

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090552 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.15

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 47/65 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.08.30

(54) АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА К CD166 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/552,345; 62/553,098; 62/554,919

(72) Изобретатель:

(32) 2017.08.30; 2017.08.31; 2017.09.06

Карман Лори, Хамфри Рэйчел,  
Кавано В. Майкл, Терретт Джонатан,  
Уивер Энни Янг, Уилл Маттиас (US)

(33) US

(86) PCT/US2018/048965

(87) WO 2019/046652 2019.03.07

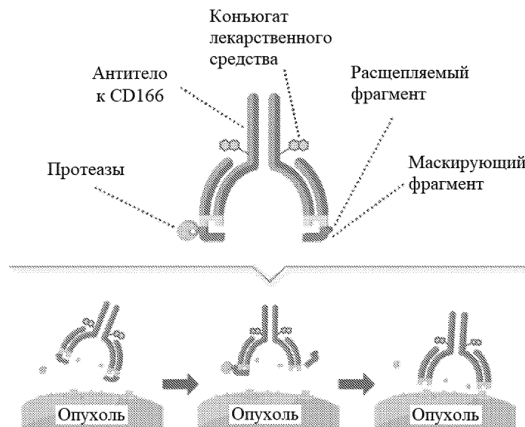
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ЦИТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.  
(RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены активируемые антитела, которые специфично связываются с CD166, и конъюгированные активируемые антитела, которые специфично связываются с CD166. Также предложены способы получения и применения этих активируемых антител при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях.



202090552

A1

A1

202090552

## **АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА К CD166 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 62/552345, поданной 30 августа 2017 г., предварительной заявке США № 62/553098, поданной 31 августа 2017 г., и предварительной заявке США № 62/554919, поданной 6 сентября 2017 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### **ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0002] «Перечень последовательностей», предоставленный в электронном виде одновременно с настоящей заявкой согласно §1.821 раздела 37 Свода федеральных нормативных актов США в машиночитаемой форме (CFR) с помощью EFS-Web, озаглавленный «CYTM054004WO\_30AUG2018\_FINAL\_ST25.txt», включен в настоящую заявку посредством ссылки. Электронная копия Перечня последовательностей была создана 30 августа 2018 года, и размер файла в текстовом формате составляет 49 килобайт.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Настоящее изобретение в целом относится к конкретным схемам дозирования для введения конъюгированных активируемых антител к CD166 для лечения рака.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0004] Было доказано, что виды терапии на основе антител являются эффективными способами лечения нескольких заболеваний, включая разные виды рака, но в некоторых случаях их терапевтическая эффективность ограничивается разными видами токсичности, обусловленной широкой экспрессией мишени. Кроме того, терапевтические средства на основе антител демонстрировали другие ограничения, такие как быстрый клиренс из кровотока после введения.

[0005] В области низкомолекулярных терапевтических средств были разработаны стратегии для обеспечения пролекарств активного химического вещества. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство метаболизируется в активное соединение в условиях *in vivo*. Такие стратегии в отношении пролекарств могут обеспечить повышенную селективность лекарственного средства в отношении его предполагаемой мишени и уменьшить нежелательные эффекты.

[0006] Соответственно, в области терапевтических средств на основе антител все еще существует потребность в антителах, которые имитируют целевые характеристики низкомолекулярного пролекарства.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (AA), конъюгированного с агентом, нуждающемуся в этом субъекту, при этом указанное AA содержит (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240; (b) маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой карциному молочной железы, устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичника, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легких.

[0008] Согласно связанному аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (AA), конъюгированного с агентом, нуждающемуся в этом субъекту, причем указанное AA содержит (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240; (b) маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA

находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246.

**[0009]** Согласно дополнительному связанному аспекту настоящего изобретения предложено активируемое антитело (АА), конъюгированное с агентом, для применения при лечении, облегчении симптомов или задержке прогрессирования рака у субъекта, причем указанное АА содержит (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой карциному молочной железы, устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичника, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легких. АА предназначено для введения субъекту в терапевтически эффективном количестве.

**[00010]** Согласно другому дополнительному связанному аспекту настоящего изобретения предложено активируемое антитело (АА), конъюгированное с агентом, для применения при ингибировании или уменьшении роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, для лечения рака у субъекта, причем указанное АА содержит (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом АВ содержит

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. АА предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом.

**[00011]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект страдает карциномой молочной железы, устойчивой к кастрации карциномой предстательной железы, холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичника, плоскоклеточной карциномой головы и шеи или немелкоклеточным раком легких. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичника, плоские клетки головы или шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.

**[00012]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, конъюгированный с АА, представляет собой майтанзиноид или его производное; например, агент, конъюгированный с АА, представляет собой DM4; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения DM4 конъюгирован с АА за счет линкера; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер содержит фрагмент SPBD (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата).

**[00013]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ соединен с СМ, например, за счет связывающего пептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ соединен с СМ так, что АА в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит соединяющий пептид между ММ и СМ; например, соединяющий пептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит соединяющий пептид между СМ и АВ; например, соединяющий пептид содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA содержит соединяющий пептид между CM и AB; например, соединяющий пептид содержит аминокислотную последовательность GGS.

**[00014]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA содержит первый соединяющий пептид (LP1) и второй соединяющий пептид (LP2), и при этом AA в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.

**[00015]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь соединена со спейсером на своем N-конце; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM и CM соединены с легкой цепью; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM соединен с CM так, что AA в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу на своей легкой цепи, как представлено далее: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479 и LP2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь соединена со спейсером на своем N-конце; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM и CM соединены с легкой цепью; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM соединен с CM так, что AA в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу на своей легкой цепи, как представлено далее: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479 и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.

**[00016]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения возраст субъекта составляет по меньшей мере 18 лет; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет показатель общего состояния по шкале ECOG 0-1; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз активного метастатического рака; согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз местно-распространенной неоперабельной солидной опухоли; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ожидаемая продолжительность жизни субъекта превышает 3 месяца на момент введения.

**[00017]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет карциному молочной железы; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения карцинома молочной железы представляет собой ER+; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил предшествующую противогормональную терапию и испытал прогрессирование заболевания; согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъект имеет тройной негативный рак молочной железы и прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии.

**[00018]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил по меньшей мере одну предшествующую терапию.

**[00019]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет холангиокарциному. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект не ответил на по меньшей мере одну предшествующую линию курса лечения, содержащего гемцитабин.

**[00020]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет карциному эндометрия; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину, для лечения внематочного заболевания или распространенного заболевания.

**[00021]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет эпителиальную карциному яичника. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет рефрактерную к платине карциному; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичника; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет мутацию BRCA и является рефрактерным к ингибиторам PARP. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет мутацию, отличную от BRCA.

**[00022]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC); согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил более одного курса лечения, включающего платину; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил более одного ингибитора PD-1/PD-L1.

**[00023]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект имеет немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.

**[00024]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА, которое конъюгировано с агентом, в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 6 мг/кг; например, введенная доза составляет примерно 0,25 мг/кг; введенная доза составляет примерно 0,5 мг/кг; введенная доза составляет примерно 1 мг/кг; введенная доза составляет примерно 2 мг/кг; введенная доза составляет примерно 4 мг/кг; введенная доза составляет примерно 5 мг/кг; введенная доза составляет примерно 6 мг/кг.

**[00025]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА, которое конъюгировано с агентом, в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 6 мг/кг; например, введенная доза составляет от примерно 0,25 мг/кг до примерно 0,5 мг/кг; введенная доза составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 1 мг/кг; введенная доза составляет от примерно 1 мг/кг до примерно 2 мг/кг; введенная доза составляет от примерно 2 мг/кг до примерно 4 мг/кг; введенная доза составляет от примерно 4 мг/кг до примерно 5 мг/кг; введенная доза составляет от примерно 5 мг/кг до примерно 6 мг/кг.

**[00026]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА, которое конъюгировано с агентом, в фиксированной дозе от примерно 10 мг до примерно 200 мг или в фиксированной дозе от примерно 25 мг до примерно 500 мг; например, введенная фиксированная доза составляет от примерно 10 мг до примерно 25 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 20 мг до примерно 50 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 30 мг до примерно 75 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 40 мг до примерно 100 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 50 мг до примерно 125 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 60 мг до примерно 150 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 80 мг до примерно 200 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 100 мг до



примерно 250 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 120 мг до примерно 300 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 140 мг до примерно 350 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 160 мг до примерно 400 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 180 мг до примерно 450 мг; введенная фиксированная доза составляет от примерно 200 мг до примерно 500 мг.

**[00027]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту внутривенно вводят АА, конъюгированное с агентом; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту внутривенно вводят АА, конъюгированное с агентом, каждый 21 день.

**[00028]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на фактической массе тела субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**[00029]** НА ФИГ. 1 изображен конъюгат активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства, предпочтительно активируемый в микросреде опухоли, где присутствуют специфичные для опухоли протеазы.

**[00030]** НА ФИГ. 2 показана экспрессия CD166 в образцах опухолей человека согласно иммуногистохимии (ИГХ).

**[00031]** НА ФИГ. 3 показана противоопухолевая активность конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства и конъюгата антитела к CD166 и лекарственного средства в опухолевой модели тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) у мышей. Также показана экспрессия CD166 согласно иммуногистохимии (ИГХ). (AADC = конъюгат активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства; ADC = конъюгат антитела к CD166 и лекарственного средства).

**[00032]** НА ФИГ. 4 показана противоопухолевая активность конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства и конъюгата антитела к CD166 и лекарственного средства в опухолевой модели немелкоклеточного рака легких у мышей. Также показана экспрессия CD166 согласно ИГХ.

**[00033]** НА ФИГ. 5 показана противоопухолевая активность конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства и конъюгата антитела к CD166 и лекарственного средства в ксенотрансплантатной модели рака яичника, полученного от пациента, на мышах. Также показана экспрессия CD166 согласно ИГХ.

**[00034]** На ФИГ. 6 проиллюстрирован дизайн части А и части В клинического исследования конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства.

**[00035]** На ФИГ. 7А-7В показана преимущественная активация активируемого антитела к CD166 в опухолях.

**[00036]** На ФИГ. 8А-8В показано разделение интактных и активированных форм конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства, частично активированного матриптазой (MT-SP1) или ММП-14.

**[00037]** На ФИГ. 9А-9Е показаны примерные фармакокинетические данные для уровней в сыворотке различных аналитов в зависимости от времени после введения конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства у субъектов-людей.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[00038]** Согласно настоящему изобретению предложены активируемые моноклональные антитела, которые специфично связывают CD166, также известный как активированная молекула адгезии лейкоцитов (ALCAM). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемые моноклональные антитела интернализуются клетками, содержащими CD166. CD166 представляет собой молекулу клеточной адгезии, которая связывает CD6, рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству белков фагоцитарных рецепторов, богатых цистеином (SRCR) (SRCRSF). Известно, что CD166 ассоциирован с взаимодействиями клетка-клетка и клетка-матрикс, клеточной адгезией, миграцией клеток, а также активацией и пролиферацией Т-клеток. Аберрантная экспрессия и/или активность CD166 и связанная с CD166 передача сигналов вовлечена в патогенез многих заболеваний и нарушений, таких как рак, воспаление и аутоиммунитет. Например, CD166 высоко экспрессируется при различных типах рака, таких как, например, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, такой как НМРЛ и/или ПКРЛ, рак ротоглотки, рак шейки матки и рак головы и шеи, такой как ПРГШ.

**[00039]** Согласно настоящему изобретению предложены активируемые антитела к CD166, которые можно применять в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 применяют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

**[00040]** Согласно настоящему изобретению предложены активируемые антитела к CD166, которые можно применять в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки ассоциированы с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 применяют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

**[00041]** Согласно настоящему изобретению предложены активируемые антитела к CD166, которые можно применять в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, при котором пораженные клетки экспрессируют CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пораженные клетки ассоциированы с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пораженные клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 применяют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, уменьшения и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

**[00042]** Активируемые антитела к CD166 включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает CD166, связанный с маскирующим фрагментом (ММ), так, что связывание ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166. ММ связан с антителом/антигенсвязывающим фрагментом за счет последовательности, которая содержит субстрат для протеазы (расщепляемый фрагмент, СМ), например, протеазы, которая локализована совместно с CD166 в месте лечения у субъекта.

#### Определения

**[00043]** Если не указано иное, научные и технические термины, используемые применительно к настоящему изобретению, будут иметь значения, соответствующие обычному пониманию специалиста в соответствующей области техники. Термин «объект» (соотв. «a»/«an» объект в исходном тексте на английском языке) относится к одному или более этим объектам. Например, соединение относится к одному или более соединениям. Как таковые, термины, обозначающие элемент в единственном числе (соотв. «a» или «an» в исходном тексте на английском языке), «один или более» и «по меньшей мере один»

могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе будут включать множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число. Обычно обозначения, используемые в связи со способами и методиками клеточной и тканевой культуры, молекулярной биологии и химии и гибридизации белков и олиго- или полинуклеотидов, описанными в настоящей заявке, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Стандартные методики используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также для культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки выполняют в соответствии со спецификациями производителя, или как это обычно осуществляют в данной области техники, или как описано в настоящей заявке. Вышеуказанные методики и процедуры обычно выполняют в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2 изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Обозначения, используемые применительно к аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанным в настоящей заявке, а также лабораторные процедуры и методики, относящиеся к вышеуказанным, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Стандартные методики используются для химических синтезов, химических анализов, фармацевтического получения, изготовления и доставки, а также лечения субъектов.

**[00044]** Следует понимать, что в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, должны иметь следующие значения:

**[00045]** В настоящей заявке термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным, например, антигенсвязывающим, частям молекул иммуноглобулинов (Ig), т.е. молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфично связывает (иммунно взаимодействует с ним) антиген. Под «специфичным связыванием» или «иммунным взаимодействием с» или «иммуноспецифическим связыванием» подразумевают, что антитело взаимодействует с одной или более антигенными детерминантами желаемого антигена и не взаимодействует с другими полипептидами или связывается с гораздо более низкой аффинностью ( $K_d > 10^{-6}$ ). Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, химерные, доменные антитела, одноцепочечные фрагменты, фрагменты Fab и  $F(ab')_2$ , scFv и библиотеку экспрессии Fab.

**[00046]** Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепи (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область, содержащую примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. В целом, молекулы антител, полученные от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Определенные классы также имеют подклассы, такие как IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

**[00047]** В настоящей заявке термин «моноклональное антитело» (MAT) или «композиция моноклонального антитела» относится к популяции молекул антител, которые содержат только один молекулярный вид молекулы антитела, состоящей из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, области, определяющие комплементарность (CDR), моноклонального антитела идентичны во всех молекулах популяции. MAT содержат антигенсвязывающий сайт, способный иммунно взаимодействовать с конкретным эпитопом антигена, характеризующийся уникальной аффинностью связывания в отношении эпитопа.

**[00048]** Термин «антигенсвязывающий сайт» или «связывающая часть» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно различающихся участка внутри V-областей тяжелой и легкой цепей, называемые «гипервариабельными участками», расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как «каркасные участки» или «FR». Таким образом, термин «FR» относится к аминокислотным последовательностям, которые обнаруживаются в природе между гипервариабельными участками в иммуноглобулинах и рядом с ними. В молекуле антитела три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве, чтобы образовать антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельных участка каждой из тяжелых и легких цепей называются «областями, определяющими комплементарность» или «CDR». Отнесение аминокислот к каждому домену соответствует определениям Kabat из «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).

**[00049]** В настоящей заявке термин «эпитоп» включает любую белковую детерминанту, способную специфично связываться с иммуноглобулином, scFv или Т-клеточным рецептором. Термин «эпитоп» включает любую белковую детерминанту, способную специфично связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Например, антитела могут быть получены против N-концевых или С-концевых пептидов полипептида. Считается, что антитело специфично связывается с антигеном, если константа диссоциации составляет  $\leq 1$  мкМ; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $\leq 100$  нМ, и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $\leq 10$  нМ.

**[00050]** В настоящей заявке термины «специфичное связывание», «иммунологическое связывание» и «свойства иммунологического связывания» относятся к нековалентным взаимодействиям определенного типа, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, в отношении которого иммуноглобулин является специфичным. Прочность или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий могут быть выражены в виде константы диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействия, причем меньшее значение  $K_d$  представляет большую аффинность. Свойства иммунологического связывания отобранных полипептидов могут быть определены количественно с применением способов, хорошо известных в данной области техники. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, обе «константа скорости прямой реакции» ( $K_{on}$ ) и «константа скорости обратной реакции» ( $K_{off}$ ) могут быть определены с помощью вычисления концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение  $K_{off}/K_{on}$  позволяет устранить все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации  $K_d$ . (См., в общих чертах, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Считается, что антитело согласно настоящему изобретению специфично связываться с мишенью, если константа связывания ( $K_d$ ) составляет  $\leq 1$  мкМ,

согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $\leq 100$  нМ, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $\leq 10$  нМ и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения от  $\leq 100$  пМ до примерно 1 пМ, согласно результатам измерения с помощью анализов, таких как анализы связывания радиолиганда или сходных анализов, известных специалистам в данной области техники.

**[00051]** В настоящей заявке термин «выделенный полинуклеотид» будет означать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, в силу своего происхождения «выделенный полинуклеотид» (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором «выделенный полинуклеотид» обнаружен в природе, (2) функционально соединен с полинуклеотидом, с которым он не соединен в природе, или (3) не встречается в природе как часть большей последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящей заявке, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы легкой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящей заявке.

**[00052]** Термин «выделенный белок», упомянутый в настоящей заявке, означает белок из кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения или некоторой их комбинации, в силу своего происхождения или источника происхождения «выделенный белок» (1) не ассоциирован с белками, обнаруженными в природе, (2) не содержит другие белки из того же источника, например, не содержит мышинные белки, (3) экспрессируется клеткой другого вида, или (4) не встречается в природе.

**[00053]** В настоящей заявке термин «полипептид» используется в качестве общего термина для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, фрагменты нативного белка и аналоги представляют собой молекулы полипептидного рода. Полипептиды в соответствии с настоящим изобретением содержат молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящей заявке, и молекулы легкой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящей заявке, а также молекулы антитела, образованные комбинациями, содержащими молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина с молекулами легкой цепи иммуноглобулина, такими как молекулы легкой каппа-цепи иммуноглобулина, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

**[00054]** В настоящей заявке термин «природный», применительно к объекту, относится к тому факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в

организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории или иным образом, является природной.

**[00055]** В настоящей заявке термин «функционально соединенный» относится к положениям описанных компонентов, которые находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предусмотренным способом. Управляющая последовательность, «функционально соединенная» с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с управляющими последовательностями.

**[00056]** В настоящей заявке термин «управляющая последовательность» относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких управляющих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина, у прокариот такие управляющие последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательность терминации транскрипции, у эукариот обычно такие управляющие последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Предполагается, что термин «управляющие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является существенным для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по гибридизации. Термин «полинуклеотид», упоминаемый в настоящей заявке, означает нуклеотиды, содержащие по меньшей мере 10 оснований в длину, либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированные формы любого типа нуклеотидов. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

**[00057]** Термин «олигонуклеотид», который упоминается в настоящей заявке, включает природные и модифицированные нуклеотиды, соединенные вместе с помощью природных и не природных олигонуклеотидных связей. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, обычно содержащих 200 или менее оснований в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения олигонуклеотиды содержат от 10 до 60 оснований в длину, и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований в длину. Олигонуклеотиды обычно являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для применения в



конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению представляют собой как смысловые, так и антисмысловые олигонуклеотиды.

**[00058]** Термин «природные нуклеотиды», упоминаемый в настоящей заявке, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин «модифицированные нуклеотиды», упоминаемый в настоящей заявке, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и тому подобное. Термин «олигонуклеотидные связи», упоминаемый в настоящей заявке, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселерлоат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоаниладат, фосфоамидат и тому подобное. См., например, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* NuCL. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* OligonuCLEotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (под ред. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). При необходимости олигонуклеотид может содержать метку для обнаружения.

**[00059]** В настоящей заявке двадцать обычных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют обычному применению. См. I Immunology - A Synthesis (2 изд., под ред. E.S. Golub and D.R. Green, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как  $\alpha$ -, $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нестандартные аминокислоты, также могут быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N,N,N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие сходные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В описании полипептида, используемом в настоящей заявке, левое направление является аминоконцевым направлением, а правое направление является карбоксиконцевым направлением в соответствии со стандартным применением и правилом.

**[00060]** Аналогичным образом, если не указано иное, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец, и левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление добавления от 5' к 3' растущих транскриптов РНК упоминается как области последовательности направления транскрипции на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и те, которые являются 5' относительно

5'-конца РНК-транскрипта, называемые «последовательности в 5'-направлении», области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и те, которые являются 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются «последовательностями в 3'-направлении».

**[00061]** Применительно к полипептидам термин «существенная идентичность» означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением весовых коэффициентов за внесение пробела по умолчанию, имеют по меньшей мере 80 процентную идентичность последовательностей, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 90 процентную идентичность последовательностей, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 95 процентную идентичность последовательностей, и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 99 процентную идентичность последовательностей.

**[00062]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными заменами аминокислот.

**[00063]** Как обсуждается в настоящей заявке, незначительные изменения в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулинов предусмотрены как включенные в настоящее изобретение, при условии, что изменения в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 80%, 90%, 95%, и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 99%. В частности, предусмотрены консервативные замены аминокислот. Консервативные замены представляют собой те, которые происходят в семействе аминокислот, которые являются родственными по своим боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислыми аминокислотами являются аспартат, глутамат; (2) основными аминокислотами являются лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярными аминокислотами являются аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженными полярными аминокислотами являются глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые относятся к семейству

алифатических гидроксиаминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, которые относятся к семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые относятся к семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые относятся к семейству ароматических аминокислот. Например, целесообразно ожидать, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или сходная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать значительного влияния на связывание или свойства готовой молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном сайте. Приведет ли замена аминокислоты к получению функционального пептида, можно легко определить путем анализа удельной активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в настоящей заявке. Фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулинов могут быть легко получены обычными специалистами в данной области техники. Подходящие амино- и карбоксиконцы фрагментов или аналогов расположены вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть определены путем сравнения данных о нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностях с общедоступными или частными базами данных последовательностей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для определения мотивов последовательности или предсказанных конформационных доменов белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией, применяют компьютеризированные способы сравнения. Известны способы определения белковых последовательностей, которые складываются в известную трехмерную структуру. *Bowie et al. Science 253:164 (1991)*. Таким образом, предшествующие примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут установить мотивы последовательности и структурные конформации, которые можно применять для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с настоящим изобретением.

**[00064]** Подходящие замены аминокислот представляют собой те, которые: (1) уменьшают восприимчивость к протеолизу, (2) уменьшают восприимчивость к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют значения аффинности связывания, и (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутированные варианты последовательности, отличной от природной пептидной последовательности. Например, единичные или множественные замены аминокислот (например, консервативные замены аминокислот) могут быть сделаны в природной последовательности (например, в части полипептида,

расположенной вне домена (ов), образующего (их) межмолекулярные контакты). Консервативная замена аминокислоты не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, заменяющая аминокислота не должна приводить к разрушению спирали, которая встречается в исходной последовательности, или нарушать другие типы вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры вторичных и третичных структур полипептидов, принятых в данной области техники, описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (под ред. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (под ред. C. Branden и J. Tooze, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

**[00065]** В настоящей заявке термин «полипептидный фрагмент» относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию и/или одну или более внутренних делеций, но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в природной последовательности, выведенной, например, на основании полноразмерной последовательности кДНК. Фрагменты, как правило, содержат по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот в длину, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 14 аминокислот в длину, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 20 аминокислот в длину, обычно по меньшей мере 50 аминокислот в длину и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 70 аминокислот в длину. В настоящей заявке термин «аналог» относится к полипептидам, которые состоят из сегмента, содержащего по меньшей мере 25 аминокислот, который имеет существенную идентичность с частью выведенной аминокислотной последовательности и который специфично связывается с мишенью в подходящих условиях связывания. Как правило, полипептидные аналоги содержат консервативную замену аминокислоты (или добавление, или делецию) по отношению к природной последовательности. Аналоги, как правило, содержат по меньшей мере 20 аминокислот в длину, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 50 или более аминокислот в длину, и часто они могут быть такими же длинными, как и полноразмерный природный полипептид.

**[00066]** В настоящей заявке термин «агент» используется для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

**[00067]** В настоящей заявке термин «метка» или «меченый» относится к включению обнаруживаемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченой

аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или обладающего ферментативной активностью, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических способов). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области техники и могут применяться. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $H^3$ ,  $C^{14}$ ,  $N^{15}$ ,  $S^{35}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Tc^{99}$ ,  $In^{111}$ ,  $I^{125}$ ,  $I^{131}$ ), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, п-галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, связывающие металл домены, эпитопные метки). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения метки присоединяют с помощью спейсерных плеч различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое препятствие. В настоящей заявке термин «фармацевтический агент или лекарственное средство» относится к химическому соединению или композиции, способным индуцировать целевой терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

**[00068]** Другие химические термины в настоящей заявке используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как описано, например, в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (под ред. Parker, S., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

**[00069]** В настоящей заявке термин «по существу чистый» означает, что целевое соединение представляет собой преобладающее присутствующее соединение (т. е. в молярном отношении оно является более распространенным, чем любое другое отдельное соединение в композиции), и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой целевое соединение составляет по меньшей мере приблизительно 50 процентов (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных соединений.

**[00070]** Обычно по существу чистая композиция будет содержать более примерно 80 процентов всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более примерно 85%, 90%, 95% и 99%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

целевое соединение очищают до существенной гомогенности (загрязняющие соединения не обнаруживаются в композиции с помощью обычных способов обнаружения), при этом композиция состоит по существу из одного макромолекулярного соединения.

**[00071]** Термин субъект-человек и ветеринарные субъекты.

Активируемые антитела (AA)

**[00072]** Согласно настоящему изобретению предложены AA, которые содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает CD166 (AB) млекопитающего.

**[00073]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD166 млекопитающего выбран из группы, состоящей из CD166 человека и CD166 яванской макаки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB специфично связывается с CD166 человека или CD166 яванской макаки с константой диссоциации менее 1 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD166 млекопитающего представляет собой CD166 человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD166 млекопитающего представляет собой CD166 яванской макаки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB имеет одну или более из следующих характеристик: (a) AB специфично связывается с CD166 человека; и (b) AB специфично связывается с CD166 человека и CD166 яванской макаки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB обладает одной или более из следующих характеристик: (a) AB специфично связывает CD166 человека и CD166 яванской макаки; (b) AB ингибирует связывание CD6 млекопитающего с CD166 млекопитающего; (c) AB ингибирует связывание CD6 человека с CD166 человека; и (d) AB ингибирует связывание CD6 яванской макаки с CD166 яванской макаки.

**[00074]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB блокирует способность природного лиганда или рецептора связываться с CD166 млекопитающего с ЭК<sub>50</sub> менее или равной 5 нМ, менее или равной 10 нМ, менее или равной 50 нМ, менее или равной 100 нМ, менее или равной 500 нМ и/или менее или равной 1000 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB блокирует способность CD6 млекопитающего связываться с CD166 млекопитающего с ЭК<sub>50</sub> менее или равной 5 нМ, менее или равной 10 нМ, менее или равной 50 нМ, менее или равной 100 нМ, менее или равной 500 нМ и/или менее или равной 1000 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения природный лиганд или рецептор CD166 представляет собой CD6.

**[00075]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ блокирует способность природного лиганда связываться с CD166 млекопитающего с ЭК<sub>50</sub> от 5 нМ до 1000 нМ, от 5 нМ до 500 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 50 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1000 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 1000 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 1000 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 150 нМ до 400 нМ, от 200 нМ до 300 нМ, от 500 нМ до 1000 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ блокирует способность CD6 млекопитающего связываться с CD166 млекопитающего с ЭК<sub>50</sub> от 5 нМ до 1000 нМ, от 5 нМ до 500 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 50 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1000 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 15 нМ до 75 нМ, от 30 нМ до 80 нМ, от 40 нМ до 150 нМ, от 50 нМ до 1000 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 1000 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 150 нМ до 400 нМ, от 200 нМ до 300 нМ, от 500 нМ до 1000 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения природный лиганд или рецептор CD166 представляет собой CD6.

**[00076]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ согласно настоящему изобретению ингибирует или уменьшает рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающего. Безотносительно к какой-либо теории, АВ согласно настоящему изобретению может ингибировать или уменьшать рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающего, посредством специфичного связывания с CD166 и ингибирования, блокирования и/или предотвращения связывания природного лиганда или рецептора с CD166 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения природный лиганд или рецептор CD166 млекопитающего представляет собой CD6 млекопитающего.

**[00077]** Антитело или антигенсвязывающий фрагмент АА связаны с маскирующим фрагментом (ММ) так, что связывание ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ связан за счет последовательности, которая содержит субстрат для протеазы, например, протеазы, которая активна в пораженной ткани, и/или протеазы, которая локализована совместно с CD166 в месте лечения у субъекта. Активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению, также взаимозаменяемо называемые в настоящей заявке АА к CD166 или активируемыми антителами к CD166, являются стабильными в кровотоке, активируются в предусмотренных местах терапии и/или диагностики, но не в нормальной, например,

здоровой ткани или другой ткани, не являющейся мишенью для лечения и/или диагностики, и, после активации, проявляют связывание с CD166, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим немодифицированным антителом, также называемым в настоящей заявке исходным антителом.

**[00078]** Согласно настоящему изобретению предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые специфично связывают CD166 млекопитающего, для применения в АА. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD166, представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечный фрагмент, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD166, представляет собой мышинное, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

**[00079]** Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены активируемые антитела (AA), содержащие: (1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, и расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

**[00080]** Антитела в АА согласно настоящему изобретению (AB) специфично связывают мишень CD166, такую как, например, CD166 млекопитающего и/или CD166 человека.

**[00081]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB имеет константу диссоциации примерно 100 нМ или менее в отношении связывания с CD166 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB имеет константу диссоциации примерно 10 нМ или менее в отношении связывания с CD166 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB имеет константу диссоциации примерно 5 нМ или менее в отношении связывания с CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего



изобретения АВ имеет константу диссоциации примерно 1 нМ или менее в отношении связывания с CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ имеет константу диссоциации примерно 0,5 нМ или менее в отношении связывания с CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ имеет константу диссоциации примерно 0,1 нМ или менее в отношении связывания с CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ имеет константу диссоциации от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ или от 10 нМ до 100 нМ в отношении связывания с CD166 млекопитающего.

**[00082]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в нерасщепленном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации менее или равной 1 нМ, менее или равной 5 нМ, менее или равной 10 нМ, менее или равной 15 нМ, менее или равной 20 нМ, менее или равной 25 нМ, менее или равной 50 нМ, менее или равной 100 нМ, менее или равной 150 нМ, менее или равной 250 нМ, менее или равной 500 нМ, менее или равной 750 нМ, менее или равной 1000 нМ и 122. /или менее или равной 2000 нМ.

**[00083]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в нерасщепленном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации более или равной 1 нМ, более или равной 5 нМ, более или равной 10 нМ, более или равной 15 нМ, более или равной 20 нМ, более или равной 25 нМ, более или равной 50 нМ, более или равной 100 нМ, более или равной 150 нМ, более или равной 250 нМ, более или равной 500 нМ, более или равной 750 нМ, более или равной 1000 нМ и 122. /или более или равной 2000 нМ.

**[00084]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в нерасщепленном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации, которая находится в пределах диапазона от 1 нМ до 2000 нМ, от 1 нМ до 1000 нМ, от 1 нМ до 750 нМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 нМ до 250 нМ, от 1 нМ до 150 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 50 нМ, от 1 нМ до 25 нМ, от 1 нМ до 15 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 2000 нМ, от 5 нМ до 1000 нМ, от 5 нМ до 750 нМ, от 5 нМ до 500 нМ, от 5 нМ до 250 нМ, от 5 нМ до 150 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5

нМ до 50 нМ, от 5 нМ до 25 нМ, от 5 нМ до 15 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 2000 нМ, от 10 нМ до 1000 нМ, от 10 нМ до 750 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 250 нМ, от 10 нМ до 150 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 10 нМ до 25 нМ, от 10 нМ до 15 нМ, от 15 нМ до 2000 нМ, от 15 нМ до 1000 нМ, от 15 нМ до 750 нМ, от 15 нМ до 500 нМ, от 15 нМ до 250 нМ, от 15 нМ до 150 нМ, от 15 нМ до 100 нМ, от 15 нМ до 50 нМ, от 15 нМ до 25 нМ, от 25 нМ до 2000 нМ, от 25 нМ до 1000 нМ, от 25 нМ до 750 нМ, от 25 нМ до 500 нМ, от 25 нМ до 250 нМ, от 25 нМ до 150 нМ, от 25 нМ до 100 нМ, от 25 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 2000 нМ, от 50 нМ до 1000 нМ, от 50 нМ до 750 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 250 нМ, от 50 нМ до 150 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 2000 нМ, от 100 нМ до 1000 нМ, от 100 нМ до 750 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 100 нМ до 250 нМ, от 100 нМ до 150 нМ, от 150 нМ до 2000 нМ, от 150 нМ до 1000 нМ, от 150 нМ до 750 нМ, от 150 нМ до 500 нМ, от 150 нМ до 250 нМ, от 250 нМ до 2000 нМ, от 250 нМ до 1000 нМ, от 250 нМ до 750 нМ, от 250 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 2000 нМ, от 500 нМ до 1000 нМ, от 500 нМ до 750 нМ, от 500 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 250 нМ, от 500 нМ до 150 нМ, от 500 нМ до 100 нМ, от 500 нМ до 50 нМ, от 750 нМ до 2000 нМ, от 750 нМ до 1000 нМ или от 1000 нМ до 2000 нМ.

**[00085]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в активированном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации менее или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

**[00086]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в активированном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации более или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

**[00087]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в активированном состоянии специфично связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации, которая находится в пределах диапазона от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,01 до 0,1 нМ, от 0,01 до 0,05 нМ, от 0,05 до 100 нМ, от 0,05 до 10 нМ, от 0,05 до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ или от 10 нМ до 100 нМ.

**[00088]** Примерные активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению включают, например, активируемые антитела (АА), которые содержат

тяжелую цепь и легкую цепь, которые содержат, представляют собой или происходят из аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, представленных ниже:

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека**

**HuCD166\_HcC**

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSED  
KHYSPLKSRILTITKDTSKNQVVLITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
239)

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека**

**HuCD166\_HcC Des-HC**

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSED  
KHYSPLKSRILTITKDTSKNQVVLITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:  
480)

**Домен VL легкой цепи  $\alpha$ CD166 человека**

**HuCD166\_Lc1**

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL  
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)



сыворотке составляет по меньшей мере 16 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 14 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 12 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 10 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 8 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 6 часов при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 4 часа при введении в организм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения период полужизни AA в сыворотке составляет по меньшей мере 3 часа при введении в организм.

Примерные активируемые антитела

**[00090]** Согласно примерным вариантам реализации AA согласно настоящему изобретению содержат любую одну или более из следующих последовательностей:

**SEQ ID NO: 239**

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека (HuCD166\_HcC) – аминокислотная последовательность**  
(представлена выше)

**SEQ ID NO: 480**

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека (HuCD166\_HcC) – Des-NC -аминокислотная последовательность**  
(представлена выше)

**SEQ ID NO: 240**

**VL домен легкой цепи  $\alpha$ CD166 человека**  
**HuCD166\_Lcl**  
(представлена выше)

**Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 246****Легкая цепь  $\alpha$ CD166 человека (спейсер-ММ-LP1-СМ-LP2-Ab)****[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lcl\_7614.6\_3001 (SEQ ID NO: 314)]**

[QGQSGQG]

[LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLPV  
TPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGS  
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]**Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 314****Легкая цепь  $\alpha$ CD166 человека (ММ-LP1-СМ-LP2-Ab)****huCD166Lcl\_7614.6\_3001**LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLPVT  
PGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGS  
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 305****Спейсер**

QGQSGQG

**SEQ ID NO: 222****Маскирующий фрагмент 7614.6**

LCHPAVLSAWESCSS

**SEQ ID NO: 76****Расщепляемый фрагмент 3001**

AVGLLAPPGGLSGRSDNH

**SEQ ID NO: 479****Соединяющий пептид 1 (LP1)**

GGGSSGGS

**Соединяющий пептид 2 (LP2)**

GGS

**[00091]** В примерном варианте реализации AA содержит: (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240; (b) маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

**[00092]** В примерном варианте реализации AA содержит: (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и конъюгирован с DM4 за счет линкера spdb (это примерное конъюгированное AA называется в настоящей заявке «spacer-7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4»), а также называется «комбинация 55». Линкерный токсин SPDB-DM4 также известен как N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат-N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанин.

**[00093]** Согласно другому примерному варианту реализации настоящего изобретения AA содержит: (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, и дополнительно конъюгирован с DM4 за счет линкера spdb, это примерное конъюгированное AA называется в настоящей заявке «7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4», а также называется «комбинация 60».

**Маскирующие фрагменты (MM)**

**[00094]** Активируемые антитела к CD166, описанные в настоящей заявке, позволяют преодолеть ограничение терапевтических средств на основе антител, в частности,

терапевтических средств на основе антител, которые, как известно, являются токсичными, по меньшей мере до некоторой степени, в условиях *in vivo*. Опосредуемая мишенью токсичность представляет собой основное ограничение для разработки терапевтических антител. Активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению сконструированы для устранения токсичности, ассоциированной с ингибированием мишени в нормальных тканях под действием стандартных терапевтических антител. Эти активируемые антитела к CD166 остаются замаскированными до протеолитической активации в очаге заболевания. Начиная с антитела к CD166 в качестве исходного терапевтического антитела, активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению были модифицированы путем связывания антитела с ингибирующей маской (маскирующий фрагмент, MM) за счет линкера, который включает субстрат протеазы (CM).

**[00095]** Соответственно, активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению содержат маскирующий фрагмент (MM). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM представляет собой аминокислотную последовательность, которая связана или присоединена иным образом к антителу к CD166 и расположена внутри конструкции активируемого антитела к CD166 так, что MM уменьшает способность антитела к CD166 специфично связывать CD166. Подходящие маскирующие фрагменты определяют с применением любой из множества известных методик. Например, пептидные маскирующие фрагменты определяют с применением способов, описанных в PCT публикации № WO 2009/025846 за авторством Daugherty et al., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

**[00096]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в присутствии CD166 MM уменьшает способность АВ связывать CD166 по меньшей мере на 90%, если CM не расщеплен, по сравнению с тем, когда CM расщеплен, согласно результатам анализа в условиях *in vitro* с применением анализа вытеснения мишени, такого как, например, анализ, описанный в PCT публикации № WO 2010/081173, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

**[00097]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM представляет собой полипептид, содержащий примерно от 2 до 40 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM представляет собой полипептид, содержащий до примерно 40 аминокислот в длину.

**[00098]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептидная последовательность MM отличается от последовательности CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептидная



последовательность ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептидная последовательность ММ отличается от последовательности CD166 и не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ.

**[00099]** Согласно одному примерному варианту реализации настоящего изобретения АА согласно настоящему изобретению содержат ММ, аминокислотная последовательность которого представлена далее:

**Маскирующий фрагмент 7614.6**

LCHPAVLSAWESS (SEQ ID NO: 222)

**[000100]** Если АВ модифицирован с применением ММ и находится в присутствии мишени, специфичное связывание АВ со своей мишенью уменьшается или ингибируется по сравнению со специфичным связыванием АВ, не модифицированного с применением ММ, или специфичным связыванием исходного АВ с мишенью.

**[000101]**  $K_d$  АВ, модифицированного с применением ММ, в отношении мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или более, или в 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 25-50, 50-250, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 500-2500, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 2500-5000, 5000-50000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 50000-5000000, 100,000-1000000, или 100000-10000000 раз больше, чем  $K_d$  АВ, не модифицированного с применением ММ, или исходного АВ в отношении мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с применением ММ, в отношении мишени по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 25-50, 50-250, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 500-2500, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 2500-5000, 5000-50000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 50000-5000000, 100000-1000000, или 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с применением ММ, или исходного АВ в отношении мишени.

**[000102]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в два раза больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000103]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в пять раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000102]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 10 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000103]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 20 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000104]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 40 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000105]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 100 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000106]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 1000 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000107]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание ММ с АВ уменьшает способность АВ связывать CD166 так, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он связан с ММ, в отношении CD166 по меньшей мере в 10000 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ, в отношении CD166.

**[000108]** Константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ обычно больше, чем  $K_d$  АВ в отношении мишени.  $K_d$  ММ в отношении АВ может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз больше, чем  $K_d$  АВ в отношении мишени. Напротив, аффинность связывания ММ в отношении АВ обычно ниже, чем аффинность связывания АВ в отношении мишени. Аффинность связывания ММ в отношении АВ может быть по меньшей мере в 5, 10, 25,

50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ в отношении мишени.

**[000109]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ приблизительно равна  $K_d$  АВ в отношении мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ не превышает константу диссоциации АВ в отношении мишени.

**[000110]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ меньше, чем константа диссоциации АВ в отношении мишени.

**[000111]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ больше, чем константа диссоциации АВ в отношении мишени.

**[000112]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в отношении связывания с АВ не превышает  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью.

**[000113]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в отношении связывания с АВ меньше, чем  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью.

**[000114]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в отношении связывания с АВ приблизительно равна  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью.

**[000115]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в отношении связывания с АВ не меньше, чем  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью.

**[000116]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в отношении связывания с АВ больше, чем  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью.

**[000117]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ в отношении АВ не более чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или более, или в 1-5, 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 25-50, 50-250, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 25-500, 500-2500, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 2500-5000, 5000-50000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 50000-5000000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз больше, чем  $K_d$  в отношении связывания АВ с мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $K_d$  ММ в

отношении связывания с АВ в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз больше, чем  $K_d$  АВ в отношении связывания с мишенью.

**[000118]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

**[000119]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая не превышает аффинность связывания АВ с мишенью.

**[000120]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая приблизительно равна аффинности связывания АВ с мишенью.

**[000121]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая не меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

**[000122]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая больше, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

**[000123]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-25, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000, 25-250, 50-500 или 100-1000 раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает аффинностью связывания с АВ, которая в 2-20 раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не соединен ковалентно с АВ и в эквимольной концентрации с АВ не ингибирует связывание АВ с мишенью.

**[000124]** Если АВ модифицирован с применением ММ и находится в присутствии мишени, специфичное связывание АВ со своей мишенью уменьшается или ингибируется по сравнению со специфичным связыванием АВ, не модифицированным с применением ММ, или специфичным связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не модифицированным с применением ММ, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность АВ связывать мишень после модификации с применением ММ может быть уменьшена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более при измерении в анализе в условиях *in vivo* или *in vitro*.

**[000125]** ММ ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ связывает антигенсвязывающий домен АВ и ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ может стерически ингибировать связывание АВ с мишенью. ММ может аллостерически ингибировать связывание АВ с его мишенью. В этих вариантах реализации, если АВ модифицирован с применением ММ или связан с ним и находится в присутствии мишени, связывание АВ с мишенью отсутствует или по существу отсутствует или составляет не более 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% от связывания АВ с мишенью, по сравнению со связыванием АВ, не модифицированным с применением ММ, исходным АВ или АВ, не связанным с ММ, с мишенью в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении в анализе в условиях *in vivo* или *in vitro*.

**[000126]** Если АВ связан с ММ или модифицирован с его применением, ММ «маскирует», уменьшает или ингибирует иным образом специфичное связывание АВ с мишенью. Если АВ связан с ММ или модифицирован с его применением, такая связь или модификация может вызвать структурное изменение, которое уменьшает или ингибирует способность АВ специфично связывать свою мишень.

**[000127]** АВ, связанный с ММ или модифицированный с его применением, может быть представлен следующими формулами (в порядке от amino (N)-концевой области к карбокси (C)-концевой области):

(ММ)-(АВ)

(АВ)-(ММ)

(ММ)-L-(АВ)

(АВ)-L-(ММ)

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, АВ представляет собой антитело или фрагмент этого антитела и L представляет собой линкер. Во многих вариантах реализации желательной может быть вставка в композицию одного или более линкеров, например, гибких линкеров, чтобы обеспечить гибкость.

**[000128]** Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ММ не является природным партнером по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не имеет или по существу не имеет гомологии с

любым природным партнером по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ обладает не более чем 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% сходством с любым природным партнером по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не более чем на 20% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ не более чем на 10% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ.

#### Расщепляемые фрагменты (СМ)

**[000129]** Активируемые антитела к CD166 согласно настоящему изобретению содержат расщепляемый фрагмент (СМ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ содержит аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, обычно внеклеточной протеазы. Подходящие субстраты могут быть определены с применением любой из множества известных методик. Например, пептидные субстраты определяют с применением способов, описанных в патенте США № 7666817 за авторством Daugherty et al.; в патенте США № 8563269 за авторством Stagliano et al.; и в PCT публикации № WO 2014/026136 за авторством La Porte et al., содержание каждого из которых настоящим полностью включено посредством ссылки. (См. также Boulware et al. «Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics». Biotechnol Bioeng. 106.3 (2010): 339-46).

**[000130]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения протеаза, которая расщепляет СМ, активна, например, активирована или в ином случае не регулируется, в пораженной ткани, и указанная протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвергается воздействию протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения протеаза локализована совместно с CD166 в ткани, и указанная протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвергается воздействию протеазы. На ФИГ. 1 изображены конъюгаты активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства,

которые преимущественно активируются в микросреде опухоли, где присутствуют специфичные для опухоли протеазы.

**[000131]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержат АВ, который модифицирован с применением ММ, а также содержат один или более расщепляемых фрагментов (СМ). Такие АА проявляют активируемое/переключаемое связывание с мишенью АВ. АА обычно содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированный с применением маскирующего фрагмента (ММ) или связанный с ним, и модифицируемый или расщепляемый фрагмент (СМ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ содержит аминокислотную последовательность, которая служит в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы.

**[000132]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ представляет собой полипептид, содержащий до 15 аминокислот в длину.

**[000133]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ представляет собой полипептид, который содержит первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом для по меньшей мере одной матричной металлопротеазы (ММП), и второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждая из субстратной последовательности СМ1 и субстратной последовательности СМ2 субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет собой полипептид, содержащий до 15 аминокислот в длину.

**[000134]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ представляет собой субстрат СМ1-СМ2, аминокислотная последовательность которого представлена ниже:

**Расщепляемый фрагмент 3001 (субстрат 3001)**

AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)

**[000135]** Элементы АА сгруппированы так, что ММ и СМ расположены таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени АВ связывает мишень, тогда как если АА находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфичное связывание АВ со своей мишенью уменьшается или ингибируется. Специфичное связывание АВ со своей мишенью может быть уменьшено из-за ингибирования или маскировки способности АВ специфично связывать свою мишень под действием ММ.

**[000136]** Kd АВ, модифицированного с применением ММ и СМ, в отношении мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000,

100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 25-50, 50-250, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 25-500, 500-2500, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 2500-5000, 5000-50000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 50000-500000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз больше, чем Kd АВ, не модифицированного с применением ММ и СМ, или исходного АВ в отношении мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с применением ММ и СМ, в отношении мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 25-50, 50-250, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 25-500, 500-2500, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 2500-5000, 5000-50000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 50000-500000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с применением ММ и СМ, или исходного АВ в отношении мишени.

**[000137]** Если АВ модифицирован с применением ММ и СМ и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, по меньшей мере одной протеазы), специфичное связывание АВ со своей мишенью уменьшается или ингибируется, по сравнению со специфичным связыванием АВ, не модифицированного с применением ММ и СМ, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или связыванием АВ, не модифицированного с применением ММ и СМ, со своей мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации с применением ММ и СМ может быть уменьшена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении в анализе в условиях *in vivo* или *in vitro*.

**[000138]** В настоящей заявке термин «расщепленное состояние» относится к состоянию АА после модификации СМ под действием по меньшей мере одной протеазы. В настоящей заявке термин «нерасщепленное состояние» относится к состоянию АА в отсутствие расщепления СМ протеазой. Как обсуждалось выше, термин «активируемые антитела» используется в настоящей заявке для обозначения АА как в их нерасщепленном (нативном) состоянии, так и в их расщепленном состоянии. Обычный специалист в данной области техники поймет, что согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения расщепленное АА может не содержать ММ из-за расщепления



СМ протеазой, что приводит к высвобождению по меньшей мере ММ (например, если ММ не присоединен к АА с помощью ковалентной связи (например, дисульфидной связи между остатками цистеина).

**[000139]** Под активируемым или переключаемым подразумевается, что АА проявляет первый уровень связывания с мишенью, когда АА находится в ингибированном, замаскированном или нерасщепленном состоянии (т. е., в первой конформации), и второй уровень связывания с мишенью в неингибированном, незамаскированном и/или нерасщепленном состоянии (т. е. вторая конформация), причем второй уровень связывания с мишенью больше первого уровня связывания. Обычно доступ мишени к АВ из АА больше в присутствии расщепляющего агента, способного расщеплять СМ, т. е. протеазы, чем в отсутствие такого расщепляющего агента. Таким образом, если АА находится в нерасщепленном состоянии, связывание АВ с мишенью ингибируется и его связывание с мишенью может маскироваться (т. е. первая конформация такова, что АВ не может связать мишень), а в расщепленном состоянии связывание АВ с мишенью не ингибируется или его связывание с мишенью не маскируется.

**[000140]** СМ и АВ из АА выбирают таким образом, чтобы АВ представлял собой связывающий фрагмент для конкретной мишени, а СМ представлял собой субстрат для протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения протеаза локализована совместно с мишенью в месте лечения или в месте диагностики у субъекта. В настоящей заявке термин «совместно локализованный» относится к расположению в одном и том же месте или относительно близости от него. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения протеаза расщепляет СМ с образованием активированного антитела, которое связывается с мишенью, расположенной рядом с сайтом расщепления. АА согласно настоящему изобретению имеют конкретное применение, если, например, протеаза, способная расщеплять сайт в СМ, т. е. протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях в ткани, содержащей мишень, места лечения или места диагностики, чем в ткани мест, не подлежащих лечению (например, в здоровых тканях). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ согласно настоящему изобретению также расщепляется одной или более другими протеазами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения это одна или более других протеаз, которые совместно локализованы с мишенью и которые отвечают за расщепление СМ в условиях *in vivo*.

**[000141]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА обеспечивают уменьшенную токсичность и/или нежелательные побочные эффекты, которые в ином случае могут возникнуть в результате связывания АВ в местах, не

подлежащих лечению, если АВ не были замаскированы или их связывание с мишенью не ингибировалось иным образом.

**[000142]** В целом, АА может быть сконструировано путем выбора АВ, представляющего интерес, и конструирования оставшейся части АА таким образом, чтобы, при конформационном ограничении, ММ обеспечивал маскировку АВ или уменьшение связывания АВ с его мишенью. Критерии структурного дизайна могут быть приняты во внимание, чтобы обеспечить эту функциональную особенность.

**[000143]** Предложены АА, проявляющие переключаемый фенотип целевого динамического диапазона в отношении связывания с мишенью в ингибированной конформации в сравнении с неингибированной конформацией. Динамический диапазон обычно относится к отношению (а) максимального обнаруженного уровня параметра при первом наборе условий к (b) минимальному обнаруженному значению этого параметра при втором наборе условий. Например, применительно к активируемому антителу динамический диапазон относится к отношению (а) максимального обнаруженного уровня связывания белка-мишени с АА в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ из АА, к (b) минимальному обнаруженному уровню связывания белка-мишени с АА в отсутствие протеазы. Динамический диапазон АА может быть рассчитан как отношение константы диссоциации для обработки расщепляющим одно АА агентом (например, ферментом) к константе диссоциации для обработки расщепляющим несколько АА агентом. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. АА, имеющие относительно более высокие значения динамического диапазона (например, больше 1), проявляют более желательные фенотипы переключения так, что связывание белка-мишени с помощью АА происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего агента (например, фермента), способного расщеплять СМ из АА, чем в отсутствие расщепляющего агента.

**[000144]** СМ специфично расщепляется по меньшей мере одной протеазой со скоростью примерно  $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 или  $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ специфично расщепляется со скоростью примерно  $100000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ специфично расщепляется со скоростью от примерно  $1 \times 10^2$  до примерно  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (т. е. от примерно  $1 \times 10^2$  до примерно  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

**[000145]** Для специфичного расщепления ферментом создают контакт между ферментом и СМ. Если АА, содержащее АВ, связанный с ММ и СМ, находится в присутствии мишени и достаточной активности фермента, СМ может быть расщеплен. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с СМ и осуществлять расщепление. Можно легко предположить, что фермент может находиться вблизи СМ, но не способен осуществлять расщепление из-за других клеточных факторов или модификации белка фермента.

#### Структурные конфигурации активируемых антител

**[000146]** АА согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены во множестве структурных конфигураций. Примерные формулы для АА приведены ниже. Конкретно предусмотрено, что порядок от N-конца к С-концу АВ, ММ и СМ может быть обращен в активируемом антителе. Также конкретно предусмотрено, что СМ и ММ могут перекрываться по аминокислотной последовательности, например, так, что СМ содержится внутри ММ.

**[000147]** Например, АА могут быть представлены следующей формулой (в порядке от amino (N)-концевой области к карбокси (C)-концевой области):

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

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, СМ представляет собой расщепляемый фрагмент и АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Следует отметить, что, несмотря на то, что ММ и СМ указаны как отдельные компоненты в формулах выше, во всех примерных вариантах реализации (включая формулы), раскрытых в настоящей заявке, предусмотрено, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, так, что СМ полностью или частично содержится внутри ММ. Помимо этого формулы, приведенные выше, обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или С-конце относительно элементов АА.

**[000148]** Во многих вариантах реализации желательной может быть вставка одного или более линкеров, например, гибких линкеров, в конструкцию АА так, чтобы обеспечить гибкость в одном или более из соединения ММ-СМ, соединения СМ-АВ или в обоих. Например, АВ, ММ и/или СМ могут не содержать достаточное количество остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, в частности, Gly и Ser, в частности, Gly), чтобы обеспечить целевую гибкость. Как таковой, переключаемый фенотип таких конструкций АА может получить преимущество от введения одной или более аминокислот, чтобы обеспечить гибкий линкер. Помимо этого, как описано ниже, в случае если АА

обеспечено в виде конформационно ограниченной конструкции, гибкий линкер может быть функционально вставлен, чтобы облегчить образование и поддержание циклической структуры в нерасщепленном активируемом антители.

**[000149]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA содержит первый соединяющий пептид (LP1) и второй соединяющий пептид (LP2), и при этом AA в нерасщепленном состоянии имеет структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два соединяющих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу.

**[000150]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице.

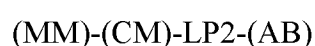
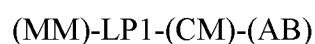
**[000151]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 3), GGSGG (SEQ ID NO: 4), GSGSG (SEQ ID NO: 5), GSGGG (SEQ ID NO: 6), GGGSG (SEQ ID NO: 7) и GSSSG (SEQ ID NO: 8).

**[000152]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 9), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 10), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11), GSSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 12), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 13) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 14).

**[000153]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 15), GSSGT (SEQ ID NO: 16) или GSSG (SEQ ID NO: 17).

**[000154]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AB имеет константу диссоциации примерно 100 nM или менее в отношении связывания с CD166.

**[000155]** Например, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения AA включает одну из следующих формул (причем формула ниже представляет аминокислотную последовательность либо в направлении от N-конца к C-концу, либо в направлении от C-конца к N-концу):



## (MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

где MM, CM и AB определены выше; причем LP1 и LP2 каждый независимо и необязательно присутствуют или отсутствуют, представляют собой одинаковые или разные гибкие линкеры, которые содержат по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Помимо этого формулы, приведенные выше, обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или C-конце относительно элементов AA. Примеры включают, но не ограничиваются ими, нацеливающие фрагменты (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и фрагменты, увеличивающие период полужизни в сыворотке (например, полипептиды, которые связывают сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HAS))).

**[000156]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA подвергается воздействию и расщепляется протеазой таким образом, что в активированном или расщепленном состоянии активированное антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, которая содержит по меньшей мере часть последовательности LP2 и/или CM после отщепления CM протеазой.

**[000157]** Линкеры, подходящие для применения в композициях, описанных в настоящей заявке, обычно представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированных AB или AA, чтобы облегчить ингибирование связывания AB с мишенью. Такие линкеры обычно называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любые подходящие различные длины, такие как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину.

**[000158]** Примерные гибкие линкеры включают глициновые полимеры (G)<sub>n</sub>, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые полимеры и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут играть роль нейтральной связи между компонентами. Глицин получает доступ к значительно большему ФУ-пространству, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с

более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Примерные гибкие линкеры включают, но не ограничиваются ими, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 3), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 5), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 7), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 8) и тому подобные. Обычный специалист в данной области техники поймет, что конструкция AA может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так, что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру, чтобы обеспечить целевую структуру AA.

**[000159]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA также содержит сигнальный пептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигнальный пептид конъюгирован с AA за счет спейсера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер конъюгирован с AA в отсутствие сигнального пептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер соединен непосредственно с MM активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер соединен непосредственно с MM из AA в структурной группировке от N-конца до C-концу спейсер-MM-CM-AB. Примером спейсера, соединенного непосредственно с N-концом MM из AA, является QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Другие примеры спейсера, соединенного непосредственно с N-концом MM из AA, включают QGQSGQG (SEQ ID NO: 305), QGQSG (SEQ ID NO: 306), QGQS (SEQ ID NO: 307), QGQ, QG и Q. Другие примеры спейсера, соединенного непосредственно с N-концом MM из AA, включают GQSGQG (SEQ ID NO: 359), QSGQG (SEQ ID NO: 360), SGQG (SEQ ID NO: 361), GQG и G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ни один спейсер не присоединен к N-концу MM. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 305). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSG (SEQ ID NO: 306). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQS (SEQ ID NO: 307). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотный остаток Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность GQSGQG (SEQ ID NO: 359). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QSGQG (SEQ ID NO: 360). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SGQG (SEQ ID NO: 361). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность GQG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер отсутствует.

#### Конъюгированные активируемые антитела

**[000160]** Композиции AA и способы согласно настоящему изобретению позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина (например, цистеину, лизину) в АВ без ущерба для активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела к CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции и способы согласно настоящему изобретению позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина в АВ без уменьшения или нарушения иным образом одной или более дисульфидных связей внутри MM. Композиции и способы согласно настоящему изобретению позволяют получить активируемое антитело к CD166, которое конъюгировано с одним или более агентами, например, с любым из множества терапевтических, диагностических и/или профилактических агентов, например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, без конъюгации любого (любых) агента (ов) с MM активируемого антитела к CD166. Композиции и способы согласно настоящему изобретению позволяют получить конъюгированные активируемые антитела к CD166, в которых MM сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ из AA в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы согласно настоящему изобретению позволяют получить конъюгированные активируемые антитела к CD166, в которых AA все еще активировано, т. е. расщеплено, в присутствии протеазы, которая может расщеплять CM.

**[000161]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA, описанные в настоящей заявке, также содержат агент, конъюгированный с активируемым

антителом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгированный агент представляет собой терапевтический агент, такой как противовоспалительный и/или противоопухолевый агент. В таких вариантах реализации агент конъюгирован с углеводным фрагментом активируемого антитела, например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых углеводный фрагмент расположен вне антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент конъюгирован с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе.

**[000162]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой цитотоксический агент, такой как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т. е. радиоконъюгат).

**[000163]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой обнаруживаемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, агент представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, один или более биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или обладающего ферментативной активностью, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических способов), один или более радиоизотопов или радионуклидов, одну или более флуоресцентных меток, одну или более ферментативных меток и/или один или более хемилюминесцентных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемые фрагменты присоединяют с помощью спейсерных молекул.

**[000164]** Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т. е. радиоконъюгат). Подходящие цитотоксические агенты включают, например, доластатины и их производные (например, ауристин Е, АFР, ММАF, ММАЕ, ММАD, DMAF, DMAE). Например, агент представляет собой монометилауристин Е (ММАЕ) или монометилауристин D (ММАD). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой агент, выбранный из группы, перечисленной в таблице 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой доластатин. Согласно некоторым вариантам

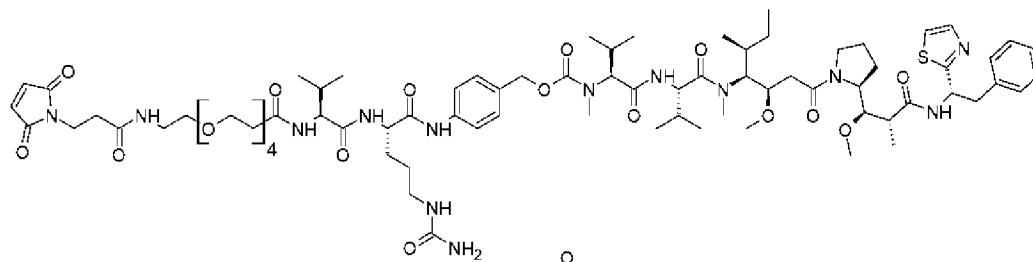


реализации настоящего изобретения агент представляет собой ауристин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой ауристин E или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристин E (ММАЕ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристин D (ММАД). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой DM1 или DM4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой дуокармицин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой калихеамицин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой пирролобензодиазепин. В примерном варианте реализации агент представляет собой DM4.

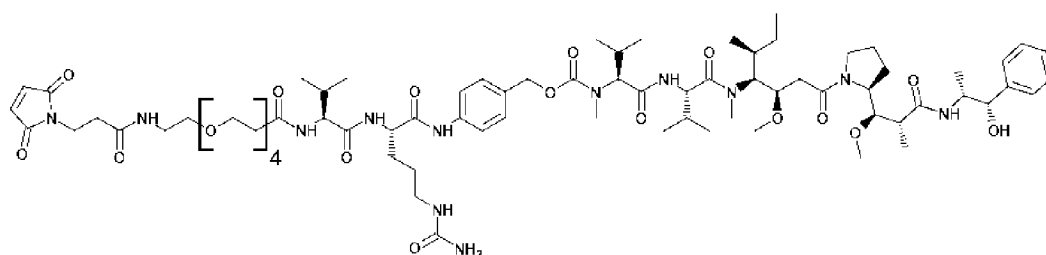
**[000165]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связан с АВ с применением малеимид-капроил-валин-цитруллинового линкера или малеимид-ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент соединен с АВ с применением малеимид-капроил-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент соединен с АВ с применением малеимид-ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристин D (ММАД), соединенный с АВ с применением малеимид-ПЭГ-валин-цитруллин-параминобензилоксикарбонильного линкера и эта конструкция целевого линкерного груза упоминается в настоящей заявке как «vc-ММАД». Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристин E (ММАЕ), связанный с АВ с применением малеимид-ПЭГ-валин-цитруллин-параминобензилоксикарбонильного линкера, и эта конструкция целевого линкерного груза упоминается в настоящей заявке как «vc-ММАЕ». Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент соединен с АВ с применением малеимид-ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристин D (ММАД), соединенный с АВ с применением малеимид-бис-ПЭГ-валин-цитруллин-параминобензилоксикарбонильного линкера, и эта конструкция целевого линкерного груза

упоминается в настоящей заявке как «PEG2-vc-MMAD». Структуры vc-MMAD, vc-MMAE и PEG2-vc-MMAD представлены ниже:

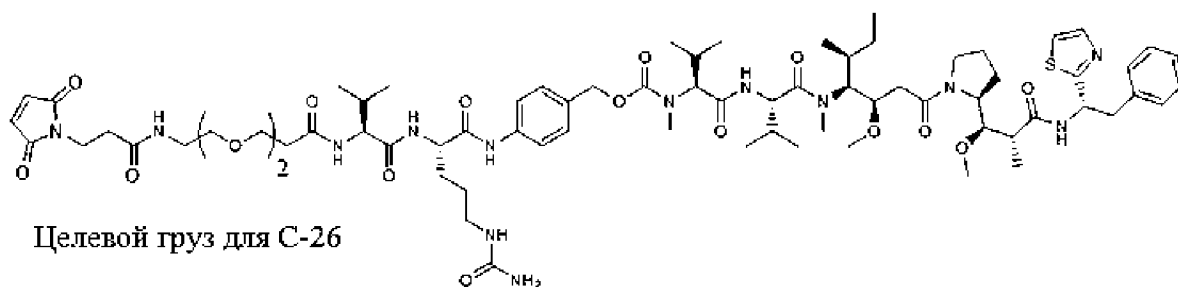
vc-MMAD:



vc-MMAE:

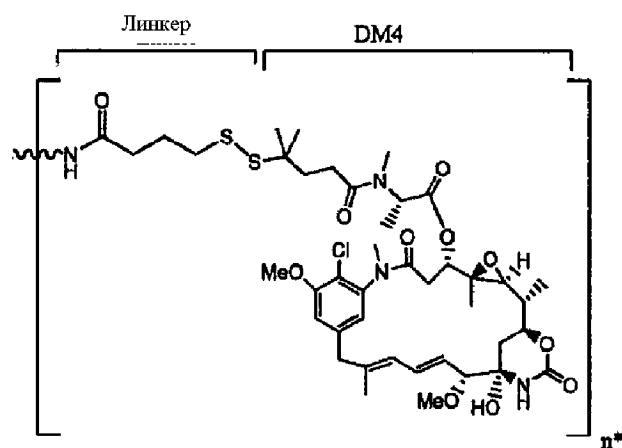


PEG2-vc-MMAD:



[000166] В примерном варианте реализации агент конъюгирован с АА за счет лизина. В примерном варианте реализации SPDB-DM4 присоединен к активируемому антителу за счет эpsilon-аминогруппы лизина на АА, например. Эpsilon-аминогруппа лизина.

[000167] В примерном варианте реализации агент представляет собой DM4, и линкер-DM является следующим:



**[000168]** Согласно настоящему изобретению также предложены конъюгированные АА, которые содержат АА, соединенное с целевым грузом монометилауристатином D (ММАД), причем указанное АА содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ из АА в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, и СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы ММП.

**[000169]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММАД-конъюгированное АА может быть конъюгировано с применением любого из нескольких способов присоединения агентов к АВ: (а) присоединения к углеводным фрагментам АВ, или (b) присоединения к сульфгидрильным группам АВ, или (с) присоединения к аминогруппам АВ, или (d) присоединения к карбоксилатным группам АВ.

**[000170]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевой груз ММАД конъюгирован с АВ за счет линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевой груз ММАД конъюгирован с цистеином в АВ за счет линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевой груз ММАД конъюгирован с лизином в АВ за счет линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевой груз ММАД конъюгирован с другим остатком АВ за счет линкера, таким как те остатки, которые раскрыты в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой тиолсодержащий линкер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой расщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения линкер выбран из группы, состоящей из линкеров, представленных в таблицах 6 и 7. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA и целевой груз MMAD соединены за счет малеимид-капроил-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA и целевой груз MMAD соединены за счет малеимид-ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA и целевой груз MMAD соединены за счет малеимид-капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA и целевой груз MMAD соединены за счет малеимид-ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевой груз MMAD конъюгирован с АВ с применением технологии частичного восстановления и конъюгации, раскрытой в настоящей заявке.

**[000171]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиэтиленгликольный компонент (ПЭГ) линкера согласно настоящему изобретению образован из 2 мономеров этиленгликоля, 3 мономеров этиленгликоля, 4 мономеров этиленгликоля, 5 мономеров этиленгликоля, 6 мономеров этиленгликоля, 7 мономеров этиленгликоля, 8 мономеров этиленгликоля, 9 мономеров этиленгликоля или по меньшей мере 10 мономеров этиленгликоля. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент ПЭГ представляет собой разветвленный полимер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент ПЭГ представляет собой неразветвленный полимер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полимерный компонент ПЭГ функционализирован с применением аминогруппы или ее производного, карбоксильной группы или ее производного или как аминогруппы или ее производного, так и карбоксильной группы или ее производного.

**[000172]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент ПЭГ линкера согласно настоящему изобретению представляет собой аминотетраэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент ПЭГ линкера согласно настоящему изобретению представляет собой аминотриэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент ПЭГ линкера согласно настоящему изобретению представляет собой аминодиэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения аминопроизводное представляет собой образование амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой, с которой оно конъюгировано. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения карбоксильное производное представляет собой образование амидной связи между карбоксильной группой и аминогруппой, с которой оно конъюгировано. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения карбоксильное производное представляет собой образование сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой оно конъюгировано.

**[000173]** Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно применять, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii* диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Различные радионуклиды доступны для получения радиоконъюгированных антител. Примеры включают Bi<sup>212</sup>, I<sup>131</sup>, In<sup>131</sup>, Y<sup>90</sup> и Re<sup>186</sup>.

**[000174]** Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с применением различных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой примерный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. (См. WO94/11026).

**[000175]** В таблице 1 перечислены некоторые примерные фармацевтические агенты, которые можно применять в изобретении, описанном в настоящей заявке, однако этот перечень не является исчерпывающим.

**Таблица 1: Примерные фармацевтические агенты для конъюгации**

### **ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ**

Ауристатины	Турбостатин
Ауристатин Е	Фенстатины
Монометилауристатин D (MMAD)	Гидроксифенстатин
Монометилауристатин Е (MMAE)	Спонгистатин 5
Десметилауристатин Е (DMAE)	Спонгистатин 7
Ауристатин F	Халистатин 1
Монометилауристатин F (MMAF)	Халистатин 2
Десметилауристатин F (DMAF)	Халистатин 3
Производные ауристатина, например их амиды	Модифицированные бриостатины
Ауристатин тирамин	Галокомстатины
Ауристатин хинолин	Пирролобензимидазолы (PBI)
Доластатины	Цибростатинб
Производные доластатина	Доксалиформ
Доластатин 16 DmJ	Аналоги антрациклинов
Доластатин 16 Dpv	
Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4	
Производные майтанзиноидов	Аналог цемадотина (CemCH2-SH)
Дуокармицин	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (PE38)
Производные дуокармицина	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38)
Альфа-аманитин	ZJ-101
Антрациклины	OSW-1
Доксорубицин	4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина
Даунорубицин	Ингибиторы топоизомеразы
Бриостатины	Гемиастерлин
Камптотецин	Цефалотаксин
Производные камптотецина	Гомогаррингтонин
7-замещенный камптотецин	Димеры пирролобензодиазепина (PBD)
10,11-	Функционализированные
Дифторметилендиоксиамптотецин	пирролобензодиазепены
Комбретастатины	Калихеамицины
Дебромоеплизиятоксин	Подофиллотоксины

Кахалалид-Ф

Дискодермолид

Эктеинасцидины

### ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ

Ацикловир

Вира А

Симметрел

### ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ

#### АГЕНТЫ

Нистатин

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ

#### АГЕНТЫ

Адриамицин

Церубидин

Блеомицин

Алкеран

Велбан

Онковин

Фторурацил

Метотрексат

Тиотепа

Бисантрен

Новантрон

Тиогуанин

Прокарбазин

Цитарабин

### АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ

#### АГЕНТЫ

Таксаны

Алкалоиды барвинка

### КОНЬЮГИРУЕМЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ

#### ОБНАРУЖЕНИЯ

Флуоресцеин и его производные

Изотиоцианат флуоресцеина (FITC)

### РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ

#### АГЕНТЫ

I<sup>125</sup>

I<sup>131</sup>

Zr<sup>89</sup>

In<sup>111</sup>

I<sup>123</sup>

I<sup>131</sup>

mTc<sup>99</sup>

Tl<sup>201</sup>

Xe<sup>133</sup>

C<sup>11</sup>

Cu<sup>62</sup>

F<sup>18</sup>

Ga<sup>68</sup>

N<sup>13</sup>

O<sup>15</sup>

K<sup>38</sup>

Rb<sup>82</sup>

mTc<sup>99</sup> (технеций)

### ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Барий

Аминогликозиды

Золото

Стрептомицин

Платина

Неомицин

Канамицин

**ПРОТИВОМИКОПЛАЗМЕННЫЕ****АГЕНТЫ**

Амикацин

Тилозин

Гентамицин

Спектиномицин

Тобрамицин

Стрептомицин В

Спектиномицин

Ампициллин

Сульфаниламид

Полимиксин

Хлорамфеникол

**[000176]** Обычные специалисты в данной области техники установят, что большое количество возможных фрагментов может быть связано с готовыми антителами согласно настоящему изобретению. (См., например, «Conjugate Vaccines», Contributions to Microbiology and Immunology, под ред. J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr, Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки).

**[000177]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА конъюгировано с одним или более эквивалентами агента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА конъюгировано с одним эквивалентом агента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА конъюгировано с двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более чем десятью эквивалентами агента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА является частью смеси АА, имеющих одинаковое количество эквивалентов конъюгированных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА является частью смеси АА, имеющих различное количество эквивалентов конъюгированных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смесь АА такова, что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от нуля до одного, от одного до двух, от двух до трех, от трех до четырех, от четырех до пяти, от пяти до шести, от шести до семи, от семи до восьми, от восьми до девяти, от девяти до десяти и десять и более. Согласно



некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смесь АА такова, что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представлена смесь АА, в которой среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от трех до четырех. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представлена смесь АА, в которой среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от 3,4 до 3,8. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представлена смесь АА, в которой среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от 3,4 до 3,6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит одну или более сайт-специфичных модификаций аминокислотной последовательности так, что количество остатков лизина и/или цистеина увеличивается или уменьшается относительно исходной аминокислотной последовательности активируемого антитела, таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения это соответственно, приводит к увеличению или уменьшению количества агентов, которые могут быть конъюгированы с активируемым антителом, или согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения приводит к ограничению конъюгации агентов с АА сайт-специфичным образом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированное АА модифицируют с применением одной или более неприродных аминокислот сайт-специфичным образом, соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, ограничивая конъюгацию агентов только сайтами неприродных аминокислот.

#### Композиции и способы получения конъюгированных активируемых антител

**[000178]** Активируемые антитела к CD166 имеют по меньшей мере одну точку конъюгации для агента (для получения конъюгированного АА). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяют не все возможные точки конъюгации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения некоторые из природных точек контакта модифицированы или удалены, чтобы сделать их недоступными для конъюгации с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более точек конъюгации представляют собой атомы азота, такие как эpsilon-аминогруппа лизина.

**[000179]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании межцепочечных дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании межцепочечных сульфидных связей, но не атомы серы, участвующие в образовании внутрицепочечных дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы цистеина или других аминокислотных остатков, содержащих атом серы. Такие остатки могут встречаться в природе в структуре антитела или могут быть встроены в антитело путем сайт-направленного мутагенеза, химического превращения или неправильного встраивания неприродных аминокислот.

**[000180]** Также предложены способы получения конъюгата активируемого антитела к CD166, имеющего одну или более межцепочечных дисульфидных связей в АВ и одну или более внутрицепочечных дисульфидных связей в ММ, а также предложено лекарственное средство, реагирующее со свободными тиолами. Способ обычно включает частичное восстановление межцепочечных дисульфидных связей в АА с помощью восстанавливающего агента, такого как, например, ТСЕР; и конъюгирование лекарственного средства, способного реагировать со свободными тиолами, с частично восстановленным активируемым антителом. В настоящей заявке термин частичное восстановление относится к ситуациям, когда активируемое антитело к CD166 вступает в контакт с восстанавливающим агентом и не все дисульфидные связи, например, не все возможные сайты конъюгации восстанавливаются. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения восстанавливается менее 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или менее 5% всех возможных сайтов конъюгации.

**[000181]** Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ восстановления и конъюгирования агента, например, лекарственного средства, с активируемым антителом к CD166, что приводит к селективности расположения агента. Способ обычно включает частичное восстановление активируемого антитела к CD166 с применением восстанавливающего агента так, что любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другой части АА, отличной от АВ, не восстанавливаются, и конъюгирование агента с межцепочечными тиолами в АВ. Сайт (ы) конъюгации выбирают так, чтобы обеспечить желаемое размещение агента, чтобы конъюгация происходила в целевом сайте. Восстанавливающий агент представляет собой, например, ТСЕР. Условия реакции восстановления, такие как, например, отношение

восстанавливающего агента к активируемому антителу, продолжительность инкубации, температура во время инкубации, pH раствора для реакции восстановления и т.д., определяют путем идентификации условий, которые позволяют получить конъюгированное АА, в котором ММ сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ из АА в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу к CD166 будет варьироваться в зависимости от активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу к CD166 будет находиться в пределах диапазона от примерно 20:1 до 1:1, от примерно 10:1 до 1:1, от примерно 9:1 до 1:1, от примерно 8:1 до 1:1, от примерно 7:1 до 1:1, от примерно 6:1 до 1:1, от примерно 5:1 до 1:1, от примерно 4:1 до 1:1, от примерно 3:1 до 1:1, от примерно 2:1 до 1:1, от примерно 20:1 до 1:1,5, от примерно 10:1 до 1:1,5, от примерно 9:1 до 1:1,5, от примерно 8:1 до 1:1,5, от примерно 7:1 до 1:1,5, от примерно 6:1 до 1:1,5, от примерно 5:1 до 1:1,5, от примерно 4:1 до 1:1,5, от примерно 3:1 до 1:1,5, от примерно 2:1 до 1:1,5, от примерно 1,5:1 до 1:1,5 или от примерно 1:1 до 1:1,5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 5:1 до 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 5:1 до 1,5:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 4:1 до 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 4:1 до 1,5:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 8:1 до примерно 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 2,5:1 до 1:1.

**[000182]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ восстановления межцепочечных дисульфидных связей в АВ активируемого антитела к CD166 и конъюгирования агента, например, тиолсодержащего агента, такого как лекарственное средство, с полученными межцепочечными тиолами для селективного расположения агента (ов) на АВ. Способ обычно включает частичное восстановление АВ с применением восстанавливающего агента с образованием по меньшей мере двух межцепочечных тиолов, без образования всех возможных межцепочечных тиолов в активируемом антителе; и конъюгирование агента с межцепочечными тиолами частично восстановленного АВ. Например, АВ из АА частично восстанавливают в течение примерно 1 часа при температуре примерно 37°C при целевом

отношении восстанавливающий агент:активируемое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение восстанавливающего агента к АА будет находиться в пределах диапазона от примерно 20:1 до 1:1, от примерно 10:1 до 1:1, от примерно 9:1 до 1:1, от примерно 8:1 до 1:1, от примерно 7:1 до 1:1, от примерно 6:1 до 1:1, от примерно 5:1 до 1:1, от примерно 4:1 до 1:1, от примерно 3:1 до 1:1, от примерно 2:1 до 1:1, от примерно 20:1 до 1:1,5, от примерно 10:1 до 1:1,5, от примерно 9:1 до 1:1,5, от примерно 8:1 до 1:1,5, от примерно 7:1 до 1:1,5, от примерно 6:1 до 1:1,5, от примерно 5:1 до 1:1,5, от примерно 4:1 до 1:1,5, от примерно 3:1 до 1:1,5, от примерно 2:1 до 1:1,5, от примерно 1,5:1 до 1:1,5 или от примерно 1:1 до 1:1,5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 5:1 до 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 5:1 до 1,5:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 4:1 до 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 4:1 до 1,5:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 8:1 до примерно 1:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение находится в пределах диапазона от примерно 2,5:1 до 1:1.

**[000183]** Тиолсодержащий реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающий агент может представлять собой, например, ТСЕР. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения восстановленное АА может быть очищено перед конъюгацией с использованием, например, колоночной хроматографии, диализа или диафильтрации. Согласно другому варианту восстановленное антитело не очищают после частичного восстановления и перед конъюгацией.

**[000184]** Согласно настоящему изобретению также предложены частично восстановленные активируемые антитела к CD166, в которых по меньшей мере одна дисульфидная связь между цепями в АА была восстановлена с применением восстанавливающего агента, без нарушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, причем указанное АА содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ из АА в нерасщепленном состоянии с мишенью CD166, и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который

функционирует в качестве субстрата для протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ связан с АВ за счет СМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей АА не нарушаются восстанавливающим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей ММ внутри АА не нарушаются восстанавливающим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в нерасщепленном состоянии имеет структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения восстанавливающий агент представляет собой ТСЕР.

**[000185]** Согласно настоящему изобретению также предложены частично восстановленные АА, в которых по меньшей мере одна дисульфидная связь между цепями в АА была восстановлена с применением восстанавливающего агента, без нарушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, причем указанное АА содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с мишенью, например, CD166, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ из АА в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ связан с АВ за счет СМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей АА не нарушаются восстанавливающим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей ММ внутри АА не нарушаются восстанавливающим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА в нерасщепленном состоянии имеет структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения восстанавливающий агент представляет собой ТСЕР.

**[000186]** Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ восстановления и конъюгирования агента, например, лекарственного средства, с активируемым антителом к CD166, позволяющий селективно расположить агент путем обеспечения активируемого антитела к CD166 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина. Согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения определенное количество остатков лизина и/или цистеина больше или меньше количества соответствующих остатков в аминокислотной последовательности исходного антитела или активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения определенное количество остатков лизина и/или цистеина может обусловить определенное количество эквивалентов агента, которые могут быть конъюгированы с антителом к CD166 или активируемым антителом к CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения определенное количество остатков лизина и/или цистеина может обусловить определенное количество эквивалентов агента, которые могут быть конъюгированы с антителом к CD166 или активируемым антителом к CD166 сайт-специфичным образом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированную А модифицируют с применением одной или более не природных аминокислот сайт-специфичным образом, соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, ограничивая конъюгацию агентов только сайтами не природных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело к CD166 или активируемое антитело к CD166 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина могут быть частично восстановлены с применением восстанавливающего агента, как обсуждается в настоящем документе, так, что любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другой части АА, отличной от АВ, не восстанавливаются, и конъюгирования агента с межцепочечными тиолами в АВ.

**[000187]** Связывание можно осуществлять с помощью любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы, при условии, что антитело и другой фрагмент сохраняют свои соответствующие виды активности. Эта связь может включать многие химические механизмы, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывание представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем встраивания внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты можно применять при связывании белковых молекул, таких как антитела согласно настоящему изобретению, с другими молекулами. Например, типичные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные сукцинимидные эфиры, диизоцианаты, глутаровый альдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Предполагается, что этот список не является исчерпывающим для различных классов связывающих агентов, известных в данной

области техники, а предпочтительнее является примером более распространенных связывающих агентов. (См. Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)).

**[000188]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в дополнение к композициям и способам согласно настоящему изобретению конъюгированное АА также может быть модифицировано для сайт-специфичной конъюгации за счет модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность АА. Эти модифицированные аминокислотные последовательности сконструированы, чтобы обеспечить контролируемое размещение и/или дозировку конъюгированного агента внутри конъюгированного активируемого антитела. Например, АА может быть модифицировано так, чтобы включать замены цистеина в положениях на легкой и тяжелой цепях, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и не оказывают отрицательного влияния на сворачивание и сборку белка, а также не влияют на связывание антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА может быть модифицировано для включения или введения иным способом одного или более остатков неприродных аминокислот внутрь АА, чтобы обеспечить подходящие сайты для конъюгации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА может быть модифицировано для включения или введения иным способом ферментативно активируемых пептидных последовательностей внутрь последовательности АА.

**[000189]** Подходящие линкеры описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), в которой описано применение MBS (сложного *N*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимидного эфира). См. также патент США № 5030719, в котором описано применение галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом посредством олигопептидного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящие линкеры включают: (i) гидрохлорид EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида); (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-придилдитио)толуол) (Pierce Chem. Co., каталожный номер 21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-придилдитио)пропионамидо]гексаноат) (Pierce Chem. Co., каталожный номер 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-придилдитио)пропионамид]гексаноат) (Pierce Chem. Co., каталожный номер 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., каталожный номер

24510), конъюгированный с EDC. Дополнительные линкеры включают, но не ограничиваются ими, SMCC ((сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил)-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат) или сульфо-SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат).

**[000190]** Описанные выше линкеры содержат компоненты, которые имеют различные характерные особенности, что приводит к получению конъюгатов с различными физико-химическими свойствами. Например, сложные сульфо-NHS-эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сложные сульфо-NHS-эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие сложные NHS-эфиры, менее растворимы, чем сложные сульфо-NHS-эфиры. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи обычно менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется в условиях *in vitro*, что приводит к уменьшению количества доступного конъюгата. В частности, сульфо-NHS может повысить стабильность карбодиимидных соединений. Карбодиимидные соединения (такие как EDC) при применении в комбинации с сульфо-NHS, образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем реакция карбодиимидного связывания по отдельности. В примерном варианте реализации линкер представляет собой SPDB. В другом примерном варианте реализации линкер представляет собой SPDB, агент представляет собой DM4.

**[000191]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкеры являются расщепляемыми. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкеры являются нерасщепляемыми. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствуют два или более линкеров. Два или более линкеров все являются одинаковыми, т. е. расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкеров являются разными, т. е., по меньшей мере один является расщепляемым и по меньшей мере один является нерасщепляемым.

**[000192]** Согласно настоящему изобретению применяют несколько способов присоединения агентов к АВ: (а) присоединение к углеводным фрагментам АВ, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или (с) присоединение к аминогруппам АВ, или (g) присоединение к карбоксилатным группам АВ. В соответствии с настоящим изобретением АВ могут быть ковалентно присоединены к агенту за счет промежуточного линкера, имеющего по меньшей мере две реакционноспособные группы: одну для реакции с АВ и одну для реакции с агентом. Линкер, который может включать любое



совместимое органическое соединение, может быть выбран так, чтобы реакция с АВ (или агентом) не оказывала неблагоприятного влияния на реакционную способность и селективность АВ. Кроме того, присоединение линкера к агенту может не нарушать активность агента. Подходящие линкеры для реакции с окисленными антителами или фрагментами окисленных антител включают те, которые содержат амин, выбранный из группы, состоящей из первичной аминной, вторичной аминной, гидразиновой, гидразидной, гидросиламинной, фенилгидразиновой, семикарбазидной и тиосемикарбазидной групп. Такие реакционноспособные функциональные группы могут существовать как часть структуры линкера или могут быть введены с помощью подходящей химической модификации линкеров, не содержащих такие группы.

**[000193]** В соответствии с настоящим изобретением подходящие линкеры для присоединения к восстановленным АВ включают те, которые имеют определенные реакционноспособные группы, способные к реакции с сульфгидрильной группой восстановленного антитела или фрагмента. Такие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими: реакционноспособные галогеналкильные группы (включая, например, галогенацетильные группы), п-меркурибензоатные группы и группы, способные к реакциям присоединения по Михаэлю (включая, например, малеимиды и группы типа, описанного Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

**[000194]** В соответствии с настоящим изобретением подходящие линкеры для присоединения к АВ, которые не являются ни окисленными, ни восстановленными, включают те, которые имеют определенные функциональные группы, способные к реакции с первичными аминогруппами, присутствующими в немодифицированных остатках лизина в АВ. Такие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, сложные карбоксильные и карбонильные эфиры NHS, сложные карбоксильные и карбонильные эфиры сульфо-NHS, сложные карбоксильные и карбонильные эфиры 4-нитрофенила, сложные карбоксильные и карбонильные эфиры пентафторфенила, ацилимидазолы, изоцианаты и изотиоцианаты.

**[000195]** В соответствии с настоящим изобретением подходящие линкеры для присоединения к АВ, которые не являются ни окисленными, ни восстановленными, включают те, которые имеют определенные функциональные группы, способные вступать в реакцию с группами карбоновых кислот, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в АВ, которые были активированы с применением подходящих реагентов. Подходящие активирующие реагенты включают EDC с добавленным NHS или сульфо-NHS или без него, и другие дегидратирующие агенты, применяемые для образования карбоксиамида. В этих случаях функциональные группы, присутствующие в подходящих

линкерах, включают первичные и вторичные амины, гидразины, гидросиламины и гидразиды.

**[000196]** Агент может быть присоединен к линкеру до или после присоединения линкера к АВ. В определенных приложениях желательным может быть получение сначала промежуточного соединения АВ-линкер, в котором линкер не содержит ассоциированный агент. В зависимости от конкретного приложения конкретный агент затем может быть ковалентно присоединен к линкеру. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АВ сначала присоединяют к ММ, СМ и ассоциированным линкерам, а затем присоединяют к линкеру в целях конъюгации.

**[000197]** *Разветвленные линкеры:* согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения применяют разветвленные линкеры, которые имеют несколько сайтов для присоединения агентов. Для линкеров с несколькими сайтами одно ковалентное присоединение к АВ приведет к получению промежуточного соединения АВ-линкер, способного связывать агент в ряде сайтов. Сайты могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы или любой химический сайт, к которому могут быть присоединены агенты.

**[000198]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более высокая удельная активность (или более высокое отношение агентов к АВ) может быть достигнута путем присоединения линкера с одним сайтом к множеству сайтов на АВ. Такое множество сайтов может быть введено в АВ с помощью любого из двух способов. Во-первых, в одном и том же АВ можно создать несколько альдегидных групп и/или сульфгидрильных групп. Во-вторых, к альдегиду или сульфгидрилу АВ можно присоединить «разветвленный линкер», имеющий несколько функциональных сайтов для последующего присоединения к линкерам. Функциональные сайты разветвленного линкера или линкера с несколькими сайтами могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы или могут представлять собой любой химический сайт, к которому могут быть присоединены линкеры. Еще более высокие значения удельной активности могут быть получены путем комбинирования этих двух подходов, т. е. присоединения линкеров с несколькими сайтами к нескольким сайтам на АВ.

**[000199]** *Расщепляемые линкеры:* пептидные линкеры, которые чувствительны к расщеплению ферментами системы комплемента, такими как, но не ограничиваясь ими, активатор и-плазминогена, активатор тканевого плазминогена, трипсин, плазмин или другой фермент, обладающий протеолитической активностью, можно применять в одном варианте реализации настоящего изобретения. В соответствии с одним способом настоящего изобретения агент присоединяют за счет линкера, чувствительного к

расщеплению комплементом. Антитело выбрано из класса, который может активировать комплемент. Таким образом, конъюгат антитело-агент активирует каскад комплемента и высвобождает агент в целевом сайте. В соответствии с другим способом настоящего изобретения агент присоединяют за счет линкера, чувствительного к расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как активатор и-плазминогена, активатор тканевого плазминогена, плазмин или трипсин. Эти расщепляемые линкеры можно применять в конъюгированных АА, которые содержат внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, представленных в таблице 1.

**[000200]** Неограничивающие примеры расщепляемых линкерных последовательностей представлены в таблице 2.

**Таблица 2: Примерные линкерные последовательности для конъюгации**

Типы расщепляемых последовательностей	Аминокислотная последовательность
<u>Расщепляемые плазмином последовательности</u>	
Про-урокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 90)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 91)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 92)
Стафилокиназа	SSSFDKGYKKGDDA (SEQ ID NO: 93)
	SSSFDKGYKRGDDA (SEQ ID NO: 94)
<u>Расщепляемые фактором Ха последовательности</u>	IEGR (SEQ ID NO: 95)
	IDGR (SEQ ID NO: 96)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 97)
<u>Расщепляемые ММП последовательности</u>	
Желатиназа А	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
<u>Расщепляемые коллагеназой последовательности</u>	
Коллаген кожи теленка (цепь α1(I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 99)

Коллаген кожи теленка (цепь $\alpha 2(I)$ )	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 100)
Коллаген бычьего хряща (цепь $\alpha 1(II)$ )	GIAGQ (SEQ ID NO: 101)
Коллаген печени человека (цепь $\alpha 1(III)$ )	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 102)
$\alpha_2M$ человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 103)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 104)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 105)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 106)
$\alpha_1M$ крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 107)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 108)
$\alpha_2M$ крысы	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 109)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 110)
$\alpha_1I_3(2J)$ крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 111)
$\alpha_1I_3(27J)$ крысы	SAPAVESE (SEQ ID NO: 112)
Коллагеназа фибробластов человека	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 113)
<u>(аутолитические расщепления)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 114)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 115)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 116)

**[000201]** Кроме того, агенты могут быть присоединены к АВ за счет дисульфидных связей (например, дисульфидных связей на молекуле цистеина). Поскольку многие опухоли естественным образом высвобождают высокие уровни глутатиона (восстанавливающего агента), это может привести к восстановлению дисульфидных связей с последующим высвобождением агента в месте доставки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения восстанавливающий агент, который будет модифицировать СМ, также будет модифицировать линкер конъюгированного активируемого антитела.

**[000202]** *Спейсеры и расщепляемые элементы:* согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения необходимым может быть конструирование линкера таким образом, чтобы оптимизировать расстояние между агентом и АВ активируемого антитела. Это может быть достигнуто путем применения линкера общей структуры:



в которой

W представляет собой либо --NH--CH<sub>2</sub>--, либо --CH<sub>2</sub>--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид; и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

**[000203]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер может содержать спейсерный элемент и расщепляемый элемент. Спейсерный элемент служит для размещения расщепляемого элемента вдали от центра АВ так, что расщепляемый элемент является более доступным для фермента, ответственного за расщепление. Некоторые из разветвленных линкеров, описанных выше, могут служить в качестве спейсерных элементов.

**[000204]** На протяжении всего этого обсуждения следует понимать, что присоединение линкера к агенту (или спейсерного элемента к расщепляемому элементу или расщепляемого элемента к агенту) необязательно должно осуществляться с помощью конкретного способа присоединения или реакции. Любая реакция, обеспечивающая продукт подходящей стабильности и биологической совместимости, является приемлемой.

**[000205]** *Сывороточный комплемент и отбор линкеров:* в соответствии с одним способом настоящего изобретения, если желательна высвобождение агента, применяют АВ, который представляет собой антитело из класса, который может активировать комплемент. Полученный конъюгат сохраняет как способность связывать антиген, так и способность активировать каскад комплемента. Таким образом, в соответствии с этим вариантом реализации настоящего изобретения агент присоединяют к одному концу расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, а другой конец линкерной группы присоединяют к конкретному сайту на АВ. Например, если агент имеет гидроксигруппу или аминогруппу, он может быть присоединен к карбоксиконцу пептида, аминокислоты или другого приемлемо выбранного линкера за счет сложноэфирной или амидной связи, соответственно. Например, такие агенты могут быть присоединены к линкерному пептиду за счет карбодимидной реакции. Если агент содержит функциональные группы, которые будут препятствовать присоединению к линкеру, такие препятствующие функциональные группы могут быть заблокированы перед присоединением и разблокированы после получения конъюгата продукта или промежуточного продукта. Противоположный или аминоконец линкера затем используют либо непосредственно, либо после дополнительной модификации для связывания с АВ, который способен активировать комплемент.

**[000206]** Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут иметь любую целевую длину и могут быть ковалентно присоединены одним концом к конкретным сайтам на АВ активируемого антитела. Другой конец линкерного или спейсерного элемента может быть присоединен к аминокислотному или пептидному линкеру.

**[000207]** Таким образом, когда эти конъюгаты связываются с антигеном в присутствии комплемента, амидная или сложноэфирная связь, которая присоединяет агент к линкеру, будет расщеплена, что приведет к высвобождению агента в его активной форме. Эти конъюгаты, при введении субъекту, будут осуществлять доставку и высвобождение агента в целевом сайте и являются особенно эффективными для доставки в условиях *in vivo* фармацевтических агентов, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных агентов и тому подобного, которые представлены в таблице 1, но не ограничиваются ими.

**[000208]** *Линкеры для высвобождения без активации комплемента:* в еще одном приложении нацеленной доставки желательным является высвобождение агента без активации комплемента, поскольку активация каскада комплемента в конечном итоге приводит к лизису клетки-мишени. Следовательно, этот подход можно применять, если доставка и высвобождение агента должны осуществляться без уничтожения клетки-мишени. Этот подход является целевым, если желательна доставка клеточных медиаторов, таких как гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейротрансмиттеры, гены или ферменты, к клеткам-мишеням. Эти конъюгаты могут быть получены путем присоединения агента к АВ, который не способен активировать комплемент, за счет линкера, который незначительно подвержен расщеплению сывороточными протеазами. При введении этого конъюгата индивидууму комплексы антиген-антитело будут быстро образовываться, тогда как отщепление агента будет происходить медленно, что приведет к высвобождению соединения в целевом сайте.

**[000209]** *Биохимические сшивающие линкеры:* согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА может быть конъюгировано с одним или более терапевтическими агентами с применением определенных биохимических сшивающих линкеров. Сшивающие реагенты образуют молекулярные мостики, которые связывают вместе функциональные группы двух разных молекул. Для поэтапного соединения двух разных белков можно применять гетеробифункциональные сшивающие линкеры, которые устраняют образование нежелательных гомополимеров.

**[000210]** Также можно применять пептидные линкеры, расщепляемые лизосомальными протеазами, например, Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, можно применять кислотолabile линкеры, расщепляемые в лизосомальной среде с низким рН, например, простой бис-сиалиловый эфир. Другие подходящие линкеры содержат катепсин-лабильные субстраты, в частности, те, которые проявляют оптимальную функцию при кислом рН.

[000211] Примерные гетеробифункциональные сшивающие линкеры приведены в таблице 3.

**Таблица 3: Примерные гетеробифункциональные сшивающие линкеры**

<b><u>Гетеробифункциональные сшивающие линкеры</u></b>			
Линкер	Реактивность в отношении	Преимущества и приложения	Длина спейсерного плеча после сшивания (Ангстрем)
SMPT	Первичных аминов	Большая стабильность	11,2 Å
	Сульфгидрилов		
SPDP	Первичных аминов	Тиолирование	6,8 Å
	Сульфгидрилов	Расщепляемая сшивка	
LC-SPDP	Первичных аминов	Удлиненное спейсерное плечо	15,6 Å
	Сульфгидрилов		
Сульфо-LC-SPDP	Первичных аминов	Удлиняющее спейсерное плечо	15,6 Å
	Сульфгидрилов	Водорастворимый	
SMCC	Первичных аминов	Стабильная малеимидная реактивная группа	11,6 Å
	Сульфгидрилов	Конъюгация фермент-антитело	
Сульфо-SMCC	Первичных аминов	Стабильная малеимидная реактивная группа	11,6 Å
	Сульфгидрилов	Водорастворимый	
MBS	Первичных аминов	Конъюгация фермент-антитело	9,9 Å

	Сульфгидрилов	Конъюгация гаптен- белковый носитель	
Сульфо-MBS	Первичных аминов	Водорастворимый	9,9 Å
	Сульфгидрилов		
SIAB	Первичных аминов	Конъюгация фермент- антитело	10,6 Å
	Сульфгидрилов		
Сульфо-SIAB	Первичных аминов	Водорастворимый	10,6 Å
	Сульфгидрилов		
SMPB	Первичных аминов	Удлиненное спейсерное плечо	14,5 Å
	Сульфгидрилов	Конъюгация фермент- антитело	
Сульфо- SMPB	Первичных аминов	Удлиняющее спейсерное плечо	14,5 Å
	Сульфгидрилов	Водорастворимый	
EDE/сульфо- NHS	Первичных аминов	Конъюгация гаптен- носитель	0
	Карбоксильных групп		
ABH	Углеводов	Реагирует с сахарными группами	11,9 Å
	Неселективно		

**[000212]** *Нерасщепляемые линкеры или непосредственное присоединение:* согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат может быть сконструирован так, что агент доставляется к мишени, но не высвобождается. Это можно осуществлять путем присоединения агента к АВ либо непосредственно, либо за счет нерасщепляемого линкера.

**[000213]** Эти нерасщепляемые линкеры могут содержать аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые могут быть модифицированы для включения функциональных групп, которые впоследствии можно применять для присоединения к АВ с помощью способов, описанных в настоящей заявке. Общая формула для такого органического линкера может представлять собой



в которой



W представляет собой либо --NH--CH<sub>2</sub>--, либо --CH<sub>2</sub>--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид; и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

**[000214]** *Нерасщепляемые конъюгаты*: согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения соединение может быть присоединено к АВ, которые не активируют комплемент. При применении АВ, которые не способны активировать комплемент, это присоединение можно осуществлять с применением линкеров, которые чувствительны к расщеплению активированным комплементом, или с применением линкеров, которые не чувствительны к расщеплению активированным комплементом.

**[000215]** Антитела согласно настоящему изобретению также могут быть изготовлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают с помощью способов, известных в данной области техники, таких как те, которые описаны в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556.

**[000216]** Особенно подходящие липосомы могут быть получены с помощью способа испарения с обращенной фазой с применением липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭА). Липосомы подвергают экструзии через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы с целевым диаметром. Фрагменты Fab' антитела согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), с помощью реакции дисульфидного обмена.

#### Полиспецифические активируемые антитела

**[000217]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 является моноспецифическим.

**[000218]** Согласно настоящему изобретению также предложены полиспецифические активируемые антитела к CD166. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 является полиспецифическим, например, в качестве неограничивающего примера, биспецифическим или трифункциональным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 изготовлено как часть молекулы про-биспецифического антитела, активирующего Т-клетки (BITE). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 изготовлено как часть модифицированной про-химерным антигенным рецептором (CAR) Т-клетки или другого модифицированного рецептора.

**[000219]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA или его антигенсвязывающий фрагмент встроен в полиспецифическое AA или его антигенсвязывающий фрагмент, причем по меньшей мере одно плечо полиспецифического AA специфично связывает CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA или его антигенсвязывающий фрагмент встроен в биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем по меньшей мере одно плечо биспецифического AA специфично связывает CD166.

**[000220]** Полиспецифические AA согласно настоящему изобретению представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают CD166 и по меньшей мере один или более различных антигенов или эпитопов, и которые содержат по меньшей мере один маскирующий фрагмент (MM), соединенный с по меньшей мере одним антиген- или эпитопсвязывающим доменом полиспецифического антитела так, что связывание MM уменьшает способность антиген- или эпитопсвязывающего домена связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения MM связан с антиген- или эпитопсвязывающим доменом полиспецифического антитела за счет расщепляемого фрагмента (CM), который функционирует в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы. Активируемые полиспецифические антитела согласно настоящему изобретению являются стабильными в кровотоке, активируются в предусмотренных местах терапии и/или диагностики, но не в нормальной, т. е. здоровой ткани, и при активации проявляют связывание с мишенью, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим, немодифицированным полиспецифическим антителом.

**[000221]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические AA сконструированы для захвата иммунных эффекторных клеток, также называемые в настоящей заявке полиспецифическими активируемыми антителами захватывающими иммунные эффекторные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические AA сконструированы для захвата лейкоцитов, также называемые в настоящей заявке полиспецифическими активируемыми антителами, захватывающими лейкоциты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические AA сконструированы для захвата Т-клеток, также называемые в настоящей заявке полиспецифическими активируемыми антителами, захватывающими Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические AA захватывают поверхностный

антиген на лейкоците, например, на Т-клетке, на клетке природного киллера (NK), на миелоидной мононуклеарной клетке, на макрофаге и/или на другой иммунной эффекторной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой лейкоцит. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой NK-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой мононуклеарную клетку, такую как миелоидная мононуклеарная клетка. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические АА сконструированы для связывания или иного взаимодействия с более чем одной мишенью и/или более чем одним эпитопом, также называемые в настоящей заявке активируемыми антителами, нацеленными на множество антигенов. В настоящей заявке термины «мишень» и «антиген» используются взаимозаменяемо.

**[000222]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические АА, захватывающие иммунные эффекторные клетки, согласно настоящему изобретению содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD166, и антитело, захватывающее иммунные эффекторные клетки, или его антигенсвязывающую часть, причем по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или антитела, захватывающего иммунные эффекторные клетки, или его антигенсвязывающей части является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее иммунные эффекторные клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), который связывает первую мишень, захватывающую иммунную эффекторную клетку, причем АВ1 присоединен к маскирующему фрагменту (ММ1) так, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать первую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), который связывает CD166, причем указанный АВ2 присоединен к маскирующему фрагменту (ММ2) так, что связывание ММ2 уменьшает способность АВ2 связывать CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее иммунные эффекторные клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), который связывает первую

мишень, захватывающую иммунные эффекторные клетки, причем указанный АВ1 присоединен к маскирующему фрагменту (ММ1) так, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), который связывает CD166, причем указанный АВ2 присоединен к маскирующему фрагменту (ММ2) так, что связывание ММ2 уменьшает способность АВ2 связывать CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее клетки, отличные от иммунных эффекторных клеток, представляет собой нацеленное на рак антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее клетки, отличные от иммунных эффекторных клеток, представляет собой IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее иммунные эффекторные клетки, представляет собой scFv. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, нацеленное на CD166 (например, антитело против клеток, отличных от иммунных эффекторных клеток), представляет собой IgG, а антитело, захватывающее иммунные эффекторные клетки, представляет собой scFv. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой лейкоцит. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой НК-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой миелоидную мононуклеарную клетку.

**[000223]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифические АА, захватывающие Т-клетки, согласно настоящему изобретению содержат антитело, нацеленное на CD166, или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело, захватывающее Т-клетки, или его антигенсвязывающую часть, причем по меньшей мере одно из антитела, нацеленного на CD166, или его антигенсвязывающего фрагмента и/или антитела, захватывающего Т-клетки, или его антигенсвязывающей части является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее Т-клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), который связывает первую мишень, захватывающую Т-клетки, причем указанный АВ1 присоединен к маскирующему фрагменту (ММ1) так, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать первую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывает CD166, причем указанный AB2 присоединен к маскирующему фрагменту (MM2) так, что связывание MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, захватывающее Т-клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывает первую мишень, захватывающую Т-клетки, причем указанный AB1 присоединен к маскирующему фрагменту (MM1) так, что связывание MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывает CD166, причем указанный AB2 присоединен к маскирующему фрагменту (MM2) так, что связывание MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166.

**[000224]** Согласно некоторым вариантам реализации полиспецифического активируемого антитела, захватывающего иммунные эффекторные клетки, один антиген представляет собой CD166, а другой антиген, как правило, представляет собой стимулирующий или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клеток, клеток природных киллеров (NK), миелоидных мононуклеарных клеток, макрофагов и/или других иммунных эффекторных клеток, такой как, но не ограничиваясь ими, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген представляет собой стимулирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки или НК-клетки; примеры таких стимулирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, CD3, CD27, CD28, CD137 (также называемый 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D и OX40. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген представляет собой ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки; примеры таких ингибирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 и KIR, экспрессируемые НК-клетками. Домен антитела, придающий специфичность в отношении поверхностного антигена Т-клеток, также может быть замещен лигандом или доменом лиганда, который связывается с рецептором Т-клеток, рецептором НК-клеток, рецептором макрофагов и/или другим

рецептором иммунных эффекторных клеток, таким как, но не ограничиваясь ими, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2 или TNFSF9.

**[000225]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое AA, захватывающее Т-клетки, содержит scFv к CD3-эпсилон (CD3ε, также называемый в настоящей заявке CD3ε и CD3) и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем по меньшей мере один из scFv к CD3ε и/или нацеливающего антитела или его антигенсвязывающей части является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывает CD3ε, причем указанный AB1 присоединен к маскирующему фрагменту (MM1) так, что связывание MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывает CD166, причем указанный AB2 присоединен к маскирующему фрагменту (MM2) так, что связывание MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывает CD3ε, причем указанный AB1 присоединен к маскирующему фрагменту (MM1) так, что связывание MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывает CD166, причем указанный AB2 присоединен к маскирующему фрагменту (MM2) так, что связывание MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166.

**[000226]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела, нацеленные на множество антигенов, и/или AA, нацеленные на множество антигенов, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает первую мишень и/или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает вторую мишень и/или второй эпитоп. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела, нацеленные на множество антигенов, и/или AA, нацеленные на множество антигенов, связывают две или более различных мишеней. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела, нацеленные на множество антигенов, и/или AA, нацеленные на множество антигенов, связывают два или более разных эпитопов на одной и той же мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

антитела, нацеленные на множество антигенов, и/или АА, нацеленные на множество антигенов, связывают комбинацию двух или более разных мишеней и двух или более разных эпитопов на одной и той же мишени.

**[000227]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА, содержащее IgG, содержит замаскированные переменные домены IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА, содержащее scFv, содержит замаскированные домены scFv. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит как переменные домены IgG, так и домены scFv, причем по меньшей мере один из переменных доменов IgG связан с маскирующим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит как переменные домены IgG, так и домены scFv, причем по меньшей мере один из доменов scFv связан с маскирующим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит как переменные домены IgG, так и домены scFv, причем по меньшей мере один из переменных доменов IgG связан с маскирующим фрагментом и по меньшей мере один из доменов scFv связан с маскирующим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит как переменные домены IgG, так и домены scFv, причем каждый из переменных доменов IgG и доменов scFv связан со своим маскирующим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один антителный домен полиспецифического АА обладает специфичностью в отношении антигена-мишени, а другой антителный домен обладает специфичностью в отношении поверхностного антигена Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один антителный домен полиспецифического АА обладает специфичностью в отношении антигена-мишени, а другой антителный домен обладает специфичностью в отношении другого антигена-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один антителный домен полиспецифического АА обладает специфичностью в отношении эпитопа антигена-мишени, а другой антителный домен обладает специфичностью в отношении другого эпитопа антигена-мишени.

**[000228]** В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть гибридован с карбоксильным концом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с карбоксильным концом легкой цепи активируемого антитела IgG или с карбоксильным концом как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть гибридован с

аминоконцом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с аминоконцом легкой цепи активируемого антитела IgG или с аминоконцом как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть гибризован с любой комбинацией одного или более карбоксильных концов и одного или более аминоконцов активируемого антитела IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент (ММ), соединенный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент (ММ), соединенный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент (ММ), соединенный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его, и маскирующий фрагмент (ММ), соединенный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его.

**[000229]** Согласно настоящему изобретению предложены примеры структур полиспецифических АА, которые включают, но не ограничиваются ими, указанные далее: (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>;



(VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; или (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>, в которых: VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепей с первым видом специфичности, содержащиеся в IgG; VL\* и VH\* представляют собой переменные домены со вторым видом специфичности, содержащиеся в scFv; L1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующий фрагмент (MM) и CM (CM); L2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий CM (CM) и антитело; L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные домены scFv; L4 представляет собой линкерный пептид, связывающий антитело с первым видом специфичности с антителом со вторым видом специфичности; CL представляет собой константный домен легкой цепи; и CH1, CH2, CH3 представляют собой константные домены тяжелой цепи. Первый и второй виды специфичности могут быть направлены к любому антигену или эпитопу.

**[000230]** Согласно некоторым вариантам реализации полиспецифического активируемого антитела, захватывающего Т-клетки, один антиген представляет собой CD166, а другой антиген, как правило, представляет собой стимулирующий (также называемый в настоящей заявке активирующим) или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, клетки природного киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или других иммунных эффекторных клеток, такой как, но не ограничиваясь ими, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (также называемый TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. Антительный домен, придающий специфичность в отношении поверхностного антигена Т-клеток, также может быть замещен лигандом или доменом лиганда, который связывается с рецептором Т-клеток, рецептором NK-клеток, рецептором макрофагов и/или другим рецептором иммунных эффекторных клеток.

**[000231]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающее антитело представляет собой антитело к CD166 согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающее антитело может быть в форме активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv может (могут) быть в форме про-scFv (см., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

**[000232]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv является специфичным в отношении связывания CD3ε и содержит или происходит из

антитела или его фрагмента, который связывает CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHL1 или V9. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv является специфичным в отношении связывания CTLA-4 (также называемого в настоящей заявке CTLA и CTLA4).

**[000233]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность:

**scFv к CTLA-4**

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA  
WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS  
SPLTFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSC  
AASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL  
YLQMNSLR AEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 117)

**[000234]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117.

**[000235]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CD3ε содержит аминокислотную последовательность:

**scFv к CD3ε**

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCASGYTFTRYT  
MHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSE  
DSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVLTQSPAIM  
SASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGT  
SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)

**[000236]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv к CD3ε содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118.

**[000237]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv является специфичным в отношении связывания одной или более Т-клеток, одной или более НК-клеток и/или одного или более макрофагов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения scFv является специфичным в отношении связывания

мишени, выбранной из группы, состоящей из B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA.

**[000238]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое AA также содержит агент, конъюгированный с АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой противоопухолевый агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой токсин или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент конъюгирован с полиспецифическим AA за счет линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент конъюгирован с АВ за счет расщепляемого линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой ингибитор микротрубочек. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту, такой как алкилирующий ДНК агент или ДНК-интеркалятор, или другой агент, повреждающий ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой расщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой агент, выбранный из группы, перечисленной в таблице 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой доластатин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой ауристатин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой ауристатин E или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой монометилауристатин D (ММАД). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой DM1 или DM4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой дуокармицин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой калихеамицин или его производное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет

собой пирролобензодиазепин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой димер пирролобензодиазеина.

**[000239]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое AA также содержит обнаруживаемый фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

**[000240]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое AA естественным образом содержит одну или более дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое AA может быть модифицировано для включения одной или более дисульфидных связей.

**[000241]** Согласно настоящему изобретению также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полиспецифическое AA, описанное в настоящей заявке, а также векторы, которые содержат последовательности этих выделенных нуклеиновых кислот. Согласно настоящему изобретению предложены способы получения полиспецифического AA путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, причем клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка содержит такой вектор.

**[000242]** Согласно настоящему изобретению также предложен способ изготовления полиспецифических AA согласно настоящему изобретению путем (a) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует полиспецифическое AA, в условиях, которые приводят к экспрессии полиспецифического активируемого антитела, и (b) выделения полиспецифического активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

**[000243]** Согласно настоящему изобретению также предложены полиспецифические AA и/или композиции полиспецифических AA, которые содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), который специфично связывает первую мишень или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), который связывает вторую мишень или второй эпитоп, причем по меньшей мере АВ1 связан или иным образом присоединен к маскирующему фрагменту (ММ1) так, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ММ1 связан с АВ1 за счет последовательности первого расщепляемого

фрагмента (СМ1), которая содержит субстрат для протеазы, например, протеазы, которая локализована совместно с мишенью АВ1 в месте лечения или в месте диагностики у субъекта. Полиспецифические АА согласно настоящему изобретению являются стабильными в кровотоке, активируются в предусмотренных местах терапии и/или диагностики, но не в нормальной, т. е. в здоровой ткани, и при активации проявляют связывание с мишенью АВ1, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим немодифицированным полиспецифическим антителом. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

**[000244]** Согласно настоящему изобретению также предложены композиции и способы, которые включают полиспецифическое АА, которое содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), который специфично связывает мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), причем по меньшей мере первый АВ в полиспецифическом АА связан с маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждый АВ связан с ММ, который уменьшает способность своего соответствующего АВ связываться с каждой мишенью. Например, в вариантах реализации биспецифического АА АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связывать свою мишень, и АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит более двух областей АВ; в таких вариантах реализации АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связывать свою мишень, АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связывать свою мишень, АВ3 связан с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который уменьшает способность АВ3 связывать свою мишень, и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

**[000245]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА дополнительно содержит по меньшей мере один расщепляемый фрагмент (СМ), который является субстратом для протеазы, причем СМ соединяет ММ с АВ. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), который специфично связывает мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), причем по меньшей мере первый АВ в полиспецифическом АА связан за

счет первого расщепляемого фрагмента (СМ1) с маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифического АА АВ1 связан за счет СМ1 с ММ1, а АВ2 связан за счет второго расщепляемого фрагмента (СМ2) со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связывать свою мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиспецифическое АА содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов реализации АВ1 связан за счет СМ1 с ММ1, АВ2 связан за счет СМ2 с ММ2, а АВ3 связан за счет третьего расщепляемого фрагмента (СМ3) с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который уменьшает способность АВ3 связывать свою мишень и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

Активируемые антитела, содержащие несвязывающие стерические фрагменты или партнеров по связыванию для несвязывающих стерических фрагментов

**[000246]** Согласно настоящему изобретению также предложены АА, которые содержат несвязывающие стерические фрагменты (NB) или партнеров по связыванию (BP) для несвязывающих стерических фрагментов, причем BP мобилизует или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. АА согласно настоящему изобретению включают, например, АА, которое содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB), расщепляемый линкер (CL) и антитело или фрагмент антитела (AB), который связывает мишень; АА, которое содержит партнера по связыванию для несвязывающего стерического фрагмента (BP), CL и AB; и АА, которое содержит BP, к которому был привлечен NB, CL и AB, который связывает мишень. АА, в которых NB ковалентно соединен с CL и AB из АА или ассоциирован с помощью взаимодействия с BP, который ковалентно соединен с CL и AB из АА, называются в настоящей заявке «NB-содержащие активируемые антитела». Под активируемым или переключаемым подразумевается, что АА проявляет первый уровень связывания с мишенью, когда АА находится в ингибированном, замаскированном или нерасщепленном состоянии (т. е. в первой конформации), и второй уровень связывания с мишенью, когда АА находится в неингибированном, незамаскированном и/или расщепленном состоянии (т. е. во второй конформации, т. е. активированное антитело), причем второй уровень связывания мишени больше, чем первый уровень связывания мишени. Композиции АА могут проявлять повышенную биодоступность и более благоприятное биораспределение по сравнению с обычными терапевтическими средствами на основе антител.

**[000247]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА обеспечивают уменьшенную токсичность и/или нежелательные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы возникнуть в результате связывания в местах, не подлежащих лечению, и/или местах, не подлежащих диагностике, если бы связывание АВ с таким местом не было замаскировано или не ингибировалось иным способом.

**[000248]** АА к CD166, которые содержат несвязывающий стерический фрагмент (NB), могут быть получены с применением способов, изложенных в PCT публикации № WO 2013/192546, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

#### Получение активируемых антител

**[000249]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы получения полипептида активируемого антитела к CD166 путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии полипептида, причем указанная клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или АА, описанные в настоящей заявке, и/или векторы, которые содержат последовательности этих выделенных нуклеиновых кислот. Согласно настоящему изобретению предложены способы получения антитела и/или АА путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела, причем указанная клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или АА, описанные в настоящей заявке, и/или векторы, которые содержат последовательности этих выделенных нуклеиновых кислот.

**[000250]** Согласно настоящему изобретению также предложен способ изготовления АА, которые в активированном состоянии связывают CD166, путем (a) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует АА, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, причем указанное АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывает CD166, (i) причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы; и (ii) при этом СМ расположен в АА таким образом, что, если АА находится в нерасщепленном состоянии, ММ препятствует специфичному связыванию АВ с CD166, тогда как в расщепленном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с CD166 или не конкурирует с ним; и (b) выделение активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

[000251] Следующие примерные нуклеотидные последовательности предложены для применения при получении и применении АА и конъюгированных АА согласно настоящему изобретению. Также предложены нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 95% или даже на 99% гомологичны нуклеотидным последовательностям, представленным ниже.

**SEQ ID NO: 241, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239**

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека (HuCD166\_HcC) - нуклеотидная последовательность**

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTCAAACCCACCCAGACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTACCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCTCCGTGTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCAGGACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGAGCCCCTGACCGTGTCCCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG



**SEQ ID NO: 481, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480**

**Тяжелая цепь  $\alpha$ CD166 человека (HuCD166\_HcC) – Des-НС нуклеотидная последовательность**

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTCAAACCCACCCAGACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGTCTCCCGCCTCCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTAAGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

**SEQ ID NO: 247, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246**

**Легкая цепь  $\alpha$ CD166 человека (спейсер-ММ-LP1-СМ-LP2-Ab)**

**[спейсер (SEQ ID NO: 319)] [huCD166Lc1\_7614.6\_3001 (SEQ ID NO: 315)]**

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC][CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAG  
TCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCC  
ACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATG  
ACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCCTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTG  
CCGGTCCCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATC  
TGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGC  
CTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA  
AGATCTCCCGGGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCT  
GGAAGTGCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTG  
GCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCAC  
CGCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAG  
TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGC  
AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGC  
CGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAG  
CAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC]

**SEQ ID NO: 315, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314**

**Легкая цепь αCD166 человека (MM-LP1-CM-LP2-Ab)**

**huCD166Lcl\_7614.6\_3001**

CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTC  
CTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGAT  
CTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCC  
CGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGC  
ACTCCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCC  
TCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCT  
CCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGA  
GGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAAGTGCCTACACCTTCGGC  
CAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCT  
TCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCT  
GAACAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT  
GCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCAC  
CTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG  
GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCT  
TCAACCGGGGCGAGTGC

**Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 319, кодирующая SEQ ID NO: 305  
спейсер**

**CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC**

Терапевтическое применение активируемых антител и конъюгированных активируемых антител

**[000252]** Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166, у субъекта с применением АА, которые связывают CD166, в частности, АА, которые связывают и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности CD166 и/или передачи сигналов, опосредуемой CD166.

**[000253]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или

активностью клеток, которые экспрессируют CD166 или aberrantly экспрессируют CD166, у субъекта с применением AA, которые связывают CD166, в частности AA, которые связывают, нацеливают, нейтрализуют, убивают или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности клеток, которые экспрессируют или aberrantly экспрессируют CD166.

**[000254]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют CD166, у субъекта с применением AA, которые связывают CD166, в частности, AA, которые связывают, нацеливают, нейтрализуют, убивают или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности клеток, которые экспрессируют CD166.

**[000255]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые aberrantly экспрессируют CD166, у субъекта с применением AA, которые связывают CD166, в частности, AA, которые связывают, нацеливают, нейтрализуют, убивают или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности клеток, которые aberrantly экспрессируют CD166.

**[000256]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, ослабления симптома или уменьшения другим способом рака у субъекта путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166, описанных в настоящей заявке.

**[000257]** Согласно настоящему изобретению также предложены AA, которые связывают CD166, в частности AA, которые связывают и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности CD166 и/или передачи сигналов CD166, для применения при лечении, предотвращении и/или задержке начала или прогрессирования, или облегчении симптома, ассоциированного с aberrantly экспрессией и/или активностью CD166, у субъекта.

**[000258]** Согласно настоящему изобретению также предложены AA, которые связывают CD166, в частности, AA, которые связывают, нацеливают, нейтрализуют, убивают или иным образом ингибируют по меньшей мере один вид биологической активности клеток, которые экспрессируют или aberrantly экспрессируют CD166, для

применения при лечении, предотвращении и/или задержке начала или прогрессирования, или ослаблении симптома, ассоциированного с наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют или aberrантно экспрессируют CD166, у субъекта.

**[000259]** Согласно настоящему изобретению также предложено антитело к CD166, конъюгированное антитело к CD166, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166, описанные в настоящей заявке, для применения при предотвращении, задержке прогрессирования, лечении или облегчении симптома, или уменьшении иным образом рака у субъекта, причем антитело предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве.

**[000260]** В качестве неограничивающего примера, АА согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования эпителиального или плоскоклеточного рака, карциноидного и/или нейроэндокринного рака. Примеры видов рака включают, но не ограничиваются ими, аденокарциному, рак желчных протоков (билиарный), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, например, тройной негативный рак молочной железы, Her2-негативный рак молочной железы, положительный по рецептору эстрогенов рак молочной железы; карциноидный рак; рак шейки матки; холангиокарциному; колоректальный рак; рак эндометрия; глиому; рак головы и шеи, например, плоскоклеточный рак головы и шеи; лейкоз; рак печени; рак легких, например, НМРЛ, ПКРЛ; лимфому; меланому; рак носоглотки; рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы, например, метастатическую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы; рак почек; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичка; рак щитовидной железы; и уротелиальный рак.

**[000261]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой любой эпителиальный или плоскоклеточный рак. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, рак шейки матки, рак ротоглотки и/или рак головы и шеи.

**[000262]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноид, рак шейки матки, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак эндометрия, эпителиальный рак, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почек, саркому,

рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеполовой системы и/или уротелиальный рак.

**[000263]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак выбран из группы, состоящей из тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ), немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), мелкоклеточного рака легких (МКРЛ), мутантной по Ras колоректальной карциномы, редкого эпителиального рака, рака ротоглотки, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПРГШ) и/или рака предстательной железы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак ассоциирован с опухолью, экспрессирующей CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак вызван опухолью, экспрессирующей CD166.

**[000264]** Антитело к CD166, конъюгированное антитело к CD166, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166, применяемые в любом из вариантов реализации этих способов и вариантов применения, могут быть введены на любой стадии заболевания. Например, такое антитело к CD166, конъюгированное антитело к CD166, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 можно вводить субъекту, страдающему раком любой стадии, от ранней до метастатической.

**[000265]** В примерных вариантах реализации субъект страдает или предположительно страдает карциномой молочной железы, устойчивым к кастрации раком предстательной железы (CPRC), холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичников, плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПРГШ) и немелкоклеточным раком легких (НМРЛ).

**[000266]** Согласно настоящему изобретению субъект, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек, примат, отличный от человека, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой животное-компаньона. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой животное, находящееся на попечении ветеринара.

**[000267]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий карциномой молочной железы, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет опухоль, экспрессирующую рецептор эстрогена (ER+), и должен

был получать противогормональную терапию, а также испытывал прогрессирование заболевания до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий карциномой молочной железы, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет тройную негативную карциному молочной железы (ТНРМЖ) и получил  $\geq 2$  предшествующих линий терапии до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000268]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий устойчивой к кастрации карциномой предстательной железы, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получил  $\geq 1$  предшествующей терапии до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000269]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий холангиокарциномой, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, не имел ответа на  $\geq 1$  предыдущую линию курса лечения, включающего гемцитабин, до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000270]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий карциномой эндометрия, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получил  $\geq 1$  курса лечения, включающего платину, для лечения внематочного заболевания или распространенного заболевания до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000271]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий эпителиальной карциномой яичника, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, либо имеет мутацию, не связанную с раком молочной железы (BRCA) (зародышевой линии или соматическую), либо имеет неизвестный мутационный статус BRCA и имеет устойчивую к платине или рефрактерную к платине карциному яичника. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий эпителиальной карциномой яичника, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет мутацию BRCA и

является рефрактерным к ингибиторам PARP или не подходит для их получения по другим причинам.

**[000272]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий ПРГШ, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получил  $\geq 1$  курса лечения, включающего платину, и ингибитор PD-1/PD-L1 (если он одобрен для показания у субъекта и в его местности), до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000273]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, страдающий или предположительно страдающий НМРЛ, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получил  $\geq 1$  курса лечения, включающего платину, до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту, страдающему или предположительно страдающему НМРЛ, который получает АА согласно настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, ранее вводили ингибитор контрольной точки (если он одобрен для показания у субъекта в его местности) до лечения с применением АА согласно настоящему изобретению.

**[000274]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект, имеющий любое из следующего, может не быть подходящим для получения АА согласно настоящему изобретению для лечения карциномы молочной железы, устойчивого к кастрации рака предстательной железы (CPRC), холангиокарциномы, карциномы эндометрия, эпителиальной карциномы яичника, ПРГШ и НМРЛ: активное или хроническое нарушение роговицы, наличие в анамнезе трансплантации роговицы, активный герпетический кератит и активные состояния глаз, требующие текущего лечения/мониторинга; серьезные сопутствующие заболевания, включая клинически значимые активные инфекции; наличие в анамнезе или текущие активные аутоиммунные заболевания; значительное заболевание сердца, такое как недавний инфаркт миокарда; наличие в анамнезе рассеянного склероза или другого демиелинизирующего заболевания, синдрома Итона-Ламберта (паранеопластический синдром), наличие в анамнезе геморрагического или ишемического инсульта в течение последних 6 месяцев или алкогольного заболевания печени; незаживающая (ие) рана (ы) или язва (ы), за исключением язвенных поражений, вызванных основным новообразованием; наличие в анамнезе тяжелых аллергических или анафилактических реакций на предыдущую терапию моноклональными антителами; текущая антикоагулянтная терапия варфарином;



или обширное хирургическое вмешательство (требующее общей анестезии) в течение 3 месяцев до дозирования.

**[000275]** Активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и его терапевтические составы вводят субъекту, страдающему или подверженному заболеванию или нарушению, ассоциированному с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего или подверженного заболеванию или нарушению, ассоциированному с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, выявляют с применением любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, страдающих раком или другим неопластическим состоянием, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ жидкости организма, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

**[000276]** Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если достигнута любая из множества лабораторных или клинических целей. Например, введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, ослаблены, уменьшены, ингибированы или не прогрессируют далее, т. е. до худшего состояния. Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если заболевание или расстройство переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует далее, т. е. до худшего состояния.

**[000277]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему или подверженному

заболеванию или нарушению, такому как субъекты, страдающие раком или другим неопластическим состоянием, причем пораженные клетки субъекта экспрессируют CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пораженные клетки ассоциированы с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пораженные клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего или подверженного заболеванию или нарушению, при котором пораженные клетки субъекта экспрессируют CD166, выявляют с применением любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, страдающих раком или другим неопластическим состоянием, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ жидкости организма, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

**[000278]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему или подверженному заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, экспрессирующими CD166, или наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью таких клеток, таким как субъекты, страдающие раком или другими неопластическими состояниями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки ассоциированы с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего или подверженного заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, которые экспрессируют CD166, выявляют с применением любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, страдающих раком или другим неопластическим состоянием, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, выявляют с применением любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое

обследование и/или анализ жидкости организма, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

**[000279]** Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если достигнута любая из множества лабораторных или клинических целей. Например, введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, ослабляются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессируют далее, т. е. до худшего состояния. Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует далее, т. е. до худшего состояния.

**[000280]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими как, например, химиотерапевтический агент, противовоспалительный агент и/или иммуносупрессорный агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) вводят одновременно. Например, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) могут быть изготовлены в виде единой композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) вводят последовательно.

**[000281]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемые антитела к CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела к CD166, описанные в настоящей заявке, применяют в сочетании с одним или более дополнительными агентами или комбинацией дополнительных агентов. Подходящие

дополнительные агенты включают современные фармацевтические и/или хирургические способы терапии для предполагаемого применения, такого как, например, рак. Например, антитела к CD166, конъюгированные антитела к CD166, активируемые антитела к CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела к CD166 можно применять в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым агентом.

**[000282]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный (ые) агент (ы) представляет (ют) собой химиотерапевтический агент, такой как химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из доцетаксела, паклитаксела, абраксана (т. е. конъюгированного с альбумином паклитаксела), доксорубицина, оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, иринотекана и гемцитабина.

**[000283]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный (ые) агент (ы) представляет (ют) собой ингибитор контрольной точки, ингибитор киназы, агент, нацеливающий ингибиторы в микросреде опухоли, и/или агонист Т-клеток или НК-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный (ые) агент (ы) представляет (ют) собой лучевую терапию, отдельно или в комбинации с другим (и) дополнительным (ми) агентом (ами), таким как химиотерапевтический или противоопухолевый агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный (ые) агент (ы) представляет (ют) собой вакцину, онковирус и/или активирующий ДК агент, такие как, в качестве неограничивающего примера, агонист Toll-подобных рецепторов (TLR) и/или  $\alpha$ -CD40. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный (ые) агент (ы) представляет (ют) собой антитело, нацеленное на опухоль, сконструированное для уничтожения опухоли за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или за счет непосредственной конъюгации с токсином (например, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)).

**[000284]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD-1, CD166, TIGIT, TIM-3, B7H4 и Vista. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAF<sub>i</sub>, MEK<sub>i</sub> и Vtk, таких как ибрутиниб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор киназы представляет собой кризотиниб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор микросреды опухоли выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора  $\alpha$ -CSF1R, ингибитора  $\alpha$ -CCR4, TGF-бета, супрессорной клетки миелоидного происхождения или регуляторной Т-клетки. Согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения агонист выбран из группы, состоящей из Oх40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

**[000285]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор CTLA-4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор LAG-3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор B7H4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор Vista. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор B-RAFi. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор MEKi. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор Btk. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ибрутиниб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой кризотиниб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор IDO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, ингибитор представляет собой ингибитор  $\alpha$ -CSF1R. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор  $\alpha$ -CCR4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой TGF-бета. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой регуляторную T-клетку.

**[000286]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой Oх40. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой GITR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой CD137. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой

ICOS. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой CD27. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агонист представляет собой HVEM.

**[000287]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA и/или конъюгированный AA вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими как, например, химиотерапевтический агент, противовоспалительный агент и/или иммуносупрессорный агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент изготовлены в виде единой терапевтической композиции, и активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят одновременно. Согласно другому варианту активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент отделены друг от друга, например, каждый из них изготовлен в виде отдельной терапевтической композиции, и активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят одновременно, или активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят в разные моменты времени в течение курса лечения. Например, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 вводят до введения дополнительного агента, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 вводят после введения дополнительного агента или активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят поочередно. Как описано в настоящей заявке, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят в виде однократных или многократных доз.

**[000288]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) вводят одновременно. Например, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) могут быть изготовлены в виде единой композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный (ые) агент (ы) вводят последовательно, или

активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят в разные моменты времени в течение курса лечения.

**[000289]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими как, в качестве неограничивающего примера, химиотерапевтический агент, противовоспалительный агент и/или иммуносупрессорный агент, такой как алкилирующий агент, антиметаболит, направленный против микротрубочек агент, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический антибиотик и/или любой другой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой таксан, такой как паклитаксел (например, абраксан®). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой антиметаболит, такой как гемцитабин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой алкилирующий агент, такой как химиотерапия на основе платины, такой как карбоплатин или цисплатин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой нацеленный агент, такой как ингибитор киназы, например, сорафениб или эрлотиниб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой нацеленный агент, такой как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой ингибитор протеосом, такой как бортезомиб или карфилзомиб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой иммуномодулирующий агент, такой как ленолидоминд или ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой излучение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой агент, считающийся стандартом лечения специалистами в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой химиотерапевтический агент, хорошо известный специалистам в данной области техники.

**[000290]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

другое АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент против той же мишени, как и первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, первое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент, например, против CD166. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительный агент представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент против мишени, отличной от мишени первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, первого конъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, АА или его антигенсвязывающего фрагмента и/или конъюгированного АА или его антигенсвязывающего фрагмента.

**[000291]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечный фрагмент, фрагмент Fab, фрагмент  $F(ab')_2$ , scFv, scAB, dAB, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, АА или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышиное, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

**[000292]** Следует понимать, что введение терапевтических веществ в соответствии с настоящим изобретением будет осуществляться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включены в составы, чтобы обеспечить улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам:



Remington's Pharmaceutical Sciences (15 изд., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, глава 87 авторства Blaug, Seymour в нем. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как липофектин™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло-в-воде» и «вода-в-масле», эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеперечисленных смесей может быть подходящей в разных видах лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым с путем введения и переносимым при нем. См. также Baldrick P. «Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance». Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. «Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals». Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN «Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts». J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и ссылки в них для дополнительной информации, относящейся к составам, вспомогательным веществам и носителям, хорошо известным химикам-фармацевтам.

**[000293]** Терапевтические составы согласно настоящему изобретению, которые содержат активируемое антитело к CD166, такое как, в качестве неограничивающего примера, AA и/или конъюгированное AA, применяют для предотвращения, лечения или уменьшения иным образом заболевания или нарушения, ассоциированного с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические составы согласно настоящему изобретению, которые содержат AA и/или конъюгированное активируемое антитело, применяют для лечения или уменьшения иным образом рака или другого неопластического состояния, воспаления, воспалительного нарушения и/или аутоиммунного заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное образование, в котором экспрессируется мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой солидную опухоль, в которой экспрессируется мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой гематологическое злокачественное образование, в котором экспрессируется мишень. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на паренхиме (например, при раке, части органа или ткани, которая часто выполняет функцию (функции) органа

или ткани). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на клетке, ткани или органе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на строме (т. е. на соединительном поддерживающем каркасе клетки, ткани или органа). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на остеобласте. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на эндотелии (сосудистой сети). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мишень экспрессируется на раковой стволовой клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, с которым конъюгировано АА, представляет собой ингибитор микротрубочек. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, с которым конъюгировано АА, представляет собой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту.

**[000294]** Эффективность предотвращения, уменьшения или лечения определяют в ассоциации с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией и/или активностью мишени, такой как, например, аберрантная экспрессия и/или активность мишени. Увеличение продолжительности выживаемости субъекта или иная задержка прогрессирования заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией и/или активностью мишени, например, аберрантной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта указывает на то, что АА и/или конъюгированное АА обеспечивает клиническую пользу.

**[000295]** АА и/или конъюгированное АА можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и соображения, связанные с приготовлением таких композиций, а также рекомендации по выбору компонентов приведены, например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy, 19 изд. (под ред. Alfonso R. Gennaro, et al.) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

**[000296]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых применяют фрагменты антител, отбирают наименьший фрагмент, который специфично связывается со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основании последовательностей варибельной области антитела могут быть сконструированы пептидные молекулы, которые сохраняют способность связывать последовательность белка-мишени. Такие пептиды могут быть синтезированы химически и/или получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК. (См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Состав также может содержать более

одного активного соединения, если это необходимо для конкретного показания, которое лечат, например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения соединения с дополняющими видами активности, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, или в дополнение к ним, композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий размножение. Такие молекулы приемлемо присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

**[000297]** Активные ингредиенты также могут быть захвачены в микрокапсулах, приготовленных, например, с помощью методик коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозных или желатиновых микрокапсулах и полиметилметакрилатных микрокапсулах, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях.

**[000298]** Составы для применения для введения в условиях *in vivo* должны быть стерильными. Это можно легко осуществить с помощью фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

**[000299]** Могут быть приготовлены препараты с длительным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с длительным высвобождением включают полупроницаемые матриксы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем указанные матриксы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриксов с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли-2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Несмотря на то, что такие полимеры как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты позволяют высвободить молекулы в течение более 100 дней, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

#### Варианты диагностического применения

**[000300]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы и наборы для применения активируемых антител к CD166 и/или конъюгированных активируемых

антител к CD166 при различных диагностических и/или профилактических показаниях. Например, согласно настоящему изобретению предложены способы и наборы для обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени, представляющей интерес, у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом к CD166, причем указанное AA к CD166 содержит маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM), который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), который специфично связывает представляющую интерес мишень, при этом AA к CD166 в нерасщепленном неактивированном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-CM-AB или AB-CM-MM; (a) причем MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с CD166, и при этом MM не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) при этом, если AB находится в нерасщепленном неактивированном состоянии, MM препятствует специфичному связыванию AB с CD166, и если AB находится в расщепленном активированном состоянии, MM не препятствует специфичному связыванию AB с CD166 или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного AA к CD166 у субъекта или в образце, причем обнаруживаемый уровень активированного AA к CD166 у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент и CD166 присутствуют у субъекта или в образце и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня активированного AA к CD166 у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент, CD166 или оба расщепляющий агент и CD166 отсутствуют у субъекта или в образце.

**[000301]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 представляет собой активируемое антитело к CD166, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активируемое антитело к CD166 содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на AB. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня активируемого антитела к CD166 у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000302]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов активируемое антитело к CD166 содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов обнаруживаемая метка содержит визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металлов или метку на основе лиганда. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов визуализирующий агент содержит радиоизотоп. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов контрастирующий агент содержит йод, гадолиний или оксид железа. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов фермент содержит пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридина. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов метка содержит метку Alexa Fluor<sup>®</sup>, такую как Alex Fluor<sup>®</sup> 680 или Alexa Fluor<sup>®</sup> 750. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенев.

**[000303]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, отличный от человека, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой грызуна.

**[000304]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов способ представляет собой способ в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *in situ*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой

способ в условиях *ex vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *in vitro*.

**[000305]** Согласно некоторым вариантам реализации способов и наборов способ применяют для определения или уточнения иным образом популяции пациентов, подходящей для лечения с применением АА к CD166 согласно настоящему изобретению, с последующим лечением путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, такого активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166. Например, пациентов с положительным результатом теста как на мишень (например, CD166), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) АА к CD166, тестируемом в этих способах, определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА к CD166, содержащего такой СМ, после этого пациенту вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166, которое было протестировано. Аналогичным образом, пациенты с отрицательным результатом теста на любую одну или обе из мишени (например, CD166) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, тестируемом с применением этих способов, могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие пациенты могут проходить тестирование с другими АА к CD166 до тех пор, пока не будет выявлено АА к CD166, подходящее для лечения (например, АА к CD166, содержащее СМ, который расщепляется у пациента в очаге заболевания). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного, в отношении которого пациент имел положительный результат теста. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых в настоящей заявке.

**[000306]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА и/или конъюгированное АА содержит обнаруживаемую метку. Применяют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab)<sub>2</sub>). Термин «меченый» в отношении зонда или антитела предназначен для включения непосредственного мечения зонда или антитела с помощью связывания (т. е. физического соединения) обнаруживаемого вещества с зондом или антителом, а также непрямого мечения зонда или антитела с помощью реакции с другим реагентом, который непосредственно помечен. Примеры непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с применением флуоресцентномеченого вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда с применением биотина так, что его можно обнаружить с помощью флуоресцентномеченого

стрептавидина. Термин «биологический образец» предназначен для включения тканей, клеток и биологических жидкостей, выделенных у субъекта, а также тканей, клеток и жидкостей, присутствующих внутри субъекта. В область применения термина «биологический образец» входит, соответственно, кровь и фракция или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Таким образом, способ обнаружения согласно настоящему изобретению можно применять для обнаружения аналита мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце в условиях *in vitro*, а также *in vivo*. Например, методики обнаружения аналита мРНК в условиях *in vitro* включают Нозерн-гибридизацию и гибридизацию *in situ*. Методики обнаружения белка-аналита в условиях *in vitro* включают твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), Вестерн-блоты, иммунопреципитацию, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Методики обнаружения аналита геномной ДНК в условиях *in vitro* включают Саузерн-гибридизацию. Процедуры проведения иммуноанализов описаны, например, «ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology», Vol. 42, J. R. Crowther (ред.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; «Immunoassay», E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; и «Practice and Theory of Enzyme Immunoassays», P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методики обнаружения белка-аналита в условиях *in vivo* включают введение субъекту меченого антитела к белку-аналиту. Например, антитело может быть помечено радиоактивным маркером, наличие и местоположение которого у субъекта можно обнаружить с помощью стандартных методик визуализации.

**[000307]** Соответственно, АА и конъюгированное АА согласно настоящему изобретению также можно применять в различных диагностических и профилактических составах. В одном варианте реализации АА и/или конъюгированное АА вводят субъектам, которые подвергаются риску развития одного или более из вышеупомянутых нарушений. Предрасположенность субъекта или органа к одному или более из вышеупомянутых нарушений может быть определена с применением генотипических, серологических или биохимических маркеров.

**[000308]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА и/или конъюгированное АА вводят людям, у которых диагностировано клиническое показание, ассоциированное с одним или более из вышеупомянутых нарушений. После постановки диагноза АА и/или конъюгированное АА вводят, чтобы смягчить или обратить эффекты клинического показания.

**[000309]** Активируемое антитело и/или конъюгированное АА согласно настоящему изобретению также можно применять при обнаружении мишени в образцах субъекта и,

соответственно, можно применять в качестве диагностического средства. Например, антитела и/или активируемые антитела и их конъюгированные варианты согласно настоящему изобретению применяют в анализах в условиях *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения уровней мишени в образце субъекта.

**[000310]** Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения АА и/или конъюгированное АА согласно настоящему изобретению иммобилизовано на твердой подложке (например, лунке (-ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное АА и/или конъюгированное АА служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного активируемого антитела и/или его конъюгированных вариантов в контакт с исследуемым образцом твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, чтобы предотвратить неспецифическую адсорбцию аналита.

**[000311]** Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, предположительно имеющего некоторые уровни циркулирующего антигена, который считается диагностическим признаком патологии. После промывки тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое содержит обнаруживаемую метку. Меченое второе антитело выполняет функцию обнаруживающего антитела. Измеряют уровень обнаруживаемой метки, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют путем сравнения со стандартной кривой, полученной на основании стандартных образцов.

**[000312]** Следует понимать, что на основании результатов, полученных с применением АА согласно настоящему изобретению и их конъюгированных вариантов в диагностическом анализе в условиях *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для конкретного заболевания отбирают образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или которые находятся на разных этапах терапевтического лечения заболевания. Диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии, устанавливают с использованием популяции образцов, которая дает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии.

**[000313]** АА и/или конъюгированное АА также можно применять в способах диагностики и/или визуализации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего



изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in situ*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, АА, содержащие ферментативно расщепляемый СМ, можно применять для обнаружения наличия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие АА можно применять в диагностике, которая может включать обнаружение в условиях *in vivo* (например, качественное или количественное) активности фермента (или, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, среды с повышенным восстановительным потенциалом, такой как среда, которая может обеспечить восстановление дисульфидной связи) путем измерения накопления активированных антител (т. е. антител, полученных в результате расщепления активируемого антитела) в конкретной клетке или ткани конкретного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань проявляет ферментативную активность (или повышенный восстановительный потенциал в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

**[000314]** Например, СМ может быть выбран в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы, обнаруженной в опухолевом очаге, в очаге вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном месте (например, в абсцессе, в органе и тому подобном) и тому подобном. АВ может представлять собой тот, который связывает антиген-мишень. Обнаруживаемая метка (например, флуоресцентная метка или радиоактивная метка или радиомаркер) может быть конъюгирована с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела с применением способов, раскрытых в настоящей заявке, или, в соответствующих случаях, способов, известных специалисту в данной области техники. Подходящие обнаруживаемые метки обсуждаются применительно к вышеупомянутым способам скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При применении АВ, специфичного для белка или пептида патологического состояния, наряду с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в представляющей интерес пораженной ткани, АА будут проявлять повышенную скорость связывания с пораженной тканью по сравнению с тканями, в которых специфичный в отношении СМ фермент не присутствует на детектируемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие

белки и пептиды быстро выводятся из крови почечной системой фильтрации, а также поскольку фермент, специфичный в отношении СМ, не присутствует на детектируемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в непораженных тканях или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной ткани увеличивается по сравнению с непораженными тканями.

**[000315]** В другом примере АА можно применять для обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, АА можно применять для обнаружения (качественного или количественного) наличия фермента в образце. В другом примере, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, АА можно применять для обнаружения (качественного или количественного) наличия восстанавливающих условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих способах, АА могут содержать обнаруживаемую метку и могут быть связаны с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Обнаруживаемая метка может быть размещена на части АА, которая не высвобождается после расщепления, например, обнаруживаемая метка может представлять собой затухшую флуоресцентную метку или другую метку, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может быть проведен, например, путем приведения иммобилизованных, содержащих обнаруживаемую метку АА в контакт с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для того, чтобы произошло расщепление, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Наличие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивают по изменению обнаруживаемого сигнала АА перед приведением в контакт с образцом, например, наличие и/или увеличение обнаруживаемого сигнала из-за расщепления АА расщепляющим агентом в образце.

**[000316]** Такие способы обнаружения могут быть адаптированы, чтобы также обеспечивать обнаружение наличия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ из АА при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки наличия или отсутствия расщепляющего агента и наличия или отсутствия мишени, представляющей интерес. Наличие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по наличию и/или увеличению уровня обнаруживаемой метки АА, как описано выше, а наличие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем обнаружения комплекса мишень-АВ, например, путем применения содержащего обнаруживаемую метку антитела к мишени.

**[000317]** АА также можно применять для визуализации в условиях *in situ*, чтобы подтвердить активацию АА, например, путем расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация в условиях *in situ* представляет собой методику, позволяющую локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как клеточные культуры или срезы тканей. Используя эту методику, можно подтвердить как связывание с конкретной мишенью, так и протеолитическую активность на основании наличия обнаруживаемой метки (например, флуоресцентной метки).

**[000318]** Эти методики можно применять для любых замороженных клеток или тканей, происходящих из очага заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти методики также можно применять для образцов свежих клеток или тканей.

**[000319]** В этих методиках АА метят с применением обнаруживаемой метки. Обнаруживаемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель ближнего ИК-диапазона (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и амплифицирующий реагент, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу).

**[000320]** Обнаружение метки в образце, который инкубировали с меченым АА, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична в отношении СМ активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наличие протеазы может быть подтверждено с применением ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как те, которые описаны в настоящей заявке, и/или с применением агента, который специфичен для протеазы, например, антитела, такого как А11, которое специфично для протеазы матрипазы и ингибирует протеолитическую активность матрипазы; см., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 года. Аналогичный подход с применением ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как те, которые описаны в настоящей заявке, и/или с применением более селективного ингибирующего агента можно применять для определения протеазы, которая является специфичной для СМ активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наличие мишени может быть подтверждено с применением агента, специфичного для мишени, например, другого антитела, или обнаруживаемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно применять немеченое АА с

обнаружением с помощью меченого вторичного антитела или более сложной системы обнаружения.

**[000321]** Сходные методики также можно применять для визуализации в условиях *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, например, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что очаг заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела.

**[000322]** Эти методики также можно применять в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, определения или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфичных для протеазы СМ в активируемом антителе.

**[000323]** Согласно настоящему изобретению предложены способы применения АА в различных диагностических и/или профилактических показаниях. Например, согласно настоящему изобретению предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и представляющей интерес мишени у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом, причем указанное АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфично связывает представляющую интерес мишень, при этом АА в нерасщепленном неактивированном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) причем указанный ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) при этом в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в образце, при этом обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в образце, тогда как отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточных уровнях у субъекта или в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000324]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или образца в контакт с АА в присутствии представляющей интерес мишени, например, мишени, причем указанное АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфично связывает представляющую интерес мишень, при этом АА в нерасщепленном неактивированном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) причем указанный ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) при этом в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, тогда как отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у субъекта или в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000325]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат по меньшей мере АА, содержащее маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ) который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфично связывает представляющую интерес мишень, при этом АА в нерасщепленном неактивированном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) причем ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) при этом в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерение уровня активированного АА у субъекта или в образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, тогда как отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у субъекта или в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит

обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000326]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом, причем указанное АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, антигенсвязывающий домен (АВ), который специфично связывает мишень, и обнаруживаемую метку, при этом АА в нерасщепленном неактивированном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; причем ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; при этом в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним; и при этом обнаруживаемая метка расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерения уровня обнаруживаемой метки у субъекта или в образце, причем обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у субъекта или в образце и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня обнаруживаемой метки у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000327]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА (например, АА, с которым конъюгирован терапевтический агент), описанные в настоящей заявке, для применения при контакте с субъектом или биологическим образцом и средство для обнаружения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у субъекта или в биологическом образце так, что связывание мишени и/или расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце.

**[000328]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с АА в присутствии мишени и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном обнаруживаемом уровне у субъекта или в биологическом образце так, что расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце. Такое АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, причем указанное АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) причем ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по



связыванию АВ; и (b) при этом ММ из АА в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как ММ из АА в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка присоединена к СМ на N-конце относительно сайта расщепления протеазой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один антигенсвязывающий сайт АВ является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт является замаскированным и по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт не является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения все антигенсвязывающие сайты являются замаскированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап измерения включает применение вторичного реагента, содержащего обнаруживаемую метку.

**[000329]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в настоящей заявке, для применения при приведении субъекта или биологического образца в контакт с АА в присутствии мишени и измерении уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном обнаруживаемом уровне у субъекта или в биологическом образце так, что расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце. Такое АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который

специфично связывает мишень, причем указанное AA в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: MM-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) причем ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ; и (b) при этом ММ из AA в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как ММ из AA в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA представляет собой AA, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка присоединена к СМ на N-конце относительно сайта расщепления протеазой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один антигенсвязывающий сайт АВ является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт является замаскированным и по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт не является замаскированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения все антигенсвязывающие сайты являются замаскированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап измерения включает применение вторичного реагента, содержащего обнаруживаемую метку.

**[000330]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат по меньшей мере AA и/или конъюгированное AA, описанные в настоящей заявке, для применения при контакте с субъектом или биологическим образцом и средство для обнаружения уровня активированного AA и/или конъюгированного AA у субъекта или в биологическом образце, причем AA содержит обнаруживаемую метку, которая расположена на части AA, которая высвобождается после расщепления СМ, при этом обнаруживаемый уровень активированного AA у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у субъекта

или в биологическом образце так, что связывание мишени и/или расщепление протеазой АА не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом отсутствие обнаруживаемого уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце на обнаруживаемом уровне.

**[000331]** Согласно настоящему изобретению предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом, причем АА содержит обнаруживаемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ, и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у субъекта или в биологическом образце так, что связывание мишени и/или расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом уменьшенный обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшенный уровень обнаруживаемой метки представляет собой, например, уменьшение на примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% и/или примерно 100%. Такое АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, причем АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) причем ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и при этом ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ; и (b) при этом ММ из АА в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, тогда как ММ из АА в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000332]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в настоящей заявке, для применения при контакте с субъектом или биологическим образцом и средство для обнаружения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у субъекта или в биологическом образце так, что связывание мишени и/или расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом уменьшенный обнаруживаемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшенный уровень обнаруживаемой метки представляет собой, например, уменьшение на примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% и/или примерно 100%.

**[000333]** Согласно настоящему изобретению также предложены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом, причем АА содержит обнаруживаемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерения уровня обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце, причем обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом

образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или присутствует на недостаточном обнаруживаемом уровне у субъекта или в биологическом образце так, что расщепление AA протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом уменьшенный обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце. Уменьшенный уровень обнаруживаемой метки составляет, например, уменьшение на примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% и/или примерно 100%. Такое AA содержит маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM), который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), который специфично связывает мишень, причем AA в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-CM-AB или AB-CM-MM; (a) причем MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и при этом MM не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию AB; и (b) при этом MM из AA в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию AB с мишенью, тогда как MM из AA в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA представляет собой AA, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AA содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на AB. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня AA у субъекта или в образце выполняют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000334]** Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента, представляющего интерес, у субъекта или в образце, причем указанные наборы содержат

по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в настоящей заявке, для применения при приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом и средство для обнаружения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, причем АА содержит обнаруживаемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ, при этом обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у субъекта или в биологическом образце так, что связывание мишени и/или расщепление АА протеазой не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом уменьшенный обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшенный уровень обнаруживаемой метки представляет собой, например, уменьшение на примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% и/или примерно 100%.

**[000335]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов обнаруживаемая метка содержит визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металлов или метку на основе лиганда. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов визуализирующий агент содержит радиоизотоп. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов контрастирующий агент содержит йод, гадолиний или оксид железа. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов фермент содержит пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридина. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения этих способов метка содержит метку Alexa Fluor<sup>®</sup>, такую как Alex Fluor<sup>®</sup> 680 или Alexa Fluor<sup>®</sup> 750. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенон.

**[000336]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, отличный от человека, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой грызуна.

**[000337]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *in situ*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *ex vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов указанный способ представляет собой способ в условиях *in vitro*.

**[000338]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in situ* и/или визуализацию в условиях *in vivo* можно применять в способах определения субъектов, подлежащих лечению. Например, при визуализации в условиях *in situ* АА применяют для скрининга образцов субъектов для определения тех субъектов, которые имеют подходящую протеазу (ы) и мишень (и) в соответствующем местоположении, например, в опухолевом очаге.

**[000339]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in situ* применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Например, субъектов, которые имеют положительный результат теста как для мишени (например, мишени), так и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) тестируемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Аналогичным образом, субъекты, которые имеют отрицательный результат теста на одну или обе из мишени (например, мишень) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, тестируемом с применением этих способов, могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты, которые имеют отрицательный результат теста в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими разные СМ, до тех пор, пока не будет выявлено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется у субъекта в очаге заболевания). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту затем вводят терапевтически эффективное количество АА, для которого субъект имел положительный результат теста.

**[000340]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in vivo* применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Например, субъектов, которые имеют положительный результат теста как для мишени (например, мишени), так и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) тестируемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Аналогичным образом, субъекты с отрицательным результатом теста могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты, которые имеют отрицательный результат теста для первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими разные СМ, до тех пор, пока не будет определено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется в очаге заболевания у субъекта). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту затем вводят терапевтически эффективное количество АА, для которого субъект имел положительный результат теста.

**[000341]** Согласно некоторым вариантам реализации способов и наборов указанный способ или набор применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Например, субъектов, которые имеют положительный результат теста как для мишени (например, мишени), так и для протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) АА, тестируемом в этих способах, определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Аналогичным образом, субъекты, которые имеют отрицательный результат теста для обеих из мишеней (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, тестируемом с применением этих способов, могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты могут быть протестированы с другими АА до тех пор, пока



не будет определено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется у субъекта в очаге заболевания). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъектов, которые имеют отрицательный результат теста для любой из мишеней (например, мишени), определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъектов, которые имеют отрицательный результат теста для любой из мишеней (например, мишени), определяют как неподходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты могут быть протестированы с другими АА до тех пор, пока не будет определено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется в очаге заболевания у субъекта). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА не конъюгировано с агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обнаруживаемая метка расположена на АВ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляют с применением вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

**[000342]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ или набор применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА и/или конъюгированного АА, направленного против мишени (например, АА, с которым конъюгирован терапевтический агент), согласно настоящему изобретению, с последующим лечением путем введения этого АА и/или конъюгированного АА субъекту, нуждающемуся в этом. Например, субъекты, которые имеют положительный результат теста для обеих мишеней (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) АА и/или конъюгированном АА, тестируемых в этих способах, определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого антитела и/или такого конъюгированного АА, содержащего такой СМ, затем субъекту вводят терапевтически эффективное количество АА и/или конъюгированного АА, которое было протестировано.

Аналогичным образом, субъекты, которые имеют отрицательный результат теста для любой или обеих из мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, тестируемом с применением этих способов, могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты могут быть протестированы с другим антителом и/или конъюгированным АА до тех пор, пока не будет определено антитело и/или конъюгированное АА, подходящее для лечения (например, АА и/или конъюгированное АА, содержащее СМ, который расщепляется в очаге заболевания у субъекта). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту затем вводят терапевтически эффективное количество АА и/или конъюгированного АА, для которого субъект имел положительный результат теста.

**[000343]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов ММ представляет собой пептид, содержащий от примерно 4 до 40 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АА содержит линкерный пептид, причем линкерный пептид расположен между ММ и СМ. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АА содержит линкерный пептид, причем линкерный пептид расположен между АВ и СМ. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АА содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2), причем первый линкерный пептид расположен между ММ и СМ, а второй линкерный пептид расположен между АВ и СМ. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот, и при этом каждый из LP1 и LP2 необязательно должен представлять собой один и тот же линкер. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов один или оба из LP1 и LP2 содержат глицин-сериновый полимер. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере единицу. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую формулу (GGS)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере единицу. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 3), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 5), Gly-Ser-Gly-

Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 7) и Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 8).

**[000344]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АВ содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из последовательностей перекрестно-реактивных антител, представленных в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов АВ содержит фрагмент Fab, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

**[000345]** Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов расщепляющий агент представляет собой протеазу, которая локализована совместно с мишенью у субъекта или в образце, и СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, причем протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвергается воздействию протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов СМ представляет собой полипептид, содержащий до 15 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов СМ связан с N-концом АВ. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов СМ связан с С-концом АВ. Согласно некоторым вариантам реализации этих способов и наборов СМ связан с N-концом цепи VL АВ.

**[000346]** Антитела, конъюгированные антитела, АА и конъюгированные АА согласно настоящему изобретению применяют в диагностических и профилактических составах. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения АА вводят субъектам, которые подвергаются риску развития одного или более из воспаления, воспалительных нарушений, рака или других нарушений, упомянутых выше.

**[000347]** Предрасположенность субъекта или органа к одному или более из вышеупомянутых нарушений может быть определена с применением генотипических, серологических или биохимических маркеров.

**[000348]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения АА и/или конъюгированное АА вводят людям, у которых диагностировано клиническое показание, ассоциированное с одним или более из вышеупомянутых нарушений. После постановки диагноза АА и/или конъюгированное АА вводят, чтобы смягчить или обратить эффекты клинического показания.

**[000349]** Антитела, конъюгированные антитела, АА и конъюгированные АА согласно настоящему изобретению также можно применять при обнаружении мишени в образцах субъекта и, соответственно, можно применять в качестве диагностического средства. Например, антитела, конъюгированные антитела, АА и конъюгированные АА согласно

настоящему изобретению применяются в анализах в условиях *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения уровней мишени в образце субъекта.

**[000350]** Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело и/или АА согласно настоящему изобретению иммобилизованы на твердой подложке (например, лунке (-ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное антитело и/или АА служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела и/или АА в контакт с образцом субъекта твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

**[000351]** Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, предположительно имеющего некоторые уровни циркулирующего антигена, который считается диагностическим признаком патологии. После промывки тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое помечено обнаруживаемой меткой. Меченое второе антитело служит в качестве обнаруживающего антитела. Измеряют уровень обнаруживаемой метки, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют путем сравнения со стандартной кривой, полученной на основании стандартных образцов.

**[000352]** Следует понимать, что на основании результатов, полученных с применением антител и/или АА согласно настоящему изобретению в диагностическом анализе в условиях *in vitro*, возможно определить стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для конкретного заболевания отбирают образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или которые находятся на различных этапах терапевтического лечения заболевания. Диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии, устанавливают с применением популяции образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии.

**[000353]** Антитела, конъюгированные антитела, АА и конъюгированные АА также можно применять в способах диагностики и/или визуализации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in vivo*. Согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *in situ*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие способы представляют собой способы в условиях *ex vivo*. Например, АА, содержащие ферментативно расщепляемый СМ, можно применять для обнаружения наличия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие АА можно применять в диагностике, которая может включать обнаружение в условиях *in vivo* (например, качественное или количественное) активности фермента (или, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, среды с повышенным восстановительным потенциалом, такой как среда, которая может обеспечить восстановление дисульфидной связи) путем измерения накопления активированных антител (т. е. антител, полученных в результате расщепления активируемого антитела) в конкретной клетке или ткани конкретного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань проявляет ферментативную активность (или повышенный восстановительный потенциал в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

**[000354]** Например, СМ может быть выбран в качестве субстрата протеазы для протеазы, обнаруженной в очаге опухоли, в очаге вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном месте (например, в абсцессе, в органе и тому подобном) и тому подобном. АВ может представлять собой тот, который связывает антиген-мишень. Обнаруживаемая метка (например, флуоресцентная метка или радиоактивная метка или радиомаркер) может быть конъюгирована с АВ или другой областью активируемого антитела с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Подходящие обнаруживаемые метки обсуждаются применительно к вышеупомянутым способам скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При применении АВ, специфичного для белка или пептида патологического состояния, наряду с протеазой, активность которой повышена в пораженной ткани, представляющей интерес, АА будут проявлять повышенную скорость связывания с пораженной тканью по сравнению с тканями, в которых фермент, специфичный для СМ, не присутствует на обнаруживаемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови почечной системой фильтрации, а также поскольку фермент, специфичный для СМ, не присутствует на обнаруживаемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в непораженных

тканях, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженных тканях увеличивается по сравнению с непораженными тканями.

**[000355]** В другом примере АА можно применять для обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, АА можно применять для обнаружения (качественного или количественного) наличия фермента в образце. В другом примере, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, АА можно применять для обнаружения (качественного или количественного) наличия восстанавливающих условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих способах, АА могут содержать обнаруживаемую метку и могут быть связаны с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Обнаруживаемая метка может быть размещена на части АА, которая не высвобождается после расщепления, например, обнаруживаемая метка может представлять собой затухшую флуоресцентную метку или другую метку, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, путем приведения иммобилизованных, содержащих обнаруживаемую метку АА в контакт с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для того, чтобы произошло расщепление, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Наличие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивают по изменению обнаруживаемого сигнала АА перед приведением в контакт с образцом, например, по наличию и/или увеличению обнаруживаемого сигнала из-за расщепления АА расщепляющим агентом в образце.

**[000356]** Такие способы обнаружения могут быть адаптированы так, чтобы также обеспечивать обнаружение наличия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ из АА при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки наличия или отсутствия расщепляющего агента и наличия или отсутствия мишени, представляющей интерес. Наличие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по наличию и/или увеличению уровня обнаруживаемой метки АА, как описано выше, а наличие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем обнаружения комплекса мишень-АВ, например, путем применения содержащего обнаруживаемую метку антитела к мишени.

**[000357]** АА также можно применять для визуализации в условиях *in situ* для подтверждения активации АА, например, путем расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация в условиях *in situ* представляет собой методику,

которая позволяет локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. Применяя эту методику, можно подтвердить как связывание с конкретной мишенью, так и протеолитическую активность на основании наличия обнаруживаемой метки (например, флуоресцентной метки).

**[000358]** Эти методики можно применять для любых замороженных клеток или тканей, происходящих из очага заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти методики также можно применять для образцов свежих клеток или тканей.

**[000359]** В этих методиках АА помечено с применением обнаруживаемой метки. Обнаруживаемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), краситель ближнего ИК-диапазона (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и реагент для амплификации, такой как стрептавидин или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

**[000360]** Обнаружение метки в образце, который инкубировали с меченым АА, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична для СМ активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наличие протеазы может быть подтверждено с применением ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как те, которые описаны в настоящей заявке, и/или с применением агента, который специфичен для протеазы, например, антитела, такого как А11, которое специфично для протеазы матрипазы и ингибирует протеолитическую активность матрипазы; см., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 года. Аналогичный подход с применением ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как те, которые описаны в настоящей заявке, и/или с применением более селективного ингибиторного агента, можно применять для определения протеазы или класса протеаз, специфичных для СМ активируемого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наличие мишени может быть подтверждено с применением агента, специфичного для мишени, например, другого антитела, или обнаруживаемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно применять немеченое АА с обнаружением с помощью меченого вторичного антитела или более сложной системы обнаружения.

**[000361]** Сходные методики также можно применять для визуализации в условиях *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, например, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что очаг заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела.

**[000362]** Эти методики также можно применять в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, определения или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфичных для протеазы СМ в активируемом антителе.

**[000363]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in situ* и/или визуализацию в условиях *in vivo* можно применять в способах определения субъектов, подлежащих лечению. Например, при визуализации в условиях *in situ* АА применяют для скрининга образцов субъектов, чтобы определить тех субъектов, которые имеют подходящую протеазу (ы) и мишень (и) в соответствующем местоположении, например, в опухолевом очаге.

**[000364]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in situ* применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Например, субъектов, которые имеют положительный результат теста как для мишени, так и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) тестируемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Аналогичным образом, субъектов, которые имеют отрицательный результат теста для любой или обеих из мишени и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, тестируемом с применением этих способов, определяют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т. е., не подходящих для лечения с применением тестируемого АА). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты, которые имеют отрицательный результат теста в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими разные СМ, до тех пор, пока не будет определено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется в очаге заболевания у субъекта).

**[000365]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения визуализацию в условиях *in vivo* применяют для определения или уточнения иным способом популяции субъектов, подходящей для лечения с применением АА согласно настоящему изобретению. Например, субъектов, которые имеют положительный результат теста для обеих мишени и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) тестируемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), определяют как подходящих кандидатов для лечения с применением такого АА, содержащего такой СМ. Аналогичным образом, субъектов с отрицательным результатом теста определяют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т. е., не



подходящих для лечения с применением тестируемого АА). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие субъекты, которые имеют отрицательный результат теста в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими разные СМ, до тех пор, пока не будет определено АА, подходящее для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется в очаге заболевания у субъекта).

#### Фармацевтические композиции

**[000366]** АА и конъюгированные АА согласно настоящему изобретению (также называемые в настоящей заявке «активные соединения») и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат АА и/или конъюгированное АА и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и задерживающих всасывание агентов и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в самом последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном руководстве в данной области техники, которое включено в настоящий документ посредством ссылки. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Также можно применять липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

**[000367]** Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению изготовлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (т. е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. В примерном варианте реализации путь введения представляет собой внутривенный путь.

**[000368]** Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, нелетучие масла,

полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно корректировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с множественными дозами, изготовленные из стекла или пластика.

**[000369]** Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Носители, подходящие для внутривенного введения, включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stenophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси, США) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы обеспечить проходимость через иглу. Композиция должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения желательным является включение в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как манит и сорбит, хлорида натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто с помощью включения в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

**[000370]** Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с

последующей стерилизацией путем фильтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций способы получения представляют собой вакуумную сушку и сублимационную сушку, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный целевой ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного путем фильтрации.

**[000371]** Композиции для перорального введения обычно содержат инертный разбавитель или пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено со вспомогательными веществами и может применяться в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального введения также могут быть получены с применением жидкого носителя для применения в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяют перорально, ополаскивают ротовую полость и выплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связующие агенты и/или вспомогательные материалы могут быть включены как часть композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений с аналогичными свойствами: связующий агент, такой как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; облегчающий скольжение агент, такой как коллоидный диоксид кремния; подслащающий агент, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

**[000372]** Для введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или распылитель.

**[000373]** Системное введение также можно осуществлять с помощью трансмукозального или трансдермального средства. Для трансмукозального или трансдермального введения в составе применяют облегчающие проникновение агенты, подходящие для барьера, который необходимо преодолеть. Такие облегчающие проникновение агенты обычно известны в данной области техники и включают,

например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмуккозальное ведение можно осуществлять путем применения назальных спреев или суппозиторияев. Для трансдермального введения активные соединения изготавливают в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, общеизвестных в данной области техники.

**[000374]** Соединения также могут быть получены в форме суппозиторияев (например, с обычными основами для суппозиторияев, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

**[000375]** Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения активные соединения получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирь и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут понятны для специалистов в данной области техники. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно применять липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам). Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

**[000376]** Особенно предпочтительным является изготовление пероральных или парентеральных композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. В настоящей заявке единичная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения целевого терапевтического эффекта, в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных лекарственных форм согласно настоящему изобретению продиктована и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и ограничений, присущих уровню техники приготовления такого активного соединения для лечения индивидуумов.

**[000377]** Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

#### Дозирование

**[000378]** Как предусмотрено в настоящей заявке, субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе, которая находится в пределах диапазона от примерно 1 нг/кг до 100 г/кг. В примерных вариантах реализации субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 6 мг/кг. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 0,25 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 0,5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 1 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 2 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 3 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 4 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе примерно 6 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 0,5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 0,5 мг/кг до примерно 1 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 0,75 мг/кг до примерно 1,5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 1 мг/кг до примерно 2 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 1,5 мг/кг до примерно 2,5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 2 мг/кг до примерно 3 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от примерно 2,5 мг/кг до примерно 3,5 мг/кг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от



настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от примерно 200 мг до примерно 500 мг.

**[000379]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят конъюгированное АА на основании массы тела субъекта.

**[000380]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят конъюгированное АА, при этом дозировка при измерении в мг/кг основана на фактической массе тела субъекта.

**[000381]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят конъюгированное АА, при этом дозировка, измеренная в мг/кг, основана на скорректированной идеальной массе тела (AIBW) субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения скорректированная идеальная масса тела рассчитывается на основании разницы между фактической массой тела данного субъекта и заранее определенной идеальной массой тела (IBW) для субъектов мужского и женского пола, в зависимости от субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения идеальная масса тела конкретного субъекта основана на росте субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения идеальная масса тела (IBW) для конкретного субъекта-мужчины в килограммах определяется как  $IBW = 0,9 \times (\text{рост в см}) - 88$ , а IBW для конкретного субъекта-женщины в килограммах определяется как  $IBW = 0,9 \times (\text{рост в см}) - 92$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения скорректированная идеальная масса тела (AIBW) для конкретного субъекта в килограммах определяется как  $AIBW = IBW + 0,4 \times (\text{фактическая масса} - IBW)$ , где IBW основывается на конкретном росте и поле субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекты мужского и женского пола представляют собой субъектов-людей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AIBW человека составляет от примерно 40 кг до примерно 100 кг.

**[000382]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту внутривенно вводят АА или конъюгированное АА каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждые 7 дней, каждые 8 дней, каждые 9 дней, каждые 10 дней, каждые 11 дней, каждые 12 дней, каждые 13 дней, каждые 14 дней, каждые 15 дней, каждые 16 дней, каждые 17 дней, каждые 18 дней, каждые 19 дней, каждые 20 дней, каждый 21 день или даже каждые 30 дней. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту внутривенно вводят АА или конъюгированное АА до тех пор, пока АА и/или агент эффективны.

**[000383]** Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА один раз в сутки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят АА или конъюгированное АА несколько раз в сутки, например, каждые 4 часа, каждые 6 часов, каждые 4-6 часов, каждые 8 часов или каждые 12 часов.

**[000384]** Настоящее изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем настоящего изобретения, описанный в формуле изобретения.

### ПРИМЕРЫ

#### **Пример 1. Получение и тестирование конъюгированных активируемых антител, которые связывают CD166**

**[000385]** АА, применяемые в приведенном ниже примере, обеспечены в настоящей заявке и были получены и охарактеризованы с применением способов, раскрытых в PCT публикации № WO 2016/179285, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

**[000386]** Конъюгаты активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства (AADC) (изображены на ФИГ. 1) проявляют противоопухолевую активность в мышинной ксенотрансплантатной модели опухолей человека и хорошо переносятся в доклинических исследованиях (Weaver et al. AACR-NCI-EOTRC International Conference 2015). CD166 широко экспрессируется при многих видах рака и в здоровых тканях, как показано на ФИГ. 2, в таблице 4 и таблице 5.

Таблица 4

Тип рака	Распространенность экспрессии CD166 (ИГХ $\geq 2+$ ), %	Распространенность CD166-негативности (ИГХ $< 1+$ ), %	Количество исследованных случаев
Билиарный рак (холангиокарцинома)	56,5	11,9	177
Рак молочной железы	87,1	1,7	533
Рак эндометрия	75,2	6,0	315
Рак головы и шеи	81,1	0,8	122
Рак легких	71,0	8,2	465



Рак предстательной железы	98,3	0,8	119
Рак яичников	70,5	3,9	129

Таблица 5

Экспрессия CD166 в здоровой ткани человека по данным ИГХ

Тип ткани	Экспрессия CD166 человека	Тип ткани	Экспрессия CD166 человека
Надпочечник	-/+	Нерв	+ /+++
Костный мозг	-/+	Яичник	- /+++
Молочная железа	+ /+++	Поджелудочная железа	+ + /+++
Мозг, большой мозг	-/+	Предстательная железа	+ + /+++
Мозг, мозжечок	-/+	Кожа	+ /+++
Шейка матки	+ /+++	Тонкая кишка	+ /+++
Толстая кишка	++	Селезенка	+ /+++
Пищевод	+ /+++	Желудок	+++
Глаз	+	Поперечно-полосатая/скелетная мышца	- /+
Сердце	+	Яичко	- /+++
Почка	+ /+++	Щитовидная железа	+ + /+++
Гортань	+ /+++	Тимус	+
Печень	++	Матка	+ /+++
Легкое	+ /+++		

[000387] НА ФИГ. 3-6 показано, что конъюгаты АА к CD166 и лекарственного средства согласно настоящему изобретению вызвали полные и длительные ответы в мышинных ксенотрансплантатных моделях опухолей человека при дозах, равных или ниже прогнозируемой дозы для человека.

**Пример 2: открытое многоцентровое исследование с повышением дозы для определения безопасности конъюгатов активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства у субъектов с опухолями с высоким уровнем экспрессии CD-166**

[000388] В этом исследовании оценивают первичные конечные точки безопасности, максимальную переносимую дозу (МПД), рекомендуемую для фазы 2 дозу (RP2D), токсичность, ограничивающую дозу, и предварительную противоопухолевую активность конъюгатов активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства, вводимых в виде монотерапии субъектам с опухолями с высоким уровнем экспрессии CD166 (карциномой молочной железы, карциномой легких, карциномой предстательной железы, карциномой яичника, карциномой эндометрия, карциномой головы и шеи и билиарной карциномой).

[000389] Вторичные конечные точки включают: (1) измерение частоты объективного ответа в соответствии с критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST), версия 1.1, или критериями, специфичными для опухоли, в зависимости от ситуации; (2) время до развития ответа; (3) продолжительность ответа; (4) выживание без прогрессирования заболевания; (5) общую выживаемость; (6) фармакокинетический профиль AADC, включая анализ интактных AADC, общих AADC, общих AADC-конъюгированного DM4, свободного DM4 и S-метил-DM4; и (7) частоту образования антител к лекарственному средству.

[000390] Дополнительные конечные точки включают (1) определение прогностических биомаркеров, ассоциированных с клинической активностью AADC, таких как экспрессия CD166 и митотические маркеры (например, Ki-67) в образцах опухоли до и во время лечения; и (2) характеристику активности протеазы и активации AADC в образцах биопсии опухоли и периферической крови во время лечения, соответственно.

[000391] Исследование, представленное в этом примере, представляет собой открытое, многоцентровое исследование с повышением дозы, а также исследование для подтверждения концепции фазы 1/2 AADC к CD166, в котором AADC к CD166 содержит DM4-конъюгированное активируемое антитело из активируемого антитела к CD166, упоминаемое в настоящей заявке как комбинация 55, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246.

[000392] В исследование включены субъекты с карциномой молочной железы, устойчивым к кастрации раком предстательной железы (CPRC), холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичников, плоскоклеточной

карциномой головы и шеи (ПРГШ) и немелкоклеточным раком легких (НМРЛ). Субъектам вводят конъюгат активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства внутривенно каждый 21 день, и исследование продолжается в следующих двух частях, части А и части В. Схема исследования также показана на ФИГ. 6.

**[000393]** В части А (повышение дозы) ( $n \leq 50$ ) после титрования повышенной дозы введенного АADC к CD166 следует обычный дизайн 3+3. Дизайн 3+3 описывается следующим образом: 3 субъекта получают первую дозу АADC к CD166 и отмечают нежелательные эффекты. Если токсичность не наблюдается, дозу увеличивают и лечение получают три дополнительных субъекта. Если 1 из 3 субъектов проявляет признаки токсичности, 3 дополнительных субъекта зачисляются для получения первой дозы. Если 2 из 3 субъектов проявляют признаки токсичности, эту дозу обозначают как максимальную переносимую дозу (описано в <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684552/>). Это исследование выполняют для определения МПД, и оно заканчивается в когорте, спланированной с модифицированным интервалом вероятности токсичности 2 (mTPI-2), получавшей лечение при МПД для определения RP2D.

**[000394]** Часть В (фаза с применением МПД) исследования представляет собой тестирование фазы с применением МПД АADC к CD166, вводимого при RP2D в 7 типах опухолей (до 14 субъектов на каждый,  $n \leq 98$ ).

**[000395]** Субъекты получают лечение до начала прогрессирования; продолжительность лечения составляет примерно 6 месяцев с последующим контактом для врачебного наблюдения каждые 3-6 месяцев или в течение еще 1 или 2 лет или до тех пор, пока субъект жив.

**[000396]** В исследовании включено до 150 субъектов в обе когорты – повышения дозы и получения МПД. Ключевые критерии включения субъектов в исследование приведены в таблице 6.

**Таблица 6**

Часть А	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Возраст <math>\geq 18</math> лет</li> <li>- Показатель общего состояния по шкале Восточной совместной группы по изучению онкологических заболеваний (ECOG) 0-1</li> <li>- Гистологически подтвержденный диагноз любой активной метастатической или местно-распространенной неоперабельной солидной опухоли.</li> <li>- Согласие на предоставление опухолевой ткани (архивной, новой или недавно приобретенной) до начала введения AADC к CD166</li> <li>- Ожидаемая продолжительность жизни <math>\geq 3</math> месяцев</li> </ul>
Часть В	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Согласие от по меньшей мере 7 субъектов (по меньшей мере 1 для каждого типа опухоли) на предоставление образца биопсии опухоли в начальных условиях и во время исследования (если проведение биопсии является безопасным) и образца периферической крови</li> </ul>
Карцинома молочной железы	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Субъекты с карциномой молочной железы, экспрессирующей рецептор эстрогена (ER+), должны были получать противогормональную терапию и перенести прогрессирование заболевания</li> <li>- ТНРМЖ с получением <math>\geq 2</math> предыдущих линий терапии</li> </ul>
Устойчивая к кастрации карцинома предстательной железы	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Получение <math>\geq 1</math> предшествующей терапии</li> </ul>
Холангиокарцинома	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Отсутствие ответа на <math>\geq 1</math> предшествующую линию схемы, включающей гемцитабин</li> </ul>
Карцинома эндометрия	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Получение <math>\geq 1</math> курса лечения, включающего платину, для лечения внематочного заболевания или распространенного заболевания</li> </ul>
Эпителиальная карцинома яичника	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Субъекты с мутацией, не связанной с раком молочной железы (BRCA) (зародышевая или соматическая), или субъекты с неизвестным мутационным статусом BRCA должны иметь устойчивую к платине или рефрактерную к</li> </ul>

	<p>платине карциному яичника</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Субъекты с мутациями BRCA должны быть рефрактерными или не подходить по иным причинам для получения ингибиторов PARP</li> </ul>
ПРГШ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Получение <math>\geq 1</math> курса лечения, включающего платину, и ингибитор PD-1/PD-L1, если одобрено для показания субъекта и местности</li> </ul>
НМРЛ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Получение <math>\geq 1</math> курса лечения, включающего платину</li> <li>- Ингибитор контрольной точки должен был быть введен, если он одобрен для показания субъекта в его местности</li> </ul>
Критерии исключения	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Активное или хроническое заболевание роговицы, трансплантация роговицы в анамнезе, активный герпетический кератит и активные состояния глаз, требующие текущего лечения/мониторинга</li> <li>- Серьезное сопутствующее заболевание, включая клинически значимую активную инфекцию</li> <li>- Наличие в анамнезе или текущие активные аутоиммунные заболевания</li> <li>- Значительное заболевание сердца, такое как недавний инфаркт миокарда</li> <li>- Наличие в анамнезе рассеянного склероза или другого демиелинизирующего заболевания, синдрома Итона-Ламберта (паранеопластического синдрома), наличие в анамнезе геморрагического или ишемического инсульта в течение последних 6 месяцев или алкогольное заболевание печени;</li> <li>- Незаживающая (ие) рана (ы) или язва (ы), за исключением язвенных поражений, вызванных основным новообразованием;</li> <li>- Наличие в анамнезе тяжелых аллергических или анафилактических реакций на предыдущую терапию моноклональным антителом;</li> <li>- Получение в настоящее время антикоагулянтной терапии варфарином;</li> <li>- Обширное хирургическое вмешательство (требующие общей анестезии) в течение 3 месяцев до дозирования</li> </ul>

**[000397]** В исследовании зачислено до 150 субъектов в обе когорты – повышения дозы и получения МПД. Нежелательные явления и сопутствующие лекарственные средства оценивают в 1, 8 и 15 день 1 цикла AADC к CD166, с последующими оценками в первый день каждого последующего цикла лечения в конце лечения. Оценка глазных симптомов и оценка общего состояния по шкале ECOG проводится при скрининге, в первый день каждого цикла лечения и в конце лечения. Полное офтальмологическое обследование проводится у всех субъектов при скрининге и в определенные моменты исследования. Субъекты, которые сообщают о внезапных изменениях зрения, связанных с лечением, или о других глазных симптомах будут проходить повторные обследования перед инфузией в каждом втором цикле и в соответствии с клиническими показаниями. Гематологические показатели и биохимический анализ крови оценивают при каждом визите лечения. Архивные ткани или свежие образцы биопсии предоставляются в начале исследования для субъектов, участвующих в части А. В части В биопсии до и во время лечения и сбор образцов периферической крови (частично для определения интактности активируемого антитела) будут обязательными для по меньшей мере 7 субъектов, по 1 для опухоли каждого типа. В некоторых случаях собирают биопсии от более чем 1 субъекта для каждого типа опухоли, например, для каждого типа опухоли собирают биопсии от 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более субъектов. Образцы крови для анализов фармакокинетики, фармакодинамики и биомаркеров получают в заранее определенные моменты времени. Визуализацию для оценки опухолевого ответа проводят каждые 8 недель после первой дозы AADC к CD166. После введения последней дозы исследуемого лекарственного средства субъекты проходят оценки каждые 3 месяца в течение первого года, а затем каждые 6 месяцев или до смерти.

**[000398]** Несколько дополнительных способов оценки активации и активности конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства перечислены в таблице 7 и на ФИГ. 7А, 7В.

**Таблица 7**

Цель	Образец (образцы)	Анализ	Способ
Определение активации конъюгата активируемого антитела к CD166 и	Биопсия, плазма	Анализ WEST <sup>™</sup>	Капиллярный электрофорез с иммунообнаружением для выявления замаскированных и активированных AADC
	Биопсия	Анализ QZ <sup>™</sup>	Обнаружение активности

лекарственного средства			протеазы
Корреляция маркеров с активностью конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства	Биопсия	ИГХ	Экспрессия CD166, Ki-67

**Пример 3. Количественная оценка активированных и интактных активируемых антител к CD166 в биологических образцах**

[000399] В этом примере описана возможность обнаружения активированного и интактного активируемого антитела к CD166, 7614.6-3001-HuCD166, в образцах плазмы и образцах ксенотрансплантатных опухолей мышей, которым вводили 7614.6-3001-HuCD166.

[000400] В исследованиях, представленных в настоящей заявке, применяли активируемое антитело к CD166, упоминаемое в настоящей заявке как 7614.6-3001-HuCD166, также упоминаемое как HuCD166-7614.6-3001, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246.

[000401] Количественную оценку активированного и интактного активируемого антитела к CD166, 7614.6-3001-HuCD166, проводили с помощью системы Wes с применением антител к IgG человека (антитела к IgG человека (H&L), American Qualex, каталожный номер A110UK). Бестимульным мышам подкожно имплантировали 5×10<sup>6</sup> клеток H292 в бессывороточной среде, смешанной с Matrigel™ в соотношении 1:1. Мышам, несущим 200-500 мм<sup>2</sup> ксенотрансплантатов H292, вводили 5 мг/кг активируемого антитела к CD166, 7614.6-3001-HuCD166. Через один день после обработки опухоль и плазму (гепарин) собирали и хранили при -80°C до анализа. Гомогенаты опухолей готовили в лизирующем буфере Thermo Scientific Pierce™ IP (каталожный номер 87788), в который был добавлен набор для однократного применения, содержащий коктейль ингибиторов протеаз, Thermo Scientific Halt™ (каталожный номер 78430), с применением Vacuocycler (Pressure Biosciences). Один мг/мл белкового лизата в лизирующем буфере IP с ингибитором протеазы HALT/ЭДТА и образцы плазмы,

разведенные в соотношении 1:20 в ФСБ, анализировали с помощью системы Wes, как описано в настоящей заявке. На ФИГ. 7А и ФИГ. 7В показана преимущественная активация в опухоли (ФИГ. 7В) по сравнению с плазмой (ФИГ. 7А).

**Пример 4. Количественная оценка активированных и интактных конъюгированных активируемых антител к CD166 в биологических образцах**

[000402] В этом примере описана возможность обнаружения активированного и интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 за счет линкера SPDB (комбинация 55).

[000403] В примере использовали DM4-конъюгированное активируемое антитело из активируемого антитела к CD166, называемое в настоящей заявке комбинацией 55, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246, конъюгированную с DM4 за счет линкера spdb.

[000404] Конъюгированное активируемое антитело к CD166 активировали с применением либо 80 мкг/мл матриптазы (R&D Systems, каталожный номер 3946-SE), либо 80 мкг/мл ММП-14 (R&D Systems, каталожный номер 918-MP) в течение 2 часов при 37С и смешивали с интактным конъюгированным активируемым антителом. Затем смесь анализировали с помощью системы Wes, как описано выше, с применением антител к IgG человека (H&L) (American Qualex, каталожный номер A110UK). На ФИГ. 8А и 8В показана возможность отличить активированные матриптазой (ФИГ. 8А) или активированные ММП-14 (ФИГ. 8В) активируемые антитела от интактных конъюгированных активируемых антител.

[000405] Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в совокупности с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема нижеследующего.

**Пример 5. Доказательство частичного ответа у субъекта после лечения с применением активируемого антитела к CD166**

[000406] В этом примере показано, что введение интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 за счет линкера SPDB (комбинация 55), приводит к частичному ответу у субъекта.

[000407] В этом примере у субъекта была выявлена плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПРГШ), при первоначальном скрининге имелись только целевые поражения и отсутствовали нецелевые поражения. У субъекта не наблюдали развития



каких-либо новых опухолей во время исследования. Субъекта лечили с применением 5 мг/кг интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 за счет линкера SPDB (комбинация 55), каждые три (3) недели. Вводимая дозировка конъюгированного активируемого антитела была основана на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

**[000408]** Субъект испытал изменение опухолевой нагрузки на -31,7% с момента первоначального скрининга (41 мм) до визита цикла 3 (28 мм), т. е. через 9 недель после первого введения. Во время визита цикла 6, т. е. через 18 недель после первого введения, субъект имел опухолевую нагрузку (31,5 мм). Таким образом, субъект испытал частичный ответ с момента первоначального скрининга на основе классификации RECIST v1.1.

**Пример 6. Фармакокинетика конечных метаболитов общих и интактных активируемых антител к CD166 у субъектов-людей после лечения**

**[000409]** Этот пример демонстрирует фармакокинетику общего и интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 за счет линкера SPDB (комбинация 55), после введения субъектам-людям.

**[000410]** В описанном выше сегменте исследования с повышением дозы данное исследование было разработано для оценки фармакокинетики (ФК) и ADA у субъектов, получающих дозы от 0,25 мг/кг до 4,0 мг/кг (на основе скорректированной идеальной массы тела субъекта) конъюгированного активируемого антитела к CD166 (комбинация 55). Для исследований ФК применяли многократные анализы, чтобы определить сывороточные уровни (1) интактного активируемого антитела к CD166 как с конъюгированным DM4, так и без него, (2) общего (т. е. обоих интактного и расщепленного) активируемого антитела к CD166 как с конъюгированным DM4, так и без него, (3) общего (т. е. обоих интактного и расщепленного) активируемого антитела к CD166 с конъюгированным DM4, (4) свободного DM4 и (5) S-метил-DM4, цитотоксического метаболита DM4.

**[000411]** Исследования выполняли, анализируя образцы крови, взятые у субъектов-людей, получавших интактное конъюгированное активируемое антитело к CD166 (комбинация 55). В цикле 1 (т. е. введение 1 раунда лекарственного средства) исследование разрабатывали так, чтобы отобрать образцы крови у субъектов, прошедших оценку, до инфузии, в конце инфузии и на 2, 3, 4, 8 и 15 дни во время визита субъекта. В последующих 2, 4, 6, 8 циклах и затем каждые 8 циклов исследование разрабатывали так, чтобы для каждого цикла отобрать образцы крови перед инфузией. В третьем цикле исследование разрабатывали так, чтобы отобрать образцы крови до инфузии, в конце

инфузии и на 8 и 15 дни во время визита субъекта. Исследование разрабатывали, чтобы отобрать последний образец крови в конце исследования во время визита субъекта.

**[000412]** На ФИГ. 9А-9Е представлены примерные результаты анализа ФК после введения указанных дозировок комбинации 55. На каждом графике пунктирная линия указывает нижний уровень количественного определения (LLOQ) для соответствующих анализов, а точкам ниже этой линии присваивается значение LLOQ/2. На Фигуре 9А представлена зависимость от времени концентрации в сыворотке интактного (т. е. нерасщепленного) активируемого антитела к CD166, которое либо неконъюгировано, либо конъюгировано с DM4, после введения субъектам-людям комбинации 55 в указанной дозировке (на основании AIBW). График на Фигуре 9В показывает зависимость от времени концентрации в сыворотке общего (т. е. нерасщепленного и расщепленного) активируемого антитела к CD166, которое конъюгировано с DM4, после введения субъектам-людям комбинации 55 в указанной дозировке (на основании AIBW). График на Фигуре 9С показывает зависимость от времени концентрации в сыворотке свободного DM4 после введения субъектам-людям комбинации 55 в указанной дозировке (на основании AIBW). График на Фигуре 9D показывает зависимость от времени концентрации в сыворотке S-метил-DM4 (DM4-Me) после введения субъектам-людям комбинации 55 в указанной дозировке (на основании AIBW). График на Фигуре 9Е показывает зависимость от времени концентрации в сыворотке общего (т. е. нерасщепленного и расщепленного) активируемого антитела к CD166, которое либо неконъюгировано, либо конъюгировано с DM4, после введения субъектам-людям комбинации 55 в указанной дозировке (на основании AIBW).

**[000413]** Примерные данные ФК свидетельствуют о том, что активируемое антитело к CD166 циркулирует в сыворотке преимущественно в интактной форме. Как свободный DM4, так и DM4-Me циркулировали как <1,9 мол. % от общего активируемого антитела к CD166. Медиана  $t_{1/2}$  интактного активируемого антитела к CD166 находилась в пределах диапазона от 3,71 до 8,57 дней. При многократном дозировании коэффициент накопления минимальной концентрации в плазме ( $C_{\min}$ ) (доза 3:доза 1) для интактного активируемого антитела к CD166 не превышал 1,34 и не зависел от дозы.

**[000414]** Примерные данные также указывают на то, что отношение интактного к общему активируемому антителу к CD166 для  $AUC_{0-\tau}$  дозы 1 (площадь под кривой, оцененной до конца интервала дозирования) и  $C_{\max}$  (максимальная концентрация в плазме) оказалось примерно одинаковым. Воздействие интактного и общего активируемого антитела к CD166 после введения однократной дозы конъюгированного

активируемого антитела к CD166 обычно увеличивалось с повышением дозы, согласно результатам измерения с помощью  $AUC_{0-\tau}$  и  $C_{max}$ .

### ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

**[000415]** Настоящее изобретение может быть определено посредством ссылки на следующие перечисленные иллюстративные варианты реализации:

**[000416] Вариант реализации 1.** Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (AA), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом указанное AA содержит:

a антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

b маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

c расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76;

**[000417]** и/или, или изложено другим образом, Вариант реализации 1 представляет собой активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения при лечении, облегчении симптома или замедлении прогрессирования рака у субъекта, причем указанное AA содержит:

a антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

b маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем указанный MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

c расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для

протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и при этом указанное АА предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом.

**[000418] Вариант реализации 2.** Способ или применение по варианту реализации 1, в котором указанный рак представляет собой карциному молочной железы, устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичника, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легких.

**[000419] Вариант реализации 3.** Способ ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (АА), конъюгированного с агентом, нуждающемуся в этом субъекту, причем указанное АА содержит:

а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

б маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

**[000420]** и/или, или изложено иным образом, Вариант реализации 3 представляет собой активируемое антитело (АА), конъюгированное с агентом, для применения при ингибировании или уменьшении роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, например, для лечения рака у субъекта, причем указанное АА содержит:

а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

б маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в

нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (CM), связанный с АВ, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и

при этом указанное AA предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом.

**[000421] Вариант реализации 4.** Способ или применение по варианту реализации 3, в котором указанный субъект страдает карциномой молочной железы, устойчивой к кастрации карциномой предстательной железы, холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичников, плоскоклеточной карциномой головы и шеи или немелкоклеточным раком легких.

**[000422] Вариант реализации 5.** Способ по варианту реализации 3, в котором указанные клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичника, плоские клетки головы или шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.

**[000423] Вариант реализации 6.** Способ по любому из вариантов реализации 1-5, в котором указанный агент представляет собой майтанзиноид или его производное.

**[000424] Вариант реализации 7.** Способ по любому из вариантов реализации 1-6, в котором указанный агент представляет собой DM4.

**[000425] Вариант реализации 8.** Способ по любому из вариантов реализации 1-7, в котором указанный DM4 конъюгирован с AA за счет линкера.

**[000426] Вариант реализации 9.** Способ или применение по варианту реализации 8, в которых указанный линкер содержит фрагмент SPBD.

**[000427] Вариант реализации 10.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-9, в которых указанный АВ соединен с указанным CM.

**[000428] Вариант реализации 11.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-10, в которых указанный MM соединен с указанным CM так, что AA в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-CM-AB или AB-CM-MM.

**[000429] Вариант реализации 12.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-11, в которых указанное AA содержит соединяющий пептид между указанными MM и CM.

**[000430] Вариант реализации 13.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-12, в которых указанное АА содержит соединяющий пептид между указанными СМ и АВ.

**[000431] Вариант реализации 14.** Способ или применение по варианту реализации 12, в которых соединяющий пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479.

**[000432] Вариант реализации 15.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-14, в которых указанное АА содержит соединяющий пептид между указанными СМ и АВ.

**[000433] Вариант реализации 16.** Способ или применение по варианту реализации 15, в которых соединяющий пептид содержит аминокислотную последовательность 15.

**[000434] Вариант реализации 17.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-16, в которых указанное АА содержит первый соединяющий пептид (LP1) и второй соединяющий пептид (LP2), и при этом АА в нерасщепленном состоянии имеет структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.

**[000435] Вариант реализации 18.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-17, в которых указанная легкая цепь соединена со спейсером на своем N-конце.

**[000436] Вариант реализации 19.** Способ или применение по варианту реализации 18, в которых указанный спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305.

**[000437] Вариант реализации 20.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-19, в которых указанные ММ и СМ соединены с указанной легкой цепью.

**[000438] Вариант реализации 21.** Способ или применение по варианту реализации 20, в которых указанный ММ соединен с указанным СМ так, что АА в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу на своей легкой цепи, как представлено далее: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь.

**[000439] Вариант реализации 22.** Способ или применение по варианту реализации 21, в которых указанный спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479 и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.

**[000440] Вариант реализации 23.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-22, в которых указанная легкая цепь АА содержит последовательность SEQ ID NO: 314.

**[000441] Вариант реализации 24.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-23, в которых указанная легкая цепь AA содержит последовательность SEQ ID NO: 246.

**[000442] Вариант реализации 25.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-24, в которых возраст указанного субъекта составляет по меньшей мере 18 лет.

**[000443] Вариант реализации 26.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-25, в которых показатель общего состояния указанного субъекта по шкале ECOG составляет 0-1.

**[000444] Вариант реализации 27.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-26, в которых указанный субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз активного метастатического рака.

**[000445] Вариант реализации 28.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-26, в которых указанный субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз местно-распространенной неоперабельной солидной опухоли.

**[000446] Вариант реализации 29.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-28, в которых ожидаемая продолжительность жизни указанного субъекта составляет по меньшей мере 3 месяца на момент введения или применения.

**[000447] Вариант реализации 30.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет карциному молочной железы.

**[000448] Вариант реализации 31.** Способ или применение по варианту реализации 30, в которых указанная карцинома молочной железы представляет собой ER+.

**[000449] Вариант реализации 32.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 30-31, и ранее получил противогормональную терапию и испытал прогрессирование заболевания.

**[000450] Вариант реализации 33.** Способ или применение по варианту 30, в которых указанный субъект имеет тройной негативный рак молочной железы и прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии.

**[000451] Вариант реализации 34.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет устойчивую к кастрации карциному предстательной железы.

**[000452] Вариант реализации 35.** Способ или применение по варианту 34, в которых указанный субъект получил по меньшей мере одну предшествующую терапию.

**[000453] Вариант реализации 36.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет холангиокарциному.

**[000454] Вариант реализации 37.** Способ или применение по варианту реализации 36, в которых указанный субъект не ответил по меньшей мере на одну предшествующую линию курса лечения, включающего гемцитабин.

**[000455] Вариант реализации 38.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет карциному эндометрия.

**[000456] Вариант реализации 39.** Способ или применение по варианту реализации 38, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину, для лечения внематочного или распространенного заболевания.

**[000457] Вариант реализации 40.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет эпителиальную карциному яичника.

**[000458] Вариант реализации 41.** Способ или применение по варианту реализации 40, в которых указанный субъект имеет устойчивую к платине карциному.

**[000459] Вариант реализации 42.** Способ или применение по варианту реализации 40, в которых субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичника.

**[000460] Вариант реализации 43.** Способ или применение по варианту реализации 40, в которых указанный субъект имеет мутацию BRCA и является рефрактерным к ингибиторам PARP или не подходит по другим причинам для их получения.

**[000461] Вариант реализации 44.** Способ или применение по варианту реализации 40, в которых указанный субъект имеет мутацию, отличную от BRCA.

**[000462] Вариант реализации 45.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (ПРГШ).

**[000463] Вариант реализации 46.** Способ или применение по варианту реализации 45, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину.

**[000464] Вариант реализации 47.** Способ или применение по варианту реализации 45, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.

**[000465] Вариант реализации 48.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-29, в которых указанный субъект имеет немелкоклеточный рак легких (НМРЛ).

**[000466] Вариант реализации 49.** Способ или применение по варианту реализации 48, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину.



[000467] **Вариант реализации 50.** Способ или применение по варианту реализации 48, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.

[000468] **Вариант реализации 51.** Способ или применение по варианту реализации 48, в которых указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.

[000469] **Вариант реализации 52.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 6 мг/кг.

[000470] **Вариант реализации 53.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 0,25 мг/кг.

[000471] **Вариант реализации 54.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 0,5 мг/кг.

[000472] **Вариант реализации 55.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 1 мг/кг.

[000473] **Вариант реализации 56.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 2 мг/кг.

[000474] **Вариант реализации 57.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 4 мг/кг.

[000475] **Вариант реализации 58.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 5 мг/кг.

[000476] **Вариант реализации 59.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет примерно 6 мг/кг.

[000477] **Вариант реализации 60.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 0,25 мг/кг до 0,5 мг/кг.

[000478] **Вариант реализации 61.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 0,5 мг/кг до 1 мг/кг.

[000479] **Вариант реализации 62.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 1 мг/кг до 2 мг/кг.

[000480] **Вариант реализации 63.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 2 мг/кг до 4 мг/кг.

[000481] **Вариант реализации 64.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 4 мг/кг до 5 мг/кг.

[000482] **Вариант реализации 65.** Способ или применение по варианту реализации 52, в которых указанная доза составляет от примерно 5 мг/кг до 6 мг/кг.

**[000483] Вариант реализации 66.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 10 мг до примерно 200 мг.

**[000484] Вариант реализации 67.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 25 мг до примерно 500 мг.

**[000485] Вариант реализации 68.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 10 мг до примерно 25 мг.

**[000486] Вариант реализации 69.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 20 мг до примерно 50 мг.

**[000487] Вариант реализации 70.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 30 мг до примерно 75 мг.

**[000488] Вариант реализации 71.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 40 мг до примерно 100 мг.

**[000489] Вариант реализации 72.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 50 мг до примерно 125 мг.

**[000490] Вариант реализации 73.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 60 мг до примерно 150 мг.

**[000491] Вариант реализации 74.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 80 мг до примерно 200 мг.

**[000492] Вариант реализации 75.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 100 мг до примерно 250 мг.

**[000493] Вариант реализации 76.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 120 мг до примерно 300 мг.

**[000494] Вариант реализации 77.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 140 мг до примерно 350 мг.

**[000495] Вариант реализации 78.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 160 мг до примерно 400 мг.

**[000496] Вариант реализации 79.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 180 мг до примерно 450 мг.

**[000497] Вариант реализации 80.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-51, в которых указанное АА, конъюгированное с агентом, представлено в фиксированной дозе от примерно 200 мг до примерно 500 мг.

**[000498] Вариант реализации 81.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-80, в которых указанному субъекту внутривенно вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, или указанное АА изготовлено для внутривенного применения.

**[000499] Вариант реализации 82.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 1-81, в которых указанному субъекту внутривенно вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, каждый 21 день или изготовленное для применения каждый 21 день.

**[000500] Вариант реализации 83.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 52-65, 81 и 82, в которых указанное АА конъюгировано с агентом, при этом дозировка основана на фактической массе тела субъекта.

**[000501] Вариант реализации 84.** Способ или применение по любому из вариантов реализации 52-65, 81 и 82, в которых указанное АА конъюгировано с агентом, при этом дозировка основана на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

#### **ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ**

**[000502]** Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в совокупности с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема нижеследующего.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения, ослабления симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (АА), конъюгированного с агентом, нуждающемуся в этом субъекту, при этом указанное АА содержит:

а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

б маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой карциному молочной железы, устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичника, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легких.

3. Способ ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (АА), конъюгированного с агентом, нуждающемуся в этом субъекту, причем указанное АА содержит:

а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

б маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем указанный СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный субъект страдает карциномой молочной железы, устойчивой к кастрации карциномой предстательной железы, холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичника, плоскоклеточной карциномой головы и шеи или немелкоклеточным раком легких.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичника, плоские клетки головы или шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный агент представляет собой майтанзиноид или его производное.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанный агент представляет собой DM4.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный DM4 конъюгирован с указанным АА с помощью линкера.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный линкер содержит фрагмент SPBD.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный АВ соединен с указанным СМ.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный ММ соединен с указанным СМ так, что АА в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к С-концу, как представлено далее: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанное АА содержит соединяющий пептид между указанными ММ и СМ.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанное АА содержит соединяющий пептид между указанными СМ и АВ.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что соединяющий пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанное АА содержит соединяющий пептид между указанными СМ и АВ.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что соединяющий пептид содержит аминокислотную последовательность 15.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанное AA содержит первый соединяющий пептид (LP1) и второй соединяющий пептид (LP2), и при этом AA в нерасщепленном состоянии имеет структурную группировку от N-конца к C-концу, как представлено далее: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что указанная легкая цепь соединена со спейсером на своем N-конце.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305.
20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанные MM и CM соединены с указанной легкой цепью.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанный MM соединен с указанным CM так, что AA в нерасщепленном состоянии содержит структурную группировку от N-конца к C-концу на своей легкой цепи, как представлено далее: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479 и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.
23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанная легкая цепь AA содержит последовательность SEQ ID NO: 314.
24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанная легкая цепь AA содержит последовательность SEQ ID NO: 246.
25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что возраст указанного субъекта составляет по меньшей мере 18 лет.
26. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что указанный субъект имеет показатель общего состояния по шкале ECOG 0-1.
27. Способ по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что указанный субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз активного метастатического рака.
28. Способ по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что указанный субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз местно-распространенной неоперабельной солидной опухоли.
29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что продолжительность жизни указанного субъекта составляет по меньшей мере 3 месяца на момент введения.
30. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет карциному молочной железы.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что указанная карцинома молочной железы представляет собой ER+.
32. Способ по любому из пп. 30-31, и получил противогормональную терапию и испытал прогрессирование заболевания.
33. Способ по п. 30, отличающийся тем, что указанный субъект имеет тройной негативный рак молочной железы и прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии.
34. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет устойчивую к кастрации карциному предстательной железы.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере одну предшествующую терапию.
36. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет холангиокарциному.
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанный субъект не имел ответа на по меньшей мере одну предшествующую линию курса лечения, включающего гемцитабин.
38. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет карциному эндометрия.
39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину, для лечения внематочного или распространенного заболевания.
40. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет эпителиальную карциному яичника.
41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный субъект имеет устойчивую к платине карциному.
42. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичника.
43. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный субъект имеет мутацию BRCA и является рефрактерным к ингибиторам PARP или не подходит по иным причинам для их получения.
44. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный субъект имеет мутацию, отличную от BRCA.
45. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (ПРГШ).
46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину.

47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.
48. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанный субъект имеет немелкоклеточный рак легких (НМРЛ).
49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один курс лечения, включающий платину.
50. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.
51. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанный субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.
52. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 6 мг/кг.
53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 0,25 мг/кг.
54. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 0,5 мг/кг.
55. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 1 мг/кг.
56. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 2 мг/кг.
57. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 4 мг/кг.
58. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 5 мг/кг.
59. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет примерно 6 мг/кг.
60. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 0,25 мг/кг до 0,5 мг/кг.
61. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 0,5 мг/кг до 1 мг/кг.
62. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 1 мг/кг до 2 мг/кг.
63. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 2 мг/кг до 4 мг/кг.



64. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 4 мг/кг до 5 мг/кг.
65. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная доза составляет от примерно 5 мг/кг до 6 мг/кг.
66. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 10 мг до примерно 200 мг.
67. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 25 мг до примерно 500 мг.
68. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 10 мг до примерно 25 мг.
69. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 20 мг до примерно 50 мг.
70. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 30 мг до примерно 75 мг.
71. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 40 мг до примерно 100 мг.
72. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 50 мг до примерно 125 мг.
73. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 60 мг до примерно 150 мг.
74. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 80 мг до примерно 200 мг.
75. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 100 мг до примерно 250 мг.

76. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 120 мг до примерно 300 мг.
77. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 140 мг до примерно 350 мг.
78. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 160 мг до примерно 400 мг.
79. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 180 мг до примерно 450 мг.
80. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от примерно 200 мг до примерно 500 мг.
81. Способ по любому из пп. 1-80, отличающийся тем, что указанному субъекту внутривенно вводят указанное АА, конъюгированное с агентом.
82. Способ по любому из пп. 1-81, отличающийся тем, что указанному субъекту внутривенно вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, каждый 21 день.
83. Способ по любому из пп. 52-65, 81 и 82, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на фактической массе тела субъекта.
84. Способ по любому из пп. 52-65, 81 и 82, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят указанное АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на скорректированной идеальной массе тела субъекта.
85. Активируемое антитело (АА), конъюгированное с агентом, для применения при лечении, облегчении симптома или замедлении прогрессирования рака у субъекта, причем указанное АА содержит:
- а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;
- б маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем указанный ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если АА находится в

нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (CM), связанный с АВ, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и

при этом указанное AA предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом.

86. Активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения при ингибировании или уменьшении роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, для лечения рака у субъекта, причем указанное AA содержит:

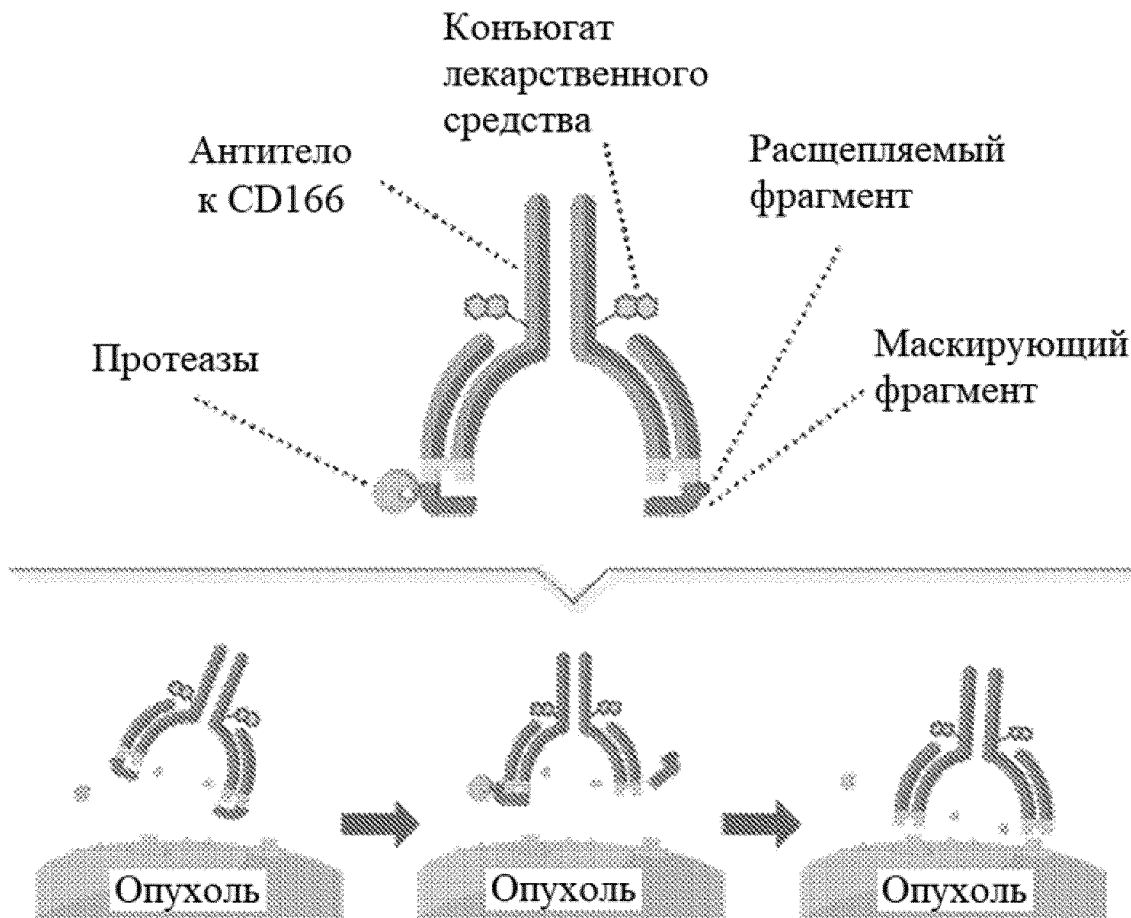
а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с CD166 млекопитающего, причем указанный AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

б маскирующий фрагмент (MM), связанный с АВ, причем указанный MM ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и

с расщепляемый фрагмент (CM), связанный с АВ, причем указанный CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и

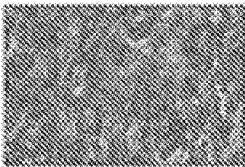
при этом указанное AA предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом.

Фиг. 1

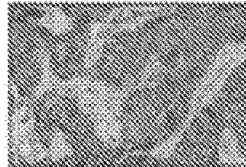


Фиг. 2

Билиарный рак  
(холангиокарцинома)



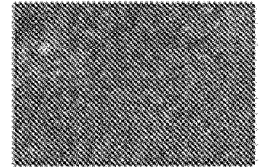
Карцинома молочной  
железы ER+/Her2-



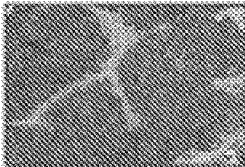
Карцинома  
эндометрия



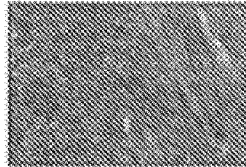
HNSCC



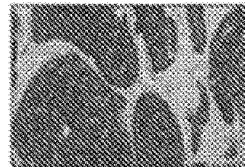
NSCLC



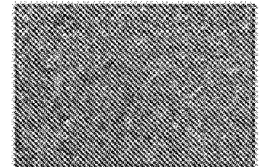
Рак яичников



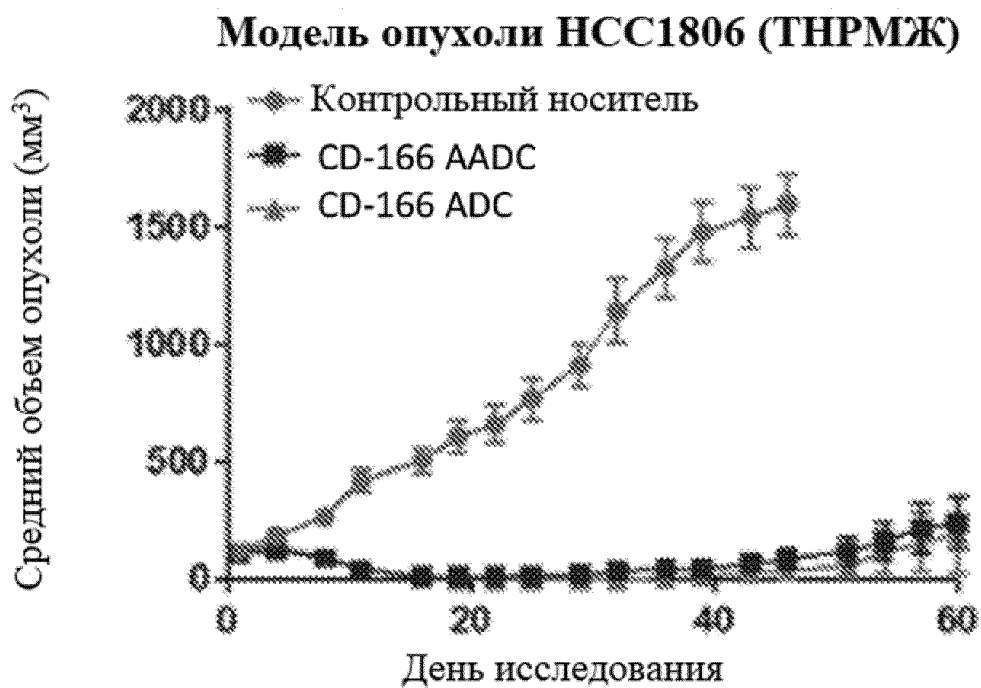
Карцинома  
предстательной  
железы



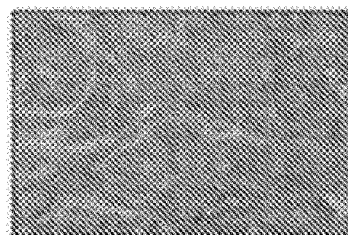
TNBC



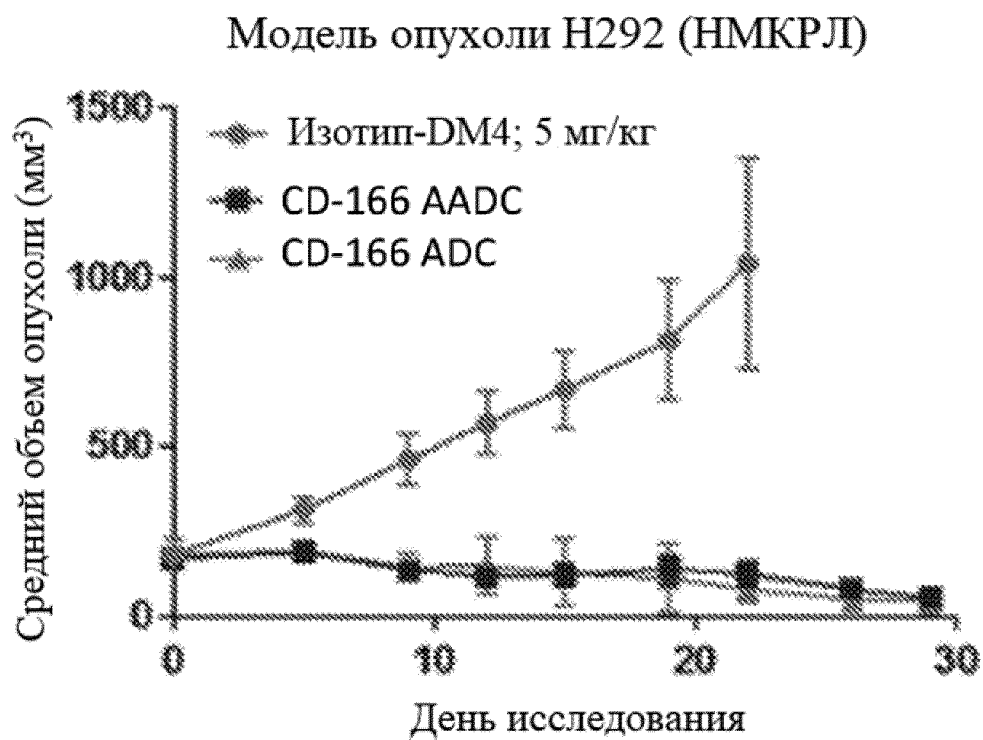
Фиг. 3



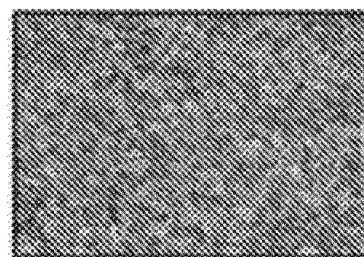
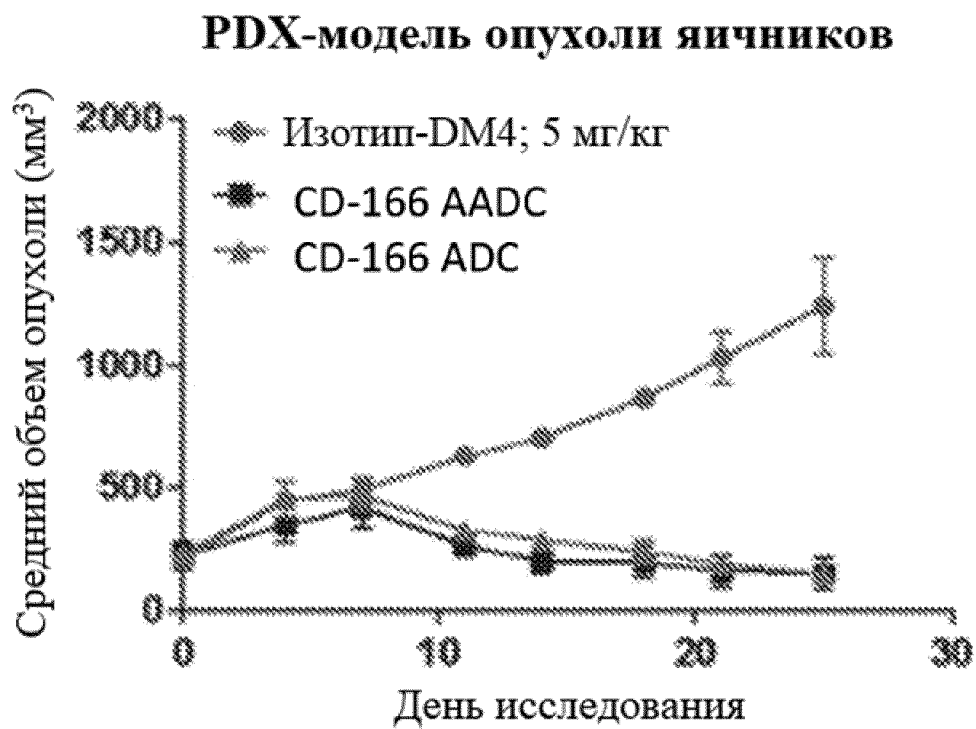
ИГХ CD166



Фиг. 4

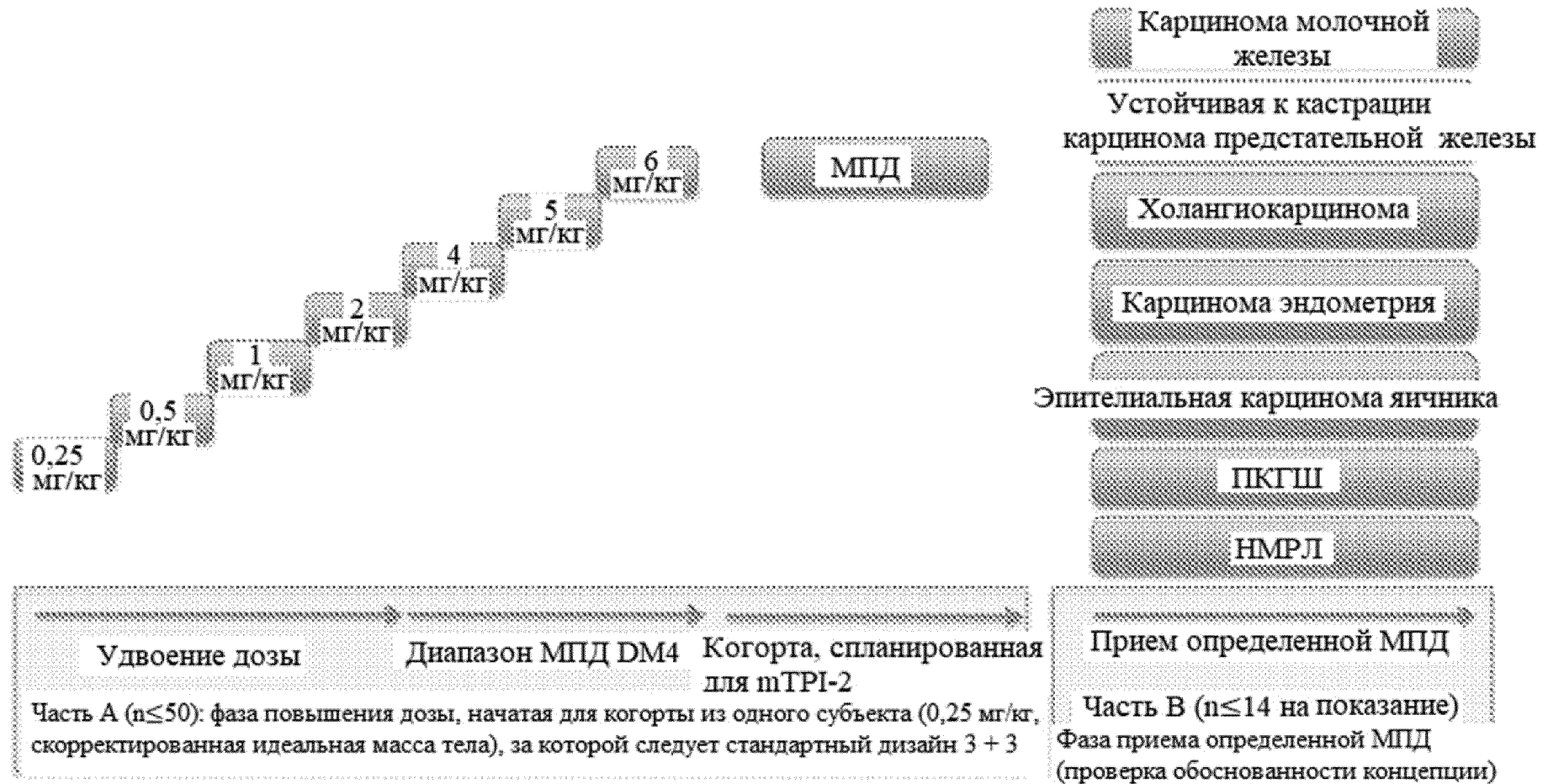


Фиг. 5





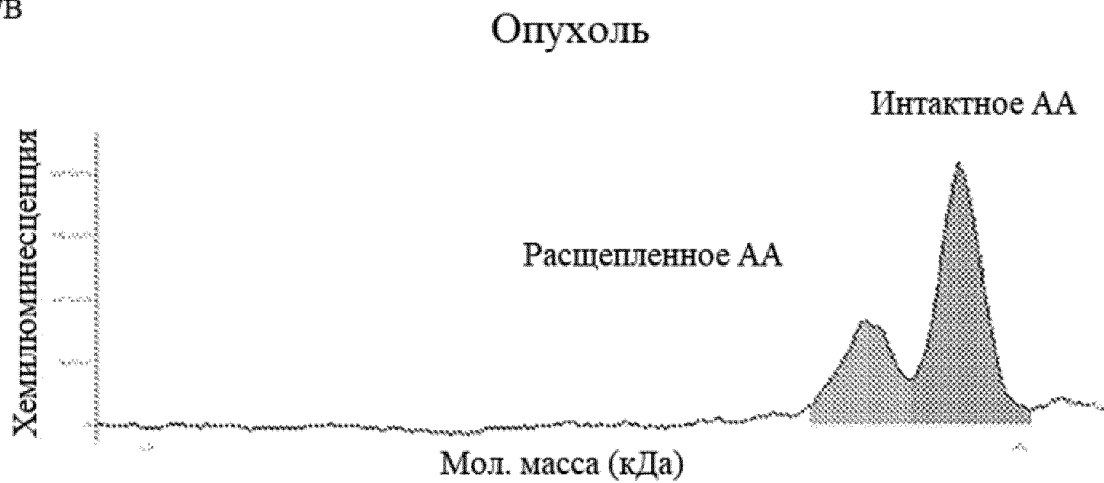
Фиг. 6



Фиг. 7А

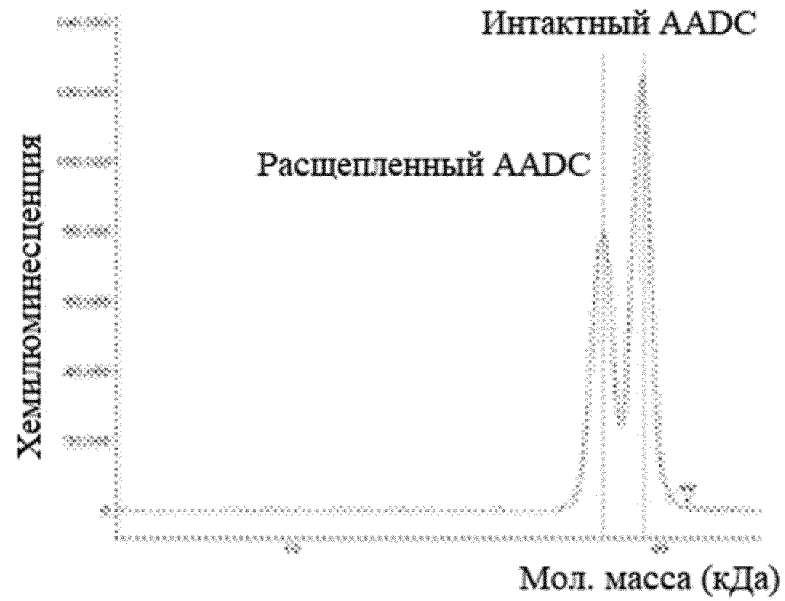


Фиг. 7В



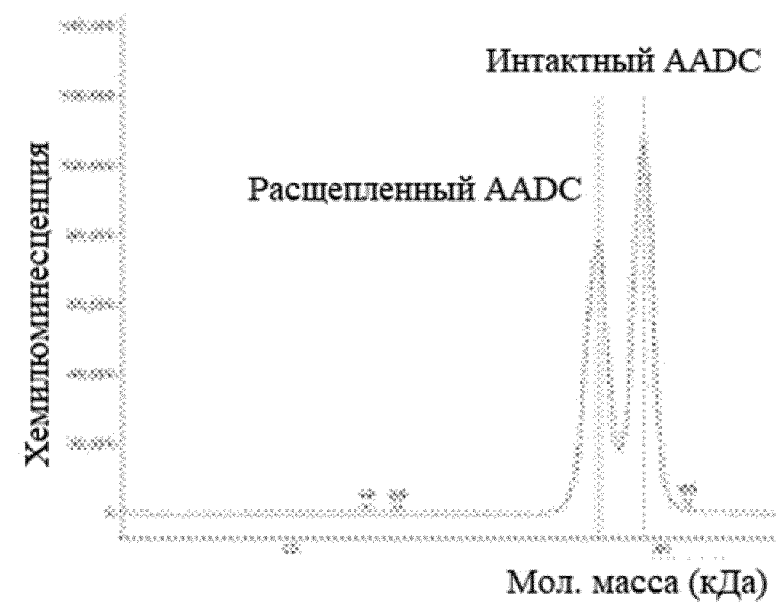
7614.6-3001-HuCD166, расщепленный MT-SP1

Фиг. 8А

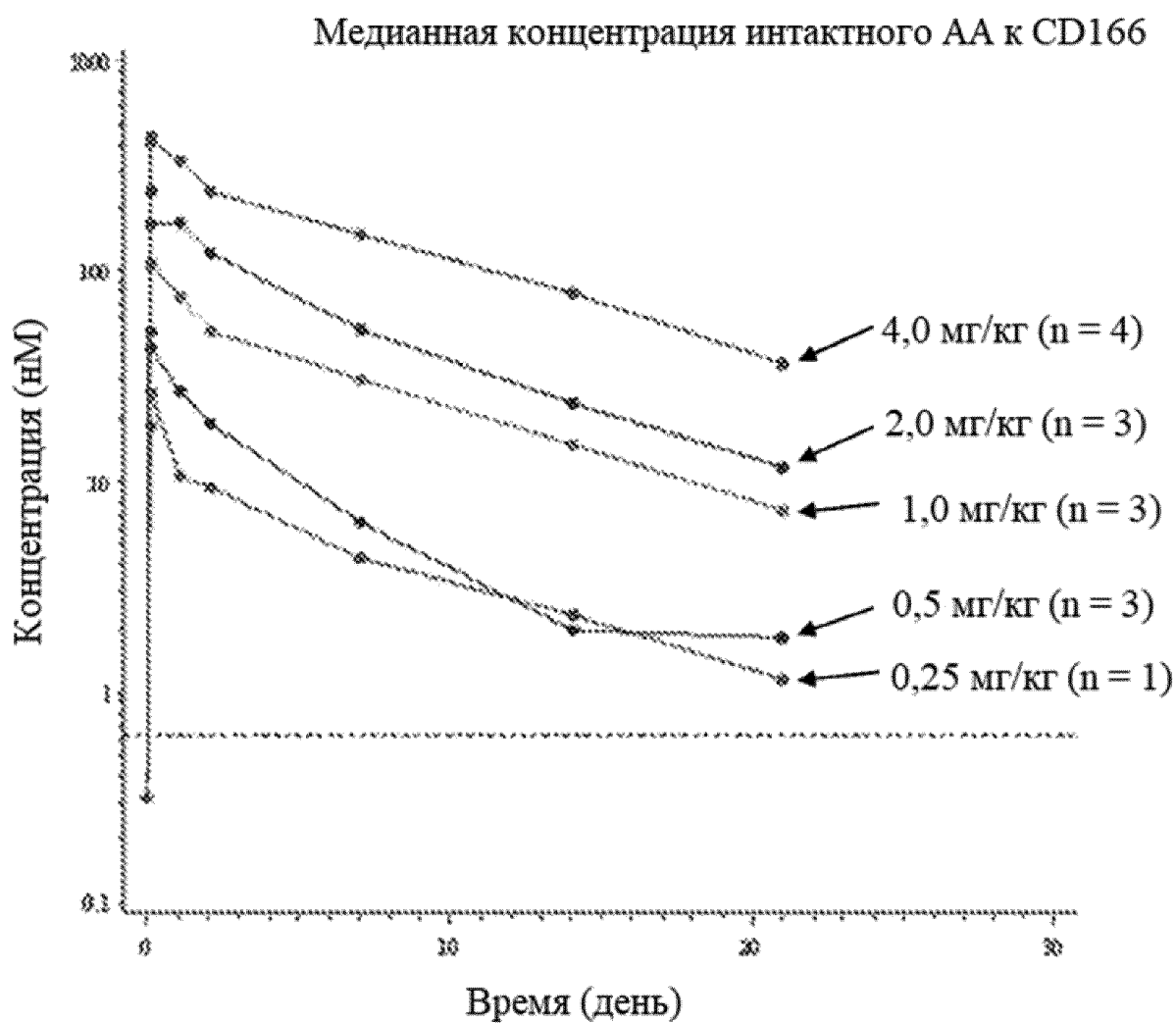


7614.6-3001-HuCD166, расщепленный ММП-14

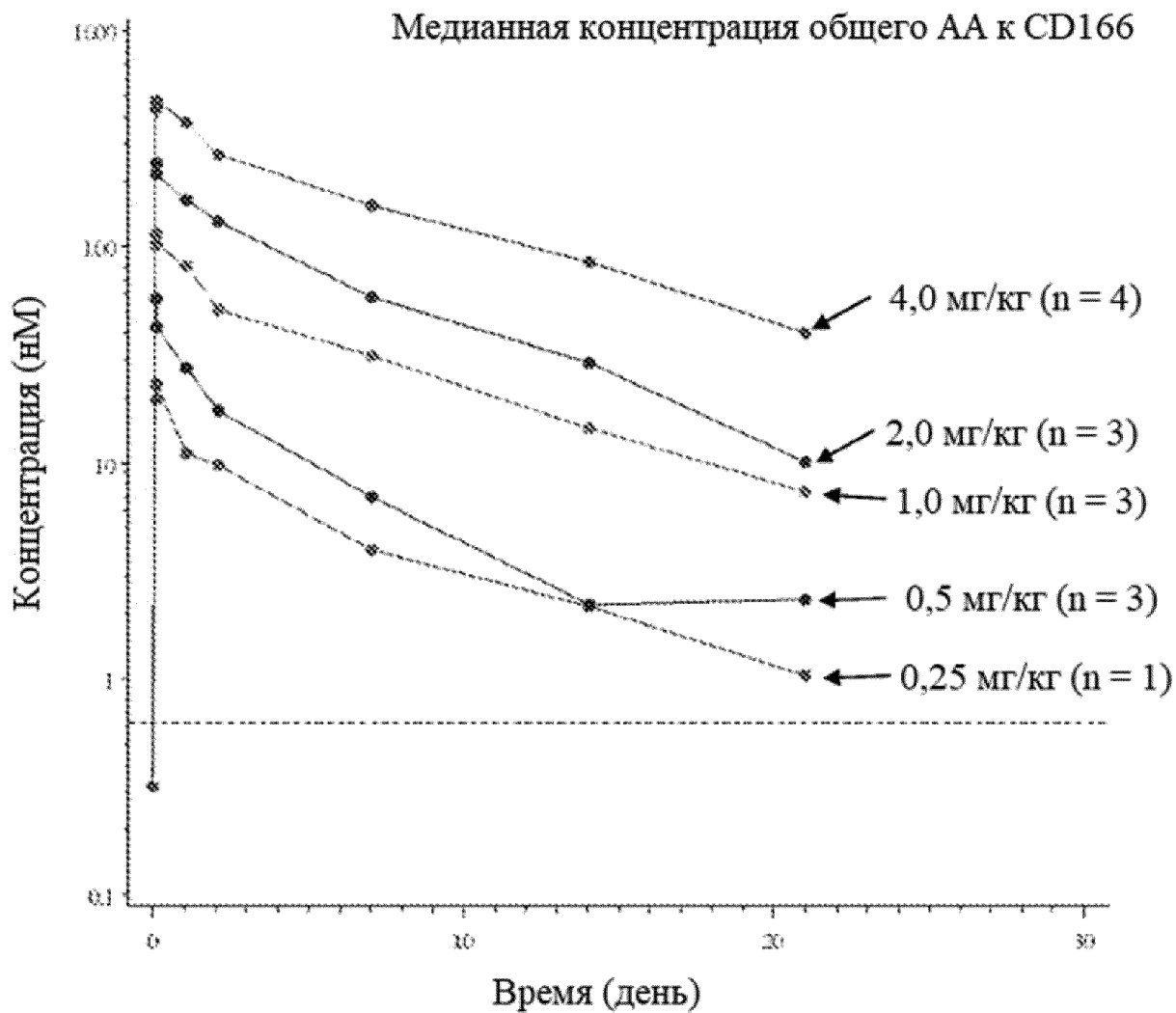
Фиг. 8В



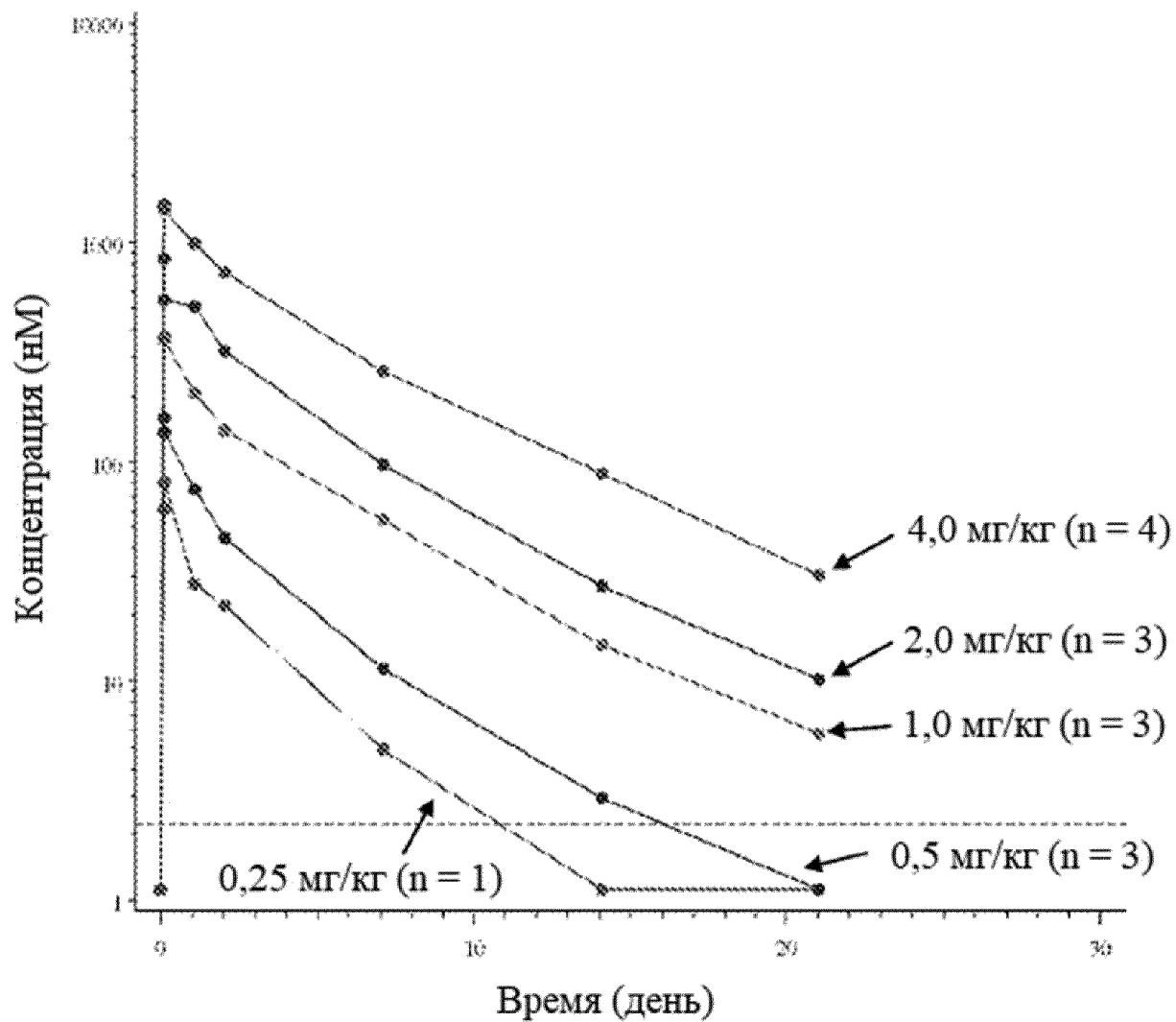
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С Медианная концентрация конъюгированного DM4



Фиг. 9D

