

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991353 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.12.08

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) ДВУХВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА, МАСКИРОВАННЫЕ СПИРАЛИЗОВАННЫМИ СПИРАЛЯМИ

(31) 62/432,472

(32) 2016.12.09

(33) US

(86) PCT/US2017/065471

(87) WO 2018/107125 2018.06.14

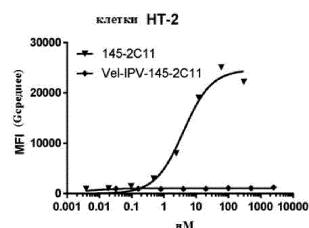
(71) Заявитель:
СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Транг Вивиан, Левенгуд Мэттью Р.,
Сентер Питер (US)

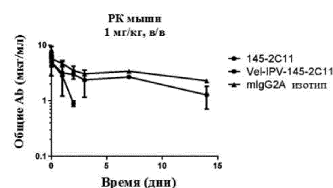
(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к двухвалентным антителам, включающим в себя две пары легкой и тяжелой цепей. N-концы одной или обеих пар легкой и тяжелой цепей соединены посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания по меньшей мере одной пары легкой и тяжелой цепей с мишенью.

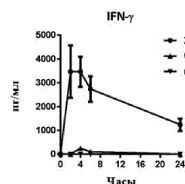
А. Сравнение немаскированного и маскированного антитела к CD3 мыши 145-2C11



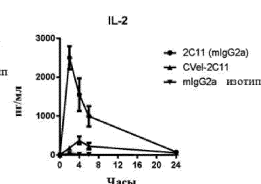
В.



С.



Д.



A1

201991353

201991353

A1

ДВУХВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА, МАСКИРОВАННЫЕ СПИРАЛИЗОВАННЫМИ СПИРАЛЯМИ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество в соответствии с заявкой на выдачу патента США № US 62/432472, поданной 9 декабря 2016 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка включает в себя перечень последовательностей в электронном виде в файле с названием 506990SEQLIST.TXT, созданном 8 декабря 2017 г. и содержащем 50 KB, который включен посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Современные терапевтические средства на основе антител могут характеризоваться селективностью, меньшей, чем оптимальная, в отношении предусмотренной мишени. Несмотря на то, что моноклональные антитела, как правило, являются специфическими в отношении связывания с их предусмотренными мишенями, большинство молекул-мишеней не являются специфическими в отношении пораженного заболеванием участка и могут присутствовать в клетках или тканях, отличных от пораженного заболеванием участка.

[0004] Было описано несколько подходов для преодоления этих ненаправленных эффектов посредством конструирования антител, чтобы получить расщепляемый линкер, присоединенный к ингибирующему или маскирующему домену, который ингибирует связывание антитела (см., например, международные патентные публикации WO2003/068934, WO2004/009638, WO 2009/025846, WO2101/081173 и WO2014103973). Линкер можно разработать так, чтобы он расщеплялся ферментами, которые являются специфическими в отношении определенных тканей или патологий, таким образом, обеспечивая то, что антитело активируется преимущественно в требуемых местах. Маскирующие фрагменты могут действовать путем связывания непосредственно с сайтом связывания антитела или могут действовать опосредованно за счет стерического препятствия. Были предложены различные

маскирующие фрагменты, линкеры, сайты протеаз и форматы сборки. Степень маскирования может варьироваться в зависимости от формата, как и совместимость маскирующих фрагментов может варьироваться в зависимости от экспрессии, очистки, конъюгации или фармакокинетики антител.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к двухвалентному антителу, содержащему две пары легкой и тяжелой цепей, в котором N-концы легкой и тяжелой цепей по меньшей мере одной из пар соединены посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепей с мишенью. Необязательно легкая и тяжелая цепи обеих пар соединены посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепей с мишенью.

[0006] Необязательно пептиды ассоциируются без образования дисульфидного мостика. Необязательно двухвалентное антитело является конъюгированным с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством. Необязательно цитотоксическое или цитостатическое лекарственное средство является конъюгированным посредством остатка цистеина двухвалентного антитела. Необязательно две пары легкой и тяжелой цепей являются одинаковыми. Необязательно две пары легкой и тяжелой цепей являются различными. Необязательно легкие цепи включают в себя переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, и тяжелые цепи включают в себя переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи. Необязательно область тяжелой цепи включает в себя следующие области: CH1, шарнир, CH2 и CH3. Необязательно две легкие цепи соединены с первым гетерологичным пептидом, и две тяжелые цепи - со вторым гетерологичным пептидом. Необязательно сайт расщепления протеазой представляет собой любой из MMP#1 или MMP#2. Необязательно мишень представляет собой любую из CD19, CD30, LIV-1, CD70 или CD74. Необязательно связывание снижается по меньшей мере в 100 раз. Необязательно связывание снижается в 200-5000, 200-4000 раз или 200-1500 раз. Необязательно цитотоксичность конъюгата снижается по меньшей мере в 100

раз. Необязательно цитотоксичность конъюгата снижается в 200-5000 раз. Необязательно образующие спирализованную спираль пептиды соединены с N-концами тяжелой и легкой цепей в одинаковой ориентации. Необязательно образующие спирализованную спираль пептиды соединены с N-концами тяжелой и легкой цепей в противоположных ориентациях. Необязательно несколько копий образующего спирализованную спираль пептида соединены в тандем с N-концами тяжелой и легкой цепей.

[0007] Необязательно пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 44, образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид согласно последовательности SEQ ID NO: 47 образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

[0008] Согласно другому варианту осуществления пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 46, образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью, и пептид согласно последовательности SEQ ID NO: 47 образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью.

[0009] Согласно другому варианту осуществления пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью, и пептид согласно последовательности QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 31) образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью.

[0010] Согласно другому варианту осуществления пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью и пептид согласно последовательности QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG

(SEQ ID NO: 31) образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

[0011] Согласно другому варианту осуществления пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 64), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью, и пептид согласно последовательности GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 65) образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью.

[0012] Согласно другому варианту осуществления пептид, содержащий или состоящий из последовательности согласно GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 65), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью и пептид согласно последовательности GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLVSLRSG (SEQ ID NO: 64) образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

Необязательно длина линкеров составляет 1-20, 2-15, 3-12, 4-10, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Предпочтительный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью, содержащей или состоящей из GSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 48). Некоторые линкеры содержат сайт протеазы MMP2.

Краткое описание графических материалов

[0013] На фиг. 1A показаны примеры образующих спирализованные спирали пептидов, линкеров и сайтов протеазы. В M11 CC и M15 CC, SGGGGG (SEQ ID NO: 22) и GGGGS (SEQ ID NO: 24) представляют собой линкеры. PLGVR (SEQ ID NO: 23) представляет собой сайт расщепления протеазой, а остальные последовательности представляют собой образующие спирализованную спираль пептиды. SEQ ID NO: 20 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M11, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 25 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M11, прикрепленный к линкеру,

включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 21 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M11 (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 26 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M11 (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 27 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M15 CC, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 29 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M15, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 28 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M15 (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 30 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид M15 (показан как соединенный с тяжелой цепью). В VelCC GS и SG представляют собой линкеры, и IPVSLR (SEQ ID NO: 33) представляет собой сайт расщепления протеазой, и остальная последовательность представляет собой образующие спирализованную спираль пептиды. SEQ ID NO: 31 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид Vel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 34 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид Vel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 32 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид Vel (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 35 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид Vel (показан как соединенный с тяжелой цепью). Образующие спирализованную спираль пептиды VEL, показанные на фиг. 1A, могут быть дополнены дополнительным N-концевым Q.

[0014] На фиг. 1B показаны примеры образующих спирализованные спирали пептидов с N-концевым цистеином, линкеров и сайтов протеаз. В CM11 CC и CM15 CC, SGGGGG (SEQ ID NO: 22) и GGGGS (SEQ ID NO: 24) представляют собой линкеры. PLGVR (SEQ ID NO: 23) представляет собой сайт расщепления протеазой, а остальные последовательности представляют собой образующие спирализованную спираль пептиды. SEQ ID NO: 36 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM11, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 38 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM11, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с

тяжелой цепью). SEQ ID NO: 37 представляет собой CM11 образующий спирализованную спираль пептид (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 39 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM11 (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 40 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM15, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 42 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM15, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 41 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM15 (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 43 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CM15 (показан как соединенный с тяжелой цепью). В CVel GS и SG представляют собой линкеры, и IPVSLR (SEQ ID NO: 33) представляет собой сайт расщепления протеазой, а остальные последовательности представляют собой образующие спирализованную спираль пептиды. SEQ ID NO: 44 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 46 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 45 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 47 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel (показан как соединенный с тяжелой цепью).

[0015] На фиг. 2 показаны концентрации антител в зависимости от времени для различных маскированных спирализованной спиралью антител, инкубированных в плазме, по сравнению с контролем hBU12ес.

[0016] На фиг. 3 показан образец ткани опухоли, который привели в контакт с маскированным антителом.

[0017] На фиг. 4 показано связывание маскированных антител к антигену 1 с положительными в отношении антигена 1 клетками с использованием анализов насыщающего связывания на основе FACS.

[0018] На фиг. 5 показан пример анализа PLRP-MS, используемого для определения расщепления пептидной последовательности. В CVel GS и SG представляют собой линкеры, и IPVSLR (SEQ ID NO: 33) представляет собой сайт расщепления протеазой, а остальная

последовательность представляет собой образующие спирализованную спираль пептиды. SEQ ID NO: 44 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 46 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel, прикрепленный к линкеру, включая в себя сайт протеазы (показан как соединенный с тяжелой цепью). SEQ ID NO: 45 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel (показан как соединенный с легкой цепью), и SEQ ID NO: 47 представляет собой образующий спирализованную спираль пептид CVel (показан как соединенный с тяжелой цепью).

[0019] На фиг. 6А и 6В показаны данные *in vivo* сравнения hAg-2 с линкером CVel или Vel в различных тканях. На фиг. 6А показаны данные *in vivo* сравнения hAg-2 с линкером CVel или Vel в опухоли, легком, печени и плазме в день 3 и день 4. На фиг. 6В показаны данные *in vivo* сравнения hAg-2 с линкером Vel-IPV опухоли, легком, печени и плазме в дни 1, 2 и 4.

[0020] На фиг. 7А-С показаны эффекты маскирования антител к Ag2 с использованием либо спирализованной спирали CVel, либо спирализованной спирали Vel в трех различных клеточных линиях: HCT116 (фиг. 7А), SW780 (фиг. 7В) и HT1080 (фиг. 7С).

[0021] На фиг. 8А-С показано сравнение немаскированных и Vel-маскированных конъюгатов антитела к CD19 с лекарственным средством с различными последовательностями расщепления. На фиг. 8А показано связывание немаскированных и Vel-маскированных ADC к CD19 с CD19-положительными клетками Ramos; на фиг. 8В показана антипролиферативная активность ADC к CD19 на CD19-положительные клетки Ramos; на фиг. 8С показана противоопухолевая активность немаскированных и Vel-маскированных конъюгатов антитела к CD19 с лекарственным средством в модели с использованием ксенотрансплантата клеток Ramos у мышей NSG.

[0022] На фиг. 9А-Д показано сравнение немаскированного и маскированного антитела к CD3 мыши 145-2C11. На фиг. 9А показана связывающая активность маскированного антитела к CD3 мыши 145-2C11; на фиг. 9В показано мишень-опосредованное распределение лекарственного средства немаскированного и маскированного антитела к CD3 мыши 145-2C11 у мышей BALB/с; на фиг. 9С и Д показано уменьшение высвобождения цитокинов IFN-гамма (фиг. 9С) и IL-2 (фиг. 9Д) антителом к CD3 145-2C11.

[0023] На фиг. 10 показана стабильность маскированных антител к Ag2 человека, несущих различные домены спирализованной спирали с использованием внутривенного введения мышам BALB/c.

[0024] На фиг. 11A-C показаны активности немаскированного и маскированного антитела к Ag2 мыши. На фиг. 11A показано мышинное реакционноспособное антитело к Ag2, маскированное той же последовательностью VEL и IPV, которую использовали на антителе к Ag2 человека; На фиг. 11B показано исследование истощения тромбоцитов маскированного антитела к Ag2 мыши у мышей BALB/c; на фиг. 11C показаны фармакокинетические параметры маскированного антитела к Ag2 мыши, Vel-IPV-Ag2.

[0025] На фиг. 12A-D показана противоопухолевая активность антитела к Ag2 мыши в модели лимфомы A20. На фиг. 12A показан эффект немаскированного и маскированного Vel-IPV антитела к Ag2 на периферические Ag2(+) клетки; на фиг. 12B показано изменение объема опухоли с течением времени после лечения с помощью немаскированного и маскированного Vel-IPV антитела к Ag2; На фиг. 12C показано связывание немаскированного и маскированного Vel-IPV антитела к Ag2 с периферическими клетками; и на фиг. 12D показано связывание немаскированного и маскированного Vel-IPV антитела к Ag2 с опухолевыми клетками.

[0026] На фиг. 13A-C показано влияние маскирования на фармакокинетику и переносимость антитела к Ag2. На фиг. 13A показана фармакокинетика антитела анти-Ag2 и антитела Vel-IPV-анти-Ag2 с использованием общего анализа ELISA для общего антитела (TA_b); на фиг. 13B показаны влияния маскирования антитела к Ag2 с использованием Vel-IPV путем сравнения истощения этих периферических Ag2(+) клеток; на фиг. 13C показаны влияния маскирования антитела к Ag2 с использованием Vel-IPV на продукцию цитокинов.

[0027] На фиг. 14A и 14B показана противоопухолевая активность антитела к Ag2 в ксенотрансплантатах L428. На фиг. 14A показано изменение объема опухоли после лечения с помощью Vel-PLGLAG-анти-Ag2 и Vel-LALGPG-анти-Ag2; на фиг. 14B показано изменение количества клеток L428 после лечения с помощью Vel-PLGLAG-анти-Ag2 и Vel-LALGPG-анти-Ag2.

Определения

[0028] Выделенное антитело или ADC является, как правило, по меньшей мере на 50% масс./масс. чистым от мешающих белков и других примесей, возникающих в результате

его получения или очистки, но не исключена возможность того, что антитело комбинируют с избытком фармацевтические приемлемого(ых) носителя(ей) или другой несущей среды, которые предназначены для облегчения его применения. Иногда антитела или ADC являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95 или 99% масс./масс. чистыми от мешающих белков и примесей, полученных в результате получения или очистки.

[0029] Специфическое связывание антитела отдельно или в качестве компонента ADC с его целевым антигеном означает аффинность, составляющую по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего по меньшей мере на одной неродственной мишени. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или определенного пространственного соответствия (например, тип замка и ключа), тогда как неспецифическое связывание, как правило, является результатом действия ван-дер-ваальсовых сил. Тем не менее, специфическое связывание не обязательно означает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

[0030] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает в себя две пары полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну “легкую” (приблизительно 25 кДа) и одну “тяжелую” цепь (приблизительно 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает в себя переменную область, составляющую приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Эта переменная область изначально экспрессируется соединенной с расщепляемым сигнальным пептидом. Переменная область без сигнального пептида иногда называется зрелая переменная область. Таким образом, например, зрелая переменная область легкой цепи представляет собой переменную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область. Константная область тяжелой цепи в первую очередь отвечает за эффекторную функцию

[0031] Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей переменные и константные области соединены областью “J” из приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область “D” из приблизительно 10 или более

аминокислот. (См. для общего обзора *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2-е изд. Raven Press, N.Y., 1989, гл. 7, полностью включенную в качестве ссылки для всех целей).

[0032] Зрелые вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело содержит два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания являются одинаковыми. Все цепи проявляют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. От N-конца до C-конца как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот по каждому домену осуществляется в соответствии с определениями Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991), или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat также предоставляет широко используемую систему нумерации (нумерация согласно Kabat), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присваивается один и тот же номер.

[0033] Термин “антитело” включает в себя интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты антител конкурируют с интактным антителом, из которого они происходят, за специфическое связывание с мишенью, включая в себя отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, диатела, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получить с помощью техник рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин “антитело” также включает в себя диатело (гомодимерный фрагмент Fv) или миниантитело (V_L-V_H-C_{H3}), биспецифическое антитело или тому подобное. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две разные пары тяжелой и легкой цепей и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). Термин “антитело” включает в себя антитело само по себе (голое антитело) или антитело, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

[0034] Термин “эпитоп” относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных

аминокислот, расположенных рядом за счет укладки в третичную структуру одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные укладкой в третичную структуру, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило включает в себя, по меньшей мере 3, и более типично по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают в себя, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0035] Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать в простом иммуноанализе, показывающем способность одного антитела конкурировать за связывание другого антитела с целевым антигеном. Эпитоп антитела также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного со своим антигеном, для идентификации контактных остатков. Альтернативно, два антитела характеризуются одним и тем же эпитопом, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[0036] Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором исследуемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток исследуемого антитела (например, по меньшей мере, в 2, 5, 10, 20 или 100 раз) ингибирует связывание эталонного антитела, по меньшей мере, на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентных анализов (конкурирующие антитела), включают в себя антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, расположенным достаточно проксимально по отношению к эпитопу, связанному с эталонным антителом для возникновения стерического препятствия.

[0037] Термин “пациент” включает в себя человека и других субъектов - млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0038] Для целей классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных аминокислоты группируют следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asp, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают в себя замены аминокислот в одном и том же классе. Неконсервативные замены означают замену представителя одного из этих классов представителем другого.

[0039] Идентичности последовательностей в процентах определяют с последовательностями, которые являются максимально выровненными.

[0040] Идентичность последовательностей можно определить путем выравнивания последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI., с использованием параметров пропусков по умолчанию или путем осмотра и наилучшего выравнивания (т.е. получая самое высокое процентное отношение сходства последовательностей по сравнению с окном сравнения). Идентичность последовательностей в процентах рассчитывают путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей по окну сравнения, определения количества положений, в которых идентичные остатки встречаются в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, деления числа совпавших положений на общее число из совпадающих и несовпадающих положений, не считая пропуски в окне сравнения (т.е. размер окна), и умножения результата на 100 с получением процентного отношения идентичности последовательностей. Последовательности антител выравнивают в соответствии с системой нумерации согласно Kabat так, чтобы остатки, занимающие одинаковое пронумерованное положение, являлись выровненными. После выравнивания, если исследуемую последовательность сравнивают с эталонной последовательностью, процентное отношение идентичности последовательностей между исследуемой и эталонной последовательностями представляет собой число положений, занимаемых одной и той же аминокислотой как в исследуемой, так и в эталонной последовательностях, деленное на общее количество выровненных положений двух областей

с неучтенными пропусками, умноженное на 100, чтобы преобразовать в процентное отношение.

[0041] Композиции или способы, “содержащие” один или несколько перечисленных элементов, могут включать в себя другие элементы, не перечисленные конкретно. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими ингредиентами.

[0042] Обозначение диапазона значений включает в себя все целые числа в пределах диапазона или определяющие диапазон.

[0043] Эффекторная функция антитела относится к функции, обеспечиваемой Fc-доменом(ами) Ig. Такими функциями могут являться, например, антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или комплементзависимая цитотоксичность. Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания эффекторного(ых) домена(ов) Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или путем связывания эффекторного(ых) домена(ов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый(е) Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит(ят) к ингибированию и/или истощению клетки-мишени. Fc-области антител могут осуществлять рекрутирование экспрессирующих Fc-рецептор (FcR) клеток и располагать их рядом с клетками-мишенями, покрытыми антителами. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая в себя FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRI (CD64), могут действовать как эффекторные клетки для разрушения клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают в себя моноциты, макрофаги, натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Связывание IgG с FcγR активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). ADCC опосредуется эффекторными клетками CD16⁺ через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз, а фагоцитоз опосредуется эффекторными клетками CD32⁺ и CD64⁺ (см. *Fundamental Immunology*, 4^е изд., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, главы 3, 17 и 30; Uchida *et al.*, 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop *et al.*, 2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe *et al.*, 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207). В дополнение к ADCC и ADCP Fc-области антител, связанных с клетками, также могут активировать классический путь комплемента, чтобы вызвать комплементзависимую цитотоксичность (CDC). C1q системы комплемента связывается с Fc-областями антител, когда они образуют комплекс с антигенами. Связывание C1q с антителами,

связанными с клетками, может инициировать каскад событий, включающих в себя активацию протеазы C4 и C2 с созданием конвертазы C3. Расщепление C3 до C3b конвертазой C3 позволяет активировать терминальные компоненты комплемента, включая в себя C5b, C6, C7, C8 и C9. В совокупности эти белки образуют поры мембраноатакующего комплекса на клетках, покрытых антителами. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая клетку-мишень (см. *Immunobiology*, 6-е изд., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, глава 2).

[0044] “Цитотоксический эффект” относится к истощению, устранению и/или уничтожению клетки-мишени. “Цитотоксическое средство” относится к средству, которое оказывает цитотоксическое действие на клетку. Цитотоксические средства можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

[0045] “Цитостатический эффект” относится к ингибированию пролиферации клеток. “Цитотоксическое средство” относится к средству, которое оказывает цитостатическое действие на клетку, тем самым ингибируя рост и/или экспансию определенной группы клеток. Цитотоксические средства можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

[0046] Термин “фармацевтически приемлемый” означает одобренный или одобряемый регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или внесенный в перечень Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на животных и, в частности, на людях. Термин “фармацевтически совместимый ингредиент” относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или несущей среде, с которыми комбинируют антитело или ADC.

[0047] Фраза “фармацевтически приемлемая соль” относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям антитела или его конъюгата или средства, вводимого вместе с антителом. Иллюстративные соли включают в себя такие соли, как сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может предусматривать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может

представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может содержать более одного заряженного атома в своей структуре. В случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут присутствовать несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов. Если иное не очевидно из контекста, любое из антител или конъюгатов антитела с лекарственным средством в маскированной или немаскированной форме может быть предоставлено в форме фармацевтически приемлемой соли.

[0048] Если иное не очевидно из контекста, термин “приблизительно” охватывает значения в пределах стандартного отклонения от заявленного значения.

[0049] Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR от не относящегося к человеку “донорного” антитела привиты к последовательностям “акцепторного” антитела человека (см., например, Queen, патенты США № 5530101 и 5585089; Winter, Патент США № 5225539, Carter, патент США № 6407213, Adair, патент США № 5859205, 6881557, Foote, патент США № 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность человеческого антитела, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность области зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее свои CDR, предпочтительно, как определено Kabat, полностью или по существу из донорного антитела и каркасные последовательности вариабельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Помимо нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе по существу происходит от соответствующей CDR в антителе, не относящемся к человеку, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено согласно Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Каркасные последовательности вариабельной области цепи антитела или константная область цепи антитела по существу происходят из каркасной последовательности вариабельной области человека или константной области человека

соответственно, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, определенных согласно Kabat, являются идентичными.

[0050] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей не относящегося к человеку антитела (например, мыши) объединены с константными областями легкой или тяжелой цепи человека или не являющегося человеком примата. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания мышиного антитела и представляют собой приблизительно две трети последовательности человека или не являющегося человеком примата.

[0051] Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и обычно все CDR и некоторые не относящиеся к человеку каркасные остатки переменной области не относящегося к человеку антитела, но заменяет другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например, экспонированные остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991) с остатками из соответствующих положений последовательности антитела человека. В результате получают антитело, в котором CDR полностью или по существу происходят от не относящегося к человеку антитела, а каркасы переменной области не относящегося к человеку антитела сделаны более похожими на относящиеся к человеку благодаря заменам.

[0052] Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) содержит антитело, конъюгированное с лекарственным средством. Лекарственное средство представляет собой соединение, которое, как известно или как предполагают, обладает фармакологической активностью, как правило, цитотоксической или цитостатической активностью.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

I. Общие положения

[0053] Настоящее изобретение относится к антителам, в которых переменные области маскированы путем связывания N-концов цепей переменных областей с образующими спирализованную спираль пептидами. Образующие спирализованную спираль пептиды ассоциируются друг с другом с образованием спирализованных спиралей (т.е. каждый из соответствующих пептидов образует спирали, и эти спирали намотаны друг на друга). Хотя понимание механизма не требуется для практического применения настоящего изобретения, считается, что спирализованные спирали стерически ингибируют связывание

сайта связывания антитела с его мишенью. Эту технологию можно применить ко всем формам антител, включая в себя двухвалентные антитела (т.е. содержащие два сайта связывания). Нековалентные ассоциации между пептидами, образующими спирализованную спираль, являются достаточными для образования стабильных спирализованных спиралей, ингибирующих связывание вариабельной области антитела; например, нет необходимости, чтобы образующие спирализованную спираль пептиды были дополнительно связаны дисульфидным мостиком между концевыми цистеинами соответствующих пептидов. Присутствие не встречающихся в природе цистеинов является потенциально неблагоприятным, поскольку они могут приводить к проблемам неправильной укладки или неправильного конъюгирования. Маскирование антител с помощью этого формата может снизить аффинности связывания (и цитотоксические активности в случае ADC) более чем в сто раз. Антитела можно маскировать в этом формате без существенного нарушения экспрессии, очистки, конъюгации, фармакокинетики или связывания или другой активности при снятии маскировки.

II. Спирализованные спирали

[0054] Образующие спирализованную спираль пептиды представляют собой пары пептидов, которые могут ассоциироваться друг с другом с образованием спирализованных спиралей. “Спирализованные спирали” (“coiled coils”) представляют собой термин в настоящей области техники, относящийся к пучкам альфа-спиралей, намотанных в сверхспиральные структуры. Пептиды, образующие лейциновую молнию, являются одним из примеров пептидов, ассоциированных с образованием спирализованных спиралей. Спирализованные спирали, образованные в настоящем изобретении, как правило, образованы из двух пептидов, образующих спирализованную спираль. Спирализованные спирали могут образовываться из альфа-спиралей на пептидах в параллельных или противоположных ориентациях (примеры которых представлены на фиг. 1A и 1B). Спирализованные спирали дополнительно характеризуются упаковкой аминокислотных боковых цепей в ядре пучка, называемой выступы-во-впадины, в которых остаток от одной спирали (выступ) упаковывается в пространство, окруженное четырьмя боковыми цепями противоположной спирали (впадина). Остатки, участвующие во взаимодействиях “выступы-во-впадины”, как правило, являются гидрофобными, тогда как внешние остатки являются гидрофильными, поэтому последовательность спирализованных спиралей демонстрирует ‘гептадный’ повтор в химической природе боковых цепей. Примеры консенсусных формул для гептадных повторов

в образующих спирализованные спирали пептидах, приведены в международной патентной публикации WO2011034605.

Формула 1: $(X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7)_n$

X1 представляет собой гидрофобную аминокислоту или аспарагин

X2, X3 и X6 представляют собой любую аминокислоту

X4 представляет собой гидрофобную аминокислоту

X5 и X7 каждый представляет собой заряженный аминокислотный остаток

Формула 2: $(X1', X2', X3', X4', X5, X6, X7)_n$

X1' представляет собой гидрофобную аминокислоту или аспарагин

X2', X3' и X6' каждый представляет собой любой аминокислотный остаток

X4' представляет собой гидрофобную аминокислоту

X5' и X7' каждый представляет собой заряженный аминокислотный остаток

где n в формуле 1 и 2 больше или равно 2; и

где каждый гептадный повтор в первом пептиде, образующем спирализованную спираль, содержит остаток X5, который противоположен по заряду остатку X'7 во втором пептиде, образующем спирализованную спираль, а первый пептид, образующий спирализованную спираль, содержит остаток X7, который противоположен по заряду остатку X'5 во втором пептиде, образующем спирализованную спираль. Гептадные повторы внутри пептида, образующего спирализованную спираль, могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, при условии соответствия формуле 1 или 2.

[0055] Спирализованные спирали могут быть гомодимерными или гетеродимерными. Примеры пар образующих спирализованную спираль пептидов представляют собой A2B1 GASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSE, SEQ ID NO: 66 и GASTTVAQLRERVKTTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLA, SEQ ID NO: 67), CA2B1 EACGASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSE, SEQ ID NO: 68 и EACGASTTVAQLRERVKTTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLA, SEQ ID NO: 69), M11 LEIEAAFLERENTALETRVAELRQVRQARNRVSQYRTRY, SEQ ID NO: 26 и LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVVSQYETRY, SEQ ID NO: 21, CM11 EACGALEIEAAFLERENTALETRVAELRQVRQARNRVSQYRTRY, SEQ ID NO: 39 и EACGALEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVVSQYETRY, SEQ ID NO: 37, M15 LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQVRQRLRNIVVSQYETRY, SEQ ID NO: 30 и LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLNIVVSQYETRY, SEQ ID NO: 28, CM15

EACGALEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRY, SEQ ID NO: 43, и EACGALEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRY, SEQ ID NO: 41), Vel (Q)GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKL, SEQ ID NO: 35 и (Q)GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQL, SEQ ID NO: 32, CVel EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKL, SEQ ID NO: 47 и EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQL, SEQ ID NO: 45), Fos-Jun AGLTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAH, SEQ ID NO: 70 и AGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNY, SEQ ID NO: 71, CFos-Jun EACGAGLTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAH, SEQ ID NO: 72 и EACGAGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNY, SEQ ID NO: 73, A4B4 GKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQ, SEQ ID NO: 74 и GEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQ, SEQ ID NO: 75, и CA4B4 EACGAGKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQ, SEQ ID NO: 76 и EACGAGEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQ, SEQ ID NO: 77.

[0056] Некоторые примеры пар образующих спирализованную спираль пептидов также показаны в таблице 1 и на фиг. 1A и 1B. Черточки в последовательностях, показанных на фиг. 1A и 1B, очерчивают различные сегменты последовательностей. Слева направо последовательности представляют собой образующий спирализованную спираль пептид, искусственный линкер, сайт расщепления протеазой в пределах искусственного линкера и оставшуюся часть искусственного линкера. Пептидные последовательности можно использовать как есть, или их компоненты можно использовать в других комбинациях. Например, образующий спирализованную спираль пептид Vel можно использовать с другими линкерными последовательностями. Последовательности, показанные для легких цепей, также можно использовать с тяжелыми цепями и наоборот.

[0057] Предпочтительная комбинация представляет собой пептид, содержащий или состоящий из аминокислот согласно SEQ ID NO: 44 ((CVelCC на фиг. 1B), образуя собой линкер, включая в себя сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид согласно последовательности SEQ ID NO: 46 (CVel CC, фиг. 1B), образуя собой линкер, включая в себя сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью, или наоборот. Пептиды, состоящие или содержащие указанные последовательности, можно соединить с любым из антител, раскрытых в настоящем документе.

[0058] Другая предпочтительная комбинация представляет собой пептид, содержащий или состоящий из аминокислот согласно SEQ ID NO: 31 ((VelCC) или SEQ ID NO: 65 (без N-концевой Q), образуя собой линкер, включая в себя сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид согласно последовательности SEQ ID NO: 34 (Vel CC) или SEQ ID NO: 64 (без N-концевой Q), образуя собой линкер, включая в себя сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью, или наоборот. Пептиды, состоящие из или содержащие указанные последовательности, можно соединять с любым из антител, раскрытых в настоящем документе.

Таблица 1. Образующие спирализованные спирали пептиды

Название спирали	Статья
Fos/Jun	Pluckthun et.al., Immunotechnology 1997, 3, 83-105
A3B3	Thomas et.al., J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 5161–516
A4B4	Thomas et.al., J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 5161–516
IAAL3	Litowski et. al., J.Biol. Chem. 2002, 277, 37272-37279
CVel	Arndt et.al., Structure 2002 10, 1235-1248; Schmidt, <i>Engineering antibodies for improved targeting of solid tumors</i> , Thesis, 2010
antiPO	McClain et.al., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3151-3152
dHLX	Pluckthun et.al., Immunotechnology 1997, 3, 83-105
Vel	Arndt et.al., Structure 2002 10, 1235-1248

A2B1	Arndt et.al., Structure 2002 10, 1235-1248
M15	Moll et.al., Protein Science 2001, 10, 649-655
M11	Moll et.al., Protein Science 2001, 10, 649-655

[0059] Кроме того, можно использовать варианты этих пептидов, характеризующиеся идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%, 90% или 95% по отношению к ним, и все еще способные образовывать спирализованную спираль. Любые замены предпочтительно являются консервативными заменами. Предпочтительно повторяющиеся гептадные структуры сохраняются, благодаря чему образующий спирализованную спираль пептид можно подразделить на смежные гептадные сегменты в соответствии с формулой, классифицирующей аминокислоты, занимающие положения в формуле, по типу аминокислоты так, как это показано выше. Предпочтительно на гептаду аминокислот приходится не более 1 или 2 замен, и любые такие замены являются консервативными.

[0060] В любой последовательности образующего спирализованную спираль пептида, в которой N-концевой остаток представляет собой Q, Q является необязательным. В любой последовательности образующего спирализованную спираль пептида, в которой N-концевой остаток отличается от Q, Q можно добавить с образованием N-концевого остатка. Присутствие Q в качестве N-концевого остатка может облегчить процессинг сигнальной последовательности.

III. Линкеры и сайты расщепления

[0061] Линкеры могут представлять собой любые сегменты аминокислот, обычно используемые в качестве линкера для присоединения пептидных доменов. Подходящие линкеры могут варьироваться по длине, например, от 1-20, 2-15, 3-12, 4-10, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Некоторые такие линкеры включают в себя сегмент полиглицина. Некоторые такие линкеры включают в себя один или несколько остатков серина, часто в положениях, фланкирующих остатки глицина. Другие линкеры включают в себя один или несколько остатков аланина. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут быть способными служить в качестве нейтральной привязки между

компонентами. Глицин получает доступ к значительно большему количеству phi-psi-пространства, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Некоторые иллюстративные линкеры находятся в форме $S(G)_nS$, где n равно 5-20. Другие иллюстративные линкеры представляют собой $(G)_n$, глицин-сериновые полимеры (включая в себя, например, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ [(GSGGS) представляет собой SEQ ID NO: 49] и $(GGGS)_n$, [(GGGS) представляет собой SEQ ID NO: 50], где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в настоящей области техники. Некоторые примеры линкеров представляют собой Ser-(Gly)₁₀-Ser (SEQ ID NO: 51), Gly-Gly-Ala-Ala (SEQ ID NO: 52), Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 24), Leu-Ala-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO: 53), Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 54), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 55), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 56), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 57), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 58), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 59) и тому подобное.

[0062] Сайт протеазы предпочтительно распознается и расщепляется протеазой, экспрессируемой внеклеточно, поэтому он контактирует с маскированным антителом, высвобождая маскированное антитело и позволяя ему контактировать с его мишенью, такой как внеклеточный домен рецептора или растворимый лиганд. Подходящими являются несколько сайтов матричной металлопротеиназы (MMP1-28). MMP играют роль в ремоделировании тканей и участвуют в неопластических процессах, таких как морфогенез, ангиогенез и метастазирование. Некоторые иллюстративные сайты протеаз представляют собой PLG-XXX (SEQ ID NO: 60), хорошо известную эндогенную последовательность для MMP, PLG-VR (SEQ ID NO: 23) (WO2014193973), IPVSLR (SEQ ID NO: 33) (Turk et al., Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 61) (Cytomx), GPLGVR (SEQ ID NO: 62) (Chang et al., Clin. Cancer Res. 2012 Jan 1; 18(1):238-47). VPMS-MRGG (MMP1, SEQ ID NO: 78), RPFs-MIMG (MMP3, SEQ ID NO: 79), IPES-LRAG (MMP14, SEQ ID NO: 80), -VPLS*LTMG (SEQ ID NO: 81) (Turk et al., Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667). Другие иллюстративные сайты протеаз представляют собой PLGLAG (SEQ ID NO: 82), LALGPG (SEQ ID NO: 83) и YGRAA (SEQ ID NO: 84).

[0063] Дополнительные примеры приведены в более ранней работе, такой как US2013/0309230, WO2009/025846, WO2010/081173, WO2014/107599, WO2015/048329, US20160160263 и Ratnikov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: E4148-E4155 (2014).

[0064] Некоторые примеры образующих спирализованную спираль пептидов, прикрепленных к линкерам, включая в себя сайты протеаз, показаны на фиг. 1A и 1B. Компоненты таких пептидов разделены черточками (т.е. образующий спирализованную спираль пептид-левая часть линкера-сайт протеазы-правая часть линкера).

IV. Антитела и связь антител со спирализованными спиралями

[0065] Образующие спирализованные спирали пептиды соединены с N-концами переменных областей антитела посредством линкера, включая в себя сайт протеазы. Типичное антитело включает в себя переменную область тяжелой и легкой цепей, и в этом случае образующий спирализованную спираль пептид соединен с N-концом каждой. Двухвалентное антитело содержит два сайта связывания, которые могут быть одинаковыми или не быть одинаковыми. В нормальном моноспецифическом антителе сайты связывания являются одинаковыми, и антитело содержит две идентичные пары легкой и тяжелой цепей. В этом случае каждая тяжелая цепь соединена с одним и тем же образующим спирализованную спираль пептидом, и каждая легкая цепь - с одним и тем же образующим спирализованную спираль пептидом (который может являться или не являться тем же пептидом, что и пептид, соединенный с тяжелой цепью).

[0066] В биспецифическом антителе сайты связывания являются различными и образованы из двух разных пар тяжелой и легкой цепей. Сайты связывания могут характеризоваться специфичностью в отношении разных мишеней или разных эпитопов на одной и той же мишени. Если сайты связывания обладают специфичностью в отношении разных мишеней, мишени могут находиться на одной и той же клетке (например, два разных поверхностных антигена на раковой клетке) или двух разных клетках (например, один поверхностный антиген на раковой клетке и один на иммунной клетке, такой как Т-клетка). Например, один сайт связывания биспецифического антитела может быть направлен против CD3 или 4-1BB.

[0067] В биспецифическом антителе переменная область тяжелой и легкой цепей одного сайта связывания может являться соответственно соединенной с образующими спирализованную спираль пептидами. Переменные области тяжелой и легкой цепей другого сайта связывания могут являться или могут не являться также соединенными с образующими спирализованную спираль пептидами. Если обе пары тяжелой и легкой цепей обоих сайтов связывания соединены с образующими спирализованную спираль пептидами, то, как правило, обе переменные области тяжелой цепи соединены с тем же типом образующего

спирализованную спираль пептида, что и обе переменные области легкой цепи. Маскирование обоих сайтов связывания может являться применимым, например, если оба сайта связывания обладают специфичностью в отношении поверхностных антигенов на одной и той же опухоли. Маскирование одного, но не обоих сайтов связывания может являться применимым, например, когда один сайт связывания является специфическим в отношении поверхностного антигена опухоли, а другой обладает специфичностью в отношении поверхностного антигена иммунной клетки. Либо сайт связывания со специфичностью к поверхностному антигену опухоли, либо сайт связывания со специфичностью к антигену иммунных клеток может являться маскированным. Некоторые биспецифические антитела со специфичностью как к поверхностному антигену опухоли, так и к иммунной клетке характеризуются маскированием обоих сайтов.

[0068] Как отмечалось, образующий спирализованную спираль пептид соединен с переменной областью антитела посредством линкера, включающего в себя сайт протеазы. Как правило, один и тот же линкер с одним и тем же сайтом расщепления протеазой используют для соединения каждой переменной области тяжелой или легкой цепей антитела с пептидом со спирализованной спиралью. Сайт расщепления протеазой должен быть таким, который может расщепляться протеазой, присутствующей внеклеточно в предполагаемой целевой ткани или патологии, такой как рак, так, чтобы расщепление линкера высвобождало антитело из спирализованной спирали, маскирующей его активность, позволяя антителу связываться с его предполагаемой мишенью, такой как антиген клеточной поверхности или растворимый лиганд.

[0069] Наряду с переменными областями маскированное антитело, как правило, включает в себя всю или часть константной области, которая может включать в себя любую или все из следующего: константная область легкой цепи, область СН1, шарнир, области СН2 и СН3. Как и в случае других антител, один или несколько С-концевых остатков можно протеолитически обработать или дериватизировать.

[0070] Спирализованные спирали могут быть образованы из одного и того же пептида, образующего гомодимер, или двух разных пептидов, образующих гетеродимер. Для образования гомодимера легкие и тяжелые цепи антител соединены с одним и тем же образующим спирализованную спираль пептидом. Для образования гетеродимера легкие и тяжелые цепи антител соединены с различными образующими спирализованную спираль пептидами. Для некоторых пар образующих спирализованную спираль пептидов

предпочтительно, чтобы одна из пары являлась соединенной с тяжелой цепью, а другая - с легкой цепью антитела, хотя также возможна обратная ориентация.

[0071] Каждая цепь антитела может являться соединенной с одним образующим спирализованную спираль пептидом или несколькими такими пептидами в тандеме (например, две, три, четыре или пять копий пептида). В последнем случае пептиды в тандемной связи, как правило, являются одинаковыми. Кроме того, если используют тандемную связь, легкие и тяжелые цепи, как правило, соединены с одинаковым количеством пептидов.

[0072] Связывание цепей антител с образующими спирализованную спираль пептидами может снижать аффинность связывания антитела, например, по меньшей мере в 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 4000, 5000 или 10000 раз относительно того же антитела без такой связи или после расщепления такой связи. В некоторых таких антителах аффинность связывания снижена в 50-10,000, 50-5000, 50-4000, 50-1000, 100-10,000, 100-5000, 100-4000, 200-10,000, 200-5000, 50-1500, 100-1500, 200-1500, 200-1000, 500-1500, 50-1000, 100-1000, 200-1000, 500-1000, 50-500, 100-500 раз. Эффекторные функции антитела, такие как ADCC, фагоцитоз и CDC или цитотоксичность в результате связывания с лекарственным средством в конъюгате антитела с лекарственным средством могут быть снижены в столько же раз или в таких же диапазонах. При протеолитическом расщеплении, демаскирующем антитело, восстановленное антитело может характеризоваться аффинностью или эффекторной функцией, которая отличается не больше чем в 5, 2, 1,5 раза или предпочтительно неизменна в пределах ошибки эксперимента по сравнению с контрольным, в остальном идентичным, антителом, которое никогда не являлось маскированным.

V. Конъюгаты антитела с лекарственным средством

[0073] Наряду со связыванием с голыми антителами образующие спирализованную спираль пептиды могут связываться с антителами, конъюгированными с цитотоксическими или цитостатическими фрагментами, в качестве конъюгатов антител с лекарственными средствами (ADC). По сравнению с голыми антителами ADC обеспечивают дополнительные механизмы, в частности доставку токсического фрагмента, связанного с антителом, внутрь клетки, тем самым уничтожая клетку или иным образом ингибируя ее пролиферацию. В настоящее время продаются два ADC: брентуксимаб ведотин (торговое название антитела к CD30: ADCETRIS®, продается Seattle Genetics и Millennium/Takeda) и трастузумаб эмтанзин (антитело к HER2, торговое название Kadcyla®, продается Genentech и Roche). Многие другие ADC находятся на разных стадиях разработки.

[0074] Техники конъюгирования лекарственных средств с антителами хорошо известны (см., например, Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,” в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery,” в *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); “Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,” в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); и Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. См. также, например, международную патентную публикацию WO 89/12624.).

[0075] Лекарственные средства, как правило, конъюгируют либо посредством аминокетильных групп на боковых цепях лизина, либо посредством свободных сульфгидрильных групп на боковых цепях цистеина. Остатки цистеина могут естественным образом присутствовать в антителе (например, межцепочечные дисульфиды) или их можно вводить путем мутагенеза. Цистеин содержит свободную сульфгидрильную группу, которая является более нуклеофильной, чем амины, и, как правило, является наиболее реакционноспособной функциональной группой в белке. Сульфгидрилы, в отличие от большинства аминов, обычно являются реакционноспособными при нейтральном pH и поэтому могут селективно связываться с другими молекулами в присутствии аминов. Эта селективность делает сульфгидрильную группу предпочтительным линкером для связывания антител. Среднее число молекул лекарственного средства на молекулу антитела часто составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, например, от 2-8 или 3-8.

[0076] Лекарственное средство может быть конъюгировано таким способом, который снижает его активность, если только оно не отщепляется от антитела (например, путем гидролиза, деградации антител или расщепляющим средством). Такое лекарственное средство прикреплено к антителу с помощью расщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде клетки-мишени, но по существу не чувствителен к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела, когда он интернализуется клеткой-мишенью (например, в эндосомной или, например, вследствие чувствительности к pH или чувствительности к протеазе, в лизосомной среде или в кавеоларной среде).

[0077] Как правило, ADC содержит линкерную область между лекарственным средством и антителом. Линкер может являться расщепляемым во внутриклеточных условиях,

так что расщепление линкера высвобождает лекарственное средство из антитела во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, эндосоме или кавеолах). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, расщепляемый внутриклеточным ферментом пептидазой или протеазой, включая лизосомную или эндосомную протеазу. Как правило, пептидильный линкер составляет по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты в длину. Расщепляющие средства могут включать в себя катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в клетках-мишенях. Например, можно использовать пептидильный линкер, который расщепляется тиолзависимой протеазой катепсином-В, который в высокой степени экспрессируется в раковой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 63)). Другие такие линкеры описаны, например, в патенте США № US 6214345. Типичный пептидильный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, содержит линкер Val-Cit или дипептид Phe-Lys (см., например, патент США № US 6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования высвобождения лекарственного средства внутриклеточной протеазой является то, что средство, как правило, ослабляется при конъюгировании, и сывороточная стабильность конъюгатов, как правило, является высокой.

[0078] Расщепляемый линкер может являться чувствительным к pH, т.е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизует в кислых условиях. Например, можно использовать кислото-неустойчивый линкер, который гидролизует в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитамид, ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное). (См., например, патенты США №№ US 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661.) Такие линкеры относительно стабильны в нейтральных условиях pH, таких как в крови, но они являются нестабильными при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительном значении pH лизосомы. Одним примером такого гидролизуемого линкера является тиоэфирный линкер (такой как, например, тиоэфир, прикрепленный к лекарственному средству через ацилгидразоновую связь (см., например, патент США №US 5622929)).

[0079] Другие линкеры расщепляются в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают в себя те, которые могут

образовываться с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуола), SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47: 5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, в *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (CW Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4880935).

[0080] Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10):1299-1304) или 3'-N-амидный аналог (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

[0081] Линкер также может представлять собой нерасщепляемый линкер, такой как малеимидо-алкиленовый или малеимид-арильный линкер, который непосредственно прикреплен к лекарственному средству (например, лекарственному средству). Активное лекарственное средство с линкером (лекарственное средство-линкер) высвобождается при разложении антитела.

[0082] Линкер представляет собой линкер, который содержит функциональную группу, которая является реакционноспособной по отношению к группе, присутствующей на антителе. Например, линкер может быть соединен с антителом посредством дисульфидной связи между атомом серы линкера и атомом серы антитела. В качестве другого примера, линкер может образовывать связь с атомом серы антитела через малеимидную группу растяжки. Атом серы может быть из остатка цистеина межцепочечного дисульфида или из остатка цистеина, введенного в антитело.

[0083] Применимые классы цитотоксических средств для конъюгирования с антителами включают в себя, например, антитубулиновые средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, сенсibilизаторы для химиотерапии, димер пирролобензодиазефина или тому подобное. Другие иллюстративные классы цитотоксических средств включают в себя антрациклины, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, мейтанзиноиды и алкалоиды барвинка. Некоторые иллюстративные цитотоксические средства включают в себя ауристатины (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ), средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, энединины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и

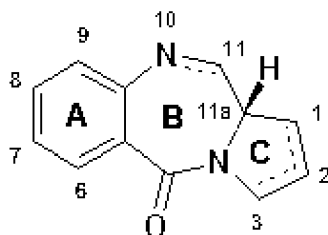
доцетаксел), алкалоиды барвинка, доксорубин, морфолино-доксорубин и цианоморфолино-доксорубин.

[0084] Цитотоксическое средство может представлять собой химиотерапевтическое средство, такое как, например, доксорубин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митомицин С или этопозид. Средство также может представлять собой аналог СС-1065, калихеамицин, майтанзин, аналог доластатина 10, ризоксин или палитоксин.

[0085] Цитотоксическое средство также может представлять собой ауристин. Ауристин может представлять собой производное ауристатина Е, например, сложный эфир, образованный между ауристином Е и кетокислотой. Например, ауристин Е может реагировать с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с образованием АЕВ и АЕВВ соответственно. Другие типичные ауристины включают в себя АФР, ММАФ и ММАЕ. Синтез и структура различных ауристинов описаны, например, в US 2005-0238649 и US2006-0074008.

[0086] Цитотоксическое средство может представлять собой средство, связывающееся с малой бороздкой ДНК. (См., например, патент США № US 6130237.) Например, средство, связывающееся с малой бороздкой ДНК может представлять собой соединение СВІ или энедин (например, калихеамицин). Другим классом средств, связывающихся с малой бороздкой ДНК, являются димеры пирролобензодиазепина (PBD). PBD проявляют свою биологическую активность посредством ковалентного связывания через их имин/карбиноламиновые фрагменты N10-C11 с положением C2-амино остатка гуанина в малой бороздке ДНК.

[0087] PBD характеризуются общей структурой:



[0088] Они различаются по количеству, типу и положению заместителей, как в их ароматических кольцах А и пирролокольцах С, так и по степени насыщения кольца С. В кольце В в положении N10-C11 находится либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)), который представляет собой электрофильный центр, ответственный за алкилирование ДНК. Все известные натуральные

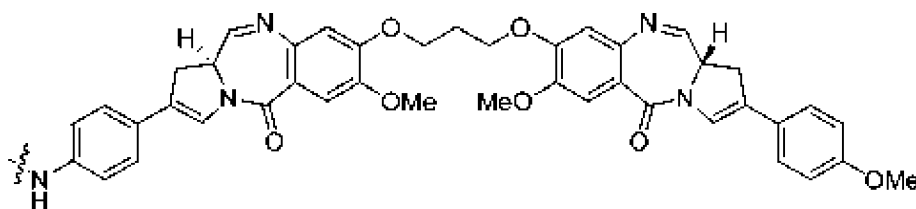
продукты характеризуются (S)-конфигурацией в хиральном положении C11a, что дает им поворот вправо, если смотреть от кольца C к кольцу A. Это дает им подходящую трехмерную форму для изогенности с малой бороздкой ДНК В-формы, что приводит к плотному прилеганию в месте связывания. Способность PBD образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им мешать процессингу ДНК, следовательно, позволяет использовать их в качестве противоопухолевых средств.

[0089] Биологическую активность этих молекул можно усилить путем соединения двух звеньев PBD вместе через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы посредством гибкого алкиленового линкера. Предполагается, что димеры PBD образуют селективные по отношению к последовательности повреждения ДНК, такие как палиндромная межнитевая поперечная сшивка 5'-Pu-GATC-Py-3', которая, как полагают, в основном отвечает за их биологическую активность.

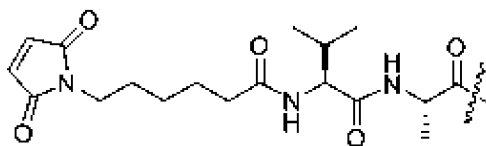
[0090] Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе PBD содержат димер PBD, соединенный с антителом. Мономеры, которые образуют димер PBD, могут быть одинаковыми или разными, т.е. симметричными или несимметричными. Димер PBD может являться соединенным с антителом в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Например, согласно некоторым вариантам осуществления димер PBD будет содержать заместитель в положении C2, который обеспечивает якорь для связывания соединения с антителом. Согласно альтернативным вариантам осуществления положение N10 димера PBD обеспечит якорь для связывания соединения с антителом.

[0091] Как правило, конъюгат антитела с лекарственным средством на основе PBD содержит линкер между лекарственным средством PBD и антителом, связывающимся с антигеном первичного рака. Линкер может содержать расщепляемое звено (например, аминокислоту или непрерывную последовательность аминокислот, которая представляет собой целевой субстрат для фермента) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый при деградации антитела). Линкер может дополнительно содержать малеимидную группу для связывания с антителом, например малеимидокапроил. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер может дополнительно содержать саморасщепляющуюся группу, такую как, например, звено п-аминобензилового спирта (PAB).

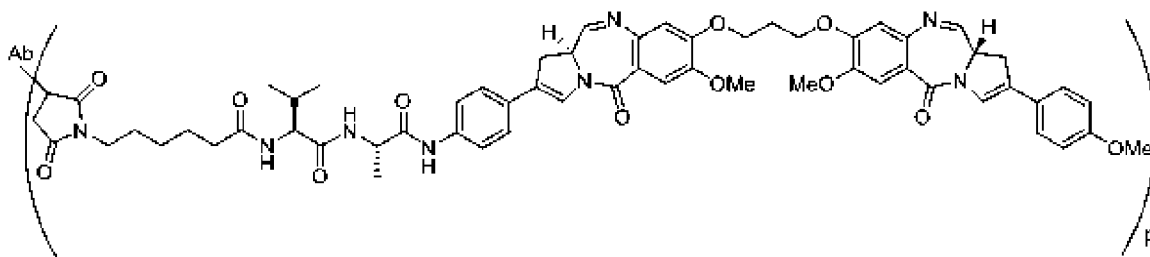
[0092] Иллюстративный PBD для использования в качестве конъюгата описан в международной патентной публикации WO 2011/130613 и представляет собой следующее, где волнистая линия указывает сайт прикрепления к линкеру:



или его фармацевтически приемлемую соль. Иллюстративный линкер представлен ниже, где волнистая линия указывает сайт прикрепления к лекарственному средству, и антитело соединено посредством maleimидной группы:



[0093] Иллюстративные конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе PBD включают в себя конъюгаты антитела с лекарственным средством, как показано ниже, где Ab представляет собой антитело, как описано в настоящем документе:



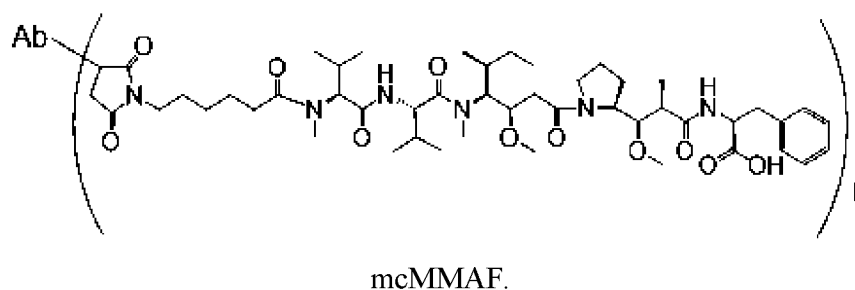
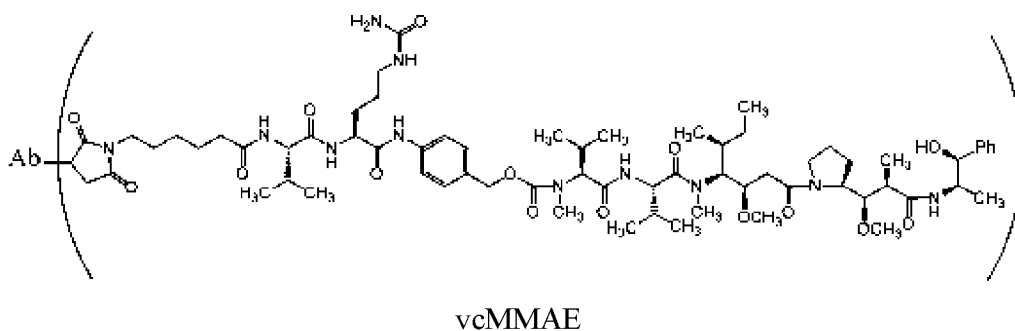
или их фармацевтически приемлемую соль. Нагрузка лекарственного средства представлена p , количеством молекул лекарственного средства с линкером (лекарственное средство-линкер) на антитело.

[0094] Цитотоксическое или цитостатическое средство может представлять собой антитубулиновое средство. Примеры антитубулиновых средств включают в себя таксаны (например, Taxol[®] (паклитаксел), Taxotere[®] (доцетаксел)), T67 (Tularik), алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и ауристатины (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Иллюстративные ауристатины показаны

ниже в формулах III-XIII. Другие подходящие антитубулиновые средства включают в себя, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин.

[0095] Цитотоксическое средство может представлять собой майтансиноид, другую группу антитубулиновых средств. Например, майтансиноид может представлять собой майтансин или майтансин, содержащий лекарственное средство с линкером, такой как DM-1 или DM-4 (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 127-131).

[0096] Иллюстративные конъюгаты антитела с лекарственным средством включают в себя конъюгаты антитела с лекарственным средством vcMMAE и mcMMAF, как показано ниже, или их фармацевтически приемлемые соли, причем p представляет нагрузку лекарственного средства и находится в диапазоне от 1 до 20, и Ab представляет собой антитело:



VI. Мишени

[0097] Антитела включают в себя не относящиеся к человеку, гуманизированные, человеческие, химерные и венеризованные антитела, нанотела, dAb, scFV, Fab и тому подобное. Некоторые такие антитела являются иммуноспецифическими в отношении антигена раковой клетки, предпочтительно антигена на клеточной поверхности, интернализуемого в клетку при связывании с антителом. Мишени, на которые могут быть направлены антитела, включают в себя рецепторы раковых клеток и их лиганды или контррецепторы (например, CD3, CD19,

CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD52, CD70, CD79a, CD123, Her-2, EphA2, лимфоцит-ассоциированный антиген 1, VEGF или VEGFR, CTLA-4, LIV-1, нектин-4, CD74 и SLTRK-6).

[0098] Некоторые примеры коммерческих антител и их мишеней, подходящих для применения согласно настоящим способам, включают в себя брентуксимаб или брентуксимаб ведотин, CD30, алемтузумаб, CD52, ритуксимаб, CD20, трастузумаб Her/neu, нимотузумаб, цетуксимаб, EGFR, бевацизумаб, VEGF, паливизумаб, RSV, абциксимаб, GpIIb/IIIa, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб, голимумаб, TNF-альфа, бациликсимаб, даклизумаб, IL-2, омализумаб, IgE, гемтузумаб или вадастуксимаб, CD33, натализумаб, VLA-4, ведолизумаб альфа4бета7, белимумаб, BAFF, отеликсизумаб, теплизумаб CD3, офатумумаб, окрелизумаб CD20, эспратузумаб CD22, алемтузумаб CD52, экулизумаб C5, канакимуаб IL-1бета, меполизумаб IL-5, реслизумаб, тоцилизумаб IL-6R, устекинумаб, бриакинумаб IL-12, 23, hBU12 (CD19) (US20120294853), гуманизированное 1F6 или 2F12 (CD70) (US20120294863), BR2-14a и BR2-22a (LIV-1) (WO2012078688). Некоторые последовательности иллюстративных антител представлены в перечне последовательностей.

VII. Фармацевтические композиции и способы лечения

[0099] Маскированные антитела (включая в себя маскированные голые антитела и ADC), полученные в соответствии с описанными выше способами, вводят в эффективном режиме, означающем дозировку, путь введения и частоту введения, который задерживает начало, уменьшает тяжесть, ингибирует дальнейшее ухудшение состояния и/или уменьшает интенсивность по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, для лечения которого оно предназначено, такого как рак, аутоиммунное заболевание или инфекция, включая в себя любое из показаний, обсуждаемых выше. Если пациент уже страдает от этого заболевания, этот режим можно назвать терапевтически эффективным режимом. Если пациент подвергается повышенному риску заболевания по сравнению с общей популяцией, но еще не испытывает симптомов, этот режим можно назвать профилактически эффективным режимом. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом испытании в популяции получивших лечение пациентов относительно контрольной популяции не получивших лечение пациентов.

[0100] Иллюстративные дозировки для маскированного антитела представляют собой 1 мг/кг - 100 мг/кг, 5 мг - 50 мг/кг, 10 мг - 25 мг/кг, 1 мг/кг - 7,5 мг/кг, или 2 мг/кг - 7,5 мг/кг или 3 мг/кг - 7,5 мг/кг массы тела субъекта, или 0,1-20, или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-15000, 200-15000 или 500-10000 мг в качестве фиксированной дозировки. В некоторых способах пациенту вводят дозу, составляющую по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере любую из 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, или 9 мг/кг, или 10 мг/кг, которую вводят раз в три недели или больше. Иллюстративные дозировки для их активных маскированных конъюгатов моноклонального антитела с лекарственным средством, например, ауристатинами, представляют собой 1 мг/кг - 7,5 мг/кг, или 2 мг/кг - 7,5 мг/кг или 3 мг/кг - 7,5 мг/кг массы тела субъекта, или 0,1-20, или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-1500 или 200-1500 мг в качестве фиксированной дозировки. Иллюстративные дозировки для их высоко активных маскированных конъюгатов моноклонального антитела с лекарственным средством, например, PBD, представляют собой 1,0 мкг/кг - 1,0 мг/кг, или 1,0 мкг/кг - 500,0 мкг/кг массы тела субъекта. В некоторых способах пациенту вводят маскированное ADC раз в две, три или четыре недели. Дозировка зависит от частоты введения, состояния пациента и реакции на предшествующее лечение, если таковое имеется, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим и является ли нарушение острым или хроническим, среди других факторов. Доза также зависит от снижения связывания, эффекторной функции или цитотоксичности. Как правило, можно вводить большие дозировки маскированных антител, чем тех же антител, без маскирования.

[0101] Введение может представлять собой парентеральное, внутривенное, пероральное, подкожное, внутриартериальное, внутричерепное, интратекальное, интраперитонеальное, местное, интраназальное или внутримышечное введение. Введение также может быть локализовано непосредственно, например, в опухоль. Введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения является предпочтительным. Внутривенное введение можно осуществить, например, с помощью инфузии в течение такого периода, как 30-90 мин, или с помощью однократной болюсной инъекции.

[0102] Частота введения зависит, среди других факторов, от периода полужизни маскированного антитела в кровотоке, состояния пациента и пути введения. Частота может являться ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование рака,

подлежащего лечению. Иллюстративная частота внутривенного введения составляет от двух раз в неделю до ежеквартального введения в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. Другие иллюстративные частоты внутривенного введения составляют раз в неделю или три из каждых четырех недель в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. Для подкожного введения иллюстративная частота введения доз составляет от раз в день до раз в месяц, хотя также возможно более или менее частое введение доз.

[0103] Количество вводимых доз зависит от природы заболевания (например, будь то наличие острых или хронических симптомов) и ответа нарушения на лечение. Для острых нарушений или обострений хронического нарушения часто достаточно от 1 до 10 доз. Иногда однократной болюсной дозы, необязательно в разделенной форме, достаточно для острого нарушения или выраженного обострения хронического нарушения. Лечение можно повторить при рецидиве острого нарушения или выраженного обострения. При хронических заболеваниях антитело можно вводить через регулярные интервалы, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение жизни пациента.

[0104] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по существу изотоническими (240-360 мОсм/кг) и их получают в условиях GMP. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в стандартной лекарственной форме (т.е. дозировке для однократного введения). Фармацевтические композиции можно составить с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций маскированные антитела можно составить в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разведения перед применением подходящей несущей средой, например стерильной апиrogenной водой. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 1-100 мг/мл, например 10 мг/мл.

[0105] Лечение с помощью маскированных антител согласно настоящему изобретению можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, операцией, противовирусными препаратами, антибиотиками, иммунодепрессантами или стимуляторами или другими видами лечения, эффективными в отношении нарушения, которое лечат. Применимые классы других средств, которые можно вводить с помощью ADC для лечения рака или аутоиммунного заболевания, включают в себя, например, антитела к другим рецепторам, экспрессируемым на раковых клетках, антитубулиновые средства (например, ауристатины), средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие средства (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, сенсibilизаторы для химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, преформирующие соединения, антиметаболиты пуринов, пуромицины, сенсibilизаторы для лучевой терапии, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и тому подобное.

[0106] Лечение с помощью маскированных антител может увеличить медиану выживаемости без прогрессирования или общее время выживания пациентов с опухолями, особенно при рецидиве или рефрактерности, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, 60% до 70% или даже 100% или более по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без маскированного антитела. В дополнение или в качестве альтернативы, лечение (например, стандартная химиотерапия), включая в себя маскированное антитело, может увеличить полную частоту ответа, частичную частоту ответа или частоту объективного ответа (полная + частичная) у пациентов с опухолями по меньшей мере на 30 или 40%, но предпочтительно 50%, 60% до 70% или даже 100% по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без маскированного антитела

[0107] Как правило, в клиническом испытании (например, в испытании фазы II, фазы II/III или фазы III) вышеупомянутое увеличение медианы выживаемости без прогрессирования и/или частоты ответа пациентов, получавших стандартную терапию, вместе с маскированным антителом по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих только стандартную терапию (или вместе с плацебо), являются статистически значимыми, например, на уровне $p = 0,05$ или $0,01$ или даже $0,001$. Частоты полного и частичного ответа

определяют по объективным критериям, обычно используемыми в клинических испытаниях рака, например, перечисленными или принятыми Национальным институтом рака и/или Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

[0108] Несмотря на то, что настоящее изобретение подробно описано для ясности понимания, очевидно, что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения можно осуществить определенные модификации. Все публикации, регистрационные номера, веб-сайты, патентные документы и тому подобное, процитированные в настоящей заявке, тем самым полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый(ая) из них был(а) обозначен(а) индивидуально. Поскольку разная информация связана с цитированием в разное время, подразумевается информация, представленная на дату подачи настоящей заявки. Действительной датой подачи заявки является дата самой ранней приоритетной заявки, в которой раскрыт рассматриваемый регистрационный номер. Если иное не очевидно из контекста, любой элемент, вариант осуществления, стадия, признак или аспект настоящего изобретения можно осуществить в комбинации с любым другим.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение и определение характеристик маскированных антител

[0109] Все химические вещества приобретали у Sigma Aldrich, если не указано иное. Все протеазы приобретали в R&D Systems, за исключением MMP2 человека (Sino Biological). Ингибиторы протеазы приобретали у EMD Millipore, если не указано иное. Пирролобензодиазепин (PBD) с линкером (PBD-линкер), содержащий малеимид, получали, как сообщалось ранее. (Jeffrey et. Al., *Bioconjugate Chemistry*, 2013, 24, 1256-1263.) Mc-MMAF-линкер получали, как сообщалось в исследованиях CD19 (например, US20120294853).

Получение антител

[0110] Антитела экспрессировали посредством транзientной трансфекции или стабильной трансфекции клеток Expi HEK, клеток Expi-CHO или CHO-DG44 и очищали с использованием колонок MabSelect SuRe (GE Healthcare), эксклюзионной хроматографии и способа после обработки с помощью белка А. Каждое полученное антитело содержало сконструированный цистеин (S239C) в константной области тяжелой цепи. Названия мутантов

константной области S239C включают в себя обозначение ес. Последовательности антител приведены в перечне последовательностей.

Флуоресцентное мечение антител

[0111] Антитела флуоресцентно метили с использованием Alexa Fluor488 или 647 NHS Ester (Life Technologies, A20000, A20006) в соответствии с протоколом поставщика. Вкратце, антитело (1 экв.) инкубировали с флуорофором (4 экв.) при pH 8 в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Флуоресцентное антитело очищали с использованием колонки Nap5 (GE Healthcare Life Sciences, 17-0853-02) и загрузку флуорофора измеряли с использованием спектрометра в УФ и видимых областях спектра (Agilent). Типичные флуорофорные нагрузки составляли 3-5 флуорофоров на антитело.

Эксперименты по конкурентному связыванию

[0112] Для оценки связывания клеток с маскированными антителами 2×10^5 указанных клеток (Raji, Ramos, PC3, Daudi) объединяли с флуоресцентно меченным исходным антителом, смешанным с серийными разведениями конкурирующего средства (маскированное антитело) в буфере для окрашивания (PBS, 2% FBS 0,2% NaN₃). Образцы инкубировали в течение 1 часа на льду и дважды отмывали ледяным буфером для окрашивания. Меченые клетки исследовали с помощью проточной цитометрии на BD LSRII, гейтированном для исключения нежизнеспособных клеток, и анализировали с использованием программного обеспечения Flowing Software (Turku Centre for Biotechnology). IC₅₀ рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6.

[0113] Четыре антитела (hBU12 к CD19, антитело к антигену 1 (сAg-1), 1C1 к EphA2 и HuMab CD74-011 к CD74) исследовали с использованием доменов, блокирующих спирализованную спираль. Антитело CD74 содержит легкую цепь (SEQ ID NO: 1) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 2). Проводили слияние последовательностей для A3B3, A4B4, CVel, antiPO и dHLX на N-конце с легкой и тяжелой цепями антител. Для исследования в отношении связывания использовали конкурентные анализы на основе FAC для учета высоких концентраций конкурирующего средства, необходимых для вытеснения исходного антитела, и результаты приведены в таблицах 2-5. Другие антитела, которые можно конъюгировать с образующим спирализованную спираль пептидом, представляют собой SEQ ID NO: 3-19. SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи hBU12, и SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи hBU12. SEQ ID NO: 5 представляет

собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи LG 2H12, и SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 2H12 HI. SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность константной области легкой цепи; PRT/1; homo sapiens. SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность CH1-CH3; PRT/1; homo sapiens. SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность CH1-CH3 тяжелой цепи (без С-концевого К); PRT/1; homo sapiens. SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность CH1-CH3 тяжелой цепи S239C; PRT/1; homo sapiens. SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность CH1-CH3 тяжелой цепи S239C (без С-концевого К); PRT/1; homo sapiens. SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи для h7G3, CD123 Ab, и SEQ ID NO: 13 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи для h7G3, CD123 Ab. SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи H1F6, CD70 Ab, и SEQ ID NO: 15 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи H1F6, CD70 Ab. SEQ ID NO: 16 представляет собой аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи гуманизированного 20F3 LD, CD352 Ab, и SEQ ID NO: 17 представляет собой аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HD, CD352 Ab. SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность hLiv1 mAb2 HG; PRT/1; искусственную, и SEQ ID NO: 19 представляет собой аминокислотную последовательность hLiv1 mAb2 LG; PRT/1; искусственную.

Таблица 2. Значения IC₅₀ различных маскированных антител, связывающихся с клетками Raji

MAb	IC₅₀ (нМ)	Кратность изменения
hBU12ec	3,6	--
A3B3 hBU12ec	298	83
A4B4 hBU12ec	>1000	>300
Cvel hBU12ec	>1000	>300
AntipO hBU12ec	138	38
dHLX hBU12ec	>1000	>300

hBU12ec с блокатором шарнира (Hinge hBU12ec)	971	269
hBU12ec с блокатором шарнира, нерасщепляемый (Hinge hBU12ec)	602	167

Таблица 3. Значения IC₅₀ различных маскированных антител, связывающихся с клетками Ramos (mAb к антигену 1)

mAb	IC₅₀ (нМ)	Кратность изменения
cAg-1ec	1,3	--
cAg-1ec с блокатором шарнира (Hinge cAg-1ec)	60	46
A3B3 cAg-1ec	45	34
A4B4 cAg-1ec	1205	927
Cvel cAg-1ec	1389	1068
antiPO cAg-1ec	34	26
dHLX cAg-1ec	302	233

[0114] Связывание маскированных антител hBU12 оценивали на CD19-положительных клетках Raji. Исследовали различные спирализованные спирали, например, A3B3, A4B4, antiPO и dHLX, а также блокатор шарнира. См., например, таблицу 1 и международную патентную публикацию WO2014/193973. Существует очевидное различие между аффинностью спирализованной спирали и способностью блокировать параллельные гомодимерные блокирующие домены. A3B3 (спираль с микромолярной аффинностью) снижала связывание антитела в 83 раза, тогда как спираль с более высокой фемтомолярной аффинностью и ковалентная спираль (A4B4 и Cvel) снижали связывание более чем в 300 раз. Антипараллельная спираль (antiPO) не блокировала с 38-кратным уменьшением связывания. Домен, блокирующий спираль-петля-спираль (dHLX), демонстрировал более чем 300-кратное снижение связывания, а блокатор шарнира характеризовался снижением в 269 раз. В примере с hBu12 спирали A3B3 и antiPO блокировали меньше по сравнению с другими спиралями и

блокатором шарнира, но было трудно проанализировать блокирующую способность оставшихся доменов.

[0115] Маскированные антитела к сAg-1 предоставили возможность более проницательно взглянуть на блокирующую способность спирализованных спиралей. Блокированные блокатором шарнира, A3B3 и antiPO антитела к сAg-1 блокировали связывание в 20-50 раз. Блокированное dHLX антитело к сAg-1 было способно уменьшить связывание в 233 раза. A4B4 и CVel, две спирали с наибольшей аффинностью, показали самую высокую кратность изменения, приблизительно 1000-кратное уменьшение связывания. Исходя из этих данных, параллельные спирали с высокой аффинностью показали лучшую блокирующую способность, и их выбрали для дальнейшего исследования других антител

[0116] В экспериментах по исследованию 1C1 к EphA2 и HuMab-CD74-011 к CD74 было показано, что антитела трудно блокировать. Маскирующий домен CVel уменьшал связывание в 43 раза для 1C1 и в 26 раз для HuMab-CD774-01. Маскирующий домен dHLX уменьшал связывание 1C1 с EphA2 в 16 раз, а блокатор шарнира уменьшал связывание HuMab-CD74-011 с CD74 в 14 раз. Остальные исследованные маскирующие домены были неспособны изменить связывание антитела (изменение от 0,6 до 6 раз). Для улучшения блокирующей панели разработали второе поколение маскирующих доменов спирализованных спиралей.

[0117] Все блокирующие домены второго поколения представляли собой параллельные спирализованные спирали с наномолярной или более высокой аффинностью между двумя пептидами. Кроме того, для исследования вклада N-концевого дисульфида в способность блокировать, каждую спирализованную спираль разработали с N-концевым цистеином. Четыре новые пары спирализованных спиралей (с N-концевым цистеином и без него) и Vel (не содержащая цистеин версия CVel) присоединяли к антителу, направленному против антигена 1, и исследовали в отношении блокирования. Все пять пар спирализованных спиралей (с N-концевым цистеином и без него) были способны уменьшать связывание антитела более чем в 200 раз. Эти эксперименты по связыванию показали, что маскирующие домены на основе спирализованных спиралей, как правило, успешны, при условии, что спирали являются параллельными с наномолярной или более высокой аффинностью.

Эксперименты по насыщающему связыванию

[0118] 2×10^5 указанных клеток (Raji, SW780, HT1080) объединяли с серийным разведением указанного антитела в буфере для окрашивания (PBS, 5% FBS, 0,2% NaN₃). Образцы инкубировали в течение 1 часа на льду и дважды отмывали ледяным буфером для

окрашивания. Клетки ресуспендировали с антителом к IgG-AF647 человека (Jacksonimmuno, разведение 1: 200 в буфере для окрашивания) в течение 1 часа на льду. Клетки дважды промывали ледяным буфером для окрашивания и ресуспендировали в буфере для окрашивания. Меченые клетки исследовали с помощью проточной цитометрии на BD LSRII, гейтированном для исключения нежизнеспособных клеток, и анализировали с использованием Flowing Software (Turku Centre for Biotechnology). Kd рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6.

[0119] Второе поколение маскированных антител к cAg-1 также исследовали в отношении связывания с использованием анализов насыщающего связывания на основе FAC для связывания с положительными в отношении антигена 1 клетками Raji. Как показано в таблице 4 и на фиг. 4, блокирование cAg-1 являлось переменным в зависимости от используемой пары спирализованных спиралей. A2B1 cAg-1 уменьшало связывание в 101 раз, M15 в 201 раз и Vel в 279 раз. M11 и Fos/Jun снижали связывание в 520 раз и в 472 раза соответственно. Отсутствовало явное преимущество в отношении добавления N-концевого дисульфида для M11 и M15, что приводило к более низкой разнице в связывании. Для A2B1 добавление N-концевой связи удвоило уменьшение связывания.

[0120] Аналогичные исследования также проводили на клетках HT1080 и клетках SW780. Значения Kd обобщенно представлены в таблицах 6 и 7. В некоторых случаях наблюдали неспецифическое связывание, по-видимому, из-за домена спирализованной спирали, взаимодействующего с поверхностью клетки. Вследствие этого значение Kd не может быть точно определено, и эти случаи обозначены *N/A. Как показано в таблице 5 для клеток HT1080, A2B1 cAg-1 уменьшало связывание в 514 раз, M15 cAg-1 в 549 раз и M11 cAg-1 в 1336 раз. Отсутствовало явное преимущество в отношении добавления N-концевого дисульфида для A2B1 и M15. Как показано в таблице 6 в клетках SW780, A2B1 cAg-1 уменьшало связывание в 101 раз, M15 cAg-1 в 153 раза, M11 cAg-1 в 216 раз и Vel в 252 раза.

[0121] Связывание немаскированных и маскированных спирализованной спиралью антител к Ag2 человека также оценивали на клеточных линиях HT1080, HCT116 и SW780 с помощью проточной цитометрии. Увеличивающуюся концентрацию каждого маскированного антитела добавляли к антиген-положительным клеткам и инкубировали в течение 30 минут на льду. Связанные антитела обнаруживали с использованием меченого флуорофором антитела к Fc человека, и данные наносили на график с использованием GraphPad Prism. Значения Kd обобщенно приведены в таблицах 8-10. Как показано в таблице 7 для клеток HT1080, A2B1

cAg-2, M15 cAg-2, M11 cAg-2 и Vel cAg-2 снижали связывание по меньшей мере в 95 раз. Путем сравнения эффектов маскирования антитела к Ag2 с использованием либо спирализованной спирали CVel, либо спирализованной спирали Vel в трех различных клеточных линиях, данные показали, что спирализованная спираль Vel ингибировала связывание в большей степени, чем CVel (фиг. 7A-C).

Таблица 4. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками Raji

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
cAg-1ec	0,3	1
A2B1 cAg-1ec	33,0	101
M15 cAg-1ec	65,5	201
M11 cAg-1ec	169,5	520
Fos/Jun cAg-1ec	153,9	472
Vel cAg-1ec	90,9	279
CA2B1 cAg-1ec	73,2	224
CM11 cAg-1ec	33,0	101
CM15 cAg-1ec	104,1	319

Таблица 5. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками HT1080

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
Анти-Ag1	1,1	--
A2B1-анти-Ag1	531	483
CA2B1-анти-Ag1	566	514
M15-анти-Ag1	469	426
CM15-анти-Ag1	604	549
M11-анти-Ag1	1470	1336
CM11-анти-Ag1	939	853

Vel-анти-Ag1	1040	946
Fos-Jun-анти-Ag1	*N/A	--

Таблица 6. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками SW780

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
Анти-Ag1	1,15	--
A2B1-анти-Ag1	134	116
CA2B1-анти-Ag1	116	101
M15-анти-Ag1	*N/A	--
CM15-анти-Ag1	177	153
M11-анти-Ag1	533	463
CM11-анти-Ag1	249	216
Vel-анти-Ag1	290	252
CVel-анти-Ag1	292	252
Fos-Jun-анти-Ag1	*N/A	--

Таблица 7. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками HT1080

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
Анти-Ag2	21,0	--
A2B1-анти-Ag2	*N/A	--
CA2B1-анти-Ag2	> 2000	> 95
M15-анти-Ag2	> 2000	> 95
CM15-анти-Ag2	> 2000	> 95
M11-анти-Ag2	2000	95
CM11-анти-Ag2	> 2000	> 95
Vel-анти-Ag2	> 2000	> 95
CVel-анти-Ag2	2000	95

A4B4-анти-Ag2	*N/A	--
---------------	------	----

Таблица 8. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками

HCT116

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
Анти-Ag2	7,8	--
A2B1-анти-Ag2	*N/A	--
CA2B1-анти-Ag2	> 2000	> 256
M15-анти-Ag2	> 2000	> 256
CM15-анти-Ag2	> 2000	> 256
M11-анти-Ag2	> 2000	> 256
CM11-анти-Ag2	2000	256
Vel-анти-Ag2	> 2000	> 256
CVel-анти-Ag2	> 2000	> 256
A4B4-анти-Ag2	*N/A	--

Таблица 9. Значения Kd маскированных антител, связывающихся с клетками

SW780

Антитело	Kd (нМ)	Кратность изменения
Анти-Ag2	9,6	--
A2B1-анти-Ag2	*N/A	--
CA2B1-анти-Ag2	800	83
M15-анти-Ag2	> 2000	> 208
CM15-анти-Ag2	> 2000	> 208
M11-анти-Ag2	> 2000	> 208
CM11-анти-Ag2	> 2000	> 208
Vel-анти-Ag2	> 2000	> 208
CVel-анти-Ag2	> 2000	> 208
A4B4-анти-Ag2	*N/A	--

Пример 2: Активности маскирования различных образующих спирализованную спираль пептидов

[0122] В таблице 10 показана кратность уменьшения связывания для различных пар образующих спирализованную спираль пептидов, включенных в различные антитела и исследованных на разных клеточных линиях. Активность исследовали с использованием антитела hBU12, cAg-1, 1C1, HuMab-CD74-011 и антитела к антигену 2, обозначенного hAg-2. Более чем 100-кратное маскирование наблюдали для hBU12ec на Raji, cAg-1ec на Ramos и hAg-2 на Raji.

Таблица 10. Активности маскирования различных образующих спирализованную спираль пептидов

Название спирали	hBU12ec (Raji)	cAg-1 ec (Ramos)	1C1ec (κ EphA2) (PC3)	hAg-2 (Raji)	HuMab-CD74-011 (Daudi)
Hinge (блокатор шарнира)	269	45	0,6	28	14
A3B3	83	34	2		
A4B4	>300	927	2,2	>190	6,1
CVel	>300	1068	43	>190	26
antipO	38	26	0,9		
dHLX	>300	233	16		
Vel		740		>125	
A2B1		221		>125	
M15		496		>125	
M11		390		>125	
Fos/Jun		218			
Cys-A2B1		225		>125	
Cys-M15		499		>125	
Cys-M11		691		>125	
Cys-Fos/Jun		1027*			

Пример 3: Расщепляющая активность различных сайтов протеаз различными протеазами

[0123] Все MMP активировали посредством инкубации с 1,25 мМ 4-аминофенилацетатом ртути (APMA) при 37°C в течение от 1 часа вплоть до 24 часов. Легумаин активировали через 2 часа инкубации при 37°C в 50 мМ ацетате натрия, 100 мМ NaCl, pH 4,0.

[0124] Для оценки профиля расщепления последовательностей расщепления антитела (10 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с 400 пмоль/мин нормализованных протеаз, как указано в сообщенных производителем значениях. Расщепление оценивали с использованием сверхэффективной жидкостной хроматографии Waters Acquity/Xevo UPLC, где расщепленные и нерасщепленные фрагменты восстанавливали с использованием избыточного DTT и разделяли с использованием 3 мкм колонки PLRP-MS (Agilent) и анализировали с использованием UNIFI (Waters). Как показано на фиг. 5, PLRP-MS использовали для определения расщепления пептидной последовательности. Легкая цепь антитела к антигену 1 с CVel характеризуется расчетной массой, составляющей 29639,9 Да и наблюдаемой массой, составляющей 29640,2 Да. Расщепленная легкая цепь антитела к антигену 1 характеризуется расчетной массой, составляющей 24623,3 Да, и наблюдаемая масса составляла 24623,8 Да.

[0125] Профиль расщепления протеазой трех сайтов расщепления протеазой (MMP#1, MMP#2 и CytomX) испытывали против панели ассоциированных с опухолью протеаз, таких как MMP человека и мыши/крысы, семейство ADAM, uPA, матриптаза и легумаин. Кроме того, испытывали расщепление последовательностей внеклеточными протеазами tPA и фактором Ха. Профили расщепления протеазой на этих трех сайтах расщепления протеазой показаны в таблице 11.

[0126] Пептиды (слитые на N-конце с основной цепью антитела hBU12) инкубировали при 37°C в течение ночи с нормализованной протеазой 400 пмоль/мин и оценивали в отношении расщепления. MMP#1 расщеплялся большинством MMP, а также uPA и матриптазой. MMP#2 расщеплялся почти всеми MMP, кроме MMP13, и не был затронут другими классами протеаз. Последовательность CytomX расщеплялась только с помощью uPA, матриптазы и легумаина. Вместе эти данные свидетельствуют о том, что MMP#1 является более неизбирательным среди классов протеаз по сравнению с двумя другими сайтами расщепления протеазами.

[0127] Для всех расщепленных антител, используемых в анализах связывания или цитотоксичности, маскированное антитело (50-250 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с активированным MMP2 человека (1 мкг).

Таблица 11. Профили расщепления протеазой на трех сайтах расщепления протеазой

Фермент	Последовательность расщепления:		
	MMP#1	MMP#2	CytomX
	GPLG*VR	IPVS*LR	LSGR*SDNH
MMP2 человека	Полное	Полное	Отсутствие
MMP7 человека	Полное	Полное	Отсутствие
MMP9 человека	Полное	Полное	Отсутствие
MMP13 человека	Полное	Минимальное	Отсутствие
MMP2 мыши	Полное	Частичное	Отсутствие
MMP7 мыши	Частичное	Полное	Отсутствие
MMP9 крысы	Частичное	Полное	Отсутствие
Ura	Частичное	Отсутствие	Полное
Матриптаза	Полное	Минимальное	Полное
Легумаин	Отсутствие	Минимальное	Полное
tPA	--	Отсутствие	Отсутствие
Фактор Ха	Минимальное	Отсутствие	Отсутствие
ADAM (человека, мыши)	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие

Пример 4: Изменения в pI при маскировании антител

[0128] Для антител проводили замену буфера на 10 mM фосфата натрия, pH 6,5, и разбавляли до рабочей концентрации, составляющей 2 мг/мл. Образец разбавляли в растворе, содержащем мочевины, амфолиты-носители, метилцеллюлозу и два маркера pI при pI 6,14 и 9,5. Образцы анализировали с использованием капиллярной системы IEF iCE3 (Protein Simple), и изоэлектрическую точку рассчитывали с использованием двух стандартов. Изоэлектрическую точку (pI) измеряли для оценки потенциальных возмущений дополнительных маскирующих доменов. В таблице 12 показаны рассчитанные и измеренные

значения рI маскированных антител hBU12ec (анти-cd19) по сравнению с контрольным антителом hBU12ec. Измеренное значение рI исходного антитела (8,3) увеличивалось путем добавления блокаторов шарнира (8,7-8,8), а также спирализованных спиралей A4B4 и dHLX (9,1). Спираль CVel снижала рI до 7,2. Как правило, рI маскированных антител к hBU12 находился в пределах 1 единицы от исходного. Все маскированные антитела к Ag-1 характеризовались значениями рI от 7,7 до 8,8, где связанные на N-конце спирализованные спирали, как правило, характеризовались более низким значением рI, чем их несвязанные аналоги, как показано в таблице 13.

Таблица 12. Изменения в рI при маскировании антител различными образующими спирализованную спираль пептидами

Образец	рI главного пика	Рассчитанное значение
hBU12ec (контроль)	8,3	
HgM2 hBU12ec V6	8,8	8,2
HgNC hBU12ec	8,7	8,2
A4B4 hBU12ec	9,1	8,5
CVel hBU12ec	7,2	7,1
dHLX hBU12ec	9,1	8,5

Таблица 13. Изменения в рI для образующих спирализованную спираль пептидов, соединенных с cAg-1 ec.

Образец	рI главного пика
A2B1 cAg-1 ec	8,3
M11 cAg-1 ec	8,8
M15 cAg-1 ec	8,2
FJ cAg-1 ec	8,6
Vel cAg-1 ec	N/A*
CA2B1 cAg-1 ec	7,7
CM11 cAg-1 ec	8,2
CM15 cAg-1 ec	7,7
CFJ cAg-1 ec	7,9

CVel cAg-1 ec	7,1
CA4B4 cAg-1 ec	8,5

Пример 5: Фармакокинетические (PK) значения маскированных антител

[0129] Эксперименты по фармакокинетике (PK) проводили с использованием радиоактивно меченных антител. Антитела (1 мг) инкубировали с 55 мкКи N10 сукцинимидилпропионата, [пропионат-2,3-3H] - (Moravek Biochemicals, Brea, CA, 80 Ки/ммоль, 1 мКи/мл, 9:1 раствор гексан:этилацетат) в течение 2 часов при комнатной температуре при pH 8,0. Смесь центрифугировали при 4000 g в течение 5 минут и нижний водный слой перемещали. Водный слой разбавляли и концентрировали четыре раза с использованием центробежных фильтрующих блоков Amicon Ultra-15 (Millipore, номер по каталогу: UFC903024, MWCO (номинальное отсечение по молекулярной массе) - 30 кДа) для удаления избытка радиоактивного материала. Антитела с радиоактивной меткой фильтровали через стерильные центрифужные фильтрующие блоки Ultrafree-MC 0,22 мкм (Millipore, Billerica, MA) и конечную концентрацию антитела или ADC измеряли спектрофотометрически. Удельную активность (мкКи/мг) каждого продукта определяли с помощью метода жидкостно-сцинтилляционного счета. Антитела с радиоактивной меткой вводили с помощью инъекции в дозе, составляющей 0,5 мг/кг мышам Balb/C через хвостовую вену (шесть животных на дозовую группу, распределенных случайным образом). Кровь забирали в пробирки с K₂EDTA через подкожную вену в различные моменты времени и перерабатывали в плазму. Образцы плазмы добавляли в жидкую сцинтилляционную смесь Ecoscint-A (National Diagnostics), а общую радиоактивность измеряли с помощью метода жидкостно-сцинтилляционного счета. Удельную активность радиоактивно меченных образцов использовали для расчета концентрации антител в каждый момент времени.

[0130] У мышей Balb/C оценивали фармакокинетику различных антител hBU12, маскированных блокаторами шарнира и спирализованной спиралью. Антитела вводили с помощью инъекции в дозе, составляющей 0,5 мг/кг и измеряли общее количество антител, обнаруженных в плазме. Маскированные антитела к hBU12 демонстрировали сходную фармакокинетику с исходным антителом, за исключением dHLX hBU12.

[0131] На фиг. 2 показаны концентрации антител в зависимости от времени для различных антител, маскированных спирализованными спиральями, инкубированных в плазме, по сравнению с контролем hBU12ec. Большая часть антител, маскированных

спирализованными спиралями, демонстрирует фармакокинетическое поведение, сходное с контролем.

Пример 6: Получение маскированных конъюгатов антител (ADC) и анализ цитотоксичности

[0132] Антитело, межцепочечные дисульфиды антител восстанавливали избытком ТСЕР (20 экв., pH 8, 37°C, 90 минут), который удаляли путем замены буфера с помощью спиновых фильтров Amicon (EMD Millipore UFC503096). Дисульфиды повторно окисляли (за исключением сконструированных тиолов) с использованием дегидроаскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich 261556) (20 экв., pH 7,4, комнатная температура, 45 минут, 2 добавления). Избыток дегидроаскорбиновой кислоты удаляли с помощью трех циклов разбавления и концентрирования в спиновых фильтрах Amicon. Пропиленгликоль добавляли к реакционной смеси до конечной концентрации, составляющей 50%. Раствор PBD-линкера (3 экв.) разбавляли пропиленгликолем и добавляли к повторно окисленному антителу (1 экв.), содержащему два свободных тиола, в положении 239. Реакции давали протекать в течение 30 минут, затем обрабатывали суспензией активированного древесного угля в воде в течение 30 минут. Активированный уголь удаляли фильтрованием и реакционную смесь дополнительно очищали с использованием колонки Nap5 (GE Healthcare Life Sciences, 17-0853-02). Для смешанных ADC с нагрузкой, составляющей 4 mc-MMAF, межцепочечные дисульфиды антител частично восстанавливали с использованием 2,1 эквивалента ТСЕР при pH 8 в течение 60 минут. Избыток ТСЕР затем удаляли двумя циклами разбавления и концентрирования. В это время к частично восстановленному антителу добавляли 4,4 молярных эквивалента лекарственного средства с линкером. После конъюгации избыток лекарственного средства с линкером удаляли с использованием тиоловой смолы Quadrasil MP в течение 15 минут с последующим обессоливанием в PBS, pH 7,4 с использованием гель-фильтрационной колонки PD-10. Для всех ADC нагрузку лекарственного средства определяли с помощью PLRP-MS, а степень агрегации определяли с помощью эксклюзионной хроматографии.

[0133] Анализы жизнеспособности клеток проводили с использованием RealTime-Glo (Promega). Клетки Ramos (700 клеток/лунку) высевали на 96-луночный планшет для культивирования с прозрачным дном в среде для культивирования в соответствии с протоколом поставщика. Разведения конъюгированного с PBD ADC добавляли в каждую лунку (от 1000 нг/мл до 0 нг/мл) и образцы инкубировали в течение 138 часов при 37°C.

Люминесценцию измеряли с использованием спектрофотометра для прочтения планшетов (Envision 4605). Данные аппроксимировали с использованием GraphPad Prism6 и рассчитывали IC₅₀. Значения IC₅₀ использовали для сравнения изменений цитотоксичности исходного ADC с маскированным ADC.

[0134] В таблице 14 показаны данные по связыванию и цитотоксичности для маскированных ADC по сравнению с контрольным ADC. Цитотоксичность антител, маскированных спирализованной спиралью, снижалась в такой же степени, что и связывание с клетками Raji или Ramos. Цитотоксичность восстанавливалась до того же уровня в пределах ошибки эксперимента, что и у контрольного антитела при удалении маскировки.

[0135] Маскированные антитела hBU12 (блокатор шарнира, A4B4, CVel) конъюгировали с пирролобензодиазепином (PBD) для получения маскированных ADC. Связывание для маскированных ADC оценивали с использованием конкурентных анализов FACS. Данные показали, что добавление PBD не влияет на способность блокирования. Маскированные антитела характеризовались снижением связывания > 100 по сравнению с исходным антителом. Когда маскирующий домен отщепляли, связывание восстанавливалось приблизительно в 2 раза по сравнению с исходным антителом.

[0136] Анализ цитотоксичности показал различие между ADC, блокированным с помощью блокатора шарнира, и двумя ADC, блокированных спирализованной спиралью. hBU12 с блокатором шарнира характеризовалось снижением цитотоксичности в 156 раз по сравнению с > 100 раз в данных в отношении связывания. ADC A4B4 hBU12 характеризовался 490-кратным снижением цитотоксичности по сравнению со снижением связывания > 60, а ADC CVel hBU12 показал 1317-кратное снижение цитотоксичности по сравнению со снижением связывания > 160. При расщеплении маскирующего домена CVel цитотоксичность восстанавливается в 1,2 раза по сравнению с исходным ADC. Для ADC hBU12 уменьшение связывания хорошо коррелирует с уменьшением цитотоксичности.

Таблица 14. Анализы цитотоксичности на маскированных антителах

Raji (NHL) – 100000 копий/клетка	Ramos (NHL) – 43000 копий/клетка
Данные в отношении связывания	Данные в отношении цитотоксичности

ADC			IC ₅₀ (нг/мл)	Кратность изменения
hBU12ec-1910(2)			0,1	
Hinge_v2-1910(2) (с блокатором шарнира)	>300	>100	12	156
A4B4-1910(2)	>600	>160	37	490
Cvel-191100(2)	>600	>160	100,4	1317
Повторно активированный Cvel-1910(2)			0,12	1,2

Пример 7: Ex vivo зимография маскированных антител

[0137] На фиг. 3 показан образец опухолевой ткани, с которым контактирует маскированное антитело. Антитело демаскируется вблизи опухолевых клеток, экспрессирующих протеазу, эффективную для демаскирования с антитела. Немаскированное антитело приводит к специфическому окрашиванию опухоли.

[0138] Собранные опухоли от мышей с ксенотрансплантатом замораживали в заливочной криосреде ОКТ и изготавливали криосрезы (5 мкм). Срезы блокировали сывороткой человека, инактивированной нагреванием, отмывали и инкубировали с мечеными AF647 антителами. Срезы опухоли предварительно обрабатывали протеазным коктейлем в течение 1 часа (1:100 РСIII и 50 мкМ галардина) в качестве контроля активности протеазы или с помощью PBS. Антитела инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, трижды отмывали с помощью TBST и герметично закрывали средой для заключения тканей, содержащей DAPI (ThermoFisher, P36962). Затем срезы опухоли визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа (Olympus) и оценивали в отношении связывания меченного AF647 антитела.

[0139] Для оценки связанного с опухолью протеазного расщепления маскированных антител использовали подход *ex vivo* для оценки активности MMP. Флуоресцентно меченные hAg-2 и CVel hAg-2 инкубировали на срезах опухоли HT1080. После инкубации срезы визуализировали в отношении связывания посредством флуоресцентного сигнала. CVel hAg-2 связывалось со срезом опухоли в той же степени, что и исходное антитело. Предварительная обработка среза опухоли ингибиторами протеаз отменяла связывание CVel

hAg-2. Эти данные позволяют предположить, что связывание маскированных антител зависит от протеазы.

[0140] Мышам, которым имплантировали ксенотрансплантаты HT1080, вводили дозу, составляющую 5 мг/кг каждого антитела (hAg-2, CVelAg-2, VelAg-2). Опухоли собирали через 1, 3 и 5 дней после введения дозы. В определенные моменты времени (1, 3, 4 дня) мышей умерщвляли и собирали ткани и плазму. Ткани гомогенизировали и антитело человека очищали от биологических образцов с использованием смолы IgSelect. Захваченное антитело восстанавливали и разделяли с помощью SDS-PAGE, а затем зондировали вестерн-блоттингом, используя конъюгированное с HRP антитело к Fc человека. Процент расщепленного антитела оценивали по денситометрии полос, соответствующих маскированным и немаскированным тяжелым цепям, которые различаются по размеру приблизительно на 5 кДа. Очень мало немаскированного антитела (<5%) обнаружили в плазме или печени в любой исследованный момент времени. На фиг. 6А и 6В показано расщепление антител к hAg-2, блокированных с помощью CVel и Vel, в указанной ткани. Расщепление антител разделяли на трех отдельных мышей для каждой временной точки. Четвертая мышь не содержала опухоль. На 3-й день VelhAg-2 продемонстрировало большее расщепление по сравнению с конструктором CVelhAg-2. Кроме того, в опухоли наблюдали больше расщепленного продукта по сравнению с нормальными тканями. На 4-й день VelhAg-2 показало постоянное, устойчивое расщепление маскированного конструктора по сравнению с более вариабельным расщеплением, наблюдаемым для CvelhAg-2.

Пример 8: Исследования на Vel-маскированных конъюгатах антитела к CD19 с лекарственным средством (ADC)

[0141] Связывание немаскированных и Vel-маскированных ADC к CD19 с различными последовательностями расщепления исследовали с помощью проточной цитометрии с использованием CD19-положительных клеток Ramos. Связанное антитело обнаруживали с использованием меченого флуорофором вторичного антитела к антителу человека, как показано на фиг. 8А.

[0142] Антипролиферативную активность ADC к CD19 оценивали на CD19-положительных клетках Ramos. Клетки Ramos инкубировали в течение 96 часов с ADC и влияние на пролиферацию клеток оценивали с использованием Cell Titer Glo (Promega), как показано на фиг. 8В.

[0143] Противоопухолевую активность конъюгатов немаскированных и Vel-маскированных конъюгатов антитела к CD19 с лекарственным средством исследовали на модели с использованием ксенотрансплантата Ramos на мышах NSG. Все ADC вводили с помощью интраперитонеальной инъекции в дозе, составляющей 6 мг/кг. Результаты показаны на фиг. 8С.

Пример 9: Исследования на маскированном антителе к CD3 мыши 145-2C11

[0144] Маскирование антитела к CD3 мыши 145-2C11 достигали с использованием последовательности Vel-IPV. Связывание оценивали с использованием клеток CD3 (+) HT-2 с помощью проточной цитометрии. Меченое флуорофором антитело к Fc мыши использовали для обнаружения связанных антител. Когда антитело к CD3 мыши маскировали с помощью Vel-IPV, наблюдали минимальное связывание антитела, как показано на фиг.9А.

[0145] Маскирование с помощью VEL-IPV улучшало мишень-опосредованное распределение лекарственного средства 145-2C11 у мышей BALB/с. Антитела метили с помощью ³H-пропионата посредством конъюгации с лизином и вводили внутривенно мышам BALB/с в дозе, составляющей 1 мг/кг. Концентрацию антител определяли с помощью сцинтилляционных измерений плазмы, взятой в разные моменты времени. Концентрация 145-2C11 в плазме была ниже обнаруживаемых количеств в течение 2 дней после введения дозы, тогда как концентрации Vel-IPV-145-2C11 можно было измерять вплоть до 14 дней после введения дозы, как показано на фиг. 9В.

[0146] Уменьшение высвобождения цитокинов с помощью антитела к CD3 145-2C11 (с каркасом mIgG2a) оценивали путем внутривенной инъекции у мышей BALB/с. Мышам вводили 25 мкг антитела, и содержания цитокинов в сыворотке определяли в серии моментов времени <24 часа после введения дозы. Значительные снижения IFN-гамма и IL-2 обнаруживали для маскированного антитела к CD3 по сравнению с немаскированным 145-2C11, как показано на фиг. 9С-D.

Пример 10: Исследования на маскированных антителах к Ag2 человека и мыши

[0147] Стабильность маскированных антител к Ag2 человека, несущих разные домены спирализованной спирали, оценивали с использованием внутривенного введения мышам BALB/с. Антитела вводили в дозе, составляющей 5 мг/кг. В заданный момент времени (3 дня) плазму собирали у мышей, которым вводили дозы. Антитело человека очищали от

плазмы с использованием смолы IgSelect. Захваченное антитело восстанавливали и разделяли с помощью SDS-PAGE, а затем зондировали вестерн-блоттингом с использованием конъюгированного с HRP антитела к Fc человека. Процент расщепленного антитела оценивали по денситометрии полос, соответствующих маскированным и немаскированным тяжелым цепям, которые различаются по размеру приблизительно на 5 кДа. Как показано на фиг. 10, M15 является нестабильным по сравнению с CM15. Между A2B1 и CA2B1 нет существенной разницы. Разница между Vel и CVel не является четко выраженной.

[0148] Мышиное реактивное антитело к Ag2 можно маскировать с использованием той же последовательности Vel и IPV, что использовали на антителе к Ag2 человека. Маскирование с помощью этих конструкторов блокировало связывание антител с Ag2-положительными клетками мыши, как показано на фиг. 11A.

[0149] Антитело к Ag2 мыши вызывает истощение тромбоцитов у мышей BALB/c при введении в однократной в/в дозе, составляющей 10 мг/кг. Напротив, это истощение не наблюдалось, когда мышам вводили Vel-IPV-анти-Ag2 в дозе, составляющей 10 мг/кг внутривенно. Результаты показаны на фиг. 11B.

[0150] Маскированное антитело Vel-IPV-Ag2 к Ag2 мыши улучшало фармакокинетику в плазме мышей BALB/c по сравнению с немаскированным антителом анти-Ag2, демонстрируя, что маскированное антитело способно избежать мишень-опосредованного распределение лекарственного средства. Антитела Vel-IPV-анти-Ag2 и анти-Ag2 метили ³H-проприонатом посредством конъюгации с лизином и вводили в/в мышам BALB/c в дозе, составляющей 1 мг/кг. Концентрацию антител определяли сцинтилляционным измерением плазмы, взятой в разные моменты времени. Концентрация анти-Ag2 в плазме была ниже обнаруживаемых количеств в течение 15 минут, тогда как концентрации Vel-IPV-анти-Ag2 можно было измерить вплоть до 7 дней после введения дозы. Результаты показаны на фиг. 11C.

[0151] Антитело к Ag2 мыши проявляло противоопухолевую активность в модели лимфомы A20, но вызывало сопутствующее истощение периферических Ag2(+) клеток. Маскированное антитело Vel-IPV-анти-Ag2 обладало сходной активностью, но устраняло влияние на истощение клеток. Антитело Vel-IPV-анти-Ag2 избегало периферического антиген-зависимого клиренса, но сохраняло связывание опухоли. Результаты показаны на фиг. 12A-D.

[0152] Для исследования способности маскирования улучшать фармакокинетику и переносимость вариантов IgG1-антител к Ag2 проводили серию исследований однократного

внутривенного введения яванским макакам. Исследованные IgG1-антитела к Ag2 являлись перекрестно-реактивными по отношению к Ag2 человека и яванского макака, который является в высокой степени консервативным у этих видов по экспрессии и последовательности. Оценка активности протеазы с помощью гелевой зимографии *in situ* панели тканей яванского макака и человека показала, что уровни активности протеазы также являлись высоко консервативными для этих видов. Таким образом, яванский макак представляет собой соответствующий вид для оценки влияния маскирования на фармакокинетику и переносимость антител к Ag2.

[0153] Фармакокинетику анти-Ag2 и Vel-IPV-анти-Ag2 оценивали с использованием общего анализа ELISA для общего антитела (TAb). В общем ELISA TAb используют 96-луночные планшеты для микротитрования, покрытые mAb к легкой цепи каппа человека, который связывается с легкой цепью каппа человека анти-Ag2 и Vel-IPV-анти-Ag2. Он не вступает в перекрестную реакцию с легкой цепью каппа яванского макака. Исследуемые образцы разводили до динамического диапазона анализа для анти-Ag2 (10 (LLOQ) - 1280 нг/мл (ULOQ)) или для Vel-IPV-анти-Ag2 (20 (LLOQ) - 2560 нг/мл (ULOQ)) с помощью не подвергнутой воздействию, объединенной в пробирках с K₂EDTA плазмы яванского макака. Разбавленные образцы вместе с QC и калибровочными стандартами подвергали минимально необходимому разведению (MRD), составляющему 1:20 с помощью буфера для анализа перед добавлением в заблокированные и промытые планшеты. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре планшеты промывали и обнаруживали связанный аналит с помощью биотинилированного mAb к легкой цепи каппа человека (идентичный клон в качестве реагента захвата) с последующим добавлением полимерной пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином (поли-HRP-SA). После инкубации и промывки субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) добавляли к планшетами и окрашивали в течение 10 минут. Реакцию останавливали с помощью 1 н. HCl и планшеты считывали на спектрофотометре для прочтения планшетов Spectromax M5 при 450-630 нм. Чистые значения поглощения импортировали в Watson LIMS версии 7.4.2, и проводили нелинейную регрессию 5-PL для преобразования поглощения в нг/мл общего антитела, присутствующего в образцах. Результат показан на фиг. 13A.

[0154] Антитело анти-Ag2 приводит к истощению периферических экспрессирующих Ag2 клеток яванского макака. Воздействия маскирования анти-Ag2 с использованием Vel-IPV оценивали путем сравнения истощения этих периферических Ag2(+)

клеток путем подсчета клеток. В дозе, составляющей 1 мг/кг анти-Ag2 вызывало выраженное уменьшение периферических Ag2(+) клеток, тогда как введение Vel-IPV-анти-Ag2 приводило к минимальным изменениям в той же популяции клеток. Доза, составляющая 10 мг/кг Vel-IPV-анти-Ag2, обеспечивала фармакодинамический эффект, аналогичный дозе анти-Ag2, составляющей 1 мг/кг. Результат показан на фиг. 13В.

[0155] Антитело анти-Ag2 также опосредует выработку цитокинов, таких как IL10. Влияние маскирования на выработку цитокинов оценивали с помощью анализа мультицитокиновой панели Lumiplex сыворотки от яванских макаков в различные моменты времени. Значительно уменьшенную выработку IL10 наблюдали для Vel-IPV-анти-Ag2 по сравнению с немаскированным антителом. Результат показан на фиг. 13С.

[0156] Антитело анти-Ag2 стимулирует противоопухолевую активность в ксенотрансплантатах L428 при четырехкратном введении дозы, составляющей 1 мг/кг внутривенно каждые 4 дня. Противоопухолевую активность антител Vel-анти-Ag2 с различными расщепляемыми протеазой линкерными последовательностями сравнивали на модели ксенотрансплантата L428. Vel-анти-Ag2, содержащее предусмотренную MMP-расщепляемую последовательность -PLGLAG-, обеспечивало противоопухолевый эффект, сходный с немаскированным антителом. Между тем, антитело Vel-анти-Ag2, содержащее скремблированную последовательность -LALGPG-, обеспечивало ослабленную противоопухолевую активность. Следует отметить, что оба Vel-маскированных антитела к Ag2 связывались с клетками L428 *in vitro*, что указывает на то, что различающаяся активность *in vivo* не связана с различиями в связывании для двух разных маскированных антител. Результаты показаны на фиг. 14А и 14В.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Сиэтл Дженетикс, Инк.
 Трэнг, Вивиан
 Левенгуд, Мэттью Р.

<120> ДВУХВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА, МАСКИРОВАННЫЕ СПИРАЛИЗОВАННЫМИ СПИРАЛЯМИ

<130> 057762-506990

<150> US 62/432472

<151> 2016-12-09

<160> 84

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 1

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
		20						25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100						105		

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Leu Val Arg Gly Ala Met Tyr Gly Thr Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 6

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 8
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 10
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 11
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
			20					25					30				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
		35					40					45					
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
	50					55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr		
65					70					75					80		
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85						90					95			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
			100					105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Cys	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
		115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
	130					135					140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
145					150					155					160		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
				165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
			180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
		195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
225					230					235					240		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
				245					250					255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
			260					265					270				

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 12

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

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

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

Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 114
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 13

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

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

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys Arg

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Thr Pro Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 17

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Lys Ser Val Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Gly Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 19

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 20
<211> 56
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 20

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

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

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

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 21
<211> 40
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 21

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

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

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 22

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 23

Pro Leu Gly Val Arg
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 25
<211> 56
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 25

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

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

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

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 26
<211> 40
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 26

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

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

Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr
35 40

<210> 27
<211> 56
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 27

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

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

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

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 28

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

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

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40

<210> 29

<211> 56

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 29

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

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

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

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 30

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

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

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40

<210> 31
<211> 48
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 31

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

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

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

<210> 32
<211> 38
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N-terminal Gln is optional

<400> 32

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

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

Glu Gln Val Ala Gln Leu
35

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 33

Ile Pro Val Ser Leu Arg
1 5

<210> 34
<211> 48
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 34

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

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

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

<210> 35
<211> 38
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N-terminal Gln is optional

<400> 35

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

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

Lys Lys Val Glu Lys Leu
35

<210> 36
<211> 61
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 36

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 37
<211> 45
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 37

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg
1 5 10 15

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

Arg Leu Glu Asn Glu Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40 45

<210> 38
<211> 61
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 38

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

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

Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Ser Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 39
<211> 45

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 39

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

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

Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr
35 40 45

<210> 40
<211> 61
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 40

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 41
<211> 45
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 41

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu
1 5 10 15

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

Arg Leu Glu Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40 45

<210> 42
<211> 61
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 42

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 43
<211> 45
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 43

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

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

Arg Leu Arg Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr
35 40 45

<210> 44
<211> 50
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 44

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

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

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

Ser Gly
50

<210> 45
<211> 40
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 45

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

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

Leu Glu Glu Gln Val Ala Gln Leu
35 40

<210> 46
<211> 50
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 46

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

Asp Gln Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
20 25 30

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

Ser Gly
50

<210> 47
<211> 40

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 47

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

Asp Gln Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu
35 40

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 48

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

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 49

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 50

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 51
<211> 12

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 51

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 52

Gly Gly Ala Ala
1

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 53

Leu Ala Ala Ala Ala
1 5

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 54

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 55

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 56

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 57

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 58

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 59

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 60

Pro Leu Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 61

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
1 5

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 62

Gly Pro Leu Gly Val Arg
1 5

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 63

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 64
<211> 47
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 64

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

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

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

<210> 65

<211> 47

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 65

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

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

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

<210> 66

<211> 39

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 66

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

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

Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu
35

<210> 67

<211> 38

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 67

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

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

Gln Val Ala Gln Leu Ala
35

<210> 68

<211> 42

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 68

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

Asp Gln Leu Gln Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu
35 40

<210> 69

<211> 41

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 69

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

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

Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Ala
35 40

<210> 70

<211> 42

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 70

Ala Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys
20 25 30

Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His
35 40

<210> 71
<211> 42
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 71

Ala Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala
1 5 10 15

Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val
20 25 30

Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr
35 40

<210> 72
<211> 46
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 72

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp
1 5 10 15

Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu
20 25 30

Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His
35 40 45

<210> 73
<211> 46
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 73

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys
1 5 10 15

Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu
20 25 30

Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr
35 40 45

<210> 74
<211> 29
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 74

Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala Ala Leu Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln
20 25

<210> 75
<211> 29
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 75

Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu
1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln
20 25

<210> 76
<211> 34
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 76

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala
1 5 10 15

Ala Leu Lys Tyr Lys Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu
20 25 30

Lys Gln

<210> 77

<211> 34

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 77

Glu Ala Cys Gly Ala Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala
1 5 10 15

Ala Leu Glu Lys Glu Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu
20 25 30

Glu Gln

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 78

Val Pro Met Ser Met Arg Gly Gly
1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 79

Arg Pro Phe Ser Met Ile Met Gly
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 80

Ile Pro Glu Ser Leu Arg Ala Gly
1 5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 81

Val Pro Leu Ser Leu Thr Met Gly
1 5

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 82

Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 83

Leu Ala Leu Gly Pro Gly
1 5

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 84

Tyr Gly Arg Ala Ala

1 5

2

1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухвалентное антитело, содержащее две пары легкой и тяжелой цепей, в котором N-концы легкой и тяжелой цепей по меньшей мере одной из пары соединены посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепей с мишенью.

2. Двухвалентное антитело по п. 1, в котором легкая и тяжелая цепи обеих пар соединены посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепей с мишенью.

3. Двухвалентное антитело по п. 1 или 2, где пептиды ассоциируются без образования дисульфидного мостика.

4. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

5. Двухвалентное антитело по п. 4, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством посредством остатка цистеина двухвалентного антитела.

6. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-5, в котором две пары легкой и тяжелой цепей являются одинаковыми.

7. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-5, в котором две пары легкой и тяжелой цепей являются различными.

8. Двухвалентное антитело по п. 7, в котором две пары легкой и тяжелой цепей характеризуются специфичностью в отношении разных мишеней.

9. Двухвалентное антитело по п. 7, в котором две пары легкой и тяжелой цепей характеризуются специфичностью в отношении одинаковой мишени.

10. Двухвалентное антитело по п. 8, в котором одна и только одна из пар соединена посредством линкеров, содержащих сайт расщепления протеазой, с образующими спирализованную спираль пептидами, которые ассоциируются с образованием спирализованной спирали, снижающей аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепей с мишенью.

11. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, в котором легкие цепи включают в себя переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, и тяжелые цепи включают в себя переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи.

12. Двухвалентное антитело по п. 10, в котором константная область тяжелой цепи включает в себя следующие области: CH1, шарнир, CH2 и CH3.

13. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, в котором две легкие цепи соединены с первым гетерологичным пептидом, и две тяжелые цепи - со вторым гетерологичным пептидом.

14. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где сайт расщепления протеазой представляет собой любой из MMP#1 или MMP#2.

15. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где мишень или одна из мишеней представляет собой любую из CD19, CD30, LIV-1, CD70 или CD74.

16. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где связывание снижается по меньшей мере в 100 раз.

17. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где связывание снижается в 200-5000 раз.

18. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где связывание снижается в 200-1500 раз.

19. Двухвалентное антитело по п. 4 или 5, где цитотоксичность конъюгата снижается по меньшей мере в 100 раз.

20. Двухвалентное антитело по п. 4 или 5, где цитотоксичность конъюгата снижается в 200-5000 раз.

21. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где образующие спирализованную спираль пептиды соединены с N-концами тяжелой и легкой цепей в одинаковой ориентации.

22. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-21, где образующие спирализованную спираль пептиды соединены с N-концами тяжелой и легкой цепей в противоположных ориентациях.

23. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где несколько копий образующего спирализованную спираль пептида соединены в тандеме с N-концами тяжелой и легкой цепей.

24. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где линкеры составляют 1-20, 2-15, 3-12, 4-10, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот в длину.

25. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где линкеры характеризуются аминокислотной последовательностью, содержащей или состоящей из GSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 43).

26. Двухвалентное антитело по любому предыдущему пункту, где сайт расщепления протеазой представляет собой сайт протеазы MMP2.

27. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, состоящий из последовательности

QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, состоящий из последовательности QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 31), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

28. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, содержащий последовательность

QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, содержащий последовательность QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 31), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

29. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, состоящий из последовательности QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 31), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, состоящий

из

последовательности

QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

30. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, содержащий последовательность QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVSLRSG

(SEQ ID NO: 31), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, содержащий последовательность QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 34), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

31. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, состоящий из последовательности GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 64), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, состоящий из последовательности GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 65), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

32. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, содержащий последовательность GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 64), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, содержащий последовательность GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 65), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

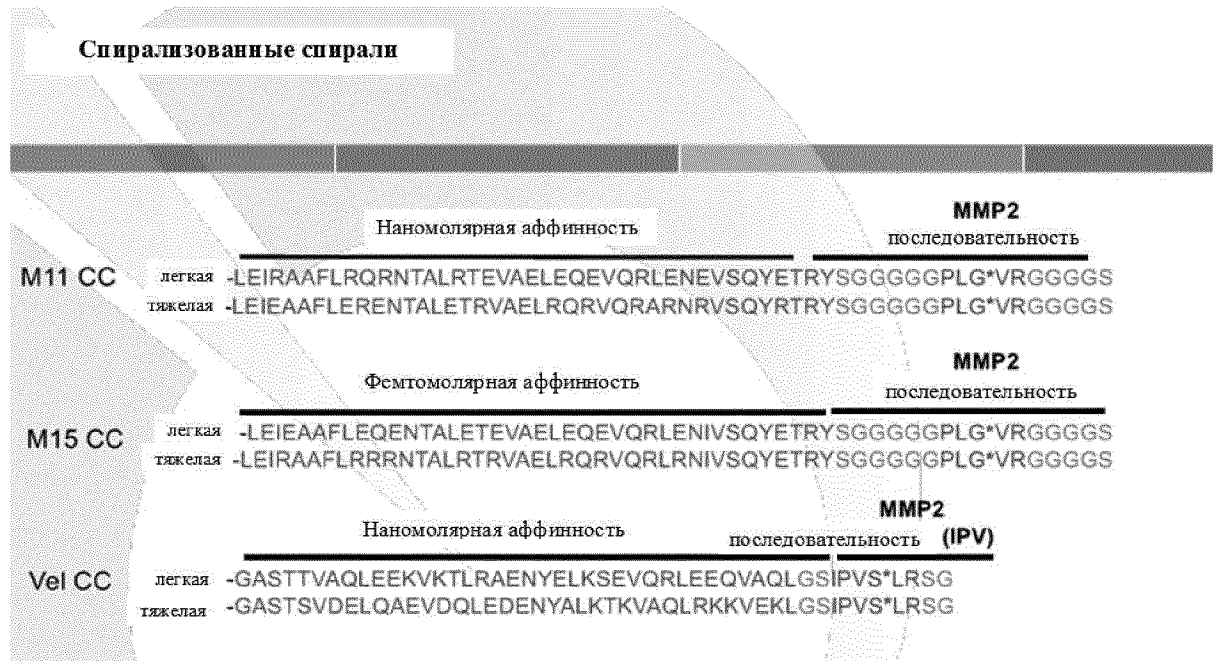
33. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, состоящий из последовательности GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 65), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, состоящий из последовательности GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPLSLRSG (SEQ ID NO: 64),

образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

34. Двухвалентное антитело по любому из пп. 1-24, где пептид, содержащий последовательность GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVSLRSG (SEQ ID NO: 65), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с легкой цепью, и пептид, содержащий последовательность GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPIVSLRSG (SEQ ID NO: 64), образует собой линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и образующий спирализованную спираль пептид, соединенный с тяжелой цепью.

35. Двухвалентное антитело по п. 8, где одна из мишеней представляет собой поверхностный антиген на иммунной клетке, а другая представляет собой поверхностный антиген на раковой клетке.

36. Двухвалентное антитело по п. 35, где поверхностный антиген на иммунной клетке представляет собой CD3.



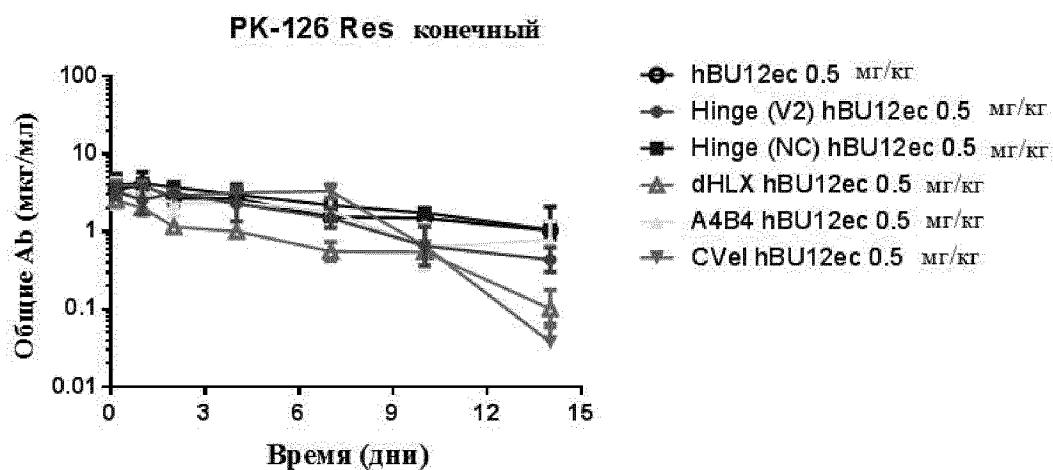
ФИГУРА 1А

Спирализованные спирали с N-концевым пистеином

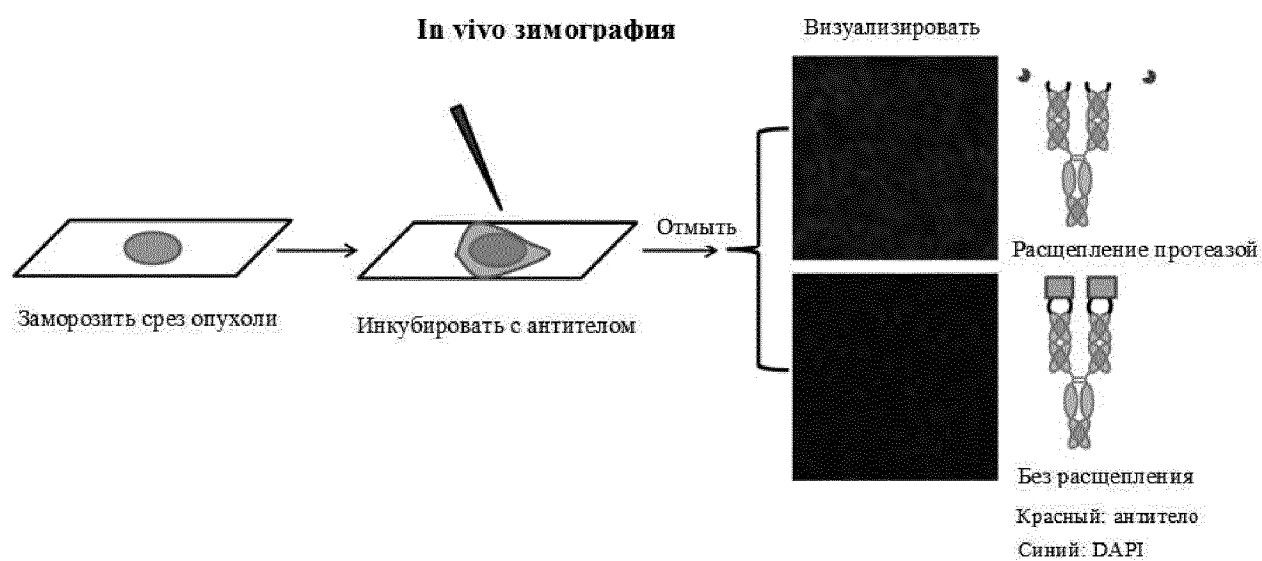
		MMP2	
		<u>последовательность</u>	
CM11 CC	легкая	-EACGALEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS	
	тяжелая	-EACGALEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYSGGGGGPLG*VRGGGGS	
		MMP2	
		<u>последовательность</u>	
CM15 CC	легкая	EACGALEIEAAFLREQNTALETEVAELEQEVQRLNIVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS	
	тяжелая	EACGALEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLNIVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS	
		MMP2	
		<u>последовательность (IPV)</u>	
CVeI CC	легкая	-EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVS*LRSG	
	тяжелая	-EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLSIPVS*LRSG	

ФИГУРА 1В

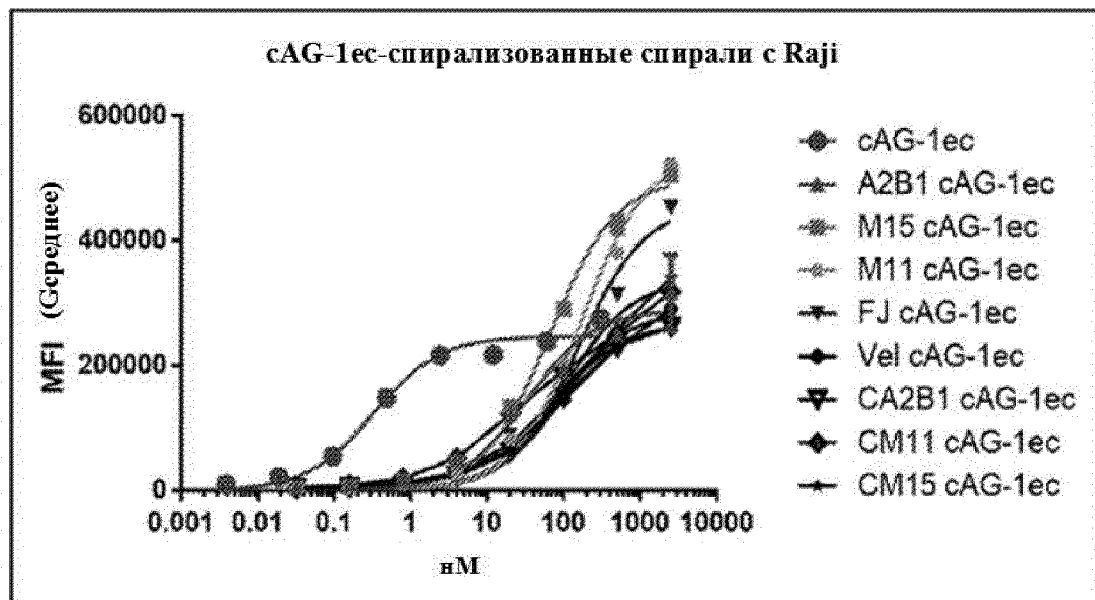
Концентрации антител в зависимости от времени для различных
маскированных спирализованной спиралью антител,
инкубированных в плазме, по сравнению с контролем hBU12ec



ФИГУРА 2



ФИГУРА 3

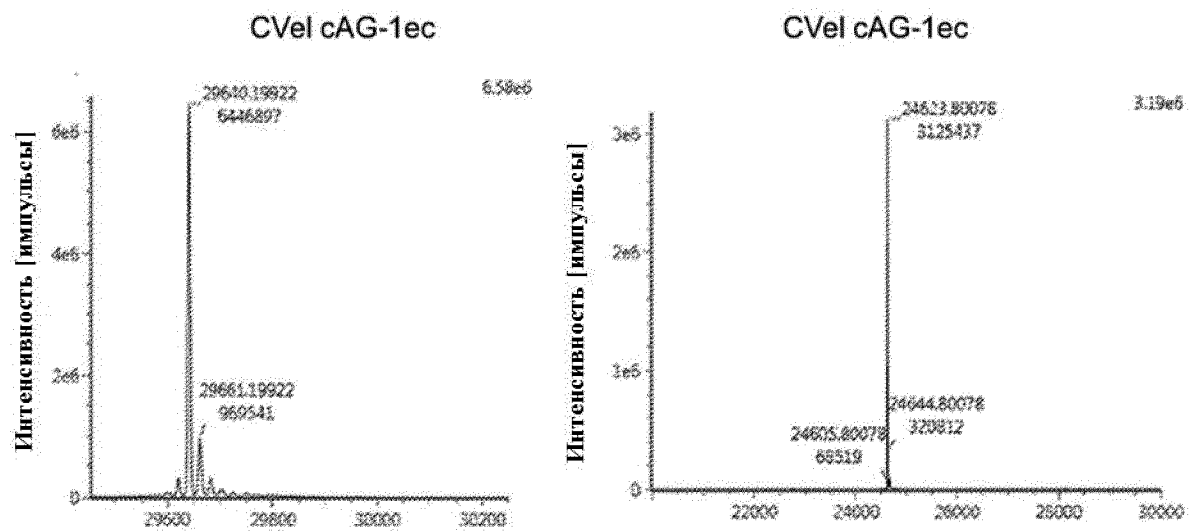


ФИГУРА 4

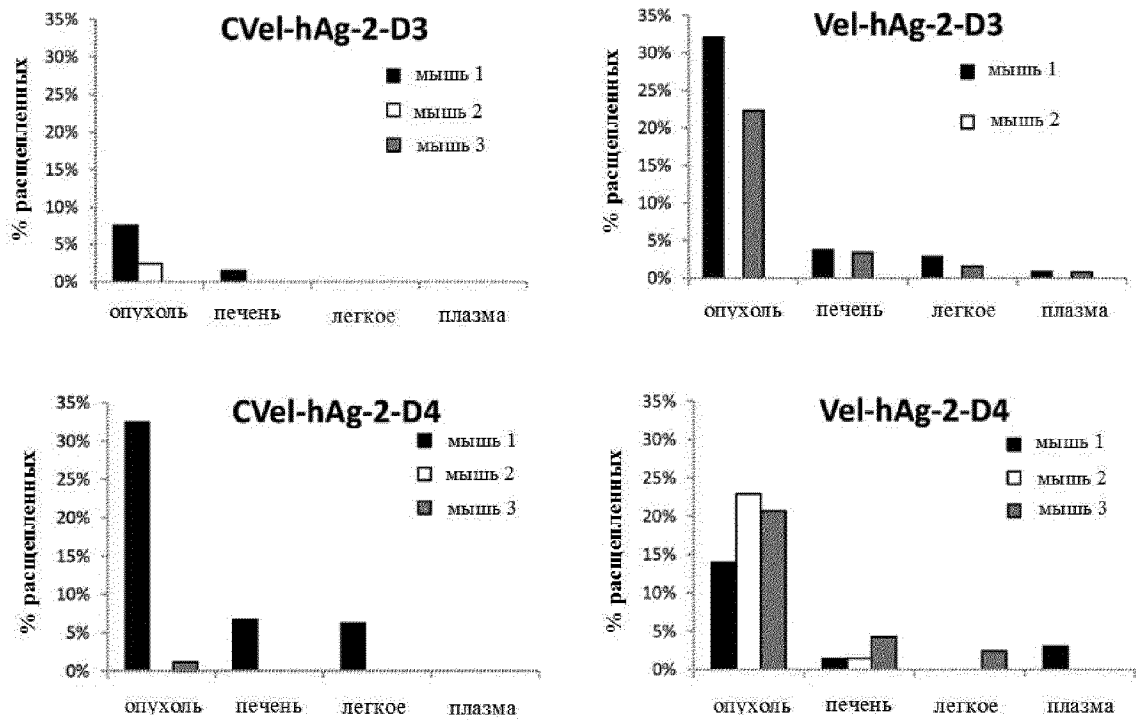
CVel спирализованная спираль

Последовательность
расщепления MMP2

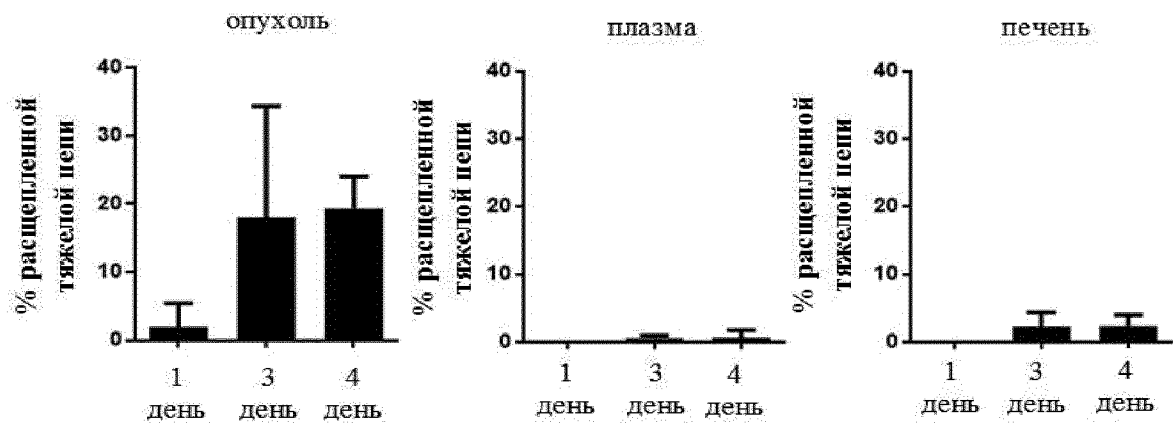
легкая -EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPVS*LRSG
тяжелая -EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSI PVS*LRSG



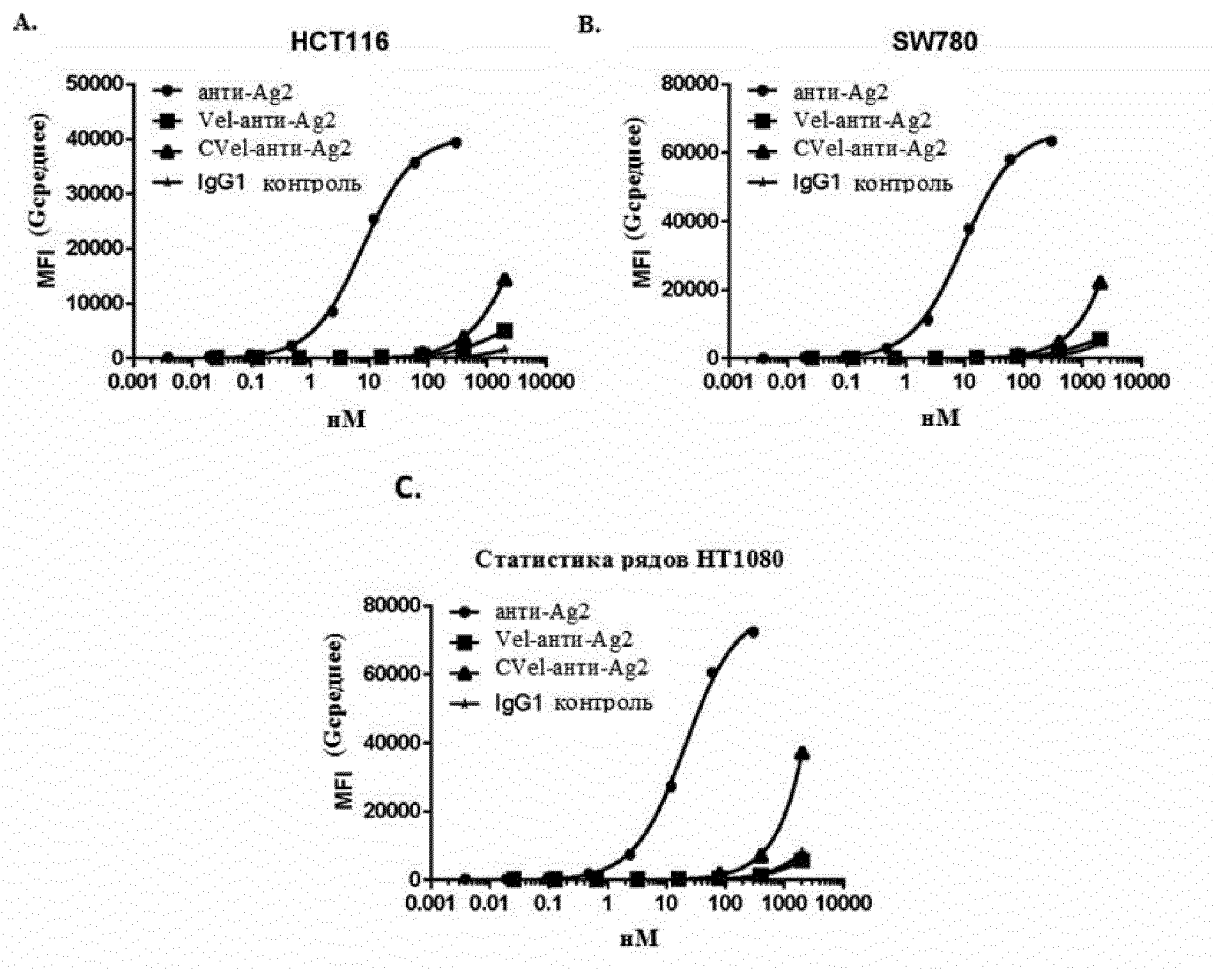
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6А



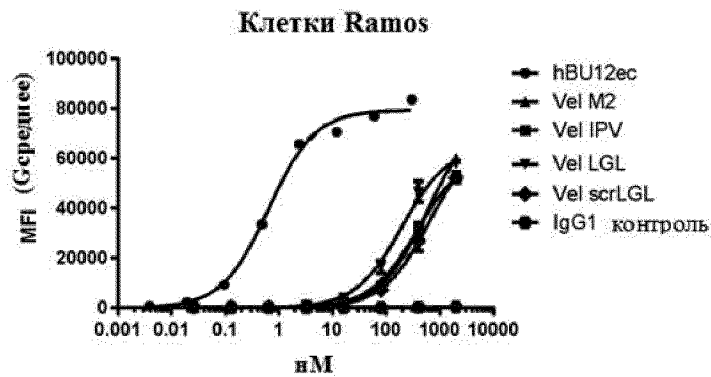
ФИГУРА 6В



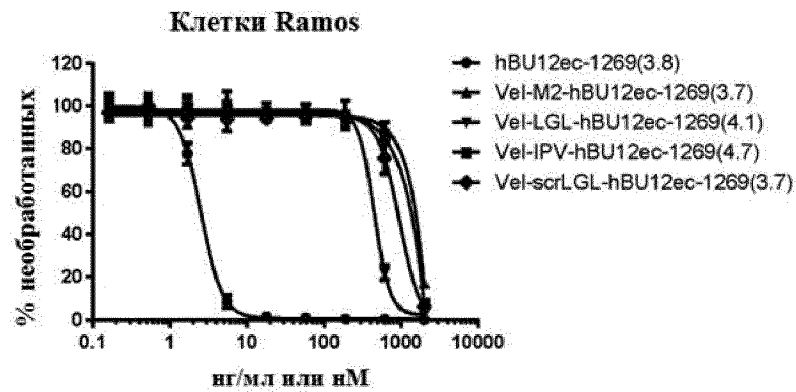
ФИГУРА 7

Сравнение немаскированных и Vel-маскированных ADC к CD19 с различными последовательностями расщепления

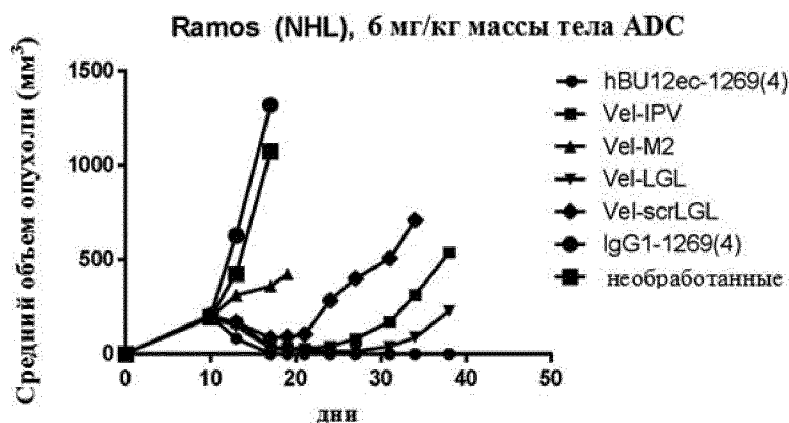
A.



B.



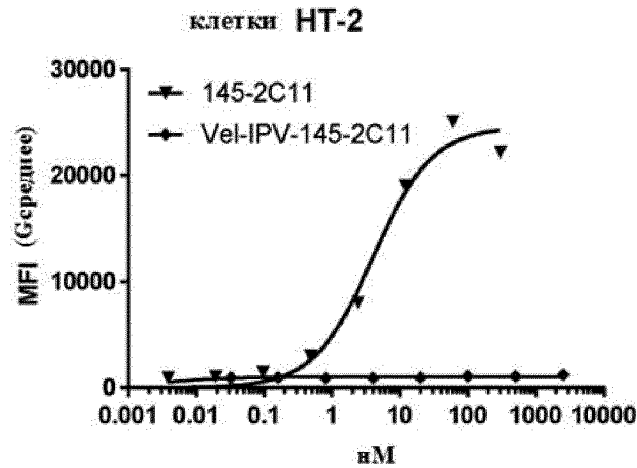
C.



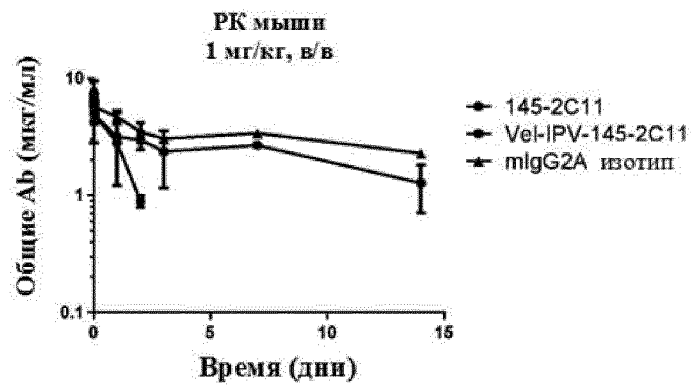
ФИГУРА 8

Сравнение немаскированного и маскированного антитела к CD3 мыши 145-2C11

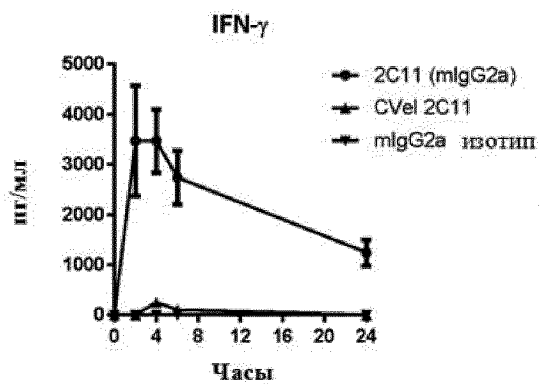
A.



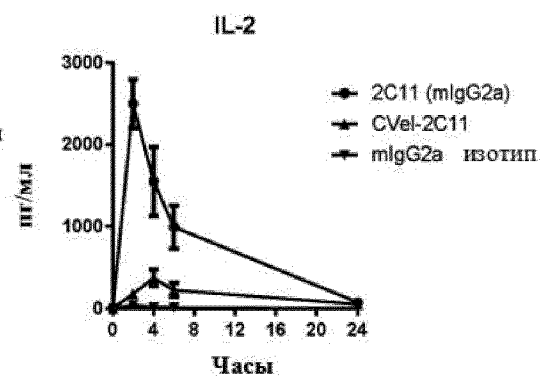
B.



C.

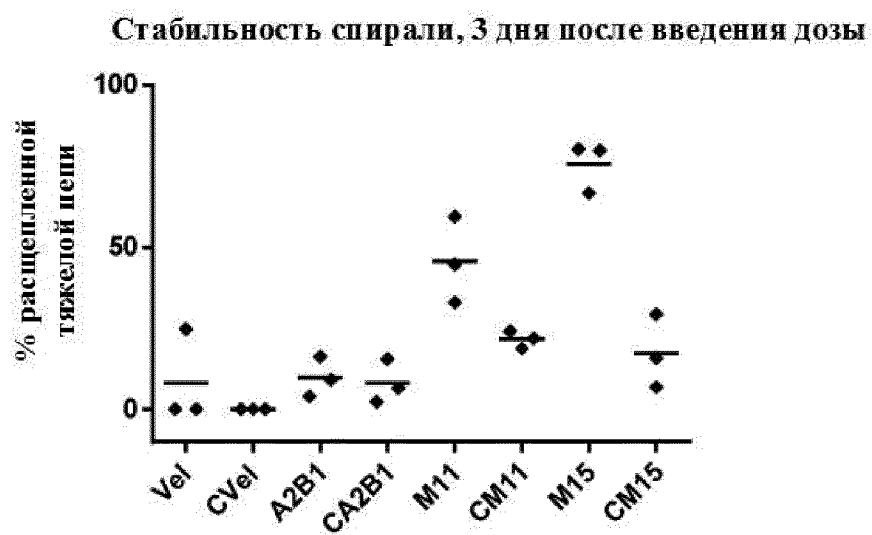


D.

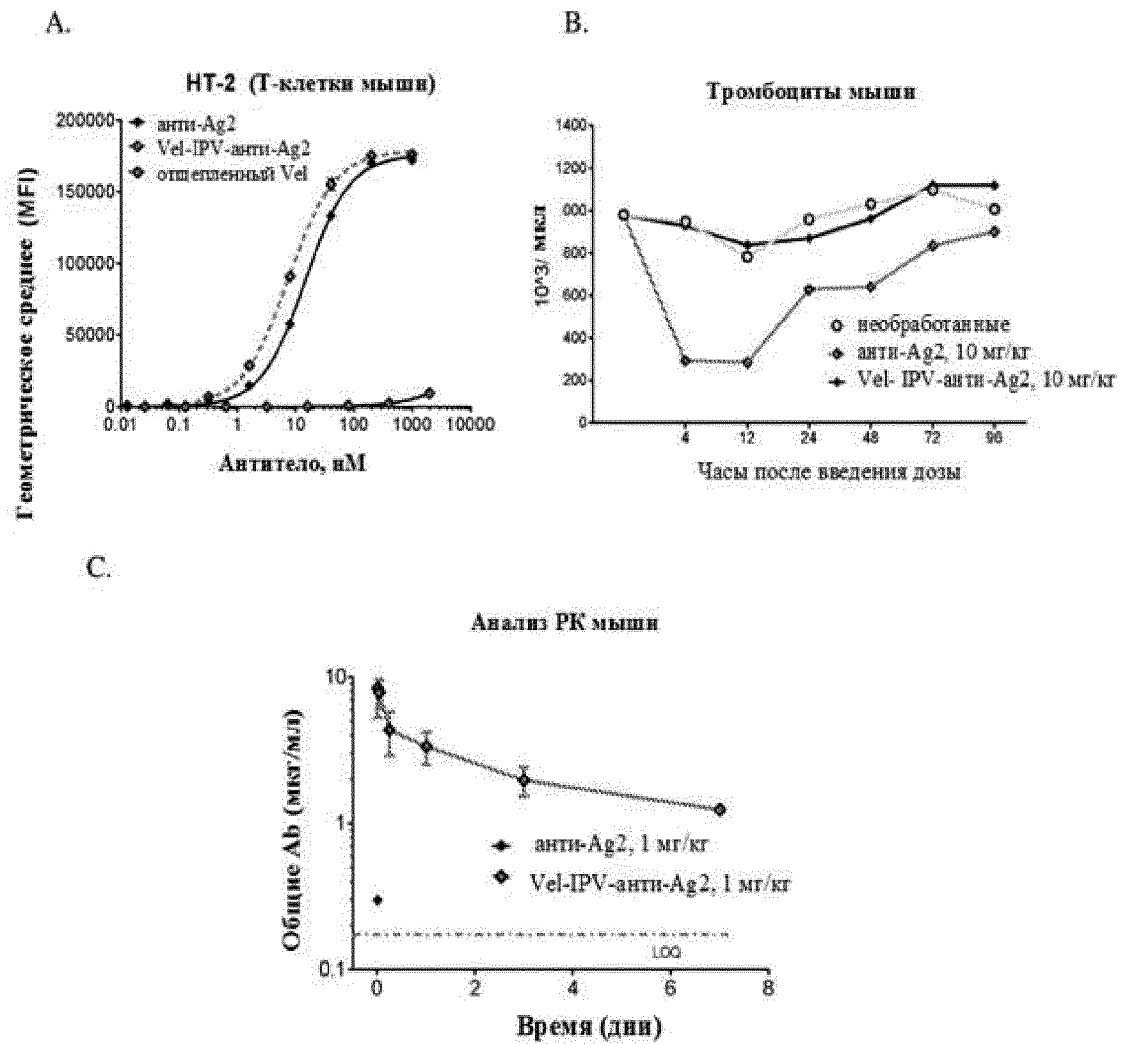


ФИГУРА 9

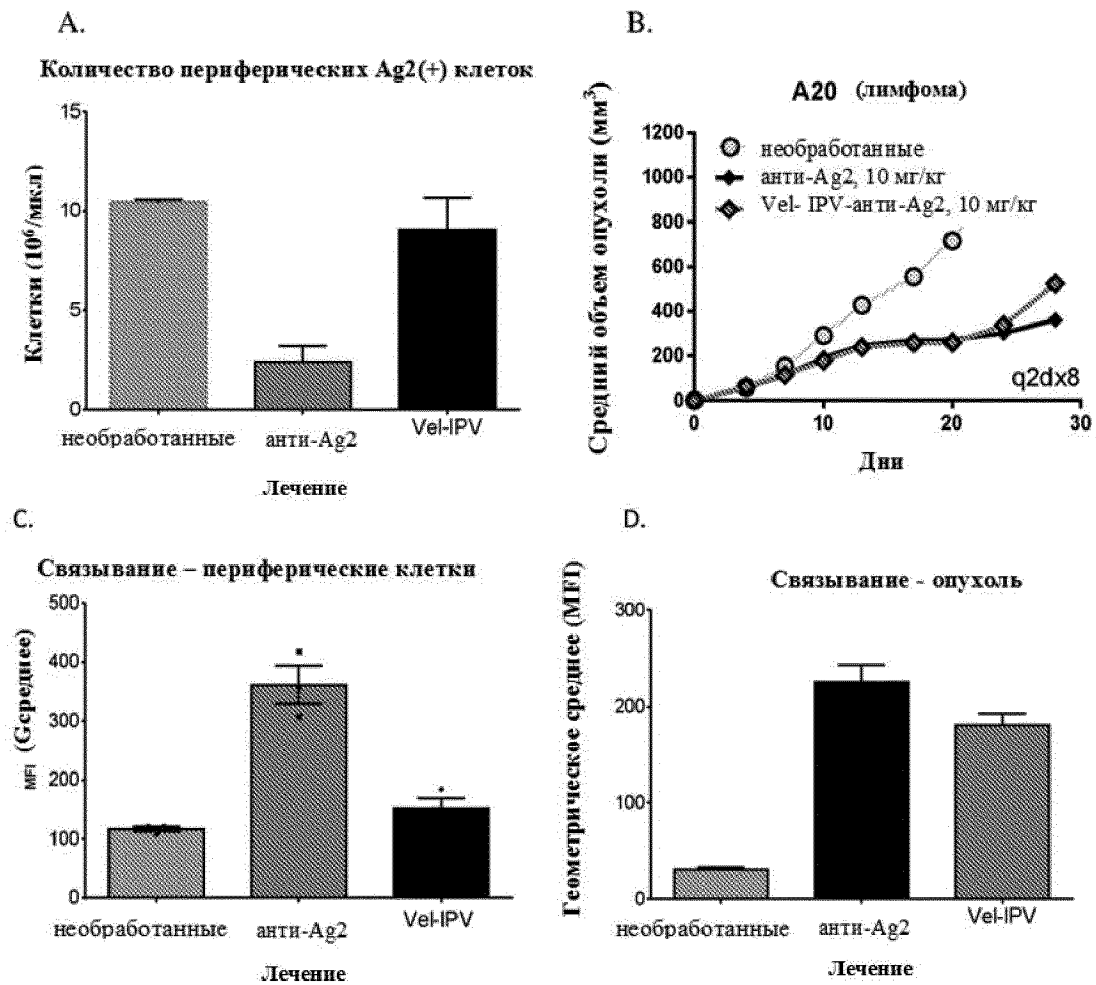
Исследование стабильности маскированных антител к Ag2 человека с различными доменами спирализованной спирали



ФИГУРА 10

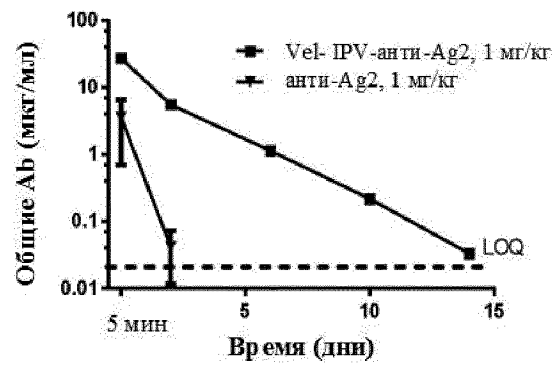


ФИГУРА 11.

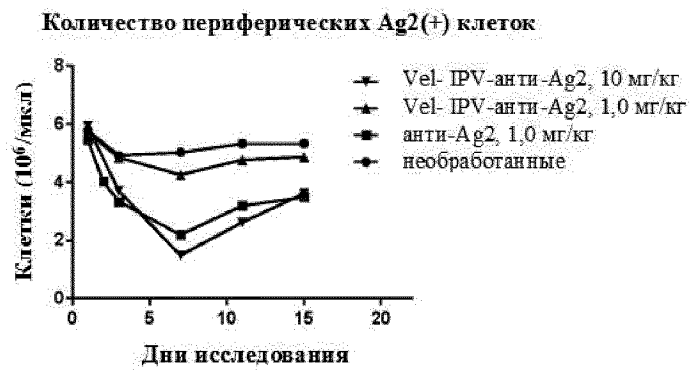


ФИГУРА 12

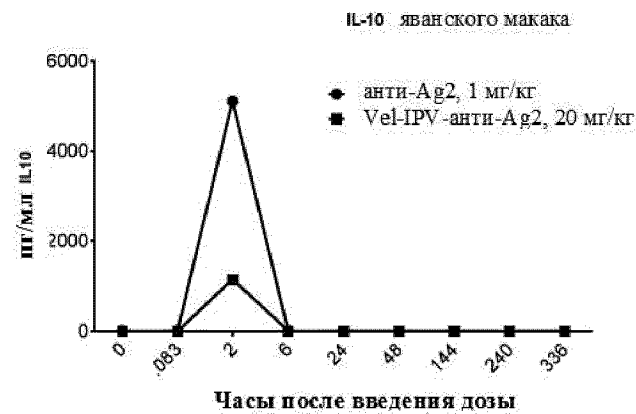
А.



В.

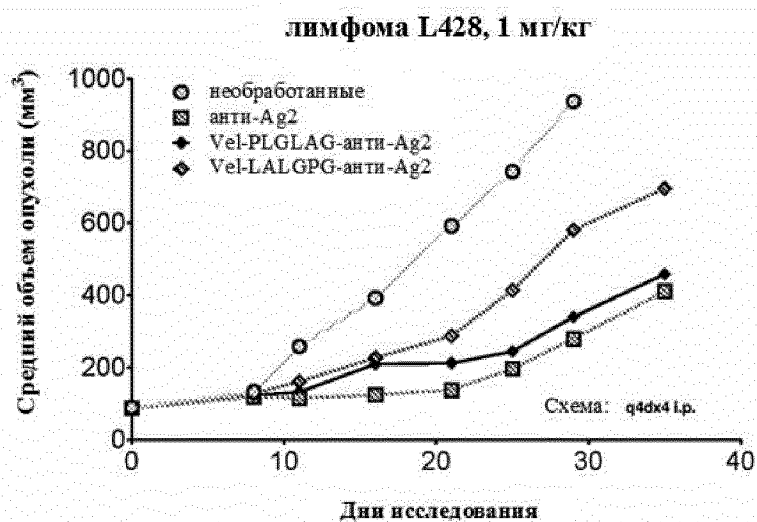


С.

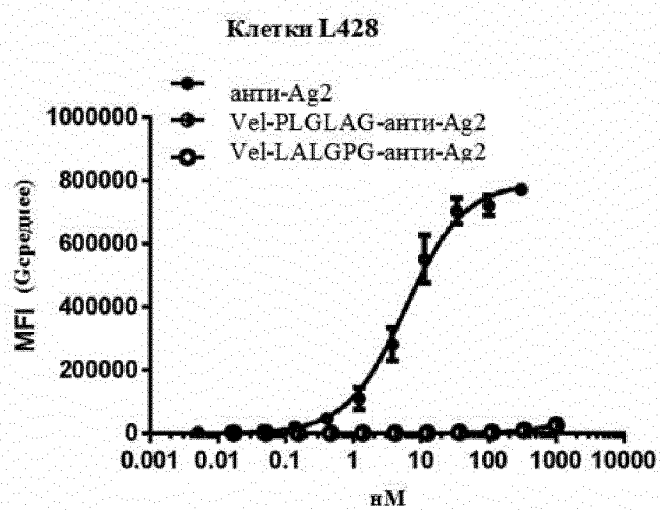


ФИГУРА 13

А.



В.



ФИГУРА 14