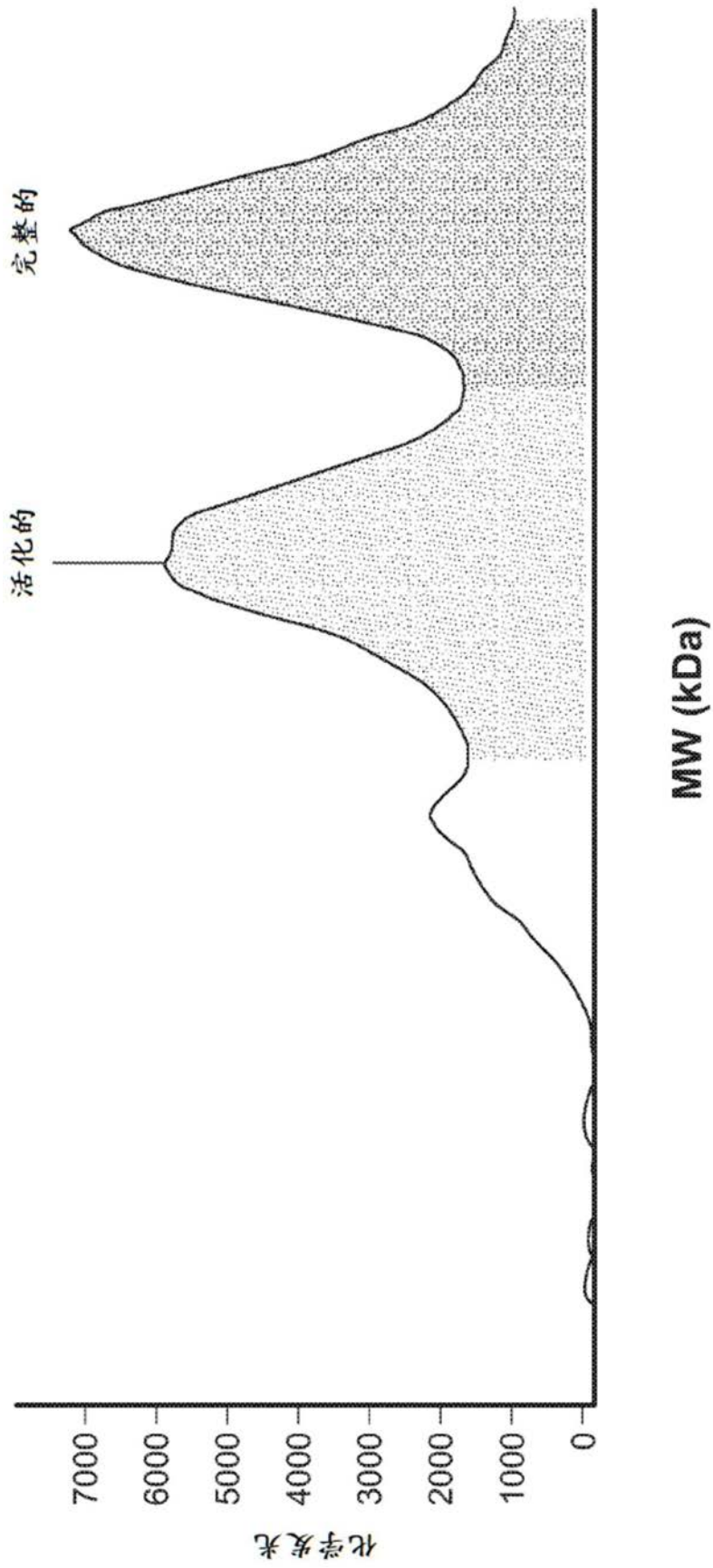


图11B

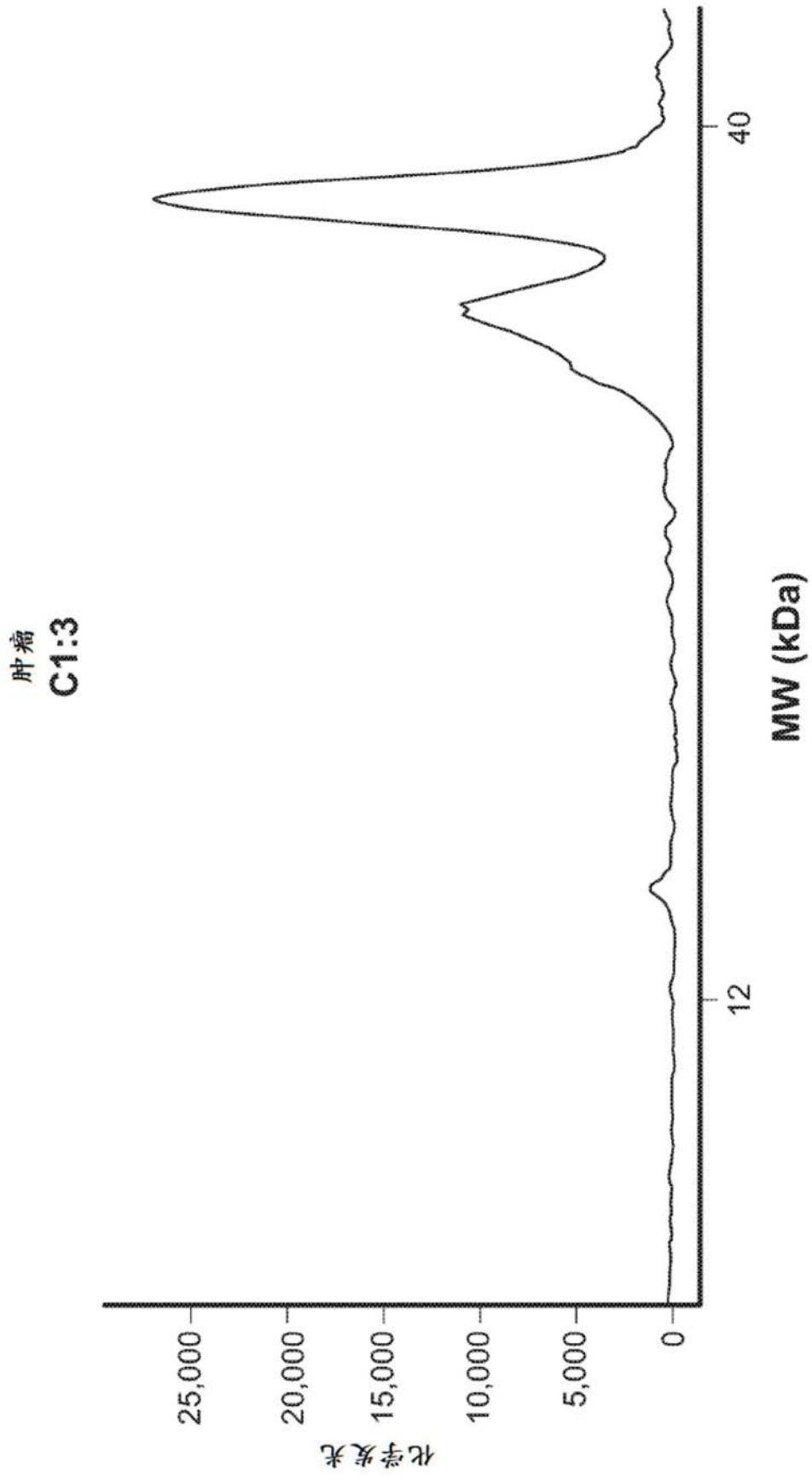


图12