

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191243** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.02

(22) Дата подачи заявки
2019.11.01

(51) Int. Cl. *A61K 47/65* (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА К CD166 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/755,247; 62/788,714; 62/789,403;
62/810,173; 62/826,465

(32) 2018.11.02; 2019.01.04; 2019.01.07;
2019.02.25; 2019.03.29

(33) US

(86) PCT/US2019/059363

(87) WO 2020/092881 2020.05.07

(71) Заявитель:
ЦИТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

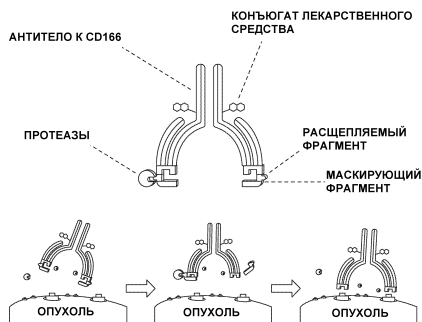
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)**

(57) В изобретении представлены активируемые антитела, которые при активации специфично связываются с CD166, и конъюгированные активируемые антитела, которые специфично связываются с CD166. Также представлены способы получения и применения этих активируемых антител при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях.



A1

202191243

202191243

A1

АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА К CD166 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Данное изобретение в целом относится к конкретным схемам дозирования для введения активируемых антител, конъюгированных с CD166, для лечения рака.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] «Перечень последовательностей», представленный в электронном виде одновременно с данным документом в соответствии со статьей 37 Кодекса Федеральных Законов США (C.F.R.) § 1.821 в машиночитаемой форме (CFR) посредством EFS-Web в виде файла с именем CYTX-059-PCT_ST25, включен в данный документ посредством ссылки. Электронная копия перечня последовательностей была создана 29 октября, 2019, размер составляет 49 килобайт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Терапия на основе антител доказала свою эффективность для лечения ряда заболеваний, включая рак. но в некоторых случаях токсичность из-за обширной экспрессии мишени ограничивает их терапевтическую эффективность. Кроме того, основанные на антителах терапевтические средства продемонстрировали другие ограничения, такие как быстрое выведение из кровотока после введения.

[0004] В области низкомолекулярной терапии были разработаны стратегии для обеспечения пролекарств активного химического вещества. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство *in vivo* метаболизируется в активное соединение. Такие стратегии в отношении пролекарств могут обеспечить повышенную селективность лекарственного средства в отношении его предполагаемой цели и уменьшить побочные эффекты.

[0005] Соответственно, в данной области существует постоянная потребность в основанных на антителах терапевтических средствах в отношении антител, имитирующих желательные характеристики низкомолекулярного пролекарства.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном аспекте изобретения в настоящем документе предлагается способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела

(AA), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом субъекту вводят AA, конъюгированное с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг, где AA содержит (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; в некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого.

[0007] В родственном аспекте изобретения в данном документе 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, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом субъекту вводят AA, конъюгированное с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг, где AA содержит (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; в некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246.

[0008] В дополнительном родственном аспекте изобретения в данном документе представлено активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения в лечении, облегчении симптомов или замедлении прогрессирования рака у субъекта, где AA включает (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которые специфически связываются с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; в некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы, карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, карциному яичников, карциному головы и шеи или рак легкого. AA предназначено для введения субъекту в терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой дозу от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг.

[0009] В еще одном родственном аспекте изобретения в данном документе предложено активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения в ингибировании или снижении роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, для лечения рака у субъекта, при этом AA содержит (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с

AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 314; в некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 246. AA предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой дозу от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг.

[0010] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичников, клетки головы или шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.

[0011] В некоторых вариантах осуществления агент, конъюгированный с AA, представляет собой майтанзиноид или его производное; например, агент, конъюгированный с AA, представляет собой DM4; в некоторых вариантах осуществления DM4 конъюгирован с AA через линкер; в некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент SPBD (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат).

[0012] В некоторых вариантах осуществления AB связано с CM, например, через связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления MM связан с CM таким образом, что AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM. В некоторых вариантах осуществления AA содержит связывающий пептид между MM и CM; например, связывающий пептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479. В некоторых вариантах осуществления AA содержит связывающий пептид между CM и AB; например, связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления AA содержит связывающий пептид между CM и AB; например, связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность GGS.

[0013] В некоторых вариантах осуществления AA содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.

[0014] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь связана со спейсером на своем N-конце; в некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305; В некоторых вариантах осуществления MM и CM связаны с легкой цепью; в некоторых вариантах осуществления MM связан с CM таким образом, что AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу на его легкой цепи: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь; в некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь связана со спейсером на своем N-конце; в некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305; В некоторых вариантах осуществления MM и CM связаны с легкой цепью; в некоторых вариантах осуществления MM связан с CM таким образом, что AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу на его легкой цепи: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь; в некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479, и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.

[0015] В некоторых вариантах осуществления субъекту по меньшей мере 18 лет; в некоторых вариантах осуществления субъект имеет оценку функционального статуса от ECOG 0-1; в некоторых вариантах осуществления субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз активного метастатического рака; в некоторых вариантах осуществления субъект имеет гистологически подтвержденный диагноз местнораспространенной неоперабельной солидной опухоли; в некоторых вариантах осуществления ожидаемая продолжительность жизни субъекта на момент введения составляет более 3 месяцев.

[0016] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет карциному молочной железы; в некоторых вариантах осуществления карцинома молочной железы является ER+; в некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал антигормональную терапию и у него наблюдалось прогрессирование заболевания; в еще одном варианте осуществления субъект имеет трижды негативный рак молочной железы и прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии; в еще одном варианте осуществления у субъекта не было в анамнезе острых или хронических заболеваний роговицы.

[0017] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, в некоторых вариантах осуществления субъект получал по меньшей мере одну предшествующую терапию.

[0018] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет холангиокарциному. В некоторых вариантах осуществления субъект потерпел неудачу по меньшей мере в одной предыдущей линии гемцитабин-содержащей схемы.

[0019] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет карциному эндометрия; в некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему для заболевания придатков матки или запущенного заболевания.

[0020] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет эпителиальную карциному яичников. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет резистентная к платине карциному; в некоторых вариантах осуществления субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичников; в некоторых вариантах осуществления субъект имеет мутацию BRCA и рефрактерен к ингибиторам PARP. В других вариантах осуществления субъект имеет отличную от BRCA мутацию.

[0021] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (МКГШ); в некоторых вариантах осуществления субъект получил более одной платиносодержащей схемы; в некоторых вариантах осуществления субъект получил более одного ингибитора PD-1/PD-L1.

[0022] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), в некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащей схему, в некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.

[0023] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет поражение кожи. В некоторых вариантах осуществления поражение кожи представляет собой кожные метастазы.

[0024] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, которое конъюгировано с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг; например, введенная доза превышает 6 мг/кг; вводимая доза составляет около 7 мг/кг; вводимая доза составляет около 8 мг/кг; вводимая доза составляет около 9 мг/кг; вводимая доза составляет около 10 мг/кг.

[0025] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, которое конъюгировано с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 7 мг/кг; например,

вводимая доза составляет от около 7 мг/кг до около 8 мг/кг; вводимая доза составляет от около 8 мг/кг до около 9 мг/кг; вводимая доза составляет от около 9 мг/кг до около 10 мг/кг; вводимая доза составляет от более чем 6 мг/кг до около 8 мг/кг; вводимая доза составляет от около 7 мг/кг до около 9 мг/кг; вводимая доза составляет от около 8 мг/кг до около 10 мг/кг.

[0026] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до около 1000 мг или в фиксированной дозе от более 240 мг до около 400 мг, или в фиксированной дозе от более 600 мг до около 1000 мг или в фиксированной дозе от более 240 мг до более 600 мг; например, вводимая фиксированная доза составляет от около 280 мг до около 700 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 320 мг до около 800 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 360 мг до около 900 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 400 мг до около 1000 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 240 мг до около 280 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 280 мг до около 320 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 320 мг до около 360 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 360 мг до около 400 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 600 мг до около 700 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 700 мг до около 800 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 800 мг до около 900 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 900 мг до около 1000 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 240 мг до около 320 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 280 мг до около 360 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 320 мг до около 400 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 600 мг до около 800 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 700 мг до около 900 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 800 мг до около 1000 мг.

[0027] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более чем 360 мг до около 600 мг; например, вводимая фиксированная доза составляет от более 360 мг до около 420 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 420 мг до около 480 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 480 мг до около 540 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 540 мг до около 600 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 360 мг до около 480 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 420 мг до около 540 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 480 мг до около 600 мг.

[0028] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более чем 480 мг до около 800 мг; например, вводимая

фиксированная доза составляет от более 480 мг до примерно 560 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 560 мг до около 640 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 640 мг до около 720 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 720 мг до около 800 мг; вводимая фиксированная доза составляет от более 480 мг до около 560 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 560 мг до около 720 мг; вводимая фиксированная доза составляет от около 640 мг до около 800 мг.

[0029] В некоторых вариантах осуществления субъекту внутривенно вводят АА, конъюгированное с агентом; в некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 21 день; в некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 14 дней.

[0030] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на фактической массе тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозировке, основанной на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

[0031] В некоторых вариантах осуществления субъект получает один или более профилактических курсов лечения для уменьшения или предотвращения нежелательных явлений со стороны глаз; в некоторых вариантах осуществления одну или более профилактических процедур назначают ежедневно; в некоторых вариантах осуществления профилактическое лечение представляет собой одну или более процедур, выбранных из группы, состоящей из: смазывания искусственных слез, офтальмологического раствора бримонидина тартрата, наложения холодного компресса для глаз и капель топического стероида.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0032] На **Фиг. 1** показан конъюгат лекарственное средство – активируемое антитело к CD166, который предпочтительно активируется в микроокружении опухоли, где присутствуют опухолеспецифические протеазы.

[0033] На **Фиг. 2** показана экспрессия CD166 в образцах опухолей человека с помощью иммуногистохимии (ИГХ).

[0034] На **Фиг. 3** показана противоопухолевая активность конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 и конъюгата лекарственное средство - антител к CD166 на мышинной модели опухоли TNBC. Также показана экспрессия CD166 с помощью иммуногистохимии (ИГХ). (AADC = конъюгат лекарственное средство –

активируемое антитело к CD166; ADC = конъюгат лекарственное средство – антитело к CD166)

[0035] На Фиг. 4 показана противоопухолевая активность конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 и конъюгата лекарственное средство – антитело к CD166 на мышинной опухолевой модели немелкоклеточного рака легкого. Также показана экспрессия CD166 с помощью ИГХ.

[0036] На Фиг. 5 показана противоопухолевая активность конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 и конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 в мышинной модели ксенотрансплантата (PDX), полученной от пациента, для рака яичников. Также показана экспрессия CD166 с помощью ИГХ.

[0037] На Фиг. 6 показан дизайн клинических исследований частей А и В для конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166.

[0038] На Фиг. 7А-7В показана преимущественная активация активируемого антитела к CD166 в опухолях.

[0039] На Фиг. 8А-8В показано разделение интактной и активированной форм конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166, частично активируемого матриптазой (MT-SP1) или MMP14.

[0040] На Фиг. 9А-9F показаны иллюстративные фармакокинетические данные уровней различных аналитов в сыворотке крови с течением времени после введения субъектам-людям конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166.

[0041] На Фиг. 10А-10D показаны иллюстративные результаты наилучших изменений в измерениях поражения опухоли от исходного уровня у людей после введения конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 по настоящему изобретению.

[0042] На Фиг. 11А-11С показаны иллюстративные результаты наилучших изменений в измерениях поражения опухоли от исходного уровня у субъектов-людей с раком молочной железы после введения конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 по настоящему изобретению.

[0043] На Фиг. 12А и 12В показаны иллюстративные результаты наилучших изменений в измерениях поражения опухоли от исходного уровня у людей после введения конъюгата лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 по настоящему изобретению, классифицированные по уровню экспрессии CD166 в опухолях пациентов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0044] Настоящее изобретение обеспечивает активируемые моноклональные антитела, которые специфически связывают CD166, также известные как активированная молекула лейкоцитарной клеточной адгезии (ALCAM). В некоторых вариантах осуществления активируемые моноклональные антитела интернализуются CD166-содержащими клетками. CD166 представляет собой молекулу клеточной адгезии, которая связывает CD6, рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству белков богатых цистеином рецепторов-мусорщиков (SRCR) (SRCRSF). CD166, как известно, связан с межклеточными взаимодействиями и межклеточным матриксом, клеточной адгезией, миграцией клеток, а также активацией и пролиферацией Т-клеток. Аберрантная экспрессия и/или активность CD166 и связанного с CD166 сигналинга вовлечены 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 легкого, такой как НМРЛ и/или МРЛ, рак ротоглотки, рак шейки матки и рак головы и шеи, такой как МКГШ.

[0045] В изобретении предложены активируемые антитела к CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, связанного с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 используются в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

[0046] В изобретении предложены активируемые антитела к CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 используются в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

[0047] В изобретении предложены активируемые антитела к CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, связанного с

аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела к CD166 используются в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

[0048] Активируемые антитела к CD166 содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает CD166, связанный с маскирующим фрагментом (ММ) таким образом, что связывание ММ снижает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166. ММ связывается с антителом/антигенсвязывающим фрагментом через последовательность, которая включает субстрат для протеазы (расщепляемый фрагмент, СМ), например протеазу, которая локализована совместно с CD166 в подвергаемой лечению области у субъекта.

Определения

[0049] Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящей заявкой, имеют значения, которые традиционно подразумеваются обычными специалистами в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Выражения в единственном числе объекта относятся к одному или более объектам. Например, соединение относится к одному или более соединениям. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Как правило, номенклатуры, используемые в связи с методиками и методами культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, а также химии белков и олиго- или полинуклеотидов, и гибридизации, описанных в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Стандартные способы применяются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и тканевой культуры и трансформации (*например*, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения осуществляются в соответствии с указаниями производителя или как обычно используется в данной области, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры обычно осуществляются в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более

конкретных справочных материалах, которые указаны и обсуждены в данном описании. См. например, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатура, применяемая в связи с этим, а также лабораторные процедуры и техники аналитической, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, лекарственного средства, композиции и доставки, а также для лечения субъектов используются стандартные способы.

[0050] Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:

[0051] Используемый в данном документе термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным, например, антигенсвязывающим, частям молекул иммуноглобулина (Ig), то есть молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается (иммунореактивно реагируют с) антигеном. Фразы «специфически связывает», или «иммунореактивно реагируют с», или «иммуноспецифически связывает» означают, что антитело реагирует с одной или более антигенными детерминантами желаемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с ними с гораздо более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, химерные, доменные антитела, одноцепочечные фрагменты Fab и F(ab')₂, scFv и библиотеку экспрессии Fab.

[0052] Известно, что основная структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. В общем, молекулы антител, полученные от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга по природе тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы, такие как IgG₁, IgG₂, и другие. Кроме того, у людей легкая цепь может быть каппа-цепью или лямбда-цепью.

[0053] Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» (мкАт) или «композиция моноклонального антитела» относится к популяции молекул антитела, которые содержат только один вид молекулы антитела, состоящей из уникального генного

продукта легкой цепи и уникального генного продукта тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела идентичны во всех молекулах популяции. мкАт содержат антигенсвязывающий сайт, способный иммунореактивно реагировать с конкретным эпитопом антигена, характеризующимся уникальной аффинностью связывания с ним.

[0054] Термин «антигенсвязывающий сайт» или «связывающая часть» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых переменных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно различающихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемые «гиперпеременными областями», расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как «каркасные области» или «FR». Таким образом, термин «FR» относится к аминокислотным последовательностям, которые встречаются в природе между и вблизи гиперпеременных областей в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гиперпеременные области легкой цепи и три гиперпеременные области тяжелой цепи расположены относительно друг - друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, а три гиперпеременные области каждой из тяжелой и легкой цепи называются «определяющими комплементарность областями», или «CDR». Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

[0055] Используемый в данном документе термин «эпитоп» включает любую детерминанту белка, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином, scFv или Т-клеточным рецептором. Термин «эпитоп» включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Например, антитела могут вырабатываться против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, если константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; в некоторых вариантах осуществления, ≤ 100 нМ, а в некоторых вариантах осуществления, ≤ 10 нМ.

[0056] Используемые в данном документе термины «специфическое связывание», «иммунологическое связывание» и «свойства иммунологического связывания» относятся к нековалентным взаимодействиям того типа, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин специфичен. Сила или аффинность взаимодействий иммунологического связывания может быть выражена в терминах константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньший K_d представляет большую аффинность. Иммунологические свойства связывания выбранных полипептидов можно количественно оценить с использованием методов, 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 компонентов комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые одинаково влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как «константу скорости ассоциации» (K_{on}), так и «константу скорости диссоциации» (K_{off}) можно определить путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off} / K_{on} позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и оно равно константе диссоциации K_d . (См, как правило, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Считается, что антитело по настоящему изобретению специфически связывается с мишенью, когда константа связывания (K_d) составляет ≤ 1 , μ в некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ, в некоторых вариантах осуществления, ≤ 10 нМ и, в некоторых вариантах осуществления, от ≤ 100 пМ до около 1 пМ, поскольку измеряется с помощью анализов, таких как анализы связывания радиолиганда или аналогичных анализов, известных специалистам в данной области техники.

[0057] Термин «выделенный полинуклеотид», используемый в данном документе, будет означать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, который в силу своего происхождения (1) не связан со всем или с частью полинуклеотида, в котором «выделенный полинуклеотид» встречается в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в виде части более крупной последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с описанием включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, приведенные в данном документе, и молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы легкой цепи иммуноглобулина, приведенные в данном документе.

[0058] Термин «выделенный белок», упоминаемый в данном документе, означает белок кДНК, рекомбинантной РНК или белок синтетического происхождения, или некоторую

их комбинацию, который в силу своего происхождения или источника происхождения (1) не связан с белками, встречающимися в природе, (2) не содержит других белков из того же источника, например, не содержит белков мышцы, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе.

[0059] Используемый в данном документе термин «полипептид» как общий термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов последовательности полипептида. Следовательно, фрагменты нативных белков и аналоги являются видами полипептидов. Полипептиды в соответствии с изобретением включают молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, приведенные в данном документе, и молекулы иммуноглобулинов легкой цепи, приведенные в данном документе, а также молекулы антител, образованные комбинациями, содержащими молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина с молекулами легкой цепи иммуноглобулина, такими как молекулы каппа-легкой цепи иммуноглобулина и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

[0060] Термин «встречающийся в природе» применительно к объекту в данном документе относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории или наоборот, является встречающейся в природе.

[0061] Термин «функционально связанный», используемый в данном документе означает, что описанные компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование ожидаемым для них путем. Контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

[0062] Термин «регулирующие экспрессию последовательности», как описано в данном документе, включает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и обработку кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких регуляторных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина: у прокариот такие регуляторные последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции, у эукариот, как правило, такие регуляторные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин «регулирующие последовательности» предназначен для включения как минимум всех компонентов, присутствие которых является существенным

для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых является преимущественным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния. Термин «полинуклеотид», упоминаемый в данном документе, означает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, или рибонуклеотиды, или дезоксинуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

[0063] Термин олигонуклеотид, упоминаемый в данном документе, включает встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные вместе встречающимися в природе и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, как правило, имеющую в длину 200 оснований или меньше. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований, а в некоторых вариантах осуществления – от 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований в длину. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для использования при конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды по изобретению представляют собой или смысловые, или антисмысловые олигонуклеотиды.

[0064] Термин «встречающиеся в природе нуклеотиды», упоминаемый в данном документе, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин «модифицированные нуклеотиды», упоминаемый в данном документе, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и тому подобное. Термин «олигонуклеотидные связи», упоминаемый в данном документе, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротриат, фосфородитриат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотриат, фосфоранилат, фосфоронмидат 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 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990).* При необходимости олигонуклеотид может включать метку для детекции.

[0065] Используемые в данном документе двадцать стандартных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют общепринятому использованию. *См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*

(1991)). Стереизомеры (*например*, D-аминокислоты) 20 обычных аминокислот, аминокислоты неприродного происхождения, такие как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота и другие нетипичные аминокислоты также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нетипичных аминокислот включают следующие: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (*например*, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, применяемом в данном документе, левостороннее направление представляет собой аминоконцевое направление, а правостороннее направление представляет собой карбоксильное концевое направление, в соответствии со стандартным применением и условиями.

[0066] Аналогичным образом, если не указано иное, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей является 5' концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5' направлением. Направление 5'–3' добавления растущих транскриптов РНК называется направлением транскрипции; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК, которые расположены 5' относительно 5' конца РНК-транскрипта, называются «вышележащими последовательностями»; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК-транскрипт, которые расположены 3' относительно 3' конца РНК-транскрипта, называются «нижележащими последовательностями».

[0067] Применительно к полипептидам термин «существенная идентичность» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с использованием стандартных штрафов за открытие гэпа, имеют по меньшей мере 80 процентов идентичности последовательностей, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 90 процентов идентичности последовательностей, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 95% идентичности последовательностей, и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

[0068] В некоторых вариантах осуществления неидентичные положения остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами.

[0069] Как обсуждается в данном документе, незначительные изменения в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулинов рассматриваются как изменения, входящие в настоящего изобретения, при условии, что

изменения в аминокислотной последовательности составляют по меньшей мере 75%, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 80%, 90%, 95% и, в некоторых вариантах осуществления, 99%. В частности, предложены консервативные замены аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, связанных в их боковых цепях. Генетически кодируемые аминокислоты, как правило, делятся на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой 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, принадлежащие к семейству алифатических гидроксилсодержащих аминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, принадлежащие семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, принадлежащие семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, принадлежащие семейству ароматических аминокислот. Например, разумно ожидать, что выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет иметь значительный эффект на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном сайте. Можно легко определить, приводит ли изменение аминокислоты к функциональному пептиду, анализируя удельную активность производного полипептида. Анализы подробно описаны в данном описании. Специалисты в данной области техники могут легко получить фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулинов. Подходящие амино- и карбоксиконцы фрагментов или аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или проприетарными базами данных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления компьютеризированные методы сравнения используются для идентификации мотивов последовательности или доменов предсказанной конформации белка, которые встречаются в других белках известной структуры и/или функции. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые складываются

в известную трехмерную структуру. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут распознавать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с изобретением.

[0070] Подходящими аминокислотными заменами являются такие, которые (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины с последовательностью, отличной от природной пептидной последовательности. Например, одиночные или множественные аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены) могут быть произведены в природной последовательности (например, в части полипептида вне домена(-ов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденцию к разрыву спирали, которая встречается в исходной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры признанных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в «Proteins, Structures and Molecular Principles»(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

[0071] Используемый в данном документе термин «полипептидный фрагмент» относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию и/или одну или более внутренних делеций, но где оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в естественной последовательности, полученной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Фрагменты, как правило, имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 14 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 20 аминокислот, как правило, длину по меньшей мере 50 аминокислот, а, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 70 аминокислот. Используемый в данном документе термин «аналог» относится к полипептидам, которые состоят из сегмента по меньшей мере из 25 аминокислот, который в значительной степени идентичен

части выведенной аминокислотной последовательности и имеет специфическое связывание с мишенью в подходящих условиях связывания. Как правило, аналоги полипептидов содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление, или удаление) по отношению к природной последовательности. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 50 аминокислот или больше, и часто могут иметь длину полноразмерного природного полипептида.

[0072] Используемый в данном документе термин «агент» для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

[0073] Применяемые в данном документе термины «метка» или «меченный» относятся к введению детектируемого маркера, например, путем введения меченной радиоизотопами аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью помеченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или имеющего ферментативную активность, которая может быть обнаружена посредством оптических или колориметрических способов). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области техники и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I); флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры); ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, р-галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, метки эпитопов). В некоторых вариантах осуществления метки присоединены с помощью спейсерных групп различной длины для уменьшения потенциальных стерических затруднений. Используемый в данном документе термин «фармацевтический агент или лекарственное средство» относится к химическому соединению или композиции, способным вызывать желаемый терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

[0074] Другие химические термины в данном документе используются в соответствии с общепринятым употреблением в данной области техники, как показано в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[0075] Используемый в данном документе термин «по существу чистый» означает, что вид объекта является преобладающим присутствующим видом (т.е. на молярной основе он более распространен, чем любой другой отдельный вид в композиции), и в некоторых вариантах осуществления существенно очищенная фракция представляет собой композицию, в которой виды объекта составляют по меньшей мере около 50 процентов (на молярной основе) всех присутствующих макромолекулярных частиц.

[0076] Как правило, по существу чистая композиция будет включать более около 80 процентов всех видов макромолекул, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления более около 85%, 90%, 95% и 99%. В некоторых вариантах осуществления вид объекта очищают до существенной гомогенности (загрязняющие вещества не могут быть обнаружены в композиции стандартными методами обнаружения), при этом композиция состоит по существу из одного вида макромолекул.

[0077] Термин «субъект» включает субъектов-людей и ветеринарных субъектов.

Активируемые антитела (AA)

[0078] В изобретении предложены AA, которые содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD166 млекопитающих, (AB).

[0079] В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающего выбран из группы, состоящей из CD166 человека и CD166 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления AB специфически связывается с CD166 человека или CD166 яванского макака с константой диссоциации менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающих представляет собой CD166 человека. В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающих представляет собой CD166 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления AB имеет одну или более из следующих характеристик: (a) AB специфически связывается с CD166 человека; и (b) AB специфически связывается с CD166 человека и CD166 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления AB имеет одну или более из следующих характеристик: (a) AB специфически связывает CD166 человека и CD166 яванского макака; (b) AB ингибирует связывание CD6 млекопитающего с CD166 млекопитающего; (c) AB ингибирует связывание CD6 человека с CD166 человека; и (d) AB ингибирует связывание CD6 яванского макака с CD166 яванского макака.

[0080] В некоторых вариантах осуществления AB блокирует способность природного лиганда или рецептора связываться с CD166 млекопитающего с EC50 меньше или равной 5 нМ, меньше или равной 10 нМ, меньше или равной 50 нМ, меньше или равной 100 нМ,

меньше или равной 500 нМ и/или меньше или равной 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность CD6 млекопитающего связываться с CD166 млекопитающего с EC50 меньше или равной 5 нМ, меньше или равной 10 нМ, меньше или равной 50 нМ, меньше или равной 100 нМ, меньше или равной 500 нМ и/или меньше или равной 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд или рецептор CD166 представляет собой CD6.

[0081] В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда связываться с CD166 млекопитающего с EC50 от 5 до 1000 нМ, от 5 до 500 нМ, от 5 до 100 нМ, от 5 до 50 нМ, от 5 до 10 нМ, от 10 до 1000 нМ, от 10 до 500 нМ, от 10 до 100 нМ, от 10 до 50 нМ, от 50 до 1000 нМ, от 50 до 500 нМ, от 50 до 100 нМ, от 100 до 1000 нМ, от 100 до 500 нМ, от 150 до 400 нМ, от 200 до 300 нМ, от 500 до 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность CD6 млекопитающего связываться с CD166 млекопитающего с EC50 от 5 до 1000 нМ, от 5 до 500 нМ, от 5 до 100 нМ, от 5 до 50 нМ, от 5 до 10 нМ, от 10 до 1000 нМ, от 10 до 500 нМ, от 10 до 100 нМ, от 10 до 50 нМ, от 15 до 75 нМ, от 30 до 80 нМ, от 40 до 150 нМ, от 50 до 1000 нМ, от 50 до 500 нМ, от 50 до 100 нМ, от 100 до 1000 нМ, от 100 до 500 нМ, от 150 до 400 нМ, от 200 до 300 нМ, от 500 до 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд или рецептор CD166 представляет собой CD6.

[0082] В некоторых вариантах осуществления АВ согласно настоящему изобретению ингибирует или снижает рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающих. Без намерения быть связанными какой-либо теорией, АВ по настоящему изобретению может ингибировать или уменьшать рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающих, путем специфического связывания с CD166 и ингибирования, блокирования и/или предотвращения связывания природного лиганда или рецептора CD166 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд или рецептор CD166 млекопитающего представляет собой CD6 млекопитающего.

[0083] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент АА связан с маскирующим фрагментом (ММ) таким образом, что связывание ММ снижает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления ММ соединяется через последовательность, которая включает субстрат для протеазы, например, протеазу, которая активна в пораженной ткани, и/или протеазу, которая локализована совместно с CD166 в подвергаемой лечению области у субъекта. Активируемые антитела к CD166, предложенные в данном документе, также называемые в данном документе взаимозаменяемо как АА к CD166 или активируемые антитела к

CD166, стабильны в кровотоке, активируются в намеченных областях терапии и/или диагностики, но не в нормальной, например, здоровой ткани или другой ткани, не являющейся мишенью для лечения и/или диагностики, и при активации проявляет связывание с CD166, которое по меньшей мере сравнимо с соответствующим немодифицированным антителом, также называемым в данном документе исходным антителом.

[0084] В изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые специфически связывают CD166 млекопитающих, для применения в АА. В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает CD166, представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечный фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело с тяжелыми цепями или однодоменное антитело с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает CD166, представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[0085] Соответственно, в данном документе представлены активируемые антитела (AA), содержащие: (1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающих, маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающих, когда AA находится в нерасщепляемом состоянии и расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы.

[0086] Антитела в АА по изобретению (AB) специфически связывают мишень CD166, такую как, например, CD166 млекопитающего и/или CD166 человека.

[0087] В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 100 нМ или менее в отношении связывания с CD166 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 10 нМ или менее в отношении связывания с CD166 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 5 нМ или менее в отношении связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 1 нМ или менее в отношении связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 0,5 нМ или менее в отношении связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около

0,1 нМ или менее в отношении связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления АВ имеет константу диссоциации от 0,01 до 100 нМ, от 0,01 до 10 нМ, от 0,01 до 5 нМ, от 0,01 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 до 1 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,05 до 0,1 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 до 10 нМ, 0,1 до 5 нМ, от 0,1 до 1 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 до 10 нМ, от 0,5 до 5 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 1 до 100 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 5 нМ, от 5 до 100 нМ, от 5 до 10 нМ или от 10 до 100 нМ, в отношении связывания с CD166 млекопитающих.

[0088] В некоторых вариантах осуществления АА в нерасщепленном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации меньше или равной 1 нМ, меньше или равной 5 нМ, меньше или равной 10 нМ, меньше или равной до 15 нМ, меньше или равной 20 нМ, меньше или равной 25 нМ, меньше или равной 50 нМ, меньше или равной 100 нМ, меньше или равной 150 нМ, меньше или равной 250 нМ, меньше или равной 500 нМ, меньше или равной 750 нМ, меньше или равной 1000 нМ и 122, и/или меньше или равной 2000 нМ.

[0089] В некоторых вариантах осуществления АА в нерасщепленном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации, большей или равной 1 нМ, большей или равной 5 нМ, большей или равной 10 нМ, большей или равной 15 нМ, большей или равной 20 нМ, большей или равной 25 нМ, большей или равной 50 нМ, большей или равной 100 нМ, большей или равной 150 нМ, большей или равной 250 нМ, большей или равной 500 нМ, большей или равной 750 нМ, большей или равной 1000 нМ, и 122, и/или большей или равной 2000 нМ.

[0090] В некоторых вариантах АА в нерасщепленном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 1 нМ до 2000 нМ, 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.

[0091] В некоторых вариантах АА в активированном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации меньше или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

[0092] В некоторых вариантах АА в активированном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации больше или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

[0093] В некоторых вариантах осуществления АА в активированном состоянии специфически связывается с CD166 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 0,01 нМ до 100 нМ, 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.

[0094] Примеры активируемых антител к CD166 по изобретению включают, например, активируемые антитела (АА), которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, которые содержат, являются или получены из переменных аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей, которые показаны ниже:

Тяжелая цепь α CD166 человека

HuCD166_HcC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
HYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLITNVPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 239)

Тяжелая цепь α CD166 человека

HuCD166_HcC Des-HC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
HYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLITNVDVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGGQTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 480)

домен VL легкой цепи α CD166 человека

HuCD166_Lc1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитела больше, чем у соответствующего АА; например, рК антитела длиннее, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке АА аналогичен периоду полужизни соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 15 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 12 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 11 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 10 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 9 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 8 дней

при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 7 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 6 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 5 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 4 дня при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 3 дня при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 2 дня при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 24 часа при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 20 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 18 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 16 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 14 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 12 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 10 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 8 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 6 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 4 часа при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни АА в сыворотке составляет по меньшей мере 3 часа при введении в организм.

Иллюстративные активируемые антитела

[0096] В иллюстративных вариантах осуществления АА по изобретению содержат любую одну или более из следующих последовательностей:

SEQ ID NO: 239

Тяжелая цепь α CD166 человека (HuCD166_HcC)– Аминокислотная последовательность
(указана выше)

SEQ ID NO: 480

Тяжелая цепь α CD166 человека (HuCD166_HcC)–Des-HC - Аминокислотная последовательность
(указана выше)

SEQ ID NO: 240

домен VL легкой цепи α CD166 человека

HuCD166_Lcl

(указана выше)

SEQ ID NO: 246 аминокислотная последовательность легкой цепи α CD166 человека (спейсер-MM-LP1-CM-LP2-Ab)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lcl_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 314)]
[QGQSGQG]

[LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLP
VTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGS
GTDFTLK

ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYF

REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC]

SEQ ID NO: 314 Аминокислотная последовательность

Легкая цепь α CD166 человека (MM-LP1-CM-LP2-Ab)

huCD166Lcl_7614.6_3001

LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLP
VTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGS
GTDFTLK

ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYF

REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO: 305 Аминокислотная последовательность

Спейсер

QGQSGQG

SEQ ID NO: 222

Маскирующий фрагмент 7614.6

LCHPAVLSAWESCSS

SEQ ID NO: 76

Расщепляемый фрагмент 3001

AVGLLAPPGGLSGRSDNH

SEQ ID NO: 479

Связывающий пептид 1 (LP1)

GGGSSGGS

Связывающий пептид 2 (LP2)

GGS

[0097] В иллюстративных вариантах осуществления АА содержит: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, где ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, и где СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

[0098] В иллюстративных вариантах осуществления АА содержит: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD166

млекопитающего, где АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и конъюгирован с DM4 через линкер SPDB (этот иллюстративный конъюгированный АА в данном документе упоминается как «спейсер-7614.6-3001-НсCD166-SPDB-DM4»), также называемый «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.

[0099] В другом иллюстративном варианте осуществления АА содержит: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где АВ 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 через линкер SPDB, этот пример конъюгированного АА в данном документе упоминается как «7614.6-3001-НсCD166-SPDB-DM4», также называемый «комбинация 60»).

Маскирующие фрагменты (ММ)

[00100] Активируемые антитела к CD166, описанные в данном документе, преодолевают ограничение терапевтических средств на основе антител, особенно терапевтических средств на основе антител, которые, как известно, являются токсичными, по меньшей мере, до некоторой степени *in vivo*. Опосредованная мишенью токсичность представляет собой главное ограничение для разработки терапевтических антител. Активируемые антитела к CD166, представленные в данном документе, предназначены для устранения токсичности, связанной с ингибированием мишени в нормальных тканях традиционными терапевтическими антителами. 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 по изобретению были сконструированы путем связывания антитела с ингибирующей маской (маскирующий фрагмент, ММ) через линкер, который включает субстрат протеазы (СМ).

[00101] Соответственно, активируемые антитела к CD166, представленные в данном документе, включают маскирующий фрагмент (ММ). В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой аминокислотную последовательность, которая связана или иным образом присоединена к антителу к CD166 и расположена внутри активируемой конструкции антитела к CD166 таким образом, что ММ снижает способность антитела к CD166 специфически связываться с CD166. Подходящие

маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием способов, описанных в публикации PCT № WO 2009/025846 Daugherty et al., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00102] В некоторых вариантах осуществления в присутствии CD166 ММ снижает способность АВ связывать CD166 по меньшей мере на 90%, когда СМ не расщеплен, по сравнению с тем, когда СМ расщепляется при анализе *in vitro* с использованием анализа замещения мишени, такого как, например, анализ, описанный в публикации PCT WO 2010/081173, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00103] В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной от 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной до около 40 аминокислот.

[00104] В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от CD166. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от CD166 и не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ.

[00105] В одном иллюстративном варианте осуществления АА, предложенные в данном документе, содержат ММ, аминокислотная последовательность которого представлена:

Маскирующий фрагмент 7614.6

LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)

[00106] Когда АВ модифицируется с помощью ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, которое не модифицировано ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью.

[00107] K_d АВ, модифицированного ММ, по отношению к мишени в по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 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, 100000-1000000, или в 100000-10000000 раз больше, чем K_d АВ, которое не модифицировано с

помощью ММ, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ, с мишенью в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, 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 в 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, которое не модифицировано ММ, или исходного АВ по отношению к мишени.

[00108] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению CD166 по меньшей мере в два раза больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[00109] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению CD166 по меньшей мере в пять раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0102] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к CD166 по меньшей мере в 10 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0103] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к CD166 по меньшей мере в 20 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0104] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к CD166 по меньшей мере в 40 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0105] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к CD166 по меньшей мере в 100 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0106] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по

отношению к CD166 по меньшей мере в 1000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0107] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к CD166 по меньшей мере в 10 000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не соединено с ММ, по отношению к CD166.

[0108] Константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ, как правило, больше, чем K_d АВ по отношению к мишени. K_d ММ по отношению к 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 по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания ММ по отношению к АВ, как правило, ниже, чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени. Аффинность связывания ММ по отношению к АВ может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени.

[0109] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ приблизительно равна K_d АВ по отношению к мишени. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ не превышает константу диссоциации АВ по отношению к мишени.

[0110] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ меньше, чем константа АВ по отношению к мишени.

[0111] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ больше, чем константа диссоциации АВ по отношению к мишени.

[0112] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая не превышает K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0113] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая меньше, чем K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0114] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая приблизительно равна K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0115] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая не меньше K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0116] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая больше, чем K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0117] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ не более в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или больше, 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, 50000-500000, 100000-1000000 или в 100000-10000000 раз больше, чем K_d в отношении связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d в отношении связывания с АВ, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1,000, 20-100, 20-1000 или в 100-1000 раз больше, чем K_d в отношении связывания АВ с мишенью.

[0118] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с АВ, которая меньше аффинности связывания АВ с мишенью.

[0119] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с АВ, которая не превышает аффинность связывания АВ с мишенью.

[0120] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая приблизительно равна аффинности связывания АВ с мишенью.

[0121] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет сродство связывания с АВ, которое не меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

[0122] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с АВ, которая больше аффинности связывания АВ с мишенью.

[0123] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность к связыванию с АВ, которое 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 в 100-1000 раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с АВ, которая в 2-20 - раз меньше, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ, не связанный ковалентно с АВ и в эквимольной концентрации с АВ, не ингибирует связывание АВ с мишенью.

[0124] Когда АВ модифицируется с помощью ММ и находится в присутствии мишени специфическое связывание АВ с его мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, которое не модифицировано ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не модифицированного ММ, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации ММ может быть снижена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и

даже 100% по меньшей мере в течение 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 *in vivo* или в анализе *in vitro*.

[0125] 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 осуществления, когда АВ модифицируется или связывается с ММ и в присутствии мишени отсутствует связывание или по существу отсутствует связывание АВ с мишенью, или оно 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% связывания АВ с мишенью человека по сравнению со связыванием АВ, не модифицированного ММ, исходного АВ или АВ, не связанного с ММ, с АВ человека 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 *in vivo* или в анализе *in vitro*.

[0126] Когда АВ связывается или модифицируется с помощью ММ, ММ «маскирует», снижает или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ связывается или модифицируется с помощью ММ, такое связывание или модификация может вызвать структурное изменение, которое снижает или ингибирует способность АВ специфически связывать свою мишень.

[0127] АВ, связанное с ММ или модифицированное им, может быть представлено следующими формулами (в порядке от amino (N)-концевой области до карбокси (C)-концевой области):

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, АВ представляет собой антитело или его фрагмент, а L представляет собой линкер. Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить в композицию один или более линкеров, например, гибкие линкеры, чтобы обеспечить гибкость.

[0128] В определенных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не имеет или практически не имеет гомологии с каким-либо природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%,

45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% аналогичен любому природному партнеру по связывания АВ. В некоторых вариантах осуществления 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 связывания АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 20% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 10% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ.

Расщепляемые фрагменты (СМ)

[0129] Активируемые антитела к CD166, представленные в данном документе, содержат расщепляемый фрагмент (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, как правило, внеклеточной протеазы. Подходящие субстраты могут быть идентифицированы с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные субстраты идентифицируют с использованием способов, описанных в патенте США № 7666817, Daugherty et al.; в патенте США № 8563269, Stagliano et al.; и в публикации PCT № WO 2014/026136 La Porte et al., содержание каждой из которых полностью включено в данный документ 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).

[0130] В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет СМ, активна, например, повышается или не повышается иным образом, в пораженной ткани, и протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвергается действию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза совместно локализована с CD166 в ткани, и протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвергается действию протеазы. На Фиг. 1 показаны конъюгаты лекарственное средство – активируемое антитело к CD166, которые предпочтительно активируются в микроокружении опухоли, где присутствуют опухолеспецифические протеазы.

[0131] В некоторых вариантах осуществления АА содержит АВ, которая модифицирована ММ, а также содержит один или более расщепляемых фрагментов (СМ). Такие АА демонстрируют активируемое/переключаемое связывание с мишенью АВ. АА, как правило, содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные или

связанные с маскирующим фрагментом (ММ) и модифицируемым или расщепляемым фрагментом (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, которая служит субстратом по меньшей мере для одной протеазы.

[0132] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот.

[0133] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид, который включает первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом по меньшей мере для одной матричной металлопротеазы (ММР), и второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления каждая из последовательности субстрата СМ1 и последовательности субстрата СМ2 из субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот.

[0134] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат СМ1-СМ2, аминокислотная последовательность которого представлена:

Расщепляемый фрагмент 3001 (субстрат 3001)

AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)

[0135] Элементы АА расположены так, чтобы субстрат ММ и СМ таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени АВ связывает мишень, но когда АА находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью снижается или ингибируется. Специфическое связывание АВ с его мишенью может быть снижено из-за ингибирования или маскировки способности АВ специфически связывать свою мишень посредством ММ.

[0136] K_d АВ, модифицированного ММ и СМ, по отношению к мишени в по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или больше, или 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 в 100000-10000000 раз больше, чем K_d АВ, которое не модифицировано с помощью ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени. И наоборот, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ и СМ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, 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, 50000-5000000, 100000-1000000, или в 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, которое не модифицировано ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени.

[0137] Когда АВ модифицируется с помощью ММ и СМ и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, по меньшей мере одной протеазы), специфическое связывание АВ с его мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного ММ и СМ, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или связыванием АВ, не модифицированного ММ и СМ, со своей мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации ММ и СМ может быть снижена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже на 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 *in vivo* или в анализе *in vitro*.

[0138] Используемый в данном документе термин «расщепленное состояние» относится к состоянию АА после модификации СМ по меньшей мере одной протеазой. Используемый в данном документе термин «нерасщепленное состояние» относится к состоянию АК в отсутствие расщепления СМ протеазой. Как обсуждалось выше, термин «АА» используется в данном документе для обозначения активируемого антитела как в его нерасщепленном (нативном) состоянии, так и в его расщепленном состоянии. Обычному специалисту в данной области техники будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления в расщепленном АА может отсутствовать ММ из-за расщепления СМ протеазой, что приводит к высвобождению по меньшей мере ММ (например, когда ММ не присоединяется к АА посредством ковалентной связи (например, дисульфидной связи между остатками цистеина).

[0139] Под активируемым или переключаемым подразумевается, что АА демонстрирует первый уровень связывания с мишенью, когда АА находится в ингибированном, замаскированном или нерасщепленном состоянии (то есть в первой конформации), и второй уровень связывания с мишенью в незащищенном, немаскированном состоянии и/или расщепленном состоянии (т.е. вторая конформация), причем второй уровень связывания мишени выше, чем первый уровень связывания. В общем, доступ мишени к АВ АА больше в присутствии расщепляющего агента, способного расщеплять СМ, то есть

протеазы, чем в отсутствие такого расщепляющего агента. Таким образом, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, АВ ингибируется в отношении связывания с мишенью и может быть замаскировано от связывания с мишенью (т. е. первая конформация такова, что АВ не может связываться с мишенью), а в расщепленном состоянии АВ не ингибируется или не маскируется в отношении целевого связывания.

[0140] СМ и АВ из АА выбраны таким образом, чтобы АВ представляет собой связывающий фрагмент для данной мишени, а СМ представляет собой субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза совместно локализована с мишенью в подвергаемой лечению области или области диагностического контроля у субъекта. В контексте данного документа термин «совместно локализованный» означает нахождение в одной и той же области или относительно близко. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ с образованием активированного антитела, которое связывается с мишенью, расположенной рядом с сайтом расщепления. Описанные в данном документе активируемые антитела находят особое применение там, где, например, протеаза, способная расщеплять сайт в СМ, т.е. протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях в содержащей мишень ткани подвергаемой лечению области или области диагностического контроля, чем в ткани областей, которые не подвергаются лечению, (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ по изобретению также расщепляется одной или более другими протеазами. В некоторых вариантах осуществления это одна или более других протеаз, которые локализованы совместно с мишенью и ответственны за расщепление СМ *in vivo*.

[0141] В некоторых вариантах осуществления АА обеспечивают сниженную токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы возникнуть в результате связывания АВ в областях, которые не подвергаются лечению, если бы АВ не были замаскированы или иным образом не ингибировались в отношении связывания с мишенью.

[0142] В общем, АА может быть сконструировано путем выбора представляющего интерес АВ и конструирования оставшейся части АА так, что при ограничении конформационной подвижности ММ обеспечивает маскировку АВ или снижение связывания АВ со своей мишенью. Критерии структурного конструирования могут быть приняты во внимание для обеспечения этой функциональной особенности.

[0143] Предлагаются активируемые антитела, проявляющие переключаемый фенотип желаемого динамического диапазона для связывания мишени в ингибированной или неингибированной конформации. 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, в контексте активируемого антитела динамический диапазон относится к отношению (a) максимального обнаруженного уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ активируемых антител к (b) минимально детектируемому уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела может быть рассчитан как отношение константы диссоциации активируемого антитела, обрабатываемого расщепляющим агентом (например, ферментом) к константе диссоциации активируемых антител, обрабатываемых расщепляющим агентом. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. Активируемые антитела, имеющие относительно более высокие значения динамического диапазона (например, более 1), демонстрируют более желательные фенотипы переключения, так что связывание белка-мишени активируемыми антителами происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего агента (например, фермента), способного расщеплять СМ активируемых антител, чем в отсутствие расщепляющего агента.

[0144] СМ специфически расщепляется по меньшей мере одной протеазой со скоростью около $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 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 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью около $100000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью от около 1×10^2 до около $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (т.е. от около 1×10^2 до около $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

[0145] Для специфического расщепления ферментом устанавливается контакт между ферментом и СМ. Когда АА, содержащая АВ, связанный с ММ и СМ, находится в присутствии мишени и достаточной активности фермента, СМ может быть отщеплен. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с СМ и влиять на расщепление. Легко предположить, что фермент может находиться поблизости от СМ, но не может расщеплять из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

Структурные конфигурации активируемых антител

[0146] АА по настоящему изобретению могут быть предложены во множестве структурных конфигураций. Иллюстративные формулы для АА представлены ниже. В

частности, предполагается, что порядок от N-конца к С-концу АВ, ММ и СМ может быть обратным в пределах активируемого антитела. Также конкретно предполагается, что СМ и ММ могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, так, чтобы СМ содержалась в ММ.

[0147] Например, АА могут быть представлены следующей формулой (в порядке от amino (N)-концевой области до карбокси (С)-концевой области:

(ММ)-(СМ)-(АВ)

(АВ)-(СМ)-(ММ)

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, СМ представляет собой расщепляемый фрагмент, а АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Следует отметить, что хотя ММ и СМ указаны как отдельные компоненты в формулах выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в данном документе, предполагается, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, такие что СМ полностью или частично содержится в ММ. Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или С-конце по отношению к элементам активируемых антител.

[0148] Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить один или более линкеров, например, гибкие линкеры, в конструкцию АА таким образом, чтобы обеспечить гибкость в одном или более из соединения ММ-СМ, соединения СМ-АВ, или обеих. Например, АВ, ММ и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желаемой гибкости. По существу, переключаемый фенотип таких конструкций АА может выиграть от введения одной или более аминокислот для обеспечения гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, когда АА предложено в виде конструкции с ограничением конформационной подвижности, гибкий линкер может быть функционально вставлен для облегчения образования и поддержания циклической структуры в нерасщепленном активируемом антителе.

[0149] В некоторых вариантах осуществления АА содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом АА в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[0150] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n является целым числом, равным по меньшей мере одному.

[0151] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGS (SEQ ID NO: 3), GSGG (SEQ ID NO: 4), GSG (SEQ ID NO: 5), GSGG (SEQ ID NO: 6), GGG (SEQ ID NO: 7) и GSSG (SEQ ID NO: 8).

[0152] В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGSGSGSG (SEQ ID NO: 9), GSSGSGSGSG (SEQ ID NO: 10), GSSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 11), GSSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 12), GSSGSGSGSG (SEQ ID NO: 13) или GSSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 14).

[0153] В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGS (SEQ ID NO: 15), GSGT (SEQ ID NO: 16) или GSG (SEQ ID NO: 17).

[0154] В некоторых вариантах осуществления АВ имеет константу диссоциации около 100 нМ или менее в отношении связывания с CD166.

[0155] Например, в некоторых вариантах осуществления АА имеет одну из следующих формул (где формула ниже представляет аминокислотную последовательность или в направлении от N- к С-концу, или в направлении от С- к N-концу):

$$(MM)-LP1-(CM)-(AT)$$

$$(MM)-(CM)-LP2-(AT)$$

$$(MM)-LP1-(CM)-LP2-(AT)$$

где MM, CM и АВ имеют указанные выше значения; где каждый из LP1 и LP2 независимо и необязательно присутствует или отсутствует, и представляют собой одинаковые или разные гибкие линкеры, которые содержат по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или С-конце по отношению к элементам активируемых антител. 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 белки сыворотки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HAS))).

[0156] В некоторых вариантах осуществления АА подвергается действию 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 расщепления CM протеазой.

[0157] Линкеры, подходящие для применения в описанных в данном документе композициях, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированных АВ или АА для облегчения ингибирования связывания АВ с мишенью. Такие линкеры, как правило, называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе 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 иметь длину в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[0158] Иллюстративные гибкие линкеры включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например: (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n — целое число, равное по меньшей мере одному), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры, а также другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральным связующим звеном между компонентами. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству фи-пси, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173–142 (1992)). Иллюстративные 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 т. п. Обычному специалисту в данной области техники понятно, что конструкция АА может содержать 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 для обеспечения желаемой структуры АА.

[0159] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид конъюгирован с активируемым антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер конъюгирован с активируемым антителом в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединен непосредственно к ММ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединен непосредственно к ММ активируемого антитела в структурном

расположении от N-конца к С-концу спейсер-ММ-СМ-Ат. Примером спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ АА, является QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ АА, включают QGQSGQG (SEQ ID NO: 305), QGQSG (SEQ ID NO: 306), QGQS (SEQ ID NO: 307), QGQ, QG и Q. Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ из АА, включают GQSGQG (SEQ ID NO: 359), QSGQG (SEQ ID NO: 360), SGQG (SEQ ID NO: 361), GQG и G. В некоторых вариантах осуществления спейсер не присоединен к N-концу ММ. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 305). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSG (SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQS (SEQ ID NO: 307). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQ. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QG. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотный остаток Q. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GQSGQG (SEQ ID NO: 359). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QSGQG (SEQ ID NO: 360). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность SGQG (SEQ ID NO: 361). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GQG. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотный остаток G. В некоторых вариантах осуществления спейсер отсутствует.

Конъюгированные активируемые антитела

[0160] Композиции АА и способы, предложенные в данном документе, позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина (например, цистеина, лизина) в АВ без ущерба для активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела к CD166. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина в АВ без уменьшения или иного нарушения одной или более дисульфидных

связей в ММ. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать активируемое антитело к CD166, которое конъюгировано с одним или более агентами, например, с любым из множества терапевтических, диагностических и/или профилактических агентов, например, в некоторых вариантах осуществления, без какого-либо агента(-ов), конъюгируемого с ММ активируемого антитела к CD166. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать конъюгированные активируемые антитела к CD166, в которых ММ сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ из АА в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать конъюгированные активируемые антитела к CD166, в которых АА все еще активировано, т.е. расщепляется, в присутствии протеазы, которая может расщеплять СМ.

[0161] В некоторых вариантах осуществления АА, описанные в данном документе, также включают агент, конъюгированный с активируемом антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированный агент представляет собой терапевтический агент, такой как противовоспалительный и/или противоопухолевый агент. В таких вариантах осуществления агент конъюгирован с углеводным фрагментом активируемого антитела, например, в некоторых вариантах осуществления, где углеводный фрагмент расположен за пределами антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента активируемого антитела.

[0162] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой цитотоксический агент, такой как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

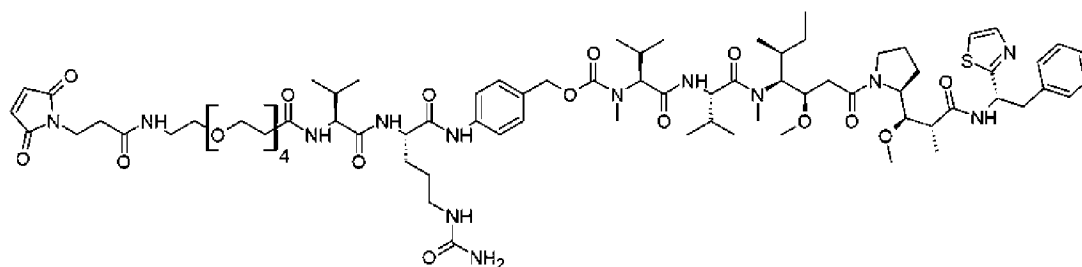
[0163] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой детектируемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, агент представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, одну или более биотинильных групп, которые могут быть обнаружены меченым авидином (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или имеющего ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами), один или более радиоизотопов или радионуклидов, одну или более флуоресцентных меток, одну или более ферментных меток и/или один или более хемилюминесцентных агентов. В некоторых вариантах осуществления детектируемые фрагменты присоединены спейсерными молекулами.

[0164] Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). Подходящие цитотоксические агенты включают, например, доластатины и их производные (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ, ММАД, DMAF, DMAE). Например, агент представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ) или монометилауристатин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристатин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой пирролобензодиазепин. В иллюстративных вариантах осуществления агент представляет собой DM4.

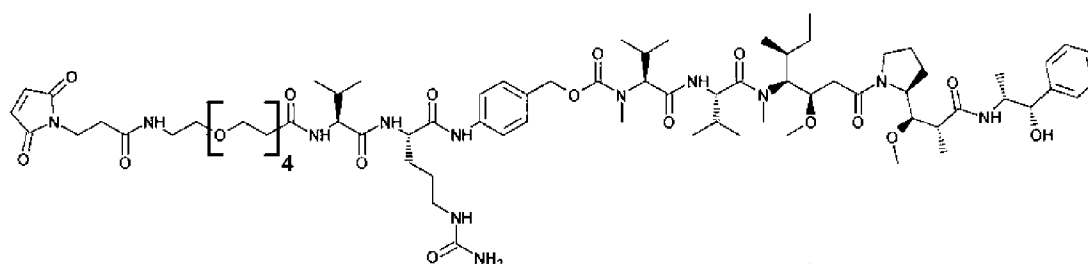
[0165] В некоторых вариантах осуществления агент связан с АВ с использованием линкера малеимид капроил-валин-цитруллин или линкера малеимид ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент связан с АВ с использованием линкера малеимид капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент связан с АВ с использованием линкера малеимид ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин D (ММАД), связанный с АВ, с использованием линкера малеимид ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и эта конструкция линкер-полезная нагрузка упоминается в данном документе как «vc-ММАД». В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ), связанный с АВ, с использованием линкера малеимид ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и эта конструкция линкер-полезная нагрузка упоминается в данном документе как «vc-ММАЕ». В некоторых вариантах осуществления агент связан с

AB с использованием линкера малеимид ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с AB, с использованием линкера малеимид бис-ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и эта конструкция линкер-полезная нагрузка упоминается в данном документе как «ПЭГ2-vc-MMAD». Структуры vc-MMAD, vc-MMAE и PEG2-vc-MMAD показаны ниже:

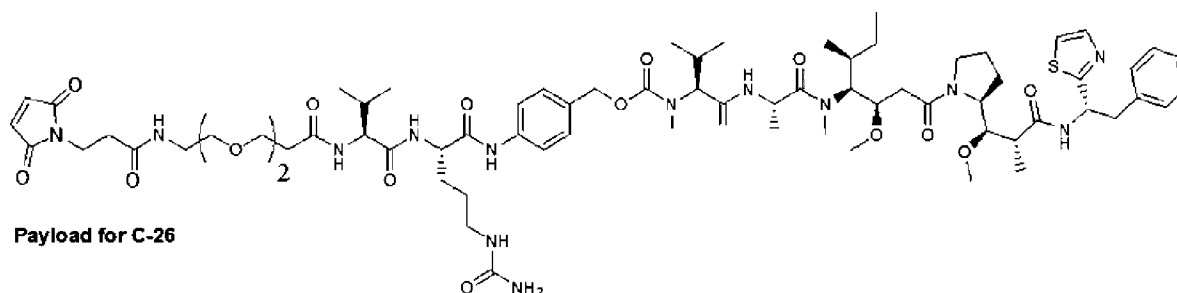
vc-MMAD:



vc-MMAE:

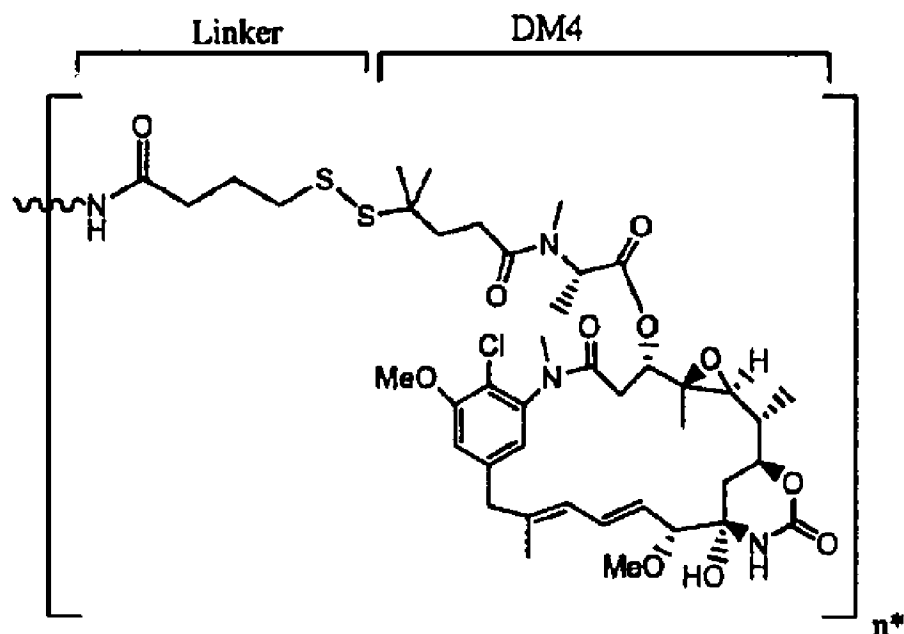


PEG2-vc-MMAD:



[0166] В иллюстративном варианте осуществления агент конъюгирован с АА через лизин. В иллюстративном варианте осуществления SPDB-DM4 присоединен к активируемому антителу через epsilon-аминогруппу лизина на АА, например, epsilon-аминогруппу лизина.

[0167] В иллюстративном варианте осуществления агент представляет собой DM4, а линкер DM выглядит следующим образом:



[0168] В изобретении также предложены конъюгированные АА, которые включают АА, связанное с полезной нагрузкой в виде монометилауристатина D (MMAD), где АА содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ АА в нерасщепленном состоянии с мишенью и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, а СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для по меньшей мере одной протеазы MMP.

[0169] В некоторых вариантах осуществления MMAD-конъюгированное АА может быть конъюгировано с использованием любого из нескольких 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 (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ.

[0170] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с цистеином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка в виде MMAD конъюгирована с лизином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с другим остатком АВ через линкер, такой как те остатки, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой тиолсодержащий линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер выбирают из группы, состоящей из линкеров, приведенных в таблицах 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления AA и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления AA и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с АВ с использованием технологии частичного восстановления и конъюгации, описанной в данном документе.

[0171] В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликолевый компонент (PEG) линкера по данному 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. В некоторых вариантах осуществления по данному изобретению компонент ПЭГ представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления по данному изобретению компонент ПЭГ представляет собой неразветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный компонент ПЭГ функционализирован аминогруппой или ее производным, карбоксильной группой или ее производным, или как аминогруппой, или ее производным, так и карбоксильной группой или ее производным.

[0172] В некоторых вариантах осуществления компонент ПЭГ линкера по настоящему изобретению представляет собой амино-тетраэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент ПЭГ линкера по настоящему изобретению представляет собой амино-триэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент ПЭГ линкера по настоящему изобретению представляет собой амино-диэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное производное представляет собой образование амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой, с которой оно конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой образование амидной связи между карбоксильной группой и аминогруппой, с которой оно

конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой образование сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой оно конъюгировано.

[0173] Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор мыльнянки лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Для получения радиоактивно конъюгированных антител доступны различные радионуклиды. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , и ^{186}Re .

[0174] Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием различных бифункциональных связывающих белок агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис (п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-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). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом. (См. WO94/11026).

[0175] В таблице 1 перечислены некоторые из иллюстративных фармацевтических агентов, которые могут использоваться в описанном в данном документе изобретении, но никоим образом не подразумевается, что это исчерпывающий список.

Таблица 1. Примеры фармацевтических агентов для конъюгации

<u>ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ</u>	
Ауристатины	Турбостатин
Ауристин Е	Фенстатины
Монометилауристин D (MMAD)	Гидроксифенстатин

Монометилауристатин E (MMAE)	Спонгистатин 5
Десметилауристатин E (DMAE)	Спонгистатин 7
Ауристатин F	Галистатин 1
Монометилауристатин F (MMAF)	Галистатин 2
Десметилауристатин F (DMAF)	Галистатин 3
Производные ауристатина, например, их амиды	Модифицированные бриостатины
Ауристатин тирамин	Галокомстатины
Ауристатин хинолин	Пирролобензимидазолы (PBI)
Доластатины	Цибростатин6
Производные доластатина	Доксалиформ
Доластатин 16 DmJ	Аналоги антрациклина
Доластатин 16 Dpv	
Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4	
Производные майтанзиноидов	Аналог цемадотина (CemCH ₂ -SH)
Дуокармицин	Вариант токсина A Pseudomonas (PE38)
	Вариант токсина A Pseudomonas (ZZ-PE38)
Производные дуокармицина	ZJ-101
Альфа-аманитин	OSW-1
Антрациклины	4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина
Доксорубицин	Ингибиторы топоизомеразы
Даунорубицин	Гемиастерлин
Бриостатины	Цефалотаксин
Камптотецин	Гомогаррингтонин
Производные камптотецина	Димер пирролобензодиазепина (PBD)
7-замещенный камптотецин	Функционализированные пирролобензодиазепены
10, 11-дифторметилендиоксикамптотецин	Калихеамицины
Комбретастатины	

Дебромонаплизинатоксин	Подобиллотоксин
Кахалалид-В	Таксан
Дискодермолит	алкалоиды барвинка
Эктейнасцидин	
	<u>КОНЬЮГИРУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ</u>
<u>ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА</u>	Флуоресцеин и его производные
Ацикловир	Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)
Vira A	
	<u>РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ</u>
Симметрил	^{125}I
<u>ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ</u>	^{131}I
Нистатин	^{89}Zr
	^{111}In
<u>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СРЕДСТВА</u>	^{123}I
Адриамицин	^{131}I
Церубидин	^{99}mTc
Блеомицин	^{201}Tl
Алкран	^{133}Xe
Вельбан	^{11}C
Онковин	^{62}Cu
Фторурацил	^{18}F
Метотрексат	^{68}Ga
Тиотепа	^{13}N
Бисантрин	^{15}O
Новантрон	^{38}K
Тиогуанин	^{82}Rb

Прокарабизин	^{99m}Tc (Технеций)
Цитарабин	
	<u>ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ</u>
<u>ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА</u>	
Аминогликозиды	Барий
Стрептомицин	Золото
Неомицин	Платина
	<u>АНТИМИКОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ</u>
Канамицин	Тилозин
Амикацин	Спектиномицин
Гентамицин	
Тобрамицин	
Стрептомицин В	
Спектиномицин	
Ампициллин	
Сульфаниламид	
Полимиксин	
Хлорамфеникол	

[0176] Специалисты в данной области техники поймут, что большое разнообразие возможных фрагментов может быть связано с полученными антителами по данному изобретению. (См., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки).

[0177] В некоторых вариантах осуществления АА конъюгировано с одним или более эквивалентами агента. В некоторых вариантах осуществления АА конъюгировано с одним эквивалентом агента. В некоторых вариантах осуществления АА конъюгировано с двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более чем десятью эквивалентами агента. В некоторых вариантах осуществления АА является частью смеси АА, имеющей однородное количество эквивалентов конъюгированных агентов. В некоторых вариантах осуществления АА является частью смеси АА, содержащей гетерогенное количество эквивалентов конъюгированных агентов. В

некоторых вариантах осуществления 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, десять и больше. В некоторых вариантах осуществления смесь АА такова, что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше. В некоторых вариантах осуществления существует смесь АА, так что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от трех до четырех. В некоторых вариантах осуществления имеется такая смесь АА, что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от 3,4 до 3,8. В некоторых вариантах осуществления имеется такая смесь АА, что среднее количество агентов, конъюгированных с каждым АА, составляет от 3,4 до 3,6. В некоторых вариантах осуществления АА содержит одну или более сайт-специфических модификаций аминокислотной последовательности, так что количество остатков лизина и/или цистеина увеличивается или уменьшается по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью активируемого антитела, таким образом, в некоторых вариантах осуществления, соответственно, увеличение или уменьшение количества агентов, которые могут быть конъюгированы с активируемым антителом, или, в некоторых вариантах осуществления, ограничение конъюгации агентов с АА сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное АА модифицируется одной или более неприродными аминокислотами сайт-специфическим образом, таким образом, в некоторых вариантах осуществления ограничивается конъюгация агентов только сайтами неприродных аминокислот.

Композиции и способы получения конъюгированных активируемых антител

[0178] Активируемые антитела к CD166 имеют по меньшей мере одну точку конъюгации для агента (для получения конъюгированной АА). В некоторых вариантах осуществления используются не все возможные точки конъюгации. В некоторых вариантах осуществления некоторые из природных точек контакта изменены или удалены, чтобы они больше не были доступны для конъюгации с агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы азота, такие как эпсилон-аминогруппа лизина.

[0179] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в дисульфидных связях. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы

серы, участвующие в межцепочечных дисульфидных связях. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в межцепочечных сульфидных связях, но не атомы серы, участвующие во внутрицепочечных дисульфидных связях. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы цистеина или другие аминокислотные остатки, содержащие атом серы. Такие остатки могут естественным образом присутствовать в структуре антитела или могут быть включены в антитело посредством сайт-направленного мутагенеза, химического превращения или неправильного включения неприродных аминокислот.

[0180] 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, и предложено лекарственное средство, реакционноспособного со свободными тиолами. Способ, как правило, включает частичное восстановление межцепочечных дисульфидных связей в АА с помощью восстанавливающего агента, такого как, например, ТСЕР; и конъюгирование лекарственного средства, реакционноспособного со свободными тиолами, с частично восстановленным активируемым антителом. Используемый в данном документе термин частичное восстановление относится к ситуациям, когда активируемое к CD166 антитело приводят в контакт с восстанавливающим агентом и восстанавливаются менее всех дисульфидных связей, например, менее всех возможных сайтов конъюгации. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 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 восстанавливается.

[0181] В еще других вариантах осуществления предложен способ восстановления и конъюгирования агента, например, лекарственного средства, с активируемым антителом к CD166, что приводит к селективности размещения агента. Способ, как правило, включает частичное восстановление активируемого антитела к CD166 восстанавливающим агентом, так что любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другой отличной от АВ части АА не восстанавливаются, и конъюгирование агента с межцепочечными тиолами в АВ. Сайт(-ы) конъюгации выбраны таким образом, чтобы обеспечить желаемое размещение агента, позволяющее конъюгации происходить в желаемом месте. 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 восстанавливающего реакционного раствора и т. д., определяют путем

идентификации условий, которые приводят к образованию конъюгированных АА, в которых ММ сохраняет способность эффективно маскировать АВ из АА в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу к CD166 будет варьироваться в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления соотношение восстанавливающего агента к активируемому антителу к CD166 будет находиться в диапазоне от около 20:1 до 1:1, от около 10:1 до 1:1, от около 9:1 до 1:1, от около 8:1 до 1:1, от около 7:1 до 1:1, от около 6:1 до 1:1, от около 5:1 до 1:1, от около 4:1 до 1:1, от около 3:1 до 1:1, от около 2:1 до 1:1, от около 20:1 до 1:1,5, от около 10:1 до 1:1,5, от около 9:1 до 1:1,5, от около 8:1 до 1:1,5, от около 7:1 до 1:1,5, от около 6:1 до 1:1,5, от около 5:1 до 1:1,5, от около 4:1 до 1:1,5, от около 3:1 до 1:1,5, от около 2:1 до 1:1,5, от около 1,5:1 до 1:1,5 или от около 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 5:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 4:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 4:1 до примерно 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 8:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 2,5:1 до примерно 1:1.

[0182] В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения 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 определения местоположения агента(-ов) на АВ. Способ, как правило, включает частичное восстановление АВ восстанавливающим агентом с образованием по меньшей мере двух тиолов между цепями без образования всех возможных тиолов между цепями в активируемом антителе; и конъюгирование агента с тиолами между цепями частично восстановленного АВ. Например, АВ из АА частично восстанавливается в течение около 1 часа при примерно 37 °C при желаемом соотношении восстанавливающий агент: активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления соотношение восстанавливающего агента к АА будет находиться в диапазоне от около 20:1 до 1:1, от около 10:1 до 1:1, от около 9:1 до 1:1, от около 8:1 до 1:1, от около 7:1 до 1:1, от около 6:1 до 1:1, от около 5:1 до 1:1, от около 4:1 до 1:1, от около 3:1 до 1:1, от около 2:1 до 1:1, от около 20:1 до 1:1,5, от около 10:1 до 1:1,5, от около 9:1 до 1:1,5, от около 8:1 до 1:1,5, от около 7:1 до 1:1,5, от около 6:1 до 1:1,5, от около 5:1 до 1:1,5, от около 4:1 до 1:1,5, от

около 3:1 до 1:1,5, от около 2:1 до 1:1,5, от около 1,5:1 до 1:1,5 или от около 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 5:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 4:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 4:1 до примерно 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 8:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от примерно 2,5:1 до примерно 1:1.

[0183] Тиолсодержащий реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающий агент может представлять собой, например, TCEP. В некоторых вариантах осуществления восстановленное AA можно очистить перед конъюгацией, например, с использованием колоночной хроматографии, диализа или диафильтрации. Альтернативно, восстановленное антитело не очищается после частичного восстановления и до конъюгации.

[0184] В изобретении также предложены частично восстановленные активируемые антитела к CD166, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в AA была восстановлена восстанавливающим агентом без нарушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где AA содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166, маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB из AA в нерасщепленном состоянии с мишенью CD166, и расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления MM связан с AB через CM. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей AA не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей MM в AA не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий агент представляет собой TCEP.

[0185] В изобретении также предложены частично восстановленные AA, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в AA была восстановлена восстанавливающим агентом без нарушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где AA содержит антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, например, CD166, маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB из AA в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует как субстрат по меньшей мере для одной протеазы. В некоторых вариантах осуществления MM связан с AB через CM. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей AA не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей MM в AA не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий агент представляет собой TCEP.

[0186] В еще других вариантах осуществления способ восстановления и конъюгирования агента, например, лекарственного средства, с активируемым антителом к CD166 обеспечивает селективность размещения агента за счет предоставления активируемого антитела к CD166 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина больше или меньше количества соответствующих остатков в аминокислотной последовательности исходного антитела или активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может обеспечить определенное количество эквивалентов агента, которые могут быть конъюгированы с антителом к CD166 или активируемым антителом к CD166. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может обеспечить определенное количество эквивалентов агента, которые могут быть конъюгированы с антителом к CD166 или активируемым антителом к CD166 сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное AA модифицируется одной или более неприродными аминокислотами сайт-специфическим образом, таким образом, в некоторых вариантах осуществления ограничивается конъюгация агентов только сайтами неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD166 или активируемое антитело к CD166 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина можно частично восстановить с помощью восстанавливающего агента, как обсуждается в данном документе, так что любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другой отличной от AB части AA не восстанавливаются, и конъюгировать агент с межцепочечными тиолами в AB.

[0187] Связывание можно осуществить с помощью любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы, пока антитело и другая часть сохраняют свои соответствующие активности. Эта связь может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Однако в некоторых вариантах осуществления связывание представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные сшивающие агенты применимы для связывания белковых молекул, таких как антитела по настоящему изобретению, с другими молекулами. Например, иллюстративные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот перечень не предназначен для того, чтобы быть исчерпывающим для различных классов связывающих агентов, известных в данной области техники, а, скорее, является примером наиболее 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).

[0188] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к композициям и способам, представленным в данном документе, конъюгированное АА также может быть модифицировано для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность АА. Эти модифицированные аминокислотные последовательности предназначены для обеспечения контролируемого размещения и/или количества конъюгированного агента в конъюгированном активируемом антителе. Например, АА может быть сконструировано таким образом, чтобы оно включало замены цистеина в положениях на легкой и тяжелой цепях, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и не влияют отрицательно на фолдинг и сборку белка и не изменяют связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления АА может быть сконструировано таким образом, чтобы включать или иным образом вводить один или более не природных аминокислотных остатков в АА для обеспечения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления АА может быть сконструировано таким образом, чтобы оно включало или иным образом вводило ферментативно активируемые пептидные последовательности в последовательность АА.

[0189] Подходящие линкеры описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), в которой описано использование MBS (сложный эфир М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид). См., например, патент США № 5030719, в котором описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)-толуол (Pierce Chem. Co., кат. (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6 [3-(2-пиридилдитио) пропионамидо] гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6 [3-(2-пиридилдитио)-пропианамид] гексаноат (Pierce Chem. Co. кат. № 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфо-сукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 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).

[0190] Описанные выше линкеры содержат компоненты, которые имеют разные свойства, что приводит к конъюгатам с разными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие NHS-эфир, менее растворимы, чем сульфо-NHS эфиры. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшему количеству доступного конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может повысить стабильность сочетания с помощью карбодиимида. Сочетания с помощью карбодиимида (например, EDC) при использовании в комбинации с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сложные эфир, образуемые при помощи только реакции сочетания с помощью карбодиимида. В иллюстративном варианте осуществления линкер представляет собой SPDB. В еще одном иллюстративном варианте осуществления линкер представляет собой SPDB, агент представляет собой DM4.

[0191] В некоторых вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления линкеры являются нерасщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления присутствуют два или более линкеров. Все два или более

линкеры являются одинаковыми, т.е. расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкеры являются различными, т.е. по меньшей мере один является расщепляемым и по меньшей мере один является нерасщепляемым.

[0192] В настоящем изобретении используется 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 (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ. Согласно изобретению, АВ могут быть ковалентно присоединены к агенту через промежуточный линкер, имеющий по меньшей мере две реакционноспособные группы, одна для реакции с АВ, а другая для реакции с агентом. Линкер, который может включать любое совместимое органическое соединение, можно выбрать так, чтобы реакция с АВ (или агентом) не влияла отрицательно на реакционную способность и селективность АВ. Более того, присоединение линкера к агенту не может нарушить активность агента. Подходящие линкеры для реакции с окисленными антителами или фрагментами окисленных антител включают линкеры, содержащие амин, выбранный из группы, состоящей из групп первичного амина, вторичного амина, гидразина, гидразида, гидроксилamina, фенилгидразина, семикарбазида и тиосемикарбазида. Такие реакционноспособные функциональные группы могут существовать как часть структуры линкера или могут быть введены подходящей химической модификацией линкеров не содержащих такие группы.

[0193] Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к восстановленным АВ включают линкеры, имеющие определенные реакционноспособные группы, способные взаимодействовать 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 описанные Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

[0194] Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения ни к окисленным, ни к восстановленным АВ включают линкеры, имеющие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с первичными аминогруппами, присутствующими в немодифицированных остатках лизина в АВ. Такие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, NHS-карбоновые или угольные эфиры, сульфо-NHS-карбоновые или угольные эфиры, 4-нитрофенилкарбоновые или угольные эфиры, пентафторфенилкарбоновые или угольные эфиры, ацилимидазолы, изоцианаты и изотиоцианаты.

[0195] Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения ни к окисленным, ни к восстановленным АВ включают линкеры, имеющие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с группами карбоновых кислот, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в АВ, которые были активированы подходящими реагентами. Подходящие активирующие реагенты включают EDC с добавлением или без добавления NHS или сульфо-NHS, а также другие дегидратирующие агенты, используемые для образования карбоксамида. В этих случаях функциональные группы, присутствующие в подходящих линкерах, будут включать первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксилламины и гидразиды.

[0196] Агент может быть присоединен к линкеру до или после того, как линкер присоединен к АВ. В некоторых применениях может быть желательно сначала получить промежуточное соединение АВ-линкер, в котором линкер не содержит ассоциированного агента. В зависимости от конкретного применения к линкеру может быть затем ковалентно присоединен конкретный агент. В некоторых вариантах осуществления АВ сначала присоединяется к ММ, СМ и связанным линкерам, а затем присоединяется к линкеру для конъюгации.

[0197] *Разветвленные линкеры:* В конкретных вариантах осуществления используются разветвленные линкеры, которые имеют несколько сайтов для присоединения агентов. Для многосайтовых линкеров одно ковалентное присоединение к АВ привело бы к промежуточному соединению АВ-линкер, способному связывать агент в нескольких сайтах. Сайты могут быть альдегидными или сульфгидрильными группами или любым химическим сайтом, к которому могут быть присоединены агенты.

[0198] В некоторых вариантах осуществления более высокая удельная активность (или более высокое отношение агентов к АВ) может быть достигнута путем присоединения односайтового линкера к множеству сайтов на АВ. Это множество сайтов может быть введено в АВ любым из двух способов. Во-первых, в одном АВ можно образовать 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 многосайтового линкера могут быть альдегидными или сульфгидрильными группами или могут быть любым химическим сайтом, к которому могут быть присоединены линкеры. Еще более высокие удельные активности могут быть получены путем комбинирования этих двух подходов, то есть путем присоединения многосайтовых линкеров к нескольким сайтам в АВ.

[0199] Расщепляемые линкеры: Пептидные линкеры, которые чувствительны к расщеплению ферментами системы комплемента, такими как, помимо прочего, урокиназный активатор плазминогена, тканевый активатор плазминоген, трипсин, плазмин или другой фермент, обладающий протеолитической активностью, могут быть использованы в одном варианте осуществления по настоящему изобретению. Согласно одному способу по настоящему изобретению агент присоединяется через линкер, чувствительный 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. Согласно другому способу по настоящему изобретению агент присоединяется через линкер, чувствительный к расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как урокиназный активатор плазминогена, тканевый активатор плазминогена, плазмин или трипсин. Эти расщепляемые линкеры полезны в конъюгированных АА, которые включают внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, приведенных в таблице 1.

[0200] Неограничивающие примеры расщепляемых линкерных последовательностей представлены в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности линкеров для конъюгации

Типы расщепляемых последовательностей	Аминокислотная последовательность
<u>Расщепляемые плазмином последовательности</u>	
Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 90)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 91)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 92)
Стафилокиназа	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 93)
	SSSFDKGKYKRGDDA (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</u> <u>последовательности</u>	<u>MMP</u>
Желатиназа А	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
<u>Расщепляемые</u> <u>последовательности</u>	<u>коллагеназой</u>
Коллаген кожи телят (цепь $\alpha 1$ (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 99)
Коллаген кожи телят (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)
α_2 M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 103)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 104)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 105)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 106)
α_1 M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 107)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 108)
α_2 M крысы	AAHYHLSQ (SEQ ID NO: 109)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 110)
α_1 I ₃ (2J) крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 111)
α_1 I 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)

[0201] Кроме того, агенты могут быть присоединены к АВ через дисульфидные связи (например, дисульфидные связи в молекуле цистеина). Поскольку многие опухоли естественным образом выделяют высокие уровни глутатиона (восстанавливающего агента), это может уменьшить дисульфидные связи с последующим высвобождением агента в месте доставки. В некоторых конкретных вариантах осуществления восстанавливающий агент, который мог бы модифицировать СМ, также мог бы модифицировать линкер конъюгированного активируемого антитела.

[0202] *Спейсеры и расщепляемые элементы:* Спейсеры и в некоторых вариантах осуществления может быть необходимо сконструировать линкер таким образом, чтобы

оптимизировать расстояние между агентом и АВ активируемого антитела. Это может быть выполнено с помощью линкера общей структуры:



где

W представляет собой --NH--CH₂-- или --CH₂--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид; и

n равен целому числу от 0 до 20.

[0203] В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать спейсер и расщепляемый элемент. Спейсерный элемент служит для размещения расщепляемого элемента от ядра АВ, так что расщепляемый элемент более доступен для фермента, ответственного за расщепление. Некоторые из описанных выше разветвленных линкеров могут служить в качестве спейсерных элементов.

[0204] На протяжении всего этого обсуждения следует понимать, что присоединение линкера к агенту (или спейсерного элемента к расщепляемому элементу, или расщепляемого элемента к агенту) не обязательно должно быть конкретным способом присоединения или реакции. Приемлема любая реакция, дающая продукт подходящей стабильности и биологической совместимости.

[0205] *Сывороточный комплемент и выбор линкеров:* Согласно одному способу по настоящему изобретению, когда желательно высвобождение агента, используется АВ, которое является антителом класса, который может активировать комплемент. Полученный конъюгат сохраняет как способность связывать антиген, так и активировать каскад комплемента. Таким образом, согласно этому варианту осуществления по настоящему изобретению агент присоединен к одному концу расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, а другой конец линкерной группы присоединен к специфическому сайту на АВ. Например, если агент имеет гидроксигруппу или аминогруппу, он может быть присоединен к карбоксиконцу пептида, аминокислоты или другого подходящим образом выбранного линкера через сложноэфирную или амидную связь, соответственно. Например, такие агенты могут быть присоединены к линкерному пептиду посредством реакции с карбодиимидом. Если агент содержит функциональные группы, которые могут препятствовать присоединению к линкеру, эти интерферирующие функциональные группы могут быть заблокированы до присоединения и деблокированы после того, как будет получен конъюгат продукта или промежуточное соединение. Противоположный или аминоконец линкера затем используется либо непосредственно, либо после дальнейшей модификации для связывания с АВ, способной активировать комплемент.

[0206] Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут иметь любую желаемую длину, один конец которой может быть ковалентно присоединен к конкретным сайтам на АВ активируемого антитела. Другой конец линкера или спейсерного элемента может быть присоединен к аминокислотному или пептидному линкеру.

[0207] Таким образом, когда эти конъюгаты связываются с антигеном в присутствии комплемента, амидная или сложноэфирная связь, которая связывает агент с линкером, 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 особенно эффективны для доставки *in vivo* фармацевтических агентов, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных агентов и т.п., представленных, но не ограничиваясь ими. к тем, что в таблице 1.

[0208] *Линкеры для высвобождения активации комплемента:* В еще одном варианте применения направленной доставки желательно высвобождение агента без активации комплемента, поскольку активация каскада комплемента в конечном итоге лизирует клетку-мишень. Следовательно, этот подход полезен, когда доставка и высвобождение агента должны осуществляться без уничтожения целевой клетки. Такова цель, когда 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, которая не способна активировать комплемент через линкер, который умеренно чувствителен к расщеплению протеазами сыворотки. Когда этот конъюгат вводят индивидууму, комплексы антиген-антитело будут образовываться быстро, тогда как расщепление агента будет происходить медленно, что приведет к высвобождению соединения в целевом сайте.

[0209] Биохимические сшивающие линкеры: В некоторых вариантах осуществления АА может быть конъюгировано с одним или более терапевтическими агентами с использованием определенных биохимических сшивающих агентов. Сшивающие реагенты образуют молекулярные мостики, которые связывают функциональные группы двух разных молекул. Для поэтапного связывания двух разных белков можно использовать гетеробифункциональные сшивающие агенты, которые устраняют образование нежелательного гомополимера.

[0210] Также применимы пептидные линкеры, расщепляемые лизосомными протеазами, например, Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, могут быть использованы кислотолабильные линкеры, расщепляемые в среде лизосомы с низким рН, например: бис-сиалиловый эфир. Другие подходящие линкеры включают лабильные по

отношению к катепсину субстраты, особенно те, которые демонстрируют оптимальную функцию при кислом pH.

[0211] Иллюстративные гетеробифункциональные сшивающие агенты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Иллюстративные гетеробифункциональные сшивающие линкеры

<u>ГЕТЕРОБИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СШИВАЮЩИЕ ЛИНКЕРЫ</u>			
Линкер	Реакционно- способный в отношении	Преимущества и применение	Длина спейсерной группы после сшивки (ангстремы)
SMPT	Первичные амины	Большая стабильность	11,2 Å
	Сульфгидрилы		
SPDP	Первичные амины	Тиолирование	6,8 Å
	Сульфгидрилы	Образование расщепляемой сшивки	
LC-SPDP	Первичные амины	Удлиненная спейсерная группа	15,6 Å
	Сульфгидрилы		
Сульфо-LC- SPDP	Первичные амины	Удлинитель спейсерной группы	15,6 Å
	Сульфгидрилы	Водорастворимый	
SMCC	Первичные амины	Стабильная реакционно- способная к малеимиду группа	11,6 Å
	Сульфгидрилы	Конъюгация фермент- антитело	
		Конъюгация гаптен- белок-носитель	
Сульфо-SMCC	Первичные амины	Стабильная реакционно- способная к малеимиду группа	11,6 Å

	Сульфгидрилы	Водорастворимый	
		Конъюгация фермент-антитело	
MBS	Первичные амины	Конъюгация фермент-антитело	9,9 Å
	Сульфгидрилы	Конъюгация гаптен-белок-носитель	
Сульфо-MBS	Первичные амины	Водорастворимый	9,9 Å
	Сульфгидрилы		
SIAB	Первичные амины	Конъюгация фермент-антитело	10,6 Å
	Сульфгидрилы		
Сульфо-SIAB	Первичные амины	Водорастворимый	10,6 Å
	Сульфгидрилы		
SMPB	Первичные амины	Удлиненная спейсерная группа	14,5 Å
	Сульфгидрилы	Конъюгация фермент-антитело	
Сульфо-SMPB	Первичные амины	Удлиненная спейсерная группа	14,5 Å
	Сульфгидрилы	Водорастворимый	
EDE/Сульфо-NHS	Первичные амины	Конъюгация гаптен-носитель	0
	Карбоксильные группы		
ABH	Углеводы	Реагирует с сахарными группами	11,9 Å
	Неселективный		

[0212] *Нерасщепляемые линкеры и прямое присоединение:* В некоторых вариантах осуществления по изобретению конъюгат может быть сконструирован так, что агент доставляется к цели, но не высвобождается. Это может быть достигнуто путем присоединения агента к АВ либо напрямую, либо через нерасщепляемый линкер.

[0213] Эти нерасщепляемые линкеры могут включать аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые могут быть

модифицированы для включения функциональных групп, которые впоследствии могут быть использованы для присоединения к АВ способами, описанными в данном документе. Общая формула такого органического линкера может представлять собой



где

W представляет собой --NH--CH₂-- или --CH₂--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид; и

n равен целому числу от 0 до 20.

[0214] *Нерасщепляемые конъюгаты:* В некоторых вариантах осуществления соединение может быть присоединено к АВ, которые не активируют комплемент. При использовании АВ, неспособных к активации комплемента, это присоединение может быть выполнено с использованием линкеров, чувствительных к расщеплению активированным комплементом, или с использованием линкеров, которые не подвержены расщеплению активированным комплементом.

[0215] Описанные в данном документе антитела также могут быть составлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области техники, такими как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и патенты США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

[0216] Особенно полезные липосомы могут быть получены методом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируются через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра. Фрагменты Fab' антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) посредством реакции дисульфидного обмена.

Полиспецифические активируемые антитела

[0217] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 является моноспецифическим.

[0218] В изобретении также предложены полиспецифические активируемые антитела к CD166. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 является полиспецифическим, например, в качестве неограничивающего примера, биспецифическим

или трифункциональным. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 создают в виде молекулы-предшественника привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (про-BITE). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 создают в виде части Т-клетки, модифицированной предшественником химерного антигенного рецептора (CAR), или другого сконструированного рецептора.

[0219] В некоторых вариантах осуществления АА или его антигенсвязывающий фрагмент включен в полиспецифическое АА или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо полиспецифического АА специфически связывает CD166. В некоторых вариантах осуществления АА или его антигенсвязывающий фрагмент включен в биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо биспецифического АА специфически связывает CD166.

[0220] Полиспецифические АА, предложенные в данном документе, представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают CD166 и по меньшей мере один или более различных антигенов или эпитопов, и которые включают по меньшей мере один маскирующий фрагмент (ММ), связанный по меньшей мере с одним антиген- или эпитоп-связывающим доменом полиспецифического антитела, таким образом, что связывание ММ снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ соединяется с антиген- или эпитоп-связывающим доменом полиспецифического антитела через расщепляемый фрагмент (СМ), которая действует как субстрат по меньшей мере для одной протеазы. Активируемые полиспецифические антитела, предложенные в данном документе, стабильны в кровотоке, активируются в намеченных областях терапии и/или диагностики, но не в нормальной, то есть здоровой ткани, и при активации проявляют связывание с мишенью, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим немодифицированным полиспецифическим антителом.

[0221] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, которые сконструированы для привлечения эффекторных клеток иммунной системы, также называются в данном документе полиспецифическими активируемыми антителами, привлекающими эффекторные клетки иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, которые предназначены для привлечения лейкоцитов, также называются в данном документе привлекающими лейкоциты полиспецифическими активируемыми антителами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, которые предназначены для привлечения Т-клеток, также

называются в данном документе привлекающими Т-клетки полиспецифическими активируемыми антителами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА взаимодействуют с поверхностным антигеном лейкоцита, такого как Т-клетка, природная клетка-киллер (NK), миелоидная мононуклеарная клетка, макрофаг и/или другая эффекторная клетка иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой мононуклеарную клетку, такую как миелоидная мононуклеарная клетка. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, которые предназначены для связывания или иного взаимодействия с более чем одной мишенью и/или более чем одним эпитопом, также называются в данном документе нацеленными на множество антигенов активируемыми антителами. Используемые в данном документе термины «мишень» и «антиген» используются взаимозаменяемо.

[0222] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, привлекающие эффекторные клетки иммунной системы, по изобретению содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает CD166, и антитело, привлекающее эффекторные клетки иммунной системы, или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или антитела, привлекающего эффекторные клетки иммунной системы, или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее эффекторные клетки иммунной системы, или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает первую мишень, привлекающую эффекторные клетки иммунной системы, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что соединение MM1 снижает способность AB1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее эффекторные клетки иммунной системы, или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает первую мишень, привлекающую эффекторные клетки иммунной системы, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1) таким образом, что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать первую мишень, а нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее неиммунные эффекторные клетки, представляет собой нацеленное на рак антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее неиммунные эффекторные клетки, представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее неиммунные эффекторные клетки, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления CD166-нацеливающее антитело (например, антитело, привлекающее неиммунные эффекторные клетки) представляет собой IgG, а антитело, взаимодействующее с эффекторными клетками иммунной системы, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой миелоидную мононуклеарную клетку.

[0223] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические АА, привлекающие Т-клетки, по изобретению содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело, привлекающее Т-клетки, или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из CD166-нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или антитела, привлекающего Т-клетки, или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее Т-клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает первую мишень, привлекающую Т-клетки, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что соединение MM1 снижает способность AB1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2

связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее Т-клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает первую мишень, привлекающую Т-клетки, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1) таким образом, что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать первую мишень, а нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать CD166.

[0224] В некоторых вариантах осуществления привлекающего эффекторные клетки иммунной системы полиспецифического активируемого антитела один антиген и еще один антиген, который, как правило, представляет собой стимулирующий или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, природной клетки-киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммунной эффекторной клетки, такой как, помимо прочего, 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. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой стимулирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки или NK-клетки; примеры таких стимулирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, CD3, CD27, CD28, CD137 (также обозначаемый как 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D и OX40. В некоторых вариантах осуществления 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 NK. Домен антитела, придающий специфичность поверхностному антигену Т-клетки, также может быть заменен лигандом или доменом лиганда, который связывается с рецептором Т-клеток, рецептором NK-клеток, рецептором макрофагов и/или другим рецептором эффекторных клеток иммунной системы, таким как, но не ограничиваясь ими, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2, или TNFSF9.

[0225] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое AA содержит scFv к CD3-эпсилон (CD3ε, также называемый в данном документе CD3ε и CD3) и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv к CD3ε и/или нацеливающего антитела или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления

scFv к CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CD3ε, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CD3ε, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает CD166, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать CD166.

[0226] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов AA содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает первую мишень и/или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает вторую мишень и/или второй эпитоп. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов AA связывают две или более разных мишеней. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов AA связывают два или более разных эпитопов на одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов AA связывают комбинацию двух или более разных мишеней и двух или более разных эпитопов на одной и той же мишени.

[0227] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA, содержащее IgG, имеет замаскированные вариабельные домены IgG. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA, содержащее scFv, имеет замаскированные домены scFv. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA имеет как вариабельные домены IgG, так и домены scFv, где по меньшей мере один из вариабельных доменов IgG связан с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA имеет как вариабельные домены IgG, так и домены scFv, где по

меньшей мере один из доменов scFv связан с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА имеет как переменные домены IgG, так и домены scFv, где по меньшей мере один из переменных доменов IgG связан с маскирующим фрагментом, а по меньшей мере один из доменов scFv связан с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА имеет как переменные домены IgG, так и домены scFv, где каждый из переменных доменов IgG и доменов scFv связан со своим собственным маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического АА обладает специфичностью в отношении антигена-мишени, а другой домен антитела имеет специфичность в отношении антигена Т-клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического АА имеет специфичность в отношении антигена-мишени, а другой домен антитела имеет специфичность в отношении другого антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического АА имеет специфичность в отношении эпитопа антигена-мишени, а другой домен антитела имеет специфичность в отношении другого эпитопа антигена-мишени.

[0228] В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слит 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 цепи активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слит с аминоконцом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с аминоконцом легкой цепи активируемого антитела IgG или с аминоконцом как тяжелой, так и легкой цепи активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слит с любой комбинацией одного или более карбоксильных концов и одного или более аминоконцов активируемого антитела IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его, а маскирующий фрагмент (ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его.

[0229] В изобретении предложены примеры структур полиспецифических АА, которые содержат, но не ограничиваются, следующее: $(VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2$; $(VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*)_2$; $(VL-CL)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; или $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$, где: VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепи первой специфичности, содержащиеся в IgG; VL* и VH* представляют собой переменные домены второй 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, соединяющий антитело первой специфичности с антителом второй специфичности; CL представляет собой константный домен легкой цепи; и CH1, CH2, CH3 представляют собой константные домены тяжелой цепи. Первая и вторая специфичности могут относиться к любому антигену или эпитопу.

[0230] В некоторых вариантах осуществления полиспецифического активируемого антитела, взаимодействующего с Т-клетками, один антиген представляет собой CD166, а

другой антиген, как правило, представляет собой стимулирующий (также называемый в данном документе активирующим) или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, природной клетки-киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммунной эффекторной клетки, такой как, помимо прочего, 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. Домен антитела, придающий специфичность поверхностному антигену Т-клетки, также может быть заменен лигандом или доменом лиганда, который связывается с рецептором Т-клеток, рецептором NK-клеток, рецептором макрофагов и/или другим рецептором эффекторных клеток иммунной системы.

[0231] В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой описанное в данном документе антитело к CD166. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело может быть в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv может быть в форме Pro-scFv (см., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

[0232] В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен в отношении связывания CD3ε и включает или получен из антитела или его фрагмента, которое связывает CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1 или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен в отношении связывания CTLA-4 (также называемый в данном документе как CTLA и CTLA4).

[0233] В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает аминокислотную последовательность:

анти-CTLA-4

scFv

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPL
TFGGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAAS
GSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 117)

[0234] В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117.

[0235] В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает аминокислотную последовательность:

анти-CD3ε**scFv**

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM
 HWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
 VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMASAPG
 EKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTIS
 GMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)

[0236] В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118.

[0237] В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен в отношении связывания одной или более Т-клеток, одной или более НК-клеток, и/или одного или более макрофагов. В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен для 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.

[0238] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА также содержит агент, конъюгированный с АВ. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой противоопухолевый агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с полиспецифическим АА через линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор сборки микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой повреждающий нуклеиновые кислоты агент, такой как алкилятор ДНК или интеркалятор ДНК, или другой повреждающий ДНК агент. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристатин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой

монометилауристатин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой димер пирролобензодиазефина.

[0239] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA также содержит детектируемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления детектируемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[0240] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA в естественных условиях содержит одну или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое AA может быть сконструировано так, чтобы содержать одну или более дисульфидных связей.

[0241] В изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любое из этих AA, а также векторы, которые содержат эти последовательности выделенной нуклеиновой кислоты. В изобретении предложены способы получения полиспецифического AA путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, причем клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

[0242] В изобретении также предложен способ получения полиспецифических активируемых антител по изобретению путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полиспецифическое AA, в условиях, которые приводят к экспрессии полиспецифического AA, и (b) выделения полиспецифического активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

[0243] В изобретении также предложены полиспецифические AA и/или композиции полиспецифических AA, которые содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое специфически связывает первую мишень или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень или второй эпитоп, где по меньшей мере AB1 связано или иным образом присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание

ММ1 снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ1 соединен с АВ1 через последовательность первого расщепляемого фрагмента (СМ1), которая содержит субстрат для протеазы, например, протеазы, которая совместно локализована с мишенью АВ1 в подвергаемой лечению области или области диагностического контроля у субъекта. Полиспецифические АА, предложенные в данном документе, стабильны в кровотоке, активируются в намеченных областях терапии и/или диагностики, но не в нормальной, то есть 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 АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

[0244] В изобретении также предложены композиции и способы, которые включают полиспецифическое АА, которое содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), которое специфически связывает мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где по меньшей мере первое АВ в полиспецифическом АА связано с маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления каждое АВ соединен с ММ, что снижает способность соответствующего АВ связывать каждую мишень. Например, в вариантах осуществления биспецифических АА АВ1 связано с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень, а АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который снижает способность АВ2 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА содержит более двух областей АВ; в таких вариантах осуществления АВ1 связано с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень, АВ2 связано со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который снижает способность АВ2 связывать свою мишень, АВ3 связано с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который снижает способность АВ3 связывать свою мишень, и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

[0245] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА дополнительно содержит по меньшей мере один расщепляемый фрагмент (СМ), который является субстратом для протеазы, где СМ связывает ММ с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), которое специфически связывает мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где по меньшей мере первое АВ в полиспецифическом АА

соединено через первый расщепляемый фрагмент (СМ1) с маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления биспецифического АА АВ1 соединено через СМ1 с ММ1, а АВ2 соединено через второй расщепляемый фрагмент (СМ2) со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который снижает способность АВ2 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое АА содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления АВ1 соединено через СМ1 с ММ1, АВ2 соединено через СМ2 с ММ2, а АВ3 соединено через третий расщепляемый фрагмент (СМ3) с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который снижает способность АВ3 связывать свою мишень, и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

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

[0246] В изобретении также представлены АА, которые содержат несвязывающие стерические фрагменты (NB) или партнеры для связывания (BP) для несвязывающих стерических фрагментов, где BP рекрутирует или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. Предложенные в данном документе АА включают, например, АА, которое содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB), расщепляемый линкер (CL) и антитело или фрагмент антитела (AB), которое связывается с мишенью; АА, которое содержит партнера по связыванию для несвязывающего стерического фрагмента (BP), CL и AB; и АА, которое содержит BP, к которому был рекрутирован NB, CL и AB, которое связывает мишень. АА, в которых NB ковалентно связан с CL и AB из АА или связан путем взаимодействия с BP, который ковалентно связан с CL и AB из АА, в данном документе называются «содержащими NB активируемыми антителами». Под активируемым или переключаемым подразумевается, что АА демонстрирует 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, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е. во второй конформации, т.е. активированном антителе), где второй уровень связывания мишени выше, чем первый уровень связывания мишени. Композиции АА могут проявлять повышенную биодоступность и более благоприятное биораспределение по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител.

[0247] В некоторых вариантах осуществления АА обеспечивают сниженную токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы возникнуть в результате связывания в областях, которые не подвергаются лечению, и/или областях недиагностического контроля, если бы АВ не были замаскированы или иным образом не ингибировались от связывания в такой области.

[0248] АА к CD166, которые содержат несвязывающий стерический фрагмент (NB), могут быть получены с использованием способов, изложенных в публикации PCT № WO 2013/192546, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Получение активируемых антител

[0249] В изобретении также предложены способы получения полипептида активируемого антитела к CD166 путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии полипептида, где клетка содержит молекулу выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или АА, описанные в данном документе, и или векторы, которые содержат эти последовательности выделенных нуклеиновых кислот. В изобретении предложены способы получения антитела и/или АА путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или АА, описанные в данном документе, и/или векторы, которые содержат эти последовательности выделенных нуклеиновых кислот.

[0250] В изобретении также предложен способ производства АА, которые в активированном состоянии связывают CD166, путем (a) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую АА, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, при этом АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывает CD166, (i) где СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы; и (ii) где СМ расположен в АА таким образом, что, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, ММ препятствует специфическому связыванию АВ с CD166, а в расщепленном состоянии ММ не препятствует специфическому связыванию АВ с CD166 и не конкурирует с ним; и (b) выделения активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

[0251] Следующие иллюстративные нуклеотидные последовательности предложены для создания и применения АА и конъюгированных АА, предложенных в данном документе.

Также предложены нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, 95% или даже 99% гомологичны нуклеотидным последовательностям, представленным ниже.

SEQ ID NO: 241, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239
Тяжелая цепь α CD166 человека (HuCD166_HcC) - нуклеотидная последовательность
CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACCCACCCAGACCCTGAC
CCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTG
GATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCG
AGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCACCAAGGACACC
TCCAAGAACCAGGTGGTGCTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCAC
CTACTACTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCA
GGGCACACTGGTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCT
GGCCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
AGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGG
AGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGAC
CCACACCTGTCCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTG
TTCCCCCCTAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCC
ACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCA
TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGC
CGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTA
CCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGA
CCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG

SEQ ID NO: 481, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480
Тяжелая цепь α CD166 человека (HuCD166_HcC) – нуклеотидная последовательность Des-HC

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACCCACCCAGACCCTGAC
CCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTG
GATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCG
AGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCACCAAGGACACC
TCCAAGAACCAGGTGGTGCTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCAC
CTACTACTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCA
GGGCACACTGGTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCT
GGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
AGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGG
AGTGACACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGAC
CCACACCTGTCCCCCCTGCCCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTG
TTCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCC
ACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCA
TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGC
CGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTA
CCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCCTTCTGTACTCCAAGCTGA
CCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

SEQ ID NO: 247, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246
Легкая цепь α CD166 человека (спейсер-ММ-LP1-СМ-LP2-Ab)

[спейсер (SEQ ID NO: 319)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 315)]

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC][CTGTGTACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGT
CCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCAC
CTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACC
CAGTCCCCCCTGTCCCTGCCCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGT

CCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGA
AGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCG
TGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCC
GGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAACTGCCC
TACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTC
CGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGT
CTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA
ACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTC
CTTCAACCGGGGCGAGTGC]

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

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

huCD166Lcl_7614.6_3001

CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCC
TCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCT
GACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCCGTG
ACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCA
ACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGC
TGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTG
GCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGC
GTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAAGTGCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAA
GCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGA
CGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCC
CCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCC
AGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC
TGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACC
CACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 319, нуклеотидная кодирующая последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 305 Спейсер

CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC

Терапевтическое применение активируемых антител , и конъюгированных активируемых антител

[0252] В изобретении предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166 у субъекта, использующего AA, которые связывают CD166, в частности AA, которые связывают и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере, одну биологическую активность CD166 и/или CD166-опосредованного сигналинга.

[0253] В изобретении также предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют CD166 или aberrантно экспрессируют CD166 у субъекта, использующего AA, которые связывают CD166, в частности AA, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, которые экспрессируют или aberrантно экспрессируют CD166.

[0254] В изобретении также предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта с использованием AA, которые связывают CD166, особенно AA, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, экспрессирующих CD166.

[0255] В изобретении также предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые aberrантно экспрессируют CD166 у субъекта с использованием AA, которые связывают CD166, особенно AA, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, которые aberrантно экспрессируют CD166.

[0256] В изобретении также предложены способы предотвращения, отсрочки прогрессирования, лечения, облегчения симптомов или иного облегчения рака у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166, антитела и/или

конъюгированного активируемого антитела к CD166, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту.

[0257] В изобретении также предложены АА, которые связывают CD166, в частности АА, которые связывают и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность CD166 и/или сигналинга CD166, для использования в лечении, предотвращении и/или отсрочке появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, у субъекта.

[0258] В изобретении также предложены АА, которые связывают CD166, в частности, АА, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, которые экспрессируют или aberrантно экспрессируют CD166, для использования в лечении, предотвращении и/или отсрочке появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют или aberrантно экспрессируют CD166, у субъекта.

[0259] В изобретении также предложены антитело к CD166, конъюгированное антитело к CD166, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166, описанные в данном документе, для применения в предотвращении, замедлении прогрессирования, лечении, облегчении симптомов, или иного снижения проявлений рака у субъекта, при этом антитело предназначено для введения в терапевтически эффективном количестве.

[0260] В качестве неограничивающего примера, АА по данному изобретению можно использовать для лечения, предотвращения и/или задержки появления или прогрессирования эпителиального или плоскоклеточного рака, карциноида и/или нейроэндокринного рака. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, аденокарциному, рак желчных протоков (желчного протока), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, например, трижды негативный рак молочной железы, Her2-негативный рак молочной железы, положительный по рецепторам эстрогена рак молочной железы; карциноидный рак; рак шейки матки; холангиокарциному; колоректальный рак; рак эндометрия; глиому; рак головы и шеи, например, плоскоклеточный рак головы и шеи; лейкемию; рак печени; рак легкого, например, НМРЛ, МРЛ; лимфому; меланому; рак пищевода; рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы, например, метастатическую кастрационно-резистентную карциному предстательной железы; рак почек; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; и уротелиальный рак.

[0261] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой эпителиальный рак или плоскоклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак шейки матки, рак ротоглотки и/или рак головы и шеи.

[0262] В некоторых вариантах осуществления 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 легкого, меланому, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почек, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, урогенитальный рак и/или уротелиальный рак.

[0263] В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из трижды негативного рака молочной железы (TNBC), немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), мелкоклеточного рака легкого (МРЛ), мутантной по Ras колоректальной карциномы, редкой формы эпителиального рака, рака ротоглотки, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ) и/или рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак связан с опухолью, экспрессирующей CD166. В некоторых вариантах осуществления рак вызван опухолью, экспрессирующей CD166.

[0264] Антитело к CD166, конъюгированное антитело к CD166, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166, используемые в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить 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.

[0265] В иллюстративных вариантах осуществления субъект имеет или предположительно имеет карциному молочной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (КРРПЖ), холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ) и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

[0266] В иллюстративных вариантах осуществления субъект имеет или предположительно имеет поражение кожи. В некоторых вариантах осуществления поражение кожи представляет собой кожные метастазы.

[0267] Как предусмотрено в данном документе, субъект, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек, отличный от человека примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное,

рабочее животное или животное из зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, находящееся на попечении ветеринара.

[0268] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий карциному молочной железы, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет экспрессирующую рецептор эстрогена (ER+) опухоль, и должен был получать антигормональную терапию и у него наблюдалось прогрессирование заболевания до лечения АА по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий карциному молочной железы, который получает АА по данному изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет трижды негативную карциному молочной железы (TNBC) и получал ≥ 2 предшествующих линий терапии до лечения АА по настоящему изобретению.

[0269] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, который получает АА по данному изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получал более 1 предшествующей терапии перед лечением АА по настоящему изобретению.

[0270] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий холангиокарциному, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, потерпели неудачу в ≥ 1 предшествующей линии гемцитабин-содержащей схемы до лечения АА по настоящему изобретению.

[0271] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеет или предположительно имеет карциному эндометрия, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получал ≥ 1 платиносодержащей схемы для заболевания придатков матки или запущенного заболевания перед лечением АА по настоящему изобретению.

[0272] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий эпителиальную карциному яичников, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, либо имеет мутацию, не связанную с раком молочной железы (BRCA) (зародышевую или соматическую), или имеет неизвестный мутационный статус BRCA и имеет резистентную к платине или рефрактерную к платине карциному яичников. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий эпителиальную карциному яичников,

который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, имеет мутацию BRCA и является рефрактерным к ингибиторам PARP или иным образом не подходит для них.

[0273] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий ПКГШ, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получил ≥ 1 платиносодержащую схему и ингибитор PD-1/PD-L1 (если он одобрен по показаниям для субъектов в их регионе) перед лечением АА по настоящему изобретению.

[0274] В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий или предположительно имеющий НМРЛ, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, получал ≥ 1 платиносодержащую схему до лечения АА по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему или предположительно имеющему НМРЛ, который получает АА по настоящему изобретению, например, комбинацию 55 или комбинацию 60, ранее вводили ингибитор контрольной точки (если он одобрен по показаниям для субъектов в их регионе) перед лечением АА по настоящему изобретению.

[0275] В некоторых вариантах осуществления субъект, у которого имеется любое из следующего, может не иметь права на получение АА по настоящему изобретению для лечения карциномы молочной железы, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (КРРПЖ), холангиокарциномы, карциномы эндометрия, эпителиальной карциномы яичников, ПКГШ и НМРЛ: активное или хроническое заболевание роговицы, трансплантация роговицы в анамнезе, активный герпетический кератит и активные глазные заболевания, требующие постоянного лечения/наблюдения; серьезное сопутствующее заболевание, включая клинически значимую активную инфекцию; история или текущие активные аутоиммунные заболевания; серьезное сердечное заболевание, такое как недавно перенесенный инфаркт миокарда, рассеянный склероз или другое демиелинизирующее заболевание в анамнезе, синдром Итона-Ламберта (паранеопластический синдром), геморрагический или ишемический инсульт в анамнезе в течение последних 6 месяцев, или алкогольная болезнь печени; незаживающие раны или язвы, за исключением язвенных поражений, вызванных лежащим в их основе новообразованием; история тяжелых аллергических или анафилактических реакций на предыдущую терапию моноклональными антителами; в настоящее время получает антикоагулянтную терапию варфарином; или серьезное хирургическое вмешательство (требующее общей анестезии) в течение 3 месяцев до введения дозы.

[0276] Активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или предрасположенному к заболеванию или нарушению, связанному с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, связанному с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, имеющих рак или другое неопластическое состояние, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья.

[0277] Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если достигается любая из множества лабораторных или клинических задач. Например, введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчаются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессируют дальше, то есть до более худшего состояния. Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует дальше, то есть до худшего состояния.

[0278] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или подверженному заболеванию или нарушению, например, субъектам, имеющим рак или другое неопластическое состояние, при котором пораженные клетки субъекта экспрессируют CD166. В некоторых вариантах

осуществления пораженные клетки связаны с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъект, имеющий или предрасположенный к заболеванию или нарушению, при котором пораженные клетки субъекта экспрессируют CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, имеющих рак или другое неопластическое состояние, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья.

[0279] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или подверженному заболеванию или нарушению, связанному с клетками, экспрессирующими CD166, или наличием, ростом, пролиферацией, метастазированием, и/или активностью таких клеток, например, у субъектов, имеющих рак или другие неопластические состояния. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с aberrантной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, связанного с клетками, экспрессирующими CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, имеющих рак или другое неопластическое состояние, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья.

[0280] Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если достигается любая из множества лабораторных или

клинических задач. Например, введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчаются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессируют дальше, то есть до более худшего состояния. Введение антитела к CD166, конъюгированного антитела к CD166, активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими CD166, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует дальше, то есть до худшего состояния.

[0281] В некоторых вариантах осуществления 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 иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) вводят одновременно. Например, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) могут быть составлены в виде одной композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) вводят последовательно.

[0282] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела к CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела к CD166, описанные в данном документе, используются в комбинации с одним или более дополнительными агентами или комбинацией дополнительных агентов. Подходящие дополнительные агенты включают современные фармацевтические и/или хирургические методы лечения для предполагаемого применения, такого как, например, для лечения рака. Например, антитела к CD166, конъюгированные антитела к CD166, активируемые антитела к CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела к CD166 могут использоваться в комбинации с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым агентом.

[0283] В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент (а) представляет собой химиотерапевтический агент, такой как химиотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из доцетаксела, паклитаксела, абраксана (т.е. паклитаксела,

конъюгированного с альбумином), доксорубицина, оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, иринотекана, и гемцитабина.

[0284] В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(-ы) представляет собой ингибитор контрольной точки, ингибитор киназы, нацеленные на агенты ингибиторы в микроокружении опухоли и/или агонист Т- или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(-ы) представляет собой лучевую терапию, отдельно или в комбинации с другим дополнительным агентом(-ами), таким как химиотерапевтический или противоопухолевый агент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(-ы) представляет собой вакцину, онковирус и/или активирующий ДК агент, такой как, в качестве неограничивающего примера, агонист Толл-подобного рецептора (TLR) и/или α -CD40. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(-ы) представляет собой нацеленное на опухоль антитело, разработанное для уничтожения опухоли посредством АЗКЦ или посредством прямой конъюгации с токсином (например, конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC)).

[0285] В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAFi, MEKi и Btk, таких как ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор микроокружения опухоли выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора α -CSF1R, ингибитора α -CCR4, ТФР-бета, супрессорной клетки миелоидного происхождения или регуляторной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления агонист выбран из группы, состоящей из Oх40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

[0286] В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CD166. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B7H4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B-RAFi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор MEKi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор

Btk. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор IDO. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор α -CSF1R. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор α -CCR4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ТФР-бета. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой регуляторную Т-клетку.

[0287] В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой Oх40. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой CD137. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой ICOS. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой CD27. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой HVEM.

[0288] В некоторых вариантах осуществления АА и/или конъюгированные АА вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими как, например, химиотерапевтический агент, противовоспалительный агент и/или иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент составляют в виде единой терапевтической композиции, и активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент отделены друг от друга, например, каждое из них составлено 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 разное время 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 в чередующемся порядке. Как описано в данном документе, активируемое антитело к CD166 и/или

конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят в виде однократных или множественных доз.

[0289] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) вводят одновременно. Например, активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) могут быть составлены в виде одной композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент(-ы) вводят последовательно, или активируемое антитело к CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело к CD166 и дополнительный агент вводят в разное время в течение курса лечения.

[0290] В некоторых вариантах осуществления 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 иммунодепрессант, такой как алкилирующий агент, антиметаболит, антимикротрубочковый агент, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический антибиотик и/или любой другой повреждающий нуклеиновые кислоты агент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой таксан, такой как паклитаксел (например, Abрахане®). В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой антиметаболит, такой как гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой алкилирующий агент, такой как химиотерапевтический агент на основе платины, такой как карбоплатин или цисплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой направленный агент, такой как ингибитор киназы, например, сорафениб или эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой направленный агент, такой как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой ингибитор протеасом, такой как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой иммуномодулирующий агент, такой как леналидомид или ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой ионизирующее излучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент,

который специалисты в данной области техники считают стандартным для лечения. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой химиотерапевтический агент, хорошо известный специалистам в данной области техники.

[0291] В некоторых вариантах осуществления 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 другой конъюгированное АА или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления 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 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, например, к CD166. В некоторых вариантах осуществления 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.

[0292] В некоторых вариантах осуществления 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, домен антитела, одноцепочечный, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело с тяжелыми цепями или однодоменное антитело с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления 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 мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[0293] Следует понимать, что введение терапевтических единиц в соответствии с изобретением будет осуществляться с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, Глава 87 авторства Blaug, Seymour, вышеуказанного источника. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии 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 подходить для лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом и состав является физиологически совместимым и переносимым с путем введения. 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 на них для получения дополнительной информации, касающейся составов, эксципиентов и носителей, хорошо известных химикам-фармацевтам.

[0294] Терапевтические композиции по настоящему изобретению, которые содержат активируемое антитело к CD166, такое как, в качестве неограничивающего примера, АА и/или конъюгированное АА, используются для предотвращения, лечения или иного облегчения заболевания или расстройства, связанного с нарушенной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические композиции по настоящему изобретению, которые содержат АА и/или конъюгированное активируемое антитело, используются для лечения или иного облегчения рака или другого неопластического состояния, воспаления, воспалительного расстройства и/или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое новообразование, в котором экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, в которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое новообразование, в котором экспрессируется мишень. В некоторых

вариантах осуществления мишень экспрессируется на паренхиме (например, при раке, части органа или ткани, которая часто выполняет функцию(-и) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на клетке, ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на строме (т. е. соединительной поддерживающей структуре клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на эндотелии (сосудистой сети). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на раковой стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления агент, с которым конъюгировано АА, представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления, агент, с которым АА конъюгировано, представляет собой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту.

[0295] Эффективность предотвращения, облегчения или лечения определяют в связи с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, такими как, например, нарушенная экспрессия и/или активность мишени. Увеличение выживаемости субъекта или иное замедление прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, например, нарушенной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта указывает на то, что АА и/или конъюгированное АА вызывают улучшение клинических показателей.

[0296] АА и/или конъюгированное АА можно вводить в форме фармацевтических композиций. Основные идеи и рекомендации по получению таких композиций, а также рекомендации по выбору компонентов приведены, например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

[0297] В некоторых вариантах осуществления, где используются фрагменты антител, выбирается наименьший фрагмент, который специфично связывается со связывающим доменом целевого белка. Например, на основе последовательностей вариабельной области антитела могут быть сконструированы пептидные молекулы, которые сохраняют способность связываться с последовательностью целевого белка. Такие пептиды можно синтезировать химическим путем и/или получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК. (См, например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889–7893 (1993)). Композиция также может содержать более одного активного соединения, если это

необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, например, в некоторых вариантах осуществления соединения с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления или дополнительно композиция может содержать агент, усиливающий ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы присутствуют в надлежащей комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемого применения.

[0298] Активные ингредиенты могут также быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях.

[0299] Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

[0300] Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы представлены в форме, *например* пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, обеспечивают возможность высвобождения молекул дольше 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

Диагностическое применение

[0301] В изобретении 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, в

изобретении предусмотрены способы и наборы для обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и представляющей интерес мишени у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или образца с активируемым антителом к CD166, где AA к CD166 содержит маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM), который расщепляется с помощью расщепляющего агента, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (AB), который специфично связывает представляющую интерес мишень, где AA к CD166 в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с CD166, и где MM не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) где, 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 и не конкурирует с ним; и (ii) измерение уровня активированного AA к CD166 у субъекта или в образце, где выявляемый 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 где не выявляемый уровень активированного AA к CD166 у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент, CD166 или и расщепляющий агент, и CD166 отсутствуют у субъекта или в образце.

[0302] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 представляет собой активируемое антитело к CD166, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 не конъюгировано со агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к CD166 содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела к CD166 у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0303] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело к CD166 содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов выявляемая метка включает визуализирующий агент,

контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов визуализирующий агент содержит радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастирующий агент содержит йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов флуоресцентная метка включает 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. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка включает производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка содержит метку Alexa Fluor[®], например, Alex Fluor[®] 680 или Alexa Fluor[®] 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптенов.

[0304] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления этих способов субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, не являющийся человеком, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное из зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

[0305] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vitro*.

[0306] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов способ используется для идентификации или другого уточнения популяции пациентов, подходящих для лечения с помощью АА к CD166 по настоящему изобретению, с последующим лечением путем введения этого активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166 субъекту, нуждающемуся в этом.

Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень (например, CD166), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) АА к CD166, исследуемые этими способами, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким АА к CD166, содержащим такой СМ, и пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество исследуемого активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела к CD166. Аналогично, пациенты, у которых был отрицательный результат теста на одну или обе мишени (*например*, CD166) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, исследуемые с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с другими АА к CD166 до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА к CD166 для лечения (например, АА к CD166, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела к CD166 и/или конъюгированного антитела, на которое тест пациента дал положительный результат. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любые АВ, ММ и/или СМ, описанные в данном документе.

[0307] В некоторых вариантах осуществления АА и/или конъюгированное АА содержат выявляемую метку. Используется интактное антитело или его фрагмент (*например*, Fab, scFv или F(ab)₂). Термин «меченый» в отношении зонда или антитела предназначен для охвата прямого мечения зонда или антитела путем связывания (*т. е.* физического связывания) выявляемого вещества с зондом или антителом, а также непрямого мечения зонда или антитела путем реактивности с другим реагентом, который является прямо меченым. Примеры непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с использованием вторичного антитела с флуоресцентной меткой и мечение по концу ДНК-зонда биотином, чтобы его можно было обнаруживать с помощью стрептавидина с флуоресцентной меткой. Термин «биологический образец» включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные у субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, присутствующие внутри субъекта. Таким образом, термин «биологический образец» включает кровь и часть или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. То есть способ обнаружения согласно настоящему описанию можно использовать для обнаружения мРНК, белка или геномной ДНК анализируемого вещества в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, методы обнаружения мРНК анализируемого вещества *in vitro* включают гибридизацию по Нозерну и гибридизацию *in situ*. Методы выявления анализируемого белка *in vitro* включают твердофазный

иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Методы обнаружения геномной ДНК анализируемого вещества *in vitro* включают гибридизацию по Саузерну. Процедуры проведения иммуноанализов описаны, например, в “ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методы обнаружения анализируемого белка *in vivo* включают введение субъекту меченого антитела против анализируемого белка. Например, антитело может быть меченым радиоактивным маркером, присутствие и расположение которого у субъекта можно определить стандартными методами визуализации.

[0308] Соответственно, АА и конъюгированные АА по настоящему изобретению также можно использовать в различных диагностических и профилактических композициях. В одном варианте осуществления АА и/или конъюгированное АА вводят субъектам, которые подвержены риску развития одного или нескольких из вышеупомянутых расстройств. Предрасположенность субъекта или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых расстройств может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[0309] В некоторых вариантах осуществления изобретения АА и/или конъюгированное АА вводят людям, у которых диагностировано клиническое проявление, связанное с одним или несколькими из вышеупомянутых расстройств. После постановки диагноза вводят АА и/или конъюгированное АА, чтобы смягчить или обратить вспять эффекты клинического показания.

[0310] Активируемое антитело и/или конъюгированное АА согласно настоящему описанию также можно использовать для обнаружения мишени в образцах субъектов и, соответственно, использовать в качестве диагностики. Например, антитела и/или активируемые антитела и их конъюгированные версии по настоящему изобретению используются в анализах *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения уровней мишени в образце субъекта.

[0311] В одном варианте осуществления АА и/или конъюгированное АА по настоящему изобретению иммобилизованы на твердой подложке (например, лунке(-ах) микротитрационного планшета). Иммобилизованное АА и/или конъюгированное АА служат в качестве улавливающих антител для любой мишени, которая может присутствовать в исследуемом образце. Перед контактом иммобилизованного

активируемого антитела и/или его конъюгированных версий с исследуемым образцом твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифичной адсорбции анализируемого вещества.

[0312] Затем лунки обрабатывают исследуемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, *например*, образец сыворотки крови от субъекта с подозрением на наличие уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После промывания исследуемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, которое мечено выявляемым образом. Меченое вторичное антитело служит антителом для обнаружения. Измеряют уровень выявляемой метки, и концентрацию целевого антигена в образце для испытаний определяют путем сравнения со стандартной кривой, построенной для стандартных образцов.

[0313] Следует принимать во внимание, что на основе результатов, полученных с использованием АА согласно настоящему изобретению, и их конъюгированных версий в диагностическом анализе *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта на основе уровней экспрессии целевого антигена. Для данного заболевания берут образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или различные моменты терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, определяют диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристикой каждой стадии.

[0314] АА и/или конъюгированное АА также могут использоваться в методах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, АА, содержащие ферментативно расщепляемый СМ, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие АА могут использоваться в диагностике, которая может включать обнаружение *in vivo* (*например*, качественное или количественное) активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления, среду с повышенным потенциалом восстановления, такую как та, которая может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измеренного накопления

активированных антител (т. е. антител, возникающих в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань проявляет ферментативную активность (или повышенный потенциал восстановления в зависимости от природы СМ), но также и на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

[0315] Например, СМ может быть выбран в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы, обнаруженной в месте опухоли, в месте вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном сайте (например, таком как абсцесс, в органе и т. п.) и т. п. АВ может быть таким, которое связывает целевой антиген. Используя способы, описанные в данном документе, или, когда это уместно, способы, знакомые специалисту в данной области техники, выявляемая метка (*например*, флуоресцентная метка, или радиоактивная метка, или радиоактивный индикатор) может быть конъюгирована с АВ или другим участком антитела и/или активируемого антитела. Подходящие выявляемые метки обсуждаются в контексте вышеупомянутых методов скрининга, а дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При использовании АВ, специфичного к белку или пептиду болезненного состояния, вместе с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в интересующей пораженной ткани, АА будут демонстрировать повышенную скорость связывания с пораженной тканью по сравнению с тканями, где СМ-специфичный фермент отсутствует на выявляемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку малые белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, и поскольку фермент, специфичный для СМ, отсутствует на выявляемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в здоровых тканях, либо присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной ткани увеличивается по сравнению с здоровыми тканями.

[0316] В другом примере АА можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, АА можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению расщепляющим агентом, АА можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия восстановительных условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих способах, АА могут быть помечены выявляемой меткой и могут быть связаны с подложкой (*например*,

твердой подложкой, такой как предметное стекло или шарик). Выявляемая метка может быть расположена на части АА, которая не высвобождается после расщепления, например, выявляемая метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не выявляется до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может быть проведен, например, путем введения в контакт иммобилизованных, выявляемым образом меченых АА с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для возникновения расщепления, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязнений. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивается по изменению выявляемого сигнала АА до контакта с образцом, например, по наличию и/или увеличению выявляемого сигнала из-за расщепления АА расщепляющим агентом в образце.

[0317] Такие методы обнаружения могут быть адаптированы для обеспечения обнаружения присутствия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ из АА при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего агента и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по присутствию и/или увеличению выявляемой метки АА, как описано выше, а присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем выявления комплекса мишень-АВ, *например*, с использованием выявляемым образом меченного антитела против мишени.

[0318] АА также пригодны при визуализации *in situ* для подтверждения активации АА, *например*, путем расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой метод, который позволяет локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. Используя этот метод, можно подтвердить как связывание с заданной мишенью, так и протеолитическую активность на основе присутствия выявляемой метки (например, флуоресцентной метки).

[0319] Эти методы применимы для любых замороженных клеток или тканей, полученных из очага заболевания (*например*, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти методы также пригодны для свежих образцов клеток или тканей.

[0320] В этих методах АА метят с помощью выявляемой метки. Выявляемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель в

ближней инфракрасной области (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).

[0321] Выявление метки в образце, который был инкубирован с меченым АА, указывает на то, что образец содержит мишень и протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с помощью ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с помощью агента, специфичного для протеазы, например, антитела, такого как A11, которое специфично для протеазы матрипазы и подавляет протеолитическую активность матрипазы; см., например, международный номер публикации WO 2010/129609, опубликованной 11 ноября 2010 г. Тот же подход с использованием ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные в данном документе, и/или с использованием более селективного ингибирующего агента можно использовать для идентификации протеазы, которая специфична для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, *например*, другого антитела, или выявляемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления немеченое АА может быть использовано с выявлением меченым вторичным антителом или более сложной системой выявления.

[0322] Подобные методики также применимы для визуализации *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, *например*, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что очаг заболевания содержит мишень и протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела.

[0323] Эти методики также применимы в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе протеаз-специфичного СМ в активируемом антителе.

[0324] В изобретении представлены способы использования АА при различных диагностических и/или профилактических показаниях. Например, в изобретении предусмотрены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и представляющей интерес мишени у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или образца с активируемым антителом, где АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется с помощью расщепляющего агента, например, протеазы, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает представляющую интерес мишень, где АА

в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии MM препятствует специфичному связыванию AB с мишенью, а в расщепленном, активированном состоянии MM не препятствует специфичному связыванию AB с мишенью и не конкурирует с ним; и (ii) измерение уровня активированного AA у субъекта или в образце, где выявляемый уровень активированного AA у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в образце, и где не выявляемый уровень активированного AA у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или и расщепляющий агент, и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления AA представляет собой AA, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления AA не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления AA содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня AA у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0325] Настоящее изобретение также предусматривает способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или образца с AA в присутствии представляющей интерес мишени, например, мишени, где AA содержит маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM), который расщепляется расщепляющим агентом, например, протеазой, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (AB), который специфично связывает представляющую интерес мишень, где AA в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) где в нерасщепленном,

неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном, активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью и не конкурирует с ним; и (ii) измерение уровня активированного АА у субъекта или в образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и где не выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0326] В изобретении также предусмотрены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере АА, которое содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется с помощью расщепляющего агента, например, протеазы, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает представляющую интерес мишень, где АА в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном, активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью и не конкурирует с ним; и (ii) измерение уровня активированного АА у субъекта или в образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и где не выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в образце указывает на то,

что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0327] В изобретении также предусмотрены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или образца с активируемым антителом, где АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется с помощью расщепляющего агента, например, протеазы, его антигенсвязывающий домен (АВ), который специфично связывает мишень и выявляемую метку, где АА в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном, активированном состоянии ММ не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью и не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня выявляемой метки у субъекта или в образце, где выявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце, и где невыявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с

активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0328] В изобретении также представлены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА (например, АА, с которым конъюгирован терапевтический агент), описанное в данном документе, для использования при контакте с субъектом или биологическим образцом, и средства для определения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, где определяемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и где не выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или как расщепляющий агент, так и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют в субъекте или биологическом образце, так что целевое связывание и/или расщепление протеазой АА не может быть выявлено у субъекта или в биологическом образце.

[0329] В изобретении также предусмотрены способы обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) приведения в контакт субъекта или биологического образца с АА в присутствии мишени и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на выявляемом уровне, так что расщепление протеазой АА 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 его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, при этом АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ АА в нерасщепленном состоянии

препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, и где ММ АА в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка присоединена к N-концу СМ к сайту расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления единственный антигенсвязывающий сайт АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению имеет по меньшей мере два сайта связывания антигена, по меньшей мере один сайт связывания антигена замаскирован и по меньшей мере один сайт связывания антигена не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все сайты связывания антигена замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает использование вторичного реагента, содержащего выявляемую метку.

[0330] В изобретении также предоставлены наборы для применения в способах обнаружения наличия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в данном документе, для использования при контакте с субъектом или биологическим образцом с АА в присутствии мишени и измерения уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на выявляемом уровне, так что расщепление протеазой АА 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 его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, при этом АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ АА в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, и где ММ АА в расщепленном (т. е.

активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка присоединена к N-концу СМ к сайту расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления единственный антигенсвязывающий сайт АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению имеет по меньшей мере два сайта связывания антигена, по меньшей мере один сайт связывания антигена замаскирован и по меньшей мере один сайт связывания антигена не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все сайты связывания антигена замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает использование вторичного реагента, содержащего выявляемую метку.

[0331] В изобретении также представлены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце, где наборы включают по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в данном документе, для использования при контакте с субъектом или биологическим образцом и средством для определения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, где АА включает выявляемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце, так что целевое связывание и/или расщепление протеазой АА не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где невыявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце на выявляемом уровне.

[0332] В изобретении представлены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где АА содержит выявляемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ, и (ii) измерения уровня активированного АА у субъекта или в биологическом образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или как расщепляющий агент, так и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют 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 где сниженный выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженный уровень выявляемой метки представляет собой, например, уменьшение на около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% и/или около 100%. Такое АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, при этом АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ; и (б) где ММ АА в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, и где ММ АА в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0333] В изобретении также представлены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в данном документе, для использования при контакте с субъектом или биологическим образцом и средством для определения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, где выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или и расщепляющий агент, и мишень отсутствуют и/или

недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что целевое связывание и/или расщепление протеазой АА не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный выявляемый уровень активированного АА у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженный уровень выявляемой метки представляет собой, например, уменьшение на около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% и/или около 100%.

[0334] В изобретении также представлены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) введения в контакт субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где АА включает выявляемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерения уровня выявляемой метки у субъекта или в биологическом образце, где выявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на выявляемом уровне, так что расщепление протеазой АА не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где сниженный выявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце. Пониженный уровень выявляемой метки представляет собой, например, уменьшение на около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% и/или около 100%. Такое АА содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и его антигенсвязывающий домен или фрагмент (АВ), который специфично связывает мишень, при этом АА в нерасщепленном (т. е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ АА в нерасщепленном состоянии препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью, и где ММ АА в расщепленном (т. е. активированном) состоянии не препятствует специфичному связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым

конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0335] В изобретении также представлены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия представляющего интерес расщепляющего агента у субъекта или в образце, где наборы включают по меньшей мере АА и/или конъюгированное АА, описанные в данном документе, для использования при контакте с субъектом или биологическим образцом и средством для определения уровня активированного АА и/или конъюгированного АА у субъекта или в биологическом образце, где АА включает выявляемую метку, которая расположена на части АА, которая высвобождается после расщепления СМ, где выявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или и расщепляющий агент, и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что целевое связывание и/или расщепление протеазой АА не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный выявляемый уровень выявляемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженный уровень выявляемой метки представляет собой, например, уменьшение на около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% и/или около 100%.

[0336] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов выявляемая метка включает визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов визуализирующий агент содержит радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастирующий агент содержит йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих

способов и наборов фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов флуоресцентная метка включает 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. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка включает производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка содержит метку Alexa Fluor[®], например, Alex Fluor[®] 680 или Alexa Fluor[®] 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптеннов.

[0337] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, не являющийся человеком, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное из зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

[0338] В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vitro*.

[0339] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* пригодны в способах идентификации субъектов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ* АА используются для скрининга образцов субъектов для идентификации субъектов, имеющих соответствующую протеазу(-ы) и мишень(-и) в соответствующем месте, *например*, в месте опухоли.

[0340] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения с помощью АА по изобретению. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) исследуемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого АА, содержащего такой СМ. Аналогично, субъекты, у которых был отрицательный

результат теста на одну или обе мишени (*например*, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, исследуемые с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления такие субъекты, у которых тест является отрицательным в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими другие СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем субъекту вводят терапевтически эффективное количество АА, на которое субъект дал положительный результат.

[0341] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения с помощью АА по изобретению. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) исследуемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого АА, содержащего такой СМ. Аналогично, субъекты с отрицательным результатом теста могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления такие субъекты, у которых тест является отрицательным в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими другие СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем субъекту вводят терапевтически эффективное количество АА, на которое субъект дал положительный результат.

[0342] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, то способ или набор используется для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения АА согласно изобретению. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) исследуемого АА такими способами, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого АА, содержащего такой СМ. Аналогично, субъекты, у которых был отрицательный результат теста на обе мишени (*например*, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, исследуемые с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах

осуществления таких субъектов можно тестировать с другими АА до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления субъекты, у которых тест отрицательный на любую из мишеней (*например*, мишень), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким АА, содержащим такой СМ. В некоторых вариантах осуществления субъекты, у которых тест отрицательный на любую из мишеней (*например*, мишень), идентифицируются как неподходящие кандидаты для лечения таким АА, содержащим такой СМ. В некоторых вариантах осуществления таких субъектов можно тестировать с другими АА до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой АА, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления АА не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления АА содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня АА у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфично связывается с активированным антителом, причем реагент содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее выявляемую метку.

[0343] В некоторых вариантах осуществления способ или набор используются для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения АА против мишени и/или конъюгированным АА (например, АА, с которым конъюгирован терапевтический агент) согласно изобретению, с последующим лечением путем введения этого АА и/или конъюгированного АА субъекту, нуждающемуся в этом. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишени (*например*, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) АА и/или конъюгированного АА, исследуемые этими способами, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким антителом и/или таким конъюгированным АА, содержащим такой СМ, и субъекту затем вводят терапевтически эффективное количество исследуемого АА и/или конъюгированного АА. Аналогично, субъекты, у которых был отрицательный результат теста на одну или обе мишени (*например*, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, исследуемые с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких субъектов можно исследовать с другим антителом и/или

конъюгированным АА до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее антитело и/или конъюгированное АА для лечения (*например*, АА и/или конъюгированное АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем субъекту вводят терапевтически эффективное количество АА и/или конъюгированного АА, на которые субъект дал положительный результат.

[0344] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов ММ представляет собой пептид, имеющий длину от около 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АА содержит линкерный пептид, в котором линкерный пептид расположен между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АА содержит линкерный пептид, в котором линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот, и каждый из LP1 и LP2 не обязательно должен быть одним и тем же линкером. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов один или оба LP1 и LP2 содержат глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n является целым числом, равным по меньшей мере одному. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую формулу (GGS)_n, где n является целым числом, равным по меньшей мере одному. В некоторых вариантах осуществления 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).

[0345] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из представленных в данном документе последовательностей перекрестно-реактивных антител. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ включает фрагмент Fab, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

[0346] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов расщепляющий агент представляет собой протеазу, которая совместно локализована в субъекте или образце с мишенью, а СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы, при этом протеаза расщепляет СМ в АА, когда АА подвержено воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ связывается с N-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ связывается с С-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ связывается с N-концом VL-цепи АВ.

[0347] Антитела, конъюгированные антитела, АА и конъюгированные АА по настоящему изобретению используются в диагностических и профилактических композициях. В одном варианте осуществления АА вводят субъектам, которые подвержены риску развития одного или нескольких из вышеупомянутых воспалений, воспалительных расстройств, рака или других расстройств.

[0348] Предрасположенность субъекта или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых расстройств может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[0349] В некоторых вариантах осуществления изобретения АА и/или конъюгированное АА вводят людям, у которых диагностировано клиническое проявление, связанное с одним или несколькими из вышеупомянутых расстройств. После постановки диагноза вводят АА и/или конъюгированное АА, чтобы смягчить или обратить вспять эффекты клинического показания.

[0350] Антитела, конъюгированные антитела, АА и/или конъюгированные АА согласно настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения мишени в образцах субъектов и, соответственно, использовать в качестве диагностики. Например, антитела, конъюгированные антитела, АА и/или конъюгированные АА по настоящему изобретению используются в анализах *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения уровней мишени в образце субъекта.

[0351] В одном варианте осуществления антитело и/или АА по настоящему изобретению иммобилизованы на твердой подложке (например, лунке(-ах) микротитрационного планшета). Иммобилизованное антитело и/или АА служат в качестве улавливающих антител для любой мишени, которая может присутствовать в исследуемом образце. Перед контактом иммобилизованного антитела и/или АА с исследуемым образцом твердую

подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифичной адсорбции анализируемого вещества.

[0352] Затем лунки обрабатывают исследуемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, *например*, образец сыворотки крови от субъекта с подозрением на наличие уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После промывания исследуемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, которое мечено выявляемым образом. Меченое вторичное антитело служит антителом для обнаружения. Измеряют уровень выявляемой метки, и концентрацию целевого антигена в образце для испытаний определяют путем сравнения со стандартной кривой, построенной для стандартных образцов.

[0353] Следует принимать во внимание, что на основе результатов, полученных с использованием антител и/или АА согласно настоящему изобретению в диагностическом анализе *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта на основе уровней экспрессии целевого антигена. Для данного заболевания берут образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или различные моменты терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, определяют диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристикой каждой стадии.

[0354] Антитела, конъюгированные антитела, АА и/или конъюгированные АА также могут использоваться в методах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, АА, содержащие ферментативно расщепляемый СМ, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие АА могут использоваться в диагностике, которая может включать обнаружение *in vivo* (*например*, качественное или количественное) активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления, среду с повышенным потенциалом восстановления, такую как та, которая может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измеренного накопления активированных антител (т. е. антител, возникающих в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного

организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань проявляет ферментативную активность (или повышенный потенциал восстановления в зависимости от природы СМ), но также и на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

[0355] Например, СМ может быть выбран в качестве субстрата для протеазы, обнаруженной в месте опухоли, в месте вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном сайте (например, таком как абсцесс, в органе и т. п.) и т. п. АВ может быть таким, которое связывает целевой антиген. Используя способы, знакомые специалисту в данной области техники, выявляемая метка (*например*, флуоресцентная метка, или радиоактивная метка, или радиоактивный индикатор) может быть конъюгирована с АВ или другим участком активируемого антитела. Подходящие выявляемые метки обсуждаются в контексте вышеупомянутых методов скрининга, а дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При использовании АВ, специфичного к белку или пептиду болезненного состояния, вместе с протеазой, активность которой повышена в интересующей пораженной ткани, АА будут демонстрировать повышенную скорость связывания с пораженной тканью по сравнению с тканями, где СМ-специфичный фермент отсутствует на выявляемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной ткани, или неактивен (*например*, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку малые белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, и поскольку фермент, специфичный для СМ, отсутствует на выявляемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в здоровых тканях, либо присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной ткани увеличивается по сравнению с здоровыми тканями.

[0356] В другом примере АА можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, АА можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, если АА содержат СМ, чувствительный к расщеплению расщепляющим агентом, АА можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия восстановительных условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих способах, АА могут быть помечены выявляемой меткой и могут быть связаны с подложкой (*например*, твердой подложкой, такой как предметное стекло или шарик). Выявляемая метка может быть расположена на части АА, которая не высвобождается после расщепления, *например*, выявляемая метка может представлять собой погашенную флуоресцентную

метку или другую метку, которая не выявляется до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может быть проведен, например, путем введения в контакт иммобилизованных, выявляемым образом меченых АА с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для возникновения расщепления, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязнений. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивается по изменению выявляемого сигнала АА до контакта с образцом, например, по наличию и/или увеличению выявляемого сигнала из-за расщепления АА расщепляющим агентом в образце.

[0357] Такие методы обнаружения могут быть адаптированы для обеспечения обнаружения присутствия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ из АА при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего агента и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по присутствию и/или увеличению выявляемой метки АА, как описано выше, а присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем выявления комплекса мишень-АВ, *например*, с использованием выявляемым образом меченного антитела против мишени.

[0358] АА также пригодны при визуализации *in situ* для подтверждения активации АА, *например*, путем расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой метод, который позволяет локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. Используя этот метод, можно подтвердить как связывание с заданной мишенью, так и протеолитическую активность на основе присутствия выявляемой метки (например, флуоресцентной метки).

[0359] Эти методы применимы для любых замороженных клеток или тканей, полученных из очага заболевания (*например*, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти методы также пригодны для свежих образцов клеток или тканей.

[0360] В этих методах АА метят с помощью выявляемой метки. Выявляемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), краситель в ближней инфракрасной области (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).

[0361] Выявление метки в образце, который был инкубирован с меченым АА, указывает на то, что образец содержит мишень и протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с помощью ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с помощью агента, специфичного для протеазы, например, антитела, такого как А11, которое специфично для протеазы матрипазы и подавляет протеолитическую активность матрипазы; см., например, международный номер публикации WO 2010/129609, опубликованной 11 ноября 2010 г. Тот же подход с использованием ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные в данном документе, и/или с использованием более селективного ингибирующего агента можно использовать для идентификации протеазы или класса протеаз, которые специфичны для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, *например*, другого антитела, или выявляемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления немеченое АА может быть использовано с выявлением меченым вторичным антителом или более сложной системой выявления.

[0362] Подобные методики также применимы для визуализации *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, *например*, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что очаг заболевания содержит мишень и протеазу, специфичную для СМ активируемого антитела.

[0363] Эти методики также применимы в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе протеаз-специфичного СМ в активируемом антителе.

[0364] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* пригодны в способах идентификации субъектов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ* АА используются для скрининга образцов субъектов для идентификации субъектов, имеющих соответствующую протеазу(-ы) и мишень(-и) в соответствующем месте, *например*, в месте опухоли.

[0365] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения с помощью АА по изобретению. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишень, так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) исследуемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания),

идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого АА, содержащего такой СМ. Аналогично, субъекты, у которых был отрицательный результат теста на одну или обе мишени и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в АА, исследуемые с использованием этих способов, идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии (*т. е.* не подходят для лечения с помощью исследуемого АА). В некоторых вариантах осуществления такие субъекты, у которых тест является отрицательным в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими другие СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания).

[0366] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции субъектов, подходящей для лечения с помощью АА по изобретению. Например, субъекты с положительным результатом теста как на мишень, так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ (СМ) исследуемого АА (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого АА, содержащего такой СМ. Аналогично, субъекты с отрицательным результатом идентифицируются как подходящие кандидаты для другой формы терапии (*т. е.* неподходящие для лечения исследуемым АА). В некоторых вариантах осуществления такие субъекты, у которых тест является отрицательным в отношении первого АА, могут быть протестированы с другими АА, содержащими другие СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее АА для лечения (например, АА, содержащее СМ, который расщепляется субъектом в очаге заболевания).

Фармацевтические композиции

[0367] АА и конъюгированные АА по изобретению (также называемые в данном описании «активные соединения») и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи, могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно содержат АА и/или конъюгированное АА и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном описании, термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и задерживающие абсорбцию средств и т. п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington Pharmaceutical Sciences, стандартный справочный текст в данной области,

который включен в настоящее описание 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 могут быть использованы липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и агентов в отношении фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или вещества являются несовместимыми с активным соединением, предусматривается их применение в композициях. Также в композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

[0368] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению составлена таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (местное), трансмукозальное и ректальное введение. В иллюстративном варианте осуществления путь введения является внутривенным.

[0369] Растворы и суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может находиться в ампулах, одноразовых шприцах или многодозовых флаконах, изготовленных из стекла или пластика.

[0370] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL[™] (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и текучей в той степени, чтобы ее было легко набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от

загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую сыпучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечить с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во некоторых вариантах осуществления будет желательно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0371] Стерильные инъекционные растворы можно готовить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный ингредиент из его ранее стерильно профильтрованного раствора.

[0372] Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. В целях перорального терапевтического введения активное соединение можно включать вместе со вспомогательными веществами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также можно готовить, используя жидкий носитель для применения в виде ополаскивателя для рта, при этом соединение в жидком носителе применяется перорально с полосканием и выплевыванием или глотанием. Фармацевтически совместимые связующие агенты и/или адъювантные материалы также могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т. п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединения схожей природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая

целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; глйдант, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[0373] В случае введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозоля, спрея из находящегося под давлением контейнера или распределителя, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

[0374] Системное введение также может осуществляться трансмукозальными или трансдермальными средствами. В случае трансмукозального или трансдермального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникновения через барьер. Такие пенетранты в целом известны в данной области техники и включают, например, в случае трансмукозального введения, детергенты, желчные соли и производные фузидовой кислоты. Введение через слизистую может быть осуществлено за счет использования назальных спреев или суппозиториев. Для трансдермального введения активные соединения изготавливают в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как в целом известно в данной области техники.

[0375] Соединения также могут быть приготовлены в форме суппозиториев (*например*, с обычными основами для суппозиториев, таких как масло какао и другие глицериды) или клизм с удержанием для ректальной доставки.

[0376] В одном варианте осуществления активное соединение 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, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны специалистам в данной области техники. Материалы можно приобрести на коммерческой основе у Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки, с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0377] В особенности преимущественно составлять пероральные или парентеральные композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и равномерности дозировки. В контексте данного документа единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для подлежащего лечению субъекта; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для единичных дозированных форм согласно изобретению обусловлены и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического действия, и ограничений, свойственных области техники составления соединений, например, активного соединения для лечения индивидов.

[0378] Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкцией по применению.

Дозирование

[0379] Как предусмотрено в данном документе, субъекту вводят АА или конъюгированное АА в любой дозе от около 1 нг/кг до 100 г/кг. В иллюстративных вариантах осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг. В одном варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе более 6 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе около 7 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе около 8 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе около 9 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе около 10 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от более чем 6 мг/кг до около 7 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от около 7 мг/кг до около 8 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от около 8 мг/кг до около 9 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от около 9 мг/кг до около 10 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от более чем 6 мг/кг до около 8 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от около 7 мг/кг до около 9 мг/кг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в дозе от около 8 мг/кг до около 10 мг/кг. В другом варианте

осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 240 мг до около 1000 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 240 мг до около 400 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 600 мг до около 1000 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 240 мг до более 600 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 240 мг до около 280 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 280 мг до около 320 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 320 мг до около 360 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 360 мг до около 400 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 240 мг до около 320 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 280 мг до около 360 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 320 мг до около 400 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 600 мг до около 700 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 700 мг до около 800 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 800 мг до около 900 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 900 мг до около 1000 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от более 600 мг до около 800 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 700 мг до около 900 мг. В другом варианте осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА в фиксированной дозе от около 800 мг до около 1000 мг.

[0380] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгированное АА в зависимости от веса субъекта.

[0381] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгированное АА, в котором дозировка, измеряемая в мг/кг, основана на фактической массе тела субъекта.

[0382] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгированное АА, в котором дозировка, измеряемая в мг/кг, основана на скорректированной идеальной массе

тела (AIBW) субъекта. В некоторых вариантах осуществления скорректированная идеальная масса тела рассчитывается на основе разницы между фактической массой тела данного субъекта и заданной идеальной массой тела (IBW) для субъектов мужского и женского пола, соответствующей субъекту. В некоторых вариантах осуществления идеальная масса тела данного субъекта зависит от его роста. В некоторых вариантах осуществления идеальная масса тела (IBW) для данного субъекта мужского пола в килограммах определяется как $IBW = 0,9 \times (\text{рост в см}) - 88$, а IBW для данного субъекта женского пола в килограммах определяется как $IBW = 0,9 \times (\text{рост в см}) - 92$. В некоторых вариантах осуществления скорректированная идеальная масса тела (AIBW) для данного субъекта в килограммах определяется как $AIBW = IBW + 0,4 \times (\text{фактический вес} - IBW)$, где IBW основывается на их заданном росте и поле. В некоторых вариантах осуществления субъекты мужского и женского пола представляют собой человека. В некоторых вариантах осуществления AIBW людей составляет от около 40 кг до около 100 кг.

[0383] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА внутривенно 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, каждые 21 день или даже каждые 30 дней. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА внутривенно до тех пор, пока АА и/или агент являются эффективными.

[0384] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА один раз в день. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят АА или конъюгированное АА несколько раз в день, например, каждые 4 часа, каждые 6 часов, каждые 4-6 часов, каждые 8 часов или каждые 12 часов.

[0385] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в комбинации с введением конъюгированных АА по настоящему изобретению, субъекта можно лечить профилактически с помощью одной или нескольких схем лечения и/или профилактических мер, предназначенных для смягчения или предотвращения офтальмологической токсичности. Не ограничиваясь теорией, эти профилактические меры предназначены для смягчения и/или предотвращения офтальмологической токсичности, связанной с майтанзиноидами, такими как DM4, связанный с конъюгированными АА согласно настоящему изобретению. Примеры профилактических мер по смягчению и/или предотвращению офтальмологической токсичности включают

использование средств защиты глаз УФ А/В (*например*, солнцезащитных очков), использование глазных капель с искусственной слезой, местных сосудосуживающих глазных капель (*например*, офтальмологического раствора бримонидина тартрата, глазных капель тетрагидрозолина), и/или капель топического стероида (*например*, глазные капли преднизолона ацетата). В некоторых вариантах осуществления проведение офтальмологических профилактических мероприятий у получавших лечение субъектов является необязательным. В некоторых вариантах осуществления проведение офтальмологических профилактических мероприятий у получавших лечение субъектов обязательно.

[0386] Далее настоящее изобретение будет описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем настоящего изобретения, описанный в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение и тестирование конъюгированных активируемых антител, связывающих CD166

[0387] АА, используемые в приведенном ниже примере, представлены в данном документе и были созданы и охарактеризованы с использованием методов, раскрытых в публикации PCT № WO 2016/179285, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0388] Конъюгаты активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства (AADC) (изображенные на Фиг. 1) демонстрируют противоопухолевую активность на мышинных моделях с ксенотрансплантатными опухолями 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, таблице 4А, таблице 4В и таблице 5.

Таблица 4А

Тип рака (коммерческие образцы)	Преобладание экспрессии CD166 (ИГХ 3+), %	Преобладание экспрессии CD166 (ИГХ $\geq 2+$), %	Преобладание CD166-негативности (ИГХ $< 1+$), %	Количество исследуемых случаев
Билиарная (холангиокарцинома)	Не рассчитано	56,5	11,9	177
Молочные железы	70%	87,1	1,7	533

Эндометриальный	57%	75,2	6,0	315
Голова и шея	49%	81,1	0,8	122
Легкое	60%	71,0	8,2	465
Предстательная железа	89%	98,3	0,8	119
Яичник	52%	70,5	3,9	129

Таблица 4В

Тип рака (получавшие лечение пациенты)	Преобладание экспрессии CD166 (ИГХ 3+), %	Количество исследуемых случаев
Молочные железы	79%	95
Эндометриальный	67%	3
Голова и шея	62%	21
Легкое	64%	22
Предстательная железа	0%	2
Яичник	59%	107

Таблица 5

Экспрессия CD166 в здоровой ткани человека с помощью ИГХ

Тип ткани	Экспрессия CD166 человека	Тип ткани	Экспрессия CD166 человека
Надпочечник	-/+	Нерв	+ /++
Костный мозг	-/+	Яичник	- /++
Молочные железы	+ /++	Поджелудочная железа	++ /+++
Мозг, большой мозг	-/+	Предстательная железа	++ /+++
Мозг, мозжечок	-/+	Кожа	+ /++

Шейка матки	+ / ++	Малый кишечник	+ / +++
Толстая кишка	++	Селезенка	+ / ++
Пищевод	+ / ++	Желудок	+++
Глаз	+	Поперечно-полосатая/скелетная мышца	- / +
Сердце	+	Яички	- / ++
Почка	+ / +++	Щитовидная железа	++ / +++
Гортань	+ / ++	Тимус	+
Печень	++	Матка	+ / +++
Легкое	+ / ++		

[0389] На Фиг. 3-6 показано, что конъюгаты лекарственного средства и АА к CD166 по настоящему изобретению вызвали полные и стойкие ответы на мышинных моделях ксенотрансплантатных опухолей человека в дозах, равных или ниже прогнозируемой дозы для человека.

Пример 2. Открытое, многоцентровое исследование с увеличением дозы для определения безопасности конъюгатов лекарственное средство – активируемое антитело к CD166 у субъектов с опухолями с высокой экспрессией CD-166

[0390] В этом исследовании оценивают основные критерии оценки безопасности, максимально переносимую дозу (МПД), рекомендуемую дозу фазы 2 (RP2D), ограничивающую дозу токсичность и предварительную противоопухолевую активность конъюгатов лекарственного средства и активируемого антитела к CD166, вводимых в качестве монотерапии субъектам с опухолями с высокой экспрессией CD166 (карциномы молочной железы, легких, предстательной железы, яичников, эндометрия, головы и шеи, а также желчных путей).

[0391] Вторичные критерии оценки включают: (1) измерение частоты объективного ответа в соответствии с критериями оценки ответа в солидных опухолях (RECIST) версии 1.1 или критериями, специфичными для опухоли, если применимо; (2) время до развития ответа; (3) продолжительность ответа; (4) выживаемость без прогрессирования; (5) общую выживаемость; (6) фармакокинетический профиль AADC, включая анализ интактных

AADC, общих AADC, общего AADC-конъюгированного DM4, свободного DM4 и S-метил-DM4; и (7) частоту образования антител к лекарственным средствам.

[0392] Дополнительные критерии оценки включают (1) идентификацию прогностических биомаркеров, связанных с клинической активностью AADC, таких как экспрессия CD166 и митотические маркеры (например, Ki-67) в образцах опухолей до и во время получения лечения; и (2) характеристику протеазной активности и активации ADCC в образцах биопсии опухоли и периферической крови во время лечения соответственно.

[0393] Исследование, представленное в этом примере, представляет собой открытое, многоцентровое исследование с увеличением дозы и проверкой концепции в фазе 1/2 исследования AADC к CD166, в котором AADC к CD166 содержат DM4-конъюгированное активируемое антитело активируемого антитела к CD166, называемое в данном документе комбинацией 55, которая содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246.

[0394] В исследование включены пациенты с карциномой молочной железы, кастрационно-резистентным раком предстательной железы (КРПРЖ), холангиокарциномой, карциномой эндометрия, эпителиальной карциномой яичников, плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПКГШ) и немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Субъекты получают лечение конъюгатом активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства внутривенно каждые 21 день, и исследование продолжается в следующих двух частях, части А и части В. Дизайн исследования также изображен на Фиг. 6.

[0395] В части А (увеличение дозы) ($n \leq 50$) после ускоренного титрования дозы введенного ADCC к CD166 следует традиционная схема 3 + 3. Схема 3+3 описана следующим образом: 3 субъекта получали первую дозу AADC к CD166, и были отмечены нежелательные явления. Если токсичности не наблюдалось, дозу увеличивали и проводили лечение еще трех субъектов. Если у 1 из 3 субъектов проявлялась токсичность, 3 дополнительных субъекта включали в стадию первой дозы. Если у 2-3 субъектов проявлялась токсичность, эта доза была обозначена как максимальная переносимая доза (описано в <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684552/>). Это исследование проводилось для определения МПД и в результате получали когорту с модифицированным интервалом вероятности токсичности 2 (mTPI-2), получавшую МПД для определения RP2D.

[0396] Часть В (расширение когорты установленной дозы) исследования представляет собой тестирование фазы расширения когорты установленной дозы AADC к CD166, вводимого в RP2D, при 7 типах опухоли (до 14 субъектов в каждом, $n < 98$).

[0397] Субъекты получают лечение до прогрессирования; продолжительность лечения составляет около 6 месяцев с последующим контактом каждые 3-6 месяцев или в течение еще 1 или 2 лет, или пока субъект жив.

[0398] В исследовании участвуют до 150 субъектов как в когорте увеличения дозы, так и в расширенной когорте. Ключевые критерии включения в исследование для субъектов показаны в таблице 6А.

Таблица 6А

Часть А	• Возраст ≥ 18 лет • Статус по шкале Восточной совместной онкологической группы (ECOG) 0-1 • Гистологически подтвержденный диагноз любой активной метастатической или местно-распространенной неоперабельной солидной опухоли • Согласие предоставить опухолевую ткань (архивную, новую или недавно полученную) до введения AADC к CD166 • Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 3 месяцев
Часть В	• Согласие по меньшей мере 7 субъектов (по меньшей мере 1 каждого типа опухоли) на предоставление исходного уровня и образца биопсии опухоли во время исследования (если это безопасно для выполнения биопсии) и образца периферической крови
Карцинома молочной железы	• Субъекты с карциномой молочной железы, экспрессирующей рецепторы эстрогена (ER+), должны были получать антигормональную терапию и у них должно было наблюдаться прогрессирование заболевания • TNBC получил ≥ 2 предыдущих линии терапии
Кастрационно-резистентная карцинома предстательной железы	• Получено ≥ 1 предшествующей терапии
Холангиокарцинома	• Неудачный прием ≥ 1 предыдущей гемцитабин-содержащей схемы

Карцинома эндометрия	Получали ≥ 1 платиносодержащей схемы при заболевании придатков матки или запущенном заболевании
Эпителиальная карцинома яичников	- Субъекты с мутацией, не связанной с раком молочной железы (BRCA) (зародышевой или соматической), или субъекты с неизвестным мутационным статусом BRCA должны иметь резистентную к платине или рефрактерную к платине карциному яичника - Субъекты с мутациями BRCA должны быть невосприимчивыми к ингибиторам PARP или иным образом не соответствовать им
ПКГШ	Получали ≥ 1 платиносодержащей схемы, и ингибитор PD-1/PD-L1, если одобрен по показаниям для субъектов в их регионе
НМРЛ	- Получали ≥ 1 платиносодержащей схемы - Ингибитор контрольной точки должен был быть введен, если он одобрен по показаниям для субъектов в их регионе
Критерий невключения	- Активное или хроническое заболевание роговицы, трансплантация роговицы в анамнезе, активный герпетический кератит и активные глазные заболевания, требующие постоянного лечения/наблюдения - Серьезное сопутствующее заболевание, включая клинически значимую активную инфекцию - Наличие в анамнезе или текущие активные аутоиммунные заболевания - Серьезное сердечное заболевание, например, недавно перенесенный инфаркт миокарда - 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 алкогольная болезнь печени; - Незаживающая 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; • Получение в настоящее время антикоагулянтной терапии варфарином; • Серьезное хирургическое вмешательство (требующее общей анестезии) в течение 3 месяцев до введения дозы.
--	--

[0399] В исследовании участвуют до 150 субъектов как в когорте увеличения дозы, так и в расширенной когорте. Нежелательные явления и сопутствующие лекарства оцениваются в день 1, день 8 и день 15 цикла 1 AADC к CD166, с последующей оценкой в первый день каждого последующего цикла лечения в конце лечения. Оценка глазных симптомов и оценка функционального статуса от ECOG проводится во время скрининга, в первый день каждого цикла лечения и в конце лечения. Полное офтальмологическое обследование проводится всем субъектам во время скрининга и в определенные моменты исследования. Субъекты, которые сообщают о внезапных изменениях зрения или других глазных симптомах после лечения, будут проходить повторные обследования перед инфузией в цикле через день и по клиническим показаниям. Общий анализ крови и химический состав сыворотки крови оцениваются при каждом визите врача. Архивные образцы ткани или только что полученные образцы биопсии предоставляются на исходном уровне для субъектов, участвующих в части А. В части В биопсии до и во время лечения и сбор образцов периферической крови (отчасти для определения целостности активируемого антитела) будут обязательными для по меньшей мере 7 субъектов, по 1 опухоли каждого типа. В некоторых случаях берут биопсию более чем у 1 субъекта каждого типа опухоли, например, биопсию у 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более субъектов берут для каждого типа опухоли. Образцы крови для фармакокинетического, фармакодинамического и биомаркерного анализов берутся в предварительно определенные моменты времени. Визуализация для оценки ответа опухоли выполняется каждые 8 недель после первой дозы AADC к CD166. После приема последней дозы исследуемого лекарства субъектов оценивают каждые 3 месяца в течение первого года, а затем каждые 6 месяцев или до смерти.

[0400] В этом иллюстративном исследовании все пациенты проходят полное офтальмологическое обследование на исходном уровне и в определенные моменты исследования. В этом иллюстративном исследовании пациенты, которые сообщают о внезапных изменениях зрения или других глазных симптомах после лечения, проходят

повторные обследования перед инфузией в цикле через день и по клиническим показаниям.

[0401] На момент включения 78 пациентов для лечения в иллюстративное исследование было показано, что 58 пациентов (74%) имели высокую экспрессию CD166, определяемую как интенсивность окрашивания мембран 3+ в $\geq 50\%$ опухолевых клеток. Эта группа из 78 пациентов получала в среднем 6 (от 1 до 20) предшествующих терапий, включая антимикротрубочковые агенты или агенты, содержащие платину, (75/78 пациентов; 96%), а также агенты к PD-1 или к PD-L1 (25/78 пациентов; 32%).

[0402] На заданную дату окончания этого иллюстративного исследования 63/78 пациентов (81%) прекратили лечение из-за прогрессирования заболевания (35/78 пациентов; 45%), симптоматического ухудшения (10/78 пациентов; 13%), нежелательных явлений, связанных с исследуемым лекарственным средством (9/78 пациентов; 12%) и решения исследователя (3/78 пациента; 4%), отмены пациентом (3/78 пациента; 4%) и смерти, не связанной с исследуемым лекарственным средством (3/78 пациента; 4%). До этой даты окончания исследования пациенты получали в среднем 2 дозы лекарственного средства (в диапазоне от 1 до 13 доз), а средняя продолжительность лечения составляла 6,3 недели (в диапазоне 0,3-42,1 недели). Сводные данные о продолжительности и введенных дозах показаны в таблице 6B.

Таблица 6B

Доза (мг/кг)	Среднее количество доз (диапазон)	Средняя продолжительность лечения, нед. (диапазон)
< 4 (n = 10)	3 (1 – 3)	8,9 (3,0 – 9,3)
4 -5 (n = 19)	3 (1 – 13)	9,0 (3,0 – 42,1)
6 -7 (n = 18)	2 (1 – 11)	6,2 (3,0 – 33,0)
8 – 9 (n = 23)	2 (1 – 7)	6,1 (0,3 – 22,1)
10 (n = 8)	2 (1 – 3)	6,0 (2,4 – 10,4)
Все когорты (n =	2	6,3

78)	(1 – 13)	(0,3 – 42,1)
-----	----------	--------------

[0403] Несколько дополнительных методов оценки активации и активности конъюгата антитела к CD166, активируемого лекарственным средством, и лекарственного средства перечислены в таблице 7 и на Фиг. 7А, 7В.

Таблица 7

Цель	Образец(-ы)	Анализ	Способ
Определение активации конъюгата активируемого антитела к CD166 и лекарственного средства	Биопсия, плазма	Анализ WEST™	Капиллярный электрофорез с иммунологическим анализом для выявления замаскированных и активированных AADC
	Биопсия	Анализ QZ™	Выявление протеазной активности
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

[0404] В этом примере описана способность обнаруживать активированные и интактные активируемые антитела к CD166 7614.6-3001-HuCD166 в образцах плазмы крови и ксенотрансплантатных опухолей мышей, которым вводили 7614.6-3001-HuCD166.

[0405] В представленных в данном документе исследованиях использовалось активируемое антитело к CD166, обозначенное в данном документе как 7614.6-3001-HuCD166, также называемое HuCD166-7614.6-3001, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246.

[0406] Количественное определение активированного и интактного активируемого антитела к CD166 7614.6-3001-HuCD166 оценивали с помощью системы Wes с

использованием антител против IgG человека (против IgG человека (H&L), American Qualex Catalog # A110UK). Голым мышам имплантировали подкожно 5×10^6 клеток H292 в бессывороточной среде, смешанной в соотношении 1:1 с Matrigel™. Мышам, несущим ксенотрансплантаты H292 200-500 мм², вводили 5 мг/кг активируемого антитела к CD166 7614.6-3001-HuCD166. Через день после лечения опухоль и плазму крови (гепарин) собирали и хранили при -80°C перед анализом. Гомогенаты опухолей получали в буфере для лизиса IP Thermo Scientific Pierce™ (№ по каталогу 87788) с добавлением одноразового набора смеси с ингибитором протеазы Thermo Scientific Halt™ (№ по каталогу 78430) с использованием Barocycler (Pressure Biosciences). Один мг/мл белкового лизата в буфере для лизиса IP с ингибитором протеазы HALT/ЭДТА и образцами плазмы крови, разведенные 1: 20 в ФСБ, анализировали с помощью системы Wes, как описано в данном документе. На Фиг. 7А и Фиг. 7В показана предпочтительная активация в опухоли (Фиг. 7В) по сравнению с плазмой крови (Фиг. 7А).

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

[0407] В этом примере описана способность обнаруживать активированные и интактные активируемые антитела к CD166, конъюгированные с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55).

[0408] В примере использовалось DM4-конъюгированное активируемое антитело активируемого антитела к CD166, называемое в данном документе комбинацией 55, которая содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 480 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 246, конъюгированное с DM4 через линкер spdb.

[0409] Конъюгированное активируемое антитело к CD166 активировали либо 80 мкг/мл матриптазы (R&D Systems, № по каталогу 3946-SE), либо 80 мкг/мл MMP14 (R&D Systems, № по каталогу 918-MP) в течение 2 часов при 37°C и смешивали с интактным конъюгированным активируемым антителом. Затем смесь анализировали системой Wes, как описано выше, с использованием антител к IgG человека (H&L) (American Qualex, № по каталогу A110UK). На Фиг. 8А и 8В показывают способность отделять матриптаза-активированные (Фиг. 8А) или MMP14-активированные (Фиг. 8В) конъюгированные активируемые антитела от интактных конъюгированных активируемых антител.

Пример 5. Доказательства частичного ответа у нескольких субъектов после лечения конъюгатом активируемого антитела к CD166 – лекарственное средство

[0410] Этот пример демонстрирует, что введение интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55), приводит к противоопухолевой активности, включая неподтвержденные частичные ответы у нескольких получавших лечение субъектов с диапазоном типов опухоли.

[0411] В одном примере у субъекта была плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ), при первоначальном скрининге проявлялись только целевые очаги поражения и не обнаруживались нецелевые поражения. Во время исследования у субъекта не наблюдалось развития каких-либо новых опухолей. Субъект получал лечение 5 мг/кг интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55) каждые три (3) недели. Вводимая доза конъюгированного активируемого антитела основывалась на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

[0412] У субъекта наблюдалось изменение опухолевой массы на 31,7% от первоначального скрининга (41 мм) до визита цикла 3 (28 мм), *то есть* через 9 недель после первого введения. Во время визита цикла 6, *то есть* через 18 недель после первого введения, у субъекта была опухолевая масса (31,6 мм). Таким образом, субъект испытал неподтвержденный частичный ответ с момента первоначального скрининга на основе классификации RECIST v1.1.

[0413] Как показано в таблицах 8A и 8B, обобщено иллюстративное исследование нескольких субъектов, получавших по меньшей мере 4 мг/кг конъюгированного активируемого антитела (комбинация 55) при различных датах прекращения исследования. Обобщенные оценки оцениваемых субъектов основаны на оценке ответа после исходного уровня на основе классификации RECIST v1.1. «Контроль над заболеванием» относится к количеству субъектов, демонстрирующих неподтвержденный полный ответ (CR), неподтвержденный частичный ответ (PR) и стабильное заболевание. Классификация стабильного заболевания включала субъектов, у которых была по меньшей мере одна оценка стабильного заболевания ≥ 7 недель после даты начала лечения и которые не демонстрировали ни полного ответа, ни прогрессирования заболевания после лечения. «Не поддающиеся оценке» включали пациентов со стабильным заболеванием, у которых было только одно поддающееся оценке сканирование опухоли после исходного уровня < 7 недель от начала лечения. «Досрочное прекращение лечения» включало пациентов, которые прекратили исследование без проведения сканирования после исходного уровня. Из 7 пациентов в таблице 8B, у которых проявился неподтвержденный частичный ответ, 5 пациентов испытали офтальмологическую

токсичность ≥ 2 степени, что привело к отсрочке введения дозы или приостановлению исследуемого лечения.

Таблица 8А

Доза (мг/кг)	Количество получавших лечение субъектов (n)	Неподтвержденный частичный ответ	Стабильное заболевание	Контроль заболевания	Прогрессирующее заболевание	Не поддающаяся оценке
4	7	0	4	4	3	0
5	7	2	2	4	3	0
6	7	0	2	2	2	3
7	5	0	2	2	3	0
8	8	1	2	3	4	1
9	2	2	0	2	0	0
10	1	0	0	0	1	0
Все дозировки	45	5	12	17	16	4

Таблица 8В (популяция, поддающаяся оценке с оценкой заболевания после исходного уровня)

Доза (мг/кг))	Количество получавших лечение субъектов (n)	Неподтвержденный частичный ответ	Стабильное заболевание	Прогрессирующее заболевание	Не поддающаяся оценке	Досрочное прекращение лечения
----------------------	---	--	---------------------------	--------------------------------	-----------------------------	-------------------------------------

< 4	10	0	0	7 (70%)	1 (10%)	2 (20%)
4 – 5	19	3 (16%)	5 (26%)	7 (37%)	0	4 (21%)
6 – 7	18	0	5 (28%)	6 (33%)	3 (17%)	4 (22%)
8 – 9	20	3 (15%)	7 (35%)	7 (35%)	0	3 (15%)
10	4	1 (25%)	0	3 (75%)	0	0
Все когор ты	71	7 (10%)	17 (24%)	30 (42%)	4 (6%)	13 (18%)

[0414] Из пяти (5) субъектов в иллюстративном исследовании у двух (2) субъектов была диагностирована эпителиальная карцинома яичников, у двух (2) субъектов была диагностирована карцинома молочной железы и у одного (1) субъекта была диагностирована плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ). Субъекты получала лечение интактным активируемым антителом к CD166, конъюгированным с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55) каждые три (3) недели. Вводимая доза конъюгированного активируемого антитела основывалась на скорректированной идеальной массе тела субъекта. Для каждого из этих субъектов количество введенного конъюгированного активируемого антитела и приблизительное уменьшение опухолевой массы (то есть уменьшение опухоли) по сравнению с их соответствующим исходным измерением обобщены в таблице 9.

Таблица 9

Тип рака	Доза на цикл (мг/кг)	Прибл. изменение опухолевой массы	Недели после начала лечения
ПКГШ	5	– 30%	8
Яичник	5	– 30%	16
Молочные железы	8	– 50%	7
Яичник	9	– 35%	6
Молочные железы	9	– 85%	5

[0415] У субъекта с трижды негативной карциномой молочной железы, получавшего 9 мг/кг конъюгированного активируемого антитела, поперечная компьютерная томография, выполненная на исходном уровне и через 8 недель после начала лечения, показала уменьшение опухоли в легких и лимфатических узлах, соответствующее неподтвержденному частичному ответу в по меньшей мере двух поперечных срезах. У этого субъекта ранее был рецидив после лечения несколькими линиями химиотерапии и локальной лучевой терапии.

[0416] У невосприимчивого к пембролизумабу субъекта с трижды негативной карциномой молочной железы, получавшего 8 мг/кг конъюгированного активируемого антитела, метастаз, представляющий собой поражение кожи до лечения, разрешился в течение трех циклов лечения конъюгированным активируемым антителом. У этого субъекта ранее случился рецидив после лечения неоадьювантной циторедуктивной химиотерапией, хирургическим вмешательством и лучевой терапией.

[0417] Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что дозы ≥ 4 мг/кг DM4-конъюгированного активируемого антитела к CD166 демонстрируют противоопухолевую активность, включая неподтвержденные частичные ответы в ряде опухолей.

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

[0418] Этот пример демонстрирует фармакокинетику общего и интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55) после введения субъектам-людям.

[0419] В вышеописанном сегменте исследования с увеличением дозы исследование было разработано для оценки фармакокинетики (PK) и ADA у субъектов, получавших 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 PK использовали несколько анализов для определения сывороточных уровней (1) интактного активируемого антитела к CD166 как с конъюгированным DM4, так и без него, (2) общего (т. е. как интактного, так и расщепленного) активируемого антитела к CD166 как с конъюгированным DM4, так и без него, (3) общего (т. е. как интактного, так и расщепленного) активируемого антитела к CD166 с конъюгированным DM4, (4) свободного DM4 и (5) S-метил-DM4, цитотоксического метаболита DM4.

[0420] Исследования были выполнены путем анализа образцов крови, взятых у субъектов-людей, получавших интактное конъюгированное активируемое антитело к CD166

(комбинация 55). В цикле 1 (т. е. введение 1-го цикла лекарственного средства) исследование было спланировано таким образом, что образцы крови отбирались у оцениваемых субъектов перед инфузией, в конце инфузии и в дни 2, 3, 4, 8 и 15 во время визита субъекта. В последующих циклах 2, 4, 6, 8 и каждые 8 циклов после этого исследование было спланировано таким образом, что образцы крови отбирались перед инфузией для каждого цикла. В цикле 3 исследование было спланировано таким образом, что образцы крови отбирались перед инфузией, в конце инфузии и в дни 8 и 15 во время визита субъекта. Исследование было разработано для взятия окончательного образца крови в конце испытания во время визита субъекта.

[0421] Как показано на Фиг. 9А-9F, показаны иллюстративные результаты РК-анализа после введения указанных доз комбинации 55. На каждом графике пунктирная линия указывает нижний предел количественного определения (LLOQ) для соответствующих анализов, а точкам ниже этой линии присваивается значение LLOQ/2. На Фиг. 9А график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени интактного (т. е. нерасщепленного) активируемого антитела к CD166, которое либо неконъюгировано, либо конъюгировано с DM4 после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. На Фиг. 9В график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени общего (т. е. нерасщепленного и расщепленного) активируемого антитела к CD166, которое конъюгировано с DM4 после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. На Фиг. 9С график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени свободного DM4 после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. На Фиг. 9D график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени S-метил-DM4 (DM4-Me) после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. На Фиг. 9Е график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени общего (т. е. нерасщепленного и расщепленного) активируемого антитела к CD166, которое либо неконъюгировано, либо конъюгировано с DM4 после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. На Фиг. 9F график показывает концентрации в сыворотке крови с течением времени общего (т. е. нерасщепленного и расщепленного) активируемого антитела к CD166, которое либо неконъюгировано, либо конъюгировано с DM4 после введения комбинации 55 в указанной дозировке (на основе AIBW) субъектам-людям. Пунктирные линии указывают количества общего активируемого антитела (AA) к CD166, а сплошные линии указывают количества интактного активируемого антитела (AA) к CD166.

[0422] В некоторых иллюстративных исследованиях настоящего изобретения конъюгированные активируемые антитела к CD166 (комбинация 55) вводили субъектам-людям и определяли количество активируемого антитела к CD166 в опухолях субъектов, которое было в активированной (например, расщепленной) форме. В этих иллюстративных исследованиях количество расщепленного активируемого антитела определяли с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных для активируемого антитела. В некоторых иллюстративных результатах этих исследований субъекты-люди, которым вводили дозы в диапазоне от 4 до 8 мг/кг конъюгированного активируемого антитела (на основе AIBW), предоставили 11 образцов своих опухолевых тканей, которые были проанализированы на концентрацию активированного активируемого антитела. Иллюстративные результаты показали взаимосвязь, в которой количество внутриопухолевого активированного активируемого антитела увеличивалось с начальной дозировкой (в диапазоне от 4 до 8 мг/кг).

[0423] Иллюстративные данные ПК показывают, что активируемое антитело к CD166 циркулирует в сыворотке крови преимущественно в интактной форме. И свободный DM4, и DM4-Me циркулировали в виде <1,9 мол.% от общего количества активируемого антитела к CD166. Среднее интактное активируемое антитело к CD166 $t_{1/2}$ находилось в диапазоне от 3,71 до 8,57 дней. При многократном введении коэффициент накопления минимальной концентрации в плазме крови (C_{min}) (доза 3: доза 1) для интактного активируемого антитела к CD166 не превышал 1,34 и не изменялся с дозой.

[0424] Иллюстративные данные также показывают, что отношение интактного к общему активируемого антитела к CD166 для дозы 1 AUC_{0-tau} (площадь под кривой, оцениваемая до конца интервала дозирования) и C_{max} (максимальная концентрация в плазме крови) выглядело приблизительно одинаковым. Воздействие интактного и общего активируемого антитела к CD166 после однократной дозы конъюгированного активируемого антитела к CD166 обычно увеличивалось с увеличением дозы, как измерено с помощью AUC_{0-tau} и C_{max} .

Пример 7. Определение максимально переносимой дозы (МПД) у субъектов, прошедших лечение активируемым антителом к CD166

[0425] Этот пример демонстрирует, что введение интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55), до 10 мг/кг (на основе скорректированной идеальной массы тела) не привело к достижению максимально переносимой дозы (МПД).

[0426] В этом примере, обозначенном как часть A2 исследования, субъекты имели карциному молочной железы, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), эпителиальную карциному яичников, карциному эндометрия или плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ). Кроме того, субъекты показали высокую экспрессию CD166 в своих опухолях, что было определено как иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание $\geq 50\%$ опухолевых клеток, окрашенных с интенсивностью 3+ (сильная) в архивном образце опухолевой ткани, где по этим критериям оценивали только мембранно-ассоциированное окрашивание внутри опухолевых клеток. Субъектам вводили 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг каждые три (3) недели с увеличением дозы в исследовании интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55). Вводимая доза конъюгированного активируемого антитела основывалась на скорректированной идеальной массе тела субъекта. Оценка ограничивающей дозу токсичности (DLT) для каждого субъекта проводилась в течение 21 дня после введения.

[0427] В течение периода оценки DLT нежелательные явления регистрировались в соответствии с Общими критериями терминологии NCI для нежелательных явлений (NCI CTCAE) v4.03. На основе этих критериев нежелательных явлений (НЯ) DLT были определены как НЯ 5-й степени, связанные с лечением, некоторые НЯ 4-й степени, связанные с лечением (включая глазные расстройства 4-й степени), и определенные НЯ 3-й степени, связанные с лечением. Основываясь на этих критериях DLT, МПД будет определяться как доза, выше которой ≥ 2 DLT на 3 субъекта в когорте (или ≥ 2 DLT на 6 субъектов в когорте) наблюдались в течение периода оценки. В этом примере МПД не достигается при дозах до 10 мг/кг включительно.

Пример 8. Наблюдаемые нежелательные явления у субъектов после монотерапии конъюгатом лекарственное средство – активируемое антитело к CD166

[0428] В этом примере показано количество и степень нежелательных явлений, наблюдаемых у субъектов после введения интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55) до 10 мг/кг (все дозировки основаны на скорректированной идеальной массе тела).

[0429] В этом иллюстративном исследовании наблюдения за нежелательными явлениями проводились у субъектов, получавших лечение из части A иллюстративного исследования (т. е. монотерапевтических исследований с увеличением дозы), в котором субъектов лечили комбинацией 55 от 0,25 мг/кг до 10 мг/кг, и из части A2 иллюстративного исследования (т. е. пациенты с CD166 +++, получавшие монотерапевтические дозы 4 мг/кг

и выше, которые были очищены в части А), в котором субъектов лечили комбинацией 55 от 4 мг/кг до 10 мг/кг. Все вводимые дозы основывались на скорректированной идеальной массе тела субъекта. Оценка нежелательных явлений для каждого субъекта проводилась в течение 21 дня после введения.

[0430] В течение периода оценки нежелательные явления регистрировались в соответствии с Общими критериями терминологии NCI для нежелательных явлений (NCI CTCAE) v4.03. Количество получавших лечение субъектов с указанным типом и степенью нежелательных явлений показано в таблице 10.

Таблица 10

Доза (мг/кг)	Количество получавших лечение субъектов (n)	Субъекты с нежелательными явлениями, связанными с лечением		Субъекты с офтальмологической токсичностью		Субъекты с реакциями на инфузию	
		Степень 1-2	Степень 3-4	Степень 1-2	Степень 3-4	Степень 1-2	Степень 3-4
0,25	1	0	0	0	0	0	0
0,5	3	1	0	0	0	0	0
1	3	2	0	0	0	1	0
2	3	3	0	0	0	1	0
4	10	7	1	2	0	1	0
5	9	6	3	5	1	2	0
6	9	7	2	2	0	3	0
7	9	6	2	3	0	3	0
8	12	6	5	6	2	2	1
9	7	3	2	1	2	0	0
10	5	1	2	1	1	0	0
Все дозировки	71	42 (59%)	17 (24%)	20 (28%)	6 (8%)	13 (18%)	1 (1%)

[0431] Эти иллюстративные данные показывают, что МПД для введенного лекарственного средства не была достигнута при дозах до 10 мг/кг включительно. Кроме того, эти иллюстративные данные также показывают, что введенное лекарственное средство продемонстрировало благоприятный профиль безопасности в этом иллюстративном исследовании на основании количества субъектов, у которых наблюдались нежелательные явления 3-4 степени, связанные с лечением (*например*, тошнота, рвота, усталость, кератит, гипокалиемия, гипонатриемия, периферическая невропатия, функциональные пробы печени и анемия). В этом иллюстративном исследовании серьезные НЯ (3-4 степени) наблюдались у 27 (35%) пациентов. Примеры серьезных НЯ у ≥ 2 пациентов включали тошноту ($n = 4$), рвоту ($n = 4$), боль в животе ($n = 3$), непроходимость тонкого кишечника ($n = 3$), гипокалиемию ($n = 2$), гипонатриемию ($n = 2$), реакцию, связанную с инфузией ($n = 2$), и выпот в полость перикарда ($n = 2$). В этом иллюстративном исследовании НЯ, связанные с лечением (TRAE), наблюдались у 69 (89%) пациентов; большинство из них относились к классу 1 и 2 СТСАЕ. Наиболее частыми ($>10\%$) TRAE любой степени были тошнота (32%), утомляемость (24%), снижение аппетита (23%), диарея (19%), кератит (19%), реакция, связанная с инфузией (18%), нечеткость зрения (17%), рвота (15%) и повышение уровня аспаратаминотрансферазы (13%). Все явления были управляемыми с медицинской точки зрения, с улучшением или разрешением после отсрочки приема, отмены и/или снижения дозы. В этом иллюстративном исследовании у 18 пациентов была по меньшей мере 1 отсрочка лечения; наиболее частыми причинами отсрочки лечения были офтальмологическая токсичность ($n = 12$, 67%) и периферическая невропатия ($n = 4$, 22%).

[0432] Сводные данные о количестве и процентном отношении субъектов, у которых наблюдались нежелательные явления, связанные с лечением (TRAE) 3-4 степени, обобщены в таблицах 11A и 11B.

Таблица 11A

Доза (мг/кг)	Количество субъектов (≥ 2), у которых наблюдались TRAE 3-4 степени (% наблюдаемых субъектов)					
	Всего TRAE 3-4 степе ни	Офтальмологиче ские расстройства	Расстройс тва обмена веществ и питания	Функциональ ные печеночные пробы ¹	Желудочн о- кишечные расстройст ва	Расстройс тва нервной системы
< 4 ($n = 1$)	0	0	0	0	0	0

0)						
4-5 (n = 19)	4 (21,1%)	1 (5,3%)	0	0	0	1 (5,3%)
6-7 (n = 18)	4 (22,2%)	0	2 (11,1%)	0	1 (5,6%)	2 (11,1%)
8-9 (n = 23)	11 (52,4%)	5 (23,8%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0
10 (n = 8)	4 (50%)	1 (12,5%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0

Таблица 11В

Доза (мг/кг)	Количество субъектов (≥ 2), у которых наблюдались TRAE 3-4 степени (% наблюдаемых субъектов)								
	Кератит	Повышенная АСТ	Повышенная АЛТ	Тошнота	HN	Анемия	Усталость	PSN	Рвота
< 4 (n = 10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-5 (n = 19)	1 (5%)	0	0	0	0	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	0
6-7 (n = 18)	0	0	0	1 (6%)	2 (11%)	1 (6%)	0	1 (6%)	1 (6%)
8-9 (n = 23)	4 (17%)	1 (4%)	1 (4%)	2 (9%)	1 (4%)	0	0	0	1 (4%)
10 (n = 8)	1 (13%)	3 (38%)	2 (25%)	1 (13%)	0	0	1 (13%)	0	0
Все	6	4	3	4	3	2	2	2	2

когорт ы (n = 78)	(8%)	(5%)	(4%)	(5%)	(4%)	(3%)	(3%)	(3%)	(3%)
-----------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

АСТ, аспаратаминотрансфераза; АЛТ, аланинаминотрансфераза; HN, гипонатриемия; PSN, периферическая сенсорная нейропатия

[0433] В данной точке прекращения сбора данных в этом иллюстративном исследовании у 9 из 78 пациентов (12%) были нежелательные явления, связанные с лечением (TRAE), которые привели к прекращению лечения. Из них кератит был TRAE, который привел к прекращению лечения у 6 пациентов, а нечеткость зрения, периферическая невропатия и тошнота были TRAE, которые привели к прекращению лечения у 1 пациента. Из них 2 пациента (2,6%) имели TRAE 4 степени (по 1: кератит, повышение уровня гамма-глутамилтрансферазы). В этом исследовании офтальмологическая профилактика (*например*, стероидные глазные капли) была введена для 2 верхних уровней доз (*например*, 9 и 10 мг/кг).

Пример 9. Наблюдаемая активность у нескольких субъектов после лечения конъюгатом лекарственное средство – активируемое антитело к CD166

[0434] Это иллюстративное исследование обеспечивает иллюстративные результаты, демонстрирующие, что введение интактного активируемого антитела к CD166, конъюгированного с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55), приводит к противоопухолевой активности у некоторых субъектов, включая неподтвержденные частичные ответы у нескольких получавших лечение субъектов с диапазоном типов опухоли.

[0435] В соответствии с частью А или частью А2 иллюстративного исследования, описанного в данном документе, активируемое антитело к CD166, конъюгированное с майтанзиноидным токсином DM4 через линкер SPDB (комбинация 55), вводили субъектам-людям в различных дозах каждые три (3) недели. Средний размер опухолевых поражений у субъекта измеряли до и после введения.

[0436] Со ссылкой на Фиг. 10А-10С, пациенты присутствовали с указанным раком (BR = карцинома молочной железы, CC = холангиокарцинома, EM = карцинома эндометрия, HN = плоскоклеточный рак головы и шеи, LU = немелкоклеточный рак легкого, OV = эпителиальный рак яичников), и им вводили конъюгированное активируемое антитело к CD166 (комбинация 55) в дозировке соответствующего числа в мг/кг на основе

скорректированной идеальной массы тела (например, OV-10 соответствует субъекту с эпителиальным раком яичника, и ему вводили дозу 10 мг/кг AIBW лекарственного средства каждые три (3) недели). Со ссылкой на Фиг. 10B, график, показывающий процентное изменение опухолевой массы для множества пациентов с различными показаниями при указанной дозировке в этом иллюстративном исследовании. На Фиг. 10B показаны пациенты, у которых был частичный ответ (PR), прогрессирующее заболевание (PD), стабильное заболевание (SD) или не поддающиеся оценке (NE). Эти цифры не включают пациентов, эффективность у которых оценивалась, но у которых были (1) неполные данные сканирования на момент даты прекращения сбора данных ($n = 9$) или (2) неопределяемое заболевание на исходном уровне ($n = 2$). Считалось, что пациенты ($n = 3$) с одним оцениваемым сканированием опухоли после исходного уровня < 7 недель от начала лечения, оцененным как стабильное заболевание, имели лучший общий ответ по сравнению с не поддающимися оценке. Как показано в иллюстративных результатах на Фиг. 10A, график показывает наилучшее процентное изменение суммы измерений целевого поражения каждого субъекта по сравнению с их соответствующими измерениями на исходном уровне. Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что дозы ≥ 4 мг/кг DM4-конъюгированного активируемого антитела к CD166 демонстрируют противоопухолевую активность на основе уменьшения размера опухоли при показаниях множественного рака.

[0437] Как показано в иллюстративных результатах, показанных на Фиг. 10C и 10D, графики показывают наилучшее процентное изменение суммы измерений целевого поражения каждого субъекта по сравнению с их соответствующими измерениями на исходном уровне. Субъекты, представленные на Фиг. 10C, ранее получали лечение ингибиторами пути PD, тогда как субъекты, представленные на Фиг. 10D, ранее не получали лечение ингибиторами пути PD. Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что дозы ≥ 4 мг/кг DM4-конъюгированного активируемого антитела к CD166 демонстрируют противоопухолевую активность на основе уменьшения размера опухоли при показаниях множественного рака независимо от того, получал ли субъект лечение ранее ингибиторами пути PD.

[0438] Со ссылкой на Фиг. 11A и 11B, эти иллюстративные результаты показывают ответ пациентов с раком молочной железы, которые получали лечение 4-10 мг/кг активируемого антитела к CD166 (комбинация 55), конъюгированного с DM4, в этом иллюстративном исследовании. Эти графики показывают наилучшее процентное изменение суммы измерений целевого поражения каждого субъекта по сравнению с их соответствующими измерениями на исходном уровне. На Фиг. 11C показано время лечения для

соответствующих пациентов, где каждый столбик указывает 3-недельный период после введения лекарственного средства, а промежутки указывают периоды времени, в течение которых пациент не получал последующего введения через 3 недели после предыдущего введения. Пациенту 1 было выполнено последующее сканирование опухоли с неполной оценкой эффективности, и на графике для этой оценки он отображается как не поддающийся оценке. Пациенты (N=3), эффективность у которых оценивалась, но у которых были введены неполные данные сканирования на дату прекращения сбора данных, не включены в диаграмму. Будет считаться, что пациенты (n = 2) с 1 оцениваемым сканированием опухоли после исходного уровня <7 недель от начала лечения, оцененным как стабильное заболевание, имели лучший общий ответ по сравнению с не поддающимися оценке. Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что 3 из этих пациентов, оцениваемых по ответу, которым вводили дозы ≥ 4 мг/кг DM4-конъюгированного активируемого антитела к CD166, показали частичный ответ на дату прекращения сбора данных.

[0439] Как показано в иллюстративных результатах на Фиг. 12A и 12B, эти иллюстративные результаты показывают ответ пациентов в Части A и/или A2 и их уровень экспрессии CD166 в их опухолевых клетках. Как описано в данном документе, в этом иллюстративном исследовании пациенты получали лечение 4-10 мг/кг активируемого антитела к CD166 (комбинация 55), конъюгированного с DM4. На Фиг. 12A показаны результаты для пациентов с высокой экспрессией CD166, что было определено как иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание $\geq 50\%$ опухолевых клеток, окрашенных с интенсивностью 3+ (сильная) в архивном образце опухолевой ткани, где по этим критериям оценивали только мембранно-ассоциированное окрашивание внутри опухолевых клеток. На Фиг. 12B показаны результаты для пациентов с более низкой экспрессией CD166. Эти графики показывают наилучшее процентное изменение суммы измерений целевого поражения каждого субъекта по сравнению с их соответствующими измерениями на исходном уровне. Эти иллюстративные результаты демонстрируют корреляцию между уровнем экспрессии CD166 у пациента с эффективностью лечения лекарственным средством, включая наблюдение, что пациенты с высокой экспрессией CD166 продемонстрировали частичный ответ.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0440] Изобретение может быть определено со ссылкой на следующие иллюстративные перечисленные варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (AA), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом субъекту вводят AA, конъюгированное с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг,

(A) где AA содержит:

- a. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;
- b. маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- c. расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; или

(B) где AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314; или

(C) где AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246;

и/или, или заявлено альтернативным образом, вариант 1 осуществления представляет собой активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения при лечении, облегчении симптома или замедлении прогрессирования рака у субъекта,

(A) где AA содержит:

- a. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;
- b. маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- c. расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; или

(B) где AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314; или

(C) где AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246;

[0441] Вариант осуществления 2. Способ или применение согласно варианту осуществления 1, где рак представляет собой карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого.

[0442] Вариант осуществления 3. Способ или применение согласно варианту осуществления 1, где рак представляет собой карциному молочной железы, карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, карциному яичников, карциному головы и шеи или рак легкого.

[0443] Вариант осуществления 4. Способ ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела

(AA), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом субъекту вводят AA, конъюгированное с агентом в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг, при этом AA содержит:

- a. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- c. расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

[0444] и/или, или заявлено альтернативным образом, вариант осуществления 3 представляет собой активируемое антитело (AA), конъюгированное с агентом, для применения для ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, например, для лечения рака у субъекта, в котором AA содержит:

- a. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, где 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, где MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- c. расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, где CM представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и где CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и

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

[0445] Вариант осуществления 5. Способ или применение согласно варианту осуществления 4, где субъект имеет карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого.

[0446] Вариант осуществления 6. Способ или применение согласно варианту осуществления 4, где субъект страдает от карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, холангиокарциномы, карциномы эндометрия, карциномы яичников, карциномы головы и шеи или рака легкого.

[0447] Вариант осуществления 7. Способ согласно варианту осуществления 4, где клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичников, клетки головы и шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.

[0448] Вариант осуществления 8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, где агент представляет собой майтанзиноид или его производное.

[0449] Вариант осуществления 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где агент представляет собой DM4.

[0450] Вариант осуществления 10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, где DM4 конъюгирован с AA через линкер.

[0451] Вариант осуществления 11. Способ или применение по варианту осуществления 10, где линкер содержит фрагмент SPBD.

[0452] Вариант осуществления 12. Способ или применение любого из вариантов осуществления 1-11, где АВ связано с СМ.

[0453] Вариант осуществления 13. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-12, где ММ связан с СМ таким образом, что AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ.

[0454] Вариант осуществления 14. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-13, где AA содержит связывающий пептид между ММ и СМ.

[0455] Вариант осуществления 15. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-14, где AA содержит связывающий пептид между СМ и АВ.

[0456] Вариант осуществления 16. Способ или применение по варианту осуществления 14, где связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479.

[0457] Вариант осуществления 17. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-16, где AA содержит связывающий пептид между СМ и АВ.

[0458] Вариант осуществления 18. Способ или применение по варианту осуществления 17, где связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность GGS.

[0459] Вариант осуществления 19. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-18, где АА содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом АА в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.

[0460] Вариант осуществления 20. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-19, где легкая цепь связана со спейсером на своем N-конце.

[0461] Вариант осуществления 21. Способ или применение по варианту осуществления 20, где спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305.

[0462] Вариант осуществления 22. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-21, где MM и CM связаны с легкой цепью.

[0463] Вариант осуществления 23. Способ или применение по варианту осуществления 22, где MM связан с CM таким образом, что АА в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу на своей легкой цепи: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь.

[0464] Вариант осуществления 24. Способ или применение по варианту осуществления 23, где спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479, и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.

[0465] Вариант осуществления 25. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-24, где легкая цепь АА содержит последовательность SEQ ID NO: 314.

[0466] Вариант осуществления 26. Способ или применение любого из вариантов осуществления 1-25, где легкая цепь АА содержит последовательность SEQ ID NO: 246.

[0467] Вариант осуществления 27. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-26, где субъекту по меньшей мере 18 лет

[0468] Вариант осуществления 28. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-27, где субъект имеет оценку функционального статуса от ECOG 0-1.

[0469] Вариант осуществления 29. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-28, где у субъекта гистологически подтвержден диагноз активного метастатического рака

[0470] Вариант осуществления 30. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-28, где у субъекта гистологически подтвержден диагноз местнораспространенной неоперабельной солидной опухоли

[0471] Вариант осуществления 31. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-30, где ожидаемая продолжительность жизни субъекта составляет по меньшей мере 3 месяца на момент введения или применения.

[0472] Вариант осуществления 32. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где субъект имеет карциному молочной железы.

[0473] Вариант осуществления 33. Способ или применение по варианту осуществления 32, где карцинома молочной железы является ER+.

[0474] Вариант осуществления 34. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 31-33, где субъект ранее получал антигормональную терапию и у него наблюдалось прогрессирование заболевания.

[0475] Вариант осуществления 35. Способ или применение в соответствии с вариантом осуществления 32, где субъект имеет трижды негативный рак молочной железы и он прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии.

[0476] Вариант осуществления 36. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где субъект имеет кастрационно-резистентную карциному предстательной железы.

[0477] Вариант осуществления 37. Способ или применение согласно варианту осуществления 36, где субъект получил по меньшей мере одну предшествующую терапию.

[0478] Вариант осуществления 38. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где субъект имеет холангиокарциному.

[0479] Вариант осуществления 39. Способ или применение по варианту осуществления 38, где субъект потерпел неудачу по меньшей мере в одной предыдущей гемцитабин-содержащей схеме.

[0480] Вариант осуществления 40. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где у субъекта присутствует карцинома эндометрия.

[0481] Вариант осуществления 41. Способ или применение по варианту осуществления 40, субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему для заболевания придатков матки или запущенного заболевания.

[0482] Вариант осуществления 42. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где у субъекта присутствует эпителиальная карцинома яичников.

[0483] Вариант осуществления 43. Способ или применение по варианту осуществления 42, где субъект имеет резистентную к платине карциному.

[0484] Вариант осуществления 44. Способ или применение по варианту осуществления 42, где субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичников.

[0485] Вариант осуществления 45. Способ или применение по варианту осуществления 42, где субъект имеет мутацию BRCA и невосприимчив к ингибиторам PARP или иным образом не подходит для них.

[0486] Вариант осуществления 46. Способ или применение по варианту осуществления 42, где у субъекта присутствует мутация, не связанная с BRCA.

[0487] Вариант осуществления 47. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (МКГШ).

[0488] Вариант осуществления 48. Способ или применение по варианту осуществления 47, где субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему.

[0489] Вариант осуществления 49. Способ или применение согласно варианту осуществления 47, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.

[0490] Вариант осуществления 50. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-31, где у субъекта присутствует немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

[0491] Вариант осуществления 51. Способ или применение по варианту осуществления 50, где субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему.

[0492] Вариант осуществления 52. Способ или применение согласно варианту осуществления 50, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.

[0493] Вариант осуществления 53. Способ или применение согласно варианту осуществления 50, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.

[0494] Вариант осуществления 54. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет около 7 мг/кг.

[0495] Вариант осуществления 55. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет около 8 мг/кг.

[0496] Вариант осуществления 56. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет около 9 мг/кг.

[0497] Вариант осуществления 57. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет около 10 мг/кг.

[0498] Вариант осуществления 58. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от более 6 мг/кг до более 7 мг/кг.

[0499] Вариант осуществления 59. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от около 7 мг/кг до около 8 мг/кг.

[0500] Вариант осуществления 60. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от около 8 мг/кг до около 9 мг/кг.

[0501] Вариант осуществления 61. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от около 9 мг/кг до около 10 мг/кг.

[0502] Вариант осуществления 62. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от более 6 мг/кг до около 8 мг/кг.

[0503] Вариант осуществления 63. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от около 7 мг/кг до около 9 мг/кг.

[0504] Вариант осуществления 64. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где доза составляет от около 8 мг/кг до около 10 мг/кг.

[0505] Вариант осуществления 65. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 240 мг до около 1000 мг.

[0506] Вариант осуществления 66. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 240 мг до около 400 мг.

[0507] Вариант осуществления 67. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 600 мг до около 1000 мг.

[0508] Вариант осуществления 68. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 240 мг до более 600 мг.

[0509] Вариант осуществления 69. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 280 мг до около 700 мг.

[0510] Вариант осуществления 70. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 320 мг до около 800 мг.

[0511] Вариант осуществления 71. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 360 мг до около 900 мг.

[0512] Вариант осуществления 72. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 400 мг до около 1000 мг.

[0513] Вариант осуществления 73. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 240 мг до около 280 мг.

[0514] Вариант осуществления 74. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 280 мг до около 320 мг.

[0515] Вариант осуществления 75. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 320 мг до около 360 мг.

[0516] Вариант осуществления 76. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 360 мг до около 400 мг.

[0517] Вариант осуществления 77. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 600 мг до около 700 мг.

[0518] Вариант осуществления 78. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 700 мг до около 800 мг.

[0519] Вариант осуществления 79. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 800 мг до около 900 мг.

[0520] Вариант осуществления 80. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 900 мг до около 1000 мг.

[0521] Вариант осуществления 81. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 240 мг до около 320 мг.

[0522] Вариант осуществления 82. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 280 мг до около 360 мг.

[0523] Вариант осуществления 83. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 320 мг до около 400 мг.

[0524] Вариант осуществления 84. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от более 600 мг до около 800 мг.

[0525] Вариант осуществления 85. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 700 мг до около 900 мг.

[0526] Вариант осуществления 86. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-53, где АА, конъюгированное с агентом, находится в фиксированной дозе от около 800 мг до около 1000 мг.

[0527] Вариант осуществления 87. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-86, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно, или АА составлено для внутривенного применения.

[0528] Вариант осуществления 88. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-83, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 21 день или составленное для применения каждые 21 день.

[0529] Вариант осуществления 89. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-83, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 14 дней или составленное для применения каждые 14 дней.

[0530] Вариант осуществления 90. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 54-64 и 87-89, где АА конъюгировано с агентом с дозировкой, основанной на фактической массе тела субъекта.

[0531] Вариант осуществления 91. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 54-64 и 87-89, где АА конъюгировано с агентом с дозировкой, основанной на скорректированной идеальной массе тела субъекта.

[0532] Вариант осуществления 92. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-91, где у субъекта в анамнезе не было острого или хронического заболевания роговицы.

[0533] Вариант осуществления 93. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 1-92, где способ включает применение субъектом профилактического лечения для уменьшения или предотвращения нежелательных явлений со стороны глаз.

[0534] Вариант осуществления 94. Способ или применение по варианту осуществления 93, где профилактическое лечение проводят ежедневно.

[0535] Вариант осуществления 95. Способ или применение в соответствии с вариантами осуществления 93 или 94, где профилактическое лечение представляет собой один или более видов лечения, выбранных из группы, состоящей из: смазывания искусственной слезой, офтальмологического раствора бримонида тартрата, наложения холодного компресса для глаз и капель топического стероида.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0536] Хотя настоящее изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у субъекта, включающий:

введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (АА – англ.: activatable antibody), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом,

где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг, и

(А) при этом АА содержит:

- а. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ – англ.: antibody), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;
- б. маскирующий фрагмент (ММ – англ.: masking moiety), связанный с АВ, при этом ММ ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- с. расщепляемый фрагмент (СМ – англ.: cleavable moiety), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и при этом СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; или

(В) при этом АА содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314; или

(С) при этом АА содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246.

2. Способ по п. 1, где рак представляет собой карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого.

3. Способ по п. 1, где рак представляет собой карциному молочной железы, карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, карциному яичников, карциному головы и шеи или рак легкого.

4. Способ ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта, включающий:

введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела (AA), конъюгированного с агентом, субъекту, нуждающемуся в этом, при этом субъекту вводят AA, конъюгированное с агентом, в дозе от более чем 6 мг/кг до около 10 мг/кг, и

(A) при этом AA содержит:

- a. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;
- b. маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, при этом MM ингибирует связывание AB с CD166 млекопитающего, когда AA находится в нерасщепленном состоянии, при этом MM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222; и
- c. расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, при этом CM представляет собой полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, и при этом CM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; или

(B) при этом AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом AB содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314; или

(C) при этом AA содержит:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфично связывается с CD166 млекопитающего, при этом AB содержит тяжелую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480 или SEQ ID NO: 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246.

5. Способ по п. 4, где субъект имеет карциному молочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, эпителиальную карциному яичников, плоскоклеточную карциному головы и шеи или немелкоклеточный рак легкого.
6. Способ по п. 4, где субъект имеет карциному молочной железы, карциному предстательной железы, холангиокарциному, карциному эндометрия, карциному яичников, карциному головы и шеи или рак легкого.
7. Способ по п. 4, где клетки представляют собой клетки молочной железы, клетки предстательной железы, клетки эндометрия, клетки яичников, клетки головы и шеи, клетки желчных протоков или клетки легких.
8. Способ по любому из пп. 1–7, где агент представляет собой майтанзиноид или его производное.
9. Способ по любому из пп. 1–8, где агент представляет собой DM4.
10. Способ по любому из вариантов осуществления 1–9, где DM4 конъюгирован с AA через линкер.
11. Способ по п. 10, где линкер содержит фрагмент SPBD.
12. Способ по любому из пп. 1–11, где АВ связан с СМ.
13. Способ по любому из пп. 1–12, где ММ связан с СМ таким образом, что AA в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ.
14. Способ по любому из пп. 1–13, где AA содержит связывающий пептид между ММ и СМ.
15. Способ по любому из пп. 1–14, где AA содержит связывающий пептид между СМ и АВ.
16. Способ по п. 14, где связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479.
17. Способ по любому из пп. 1–16, где AA содержит связывающий пептид между СМ и АВ.
18. Способ по п. 17, где связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность GGS.
19. Способ по любому из пп. 1–18, где AA содержит первый связывающий пептид (LP1 – англ.: first linking peptide) и второй связывающий пептид (LP2 – англ.: second

linking peptide), и при этом АА в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM.

20. Способ по любому из пп. 1–19, где легкая цепь связана со спейсером на своем N-конце.

21. Способ по п. 20, где спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305.

22. Способ по любому из пп. 1–21, где MM и CM связаны с легкой цепью.

23. Способ по п. 22 где MM связан с CM таким образом, что АА в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу на своей легкой цепи: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-легкая цепь.

24. Способ по п. 23, где спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, LP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479, и LP2 содержит аминокислотную последовательность GGS.

25. Способ по любому из пп. 1–24, где легкая цепь АА содержит последовательность SEQ ID NO: 314.

26. Способ по любому из пп. 1–25, где легкая цепь АА содержит последовательность SEQ ID NO: 246.

27. Способ по любому из пп. 1–26, где субъекту по меньшей мере 18 лет

28. Способ по любому из пп. 1–27, где субъект имеет оценку функционального статуса по ECOG 0–1.

29. Способ по любому из пп. 1–28, где у субъекта гистологически подтвержден диагноз активного метастатического рака.

30. Способ по любому из пп. 1–28, где у субъекта гистологически подтвержден диагноз местнораспространенной неоперабельной солидной опухоли.

31. Способ по любому из пп. 1–30, где ожидаемая продолжительность жизни субъекта на момент введения составляет по меньшей мере 3 месяца.

32. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет карциному молочной железы.

33. Способ по п. 32, где карцинома молочной железы является ER+.

34. Способ по любому из пп. 32–33, где субъект ранее получал антигормональную терапию и у него наблюдалось прогрессирование заболевания.

35. Способ по п. 32, где субъект имеет трижды негативный рак молочной железы и он прошел по меньшей мере две предшествующие линии терапии.

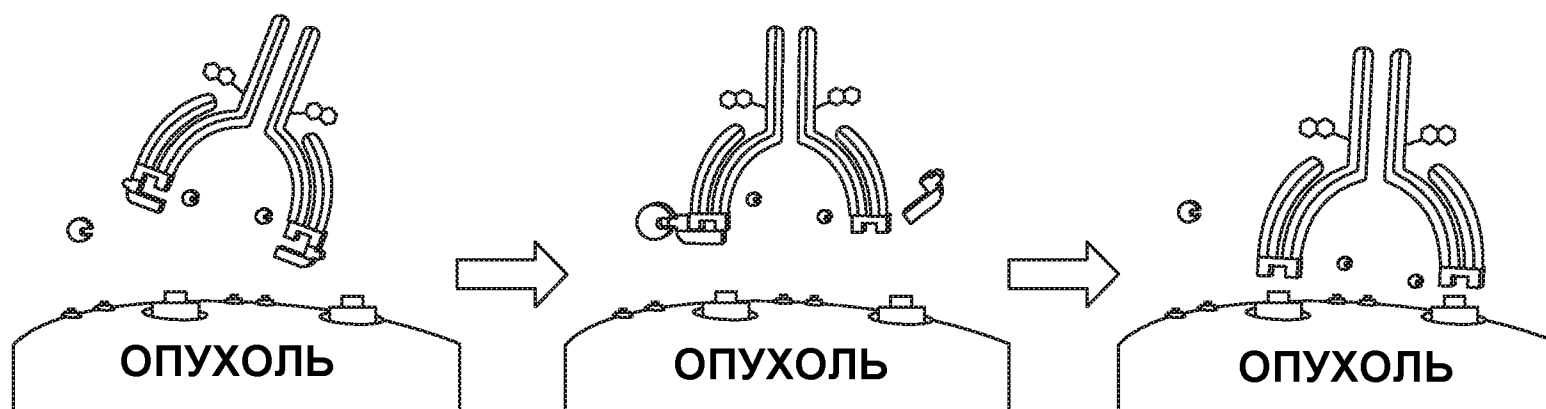
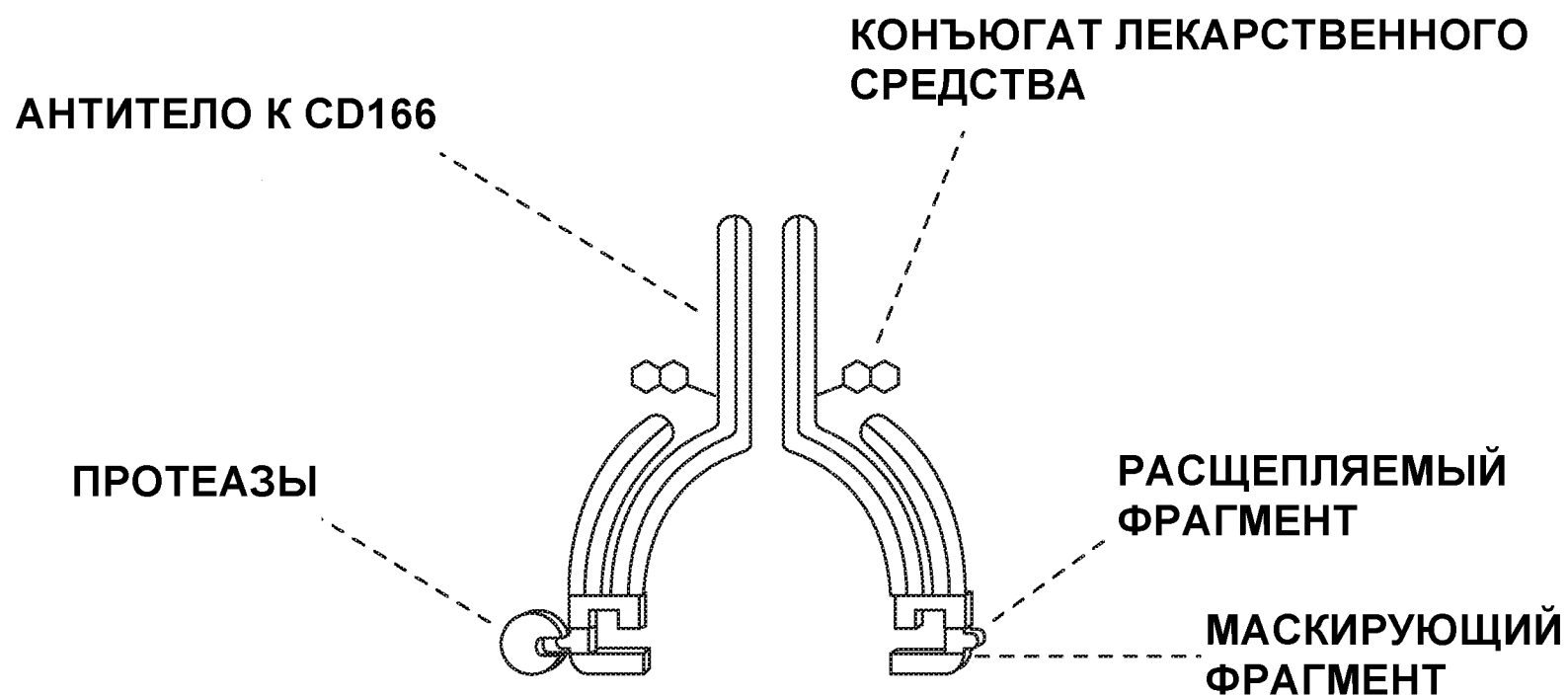
36. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект присутствует кастрационно-резистентная карцинома предстательной железы.

37. Способ по п. 36, где субъект получил по меньшей мере одну предшествующую терапию.
38. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет холангиокарциному.
39. Способ по п. 38, где субъект потерпел неудачу по меньшей мере в одной предыдущей линии гемцитабин-содержащей схемы.
40. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет макулярную дистрофию.
41. Способ по п. 40, где субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему для заболевания придатков матки или запущенного заболевания.
42. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет эпителиальную карциному яичников.
43. Способ по п. 42, где субъект имеет резистентную к платине карциному.
44. Способ по п. 42, где субъект имеет рефрактерную к платине карциному яичников.
45. Способ по п. 42, где субъект имеет мутацию BRCA и невосприимчив к ингибиторам PARP или иным образом не подходит для них.
46. Способ по п. 42, где субъект имеет мутацию, не связанную с BRCA.
47. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет мелкоклеточную карциному головы и шеи (МКГШ).
48. Способ по п. 47, где субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему лечения.
49. Способ по п. 47, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.
50. Способ по любому из пп. 1–31, где субъект имеет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).
51. Способ по п. 50, где субъект получил по меньшей мере одну платиносодержащую схему.
52. Способ по п. 50, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор контрольной точки.
53. Способ по п. 50, где субъект получил по меньшей мере один ингибитор PD-1/PD-L1.
54. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет около 7 мг/кг.
55. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет около 8 мг/кг.
56. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет около 9 мг/кг.
57. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет около 10 мг/кг.

58. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от более 6 мг/кг до более 7 мг/кг.
59. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от около 7 мг/кг до около 8 мг/кг.
60. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от около 8 мг/кг до около 9 мг/кг.
61. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от около 9 мг/кг до около 10 мг/кг.
62. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от более 6 мг/кг до около 8 мг/кг.
63. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от около 7 мг/кг до около 9 мг/кг.
64. Способ по любому из пп. 1–53, где доза составляет от около 8 мг/кг до около 10 мг/кг.
65. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до около 1000 мг.
66. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до около 400 мг.
67. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 600 мг до около 1000 мг.
68. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до более 600 мг.
69. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 280 мг до около 700 мг.
70. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 320 мг до около 800 мг.
71. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 360 мг до около 900 мг.
72. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 400 мг до около 1000 мг.
73. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до около 280 мг.
74. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 280 мг до около 320 мг.

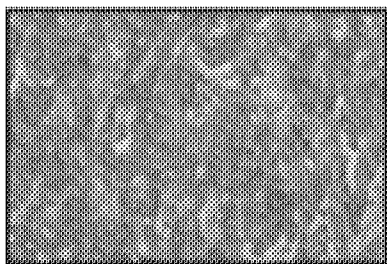
75. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 320 мг до около 360 мг.
76. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 360 мг до около 400 мг.
77. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 600 мг до около 700 мг.
78. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 700 мг до около 800 мг.
79. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 800 мг до около 900 мг.
80. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 900 мг до около 1000 мг.
81. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 240 мг до около 320 мг.
82. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 280 мг до около 360 мг.
83. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 320 мг до около 400 мг.
84. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от более 600 мг до около 800 мг.
85. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 700 мг до около 900 мг.
86. Способ по любому из пп. 1–53, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, в фиксированной дозе от около 800 мг до около 1000 мг.
87. Способ по любому из пп. 1–86, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно.
88. Способ по любому из пп. 1–87, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 21 день.
89. Способ по любому из пп. 1–87, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом, внутривенно каждые 14 дней.
90. Способ по любому из пп. 54–64 и 87–89, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом с дозировкой, основанной на фактической массе тела субъекта.

91. Способ по любому из пп. 54–64 и 87–89, где субъекту вводят АА, конъюгированное с агентом с дозировкой, основанной на скорректированной идеальной массе тела субъекта.
92. Способ по любому из пп. 1–91, где у субъекта в анамнезе не было острого или хронического заболевания роговицы.
93. Способ по любому из пп. 1–92, где способ включает применение субъектом профилактического лечения для уменьшения или предотвращения нежелательных явлений со стороны глаз.
94. Способ по п. 93, где профилактическое лечение проводят ежедневно.
95. Способ по п. 93 или п. 94, где профилактическое лечение представляет собой один или более видов лечения, выбранных из группы, состоящей из: смазывания искусственной слезой, офтальмологического раствора бримонидина тартрата, наложения холодного компресса для глаз и капель топического стероида.

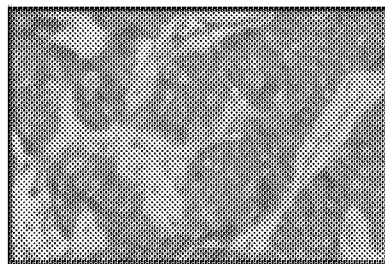


ФИГ. 1

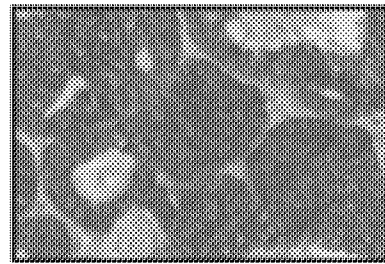
Рак желчных путей
(холангиокарцинома)



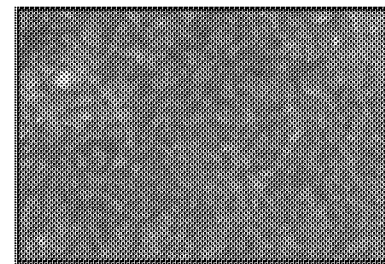
Карцинома молочной
железы, ER+/Her2-



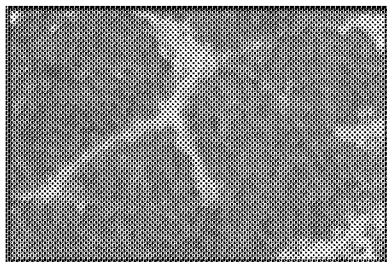
Карцинома эндометрия



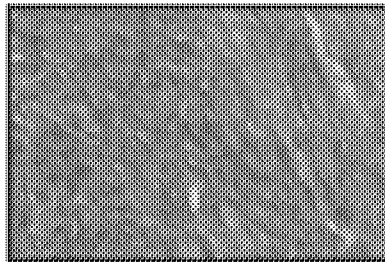
ПКГШ



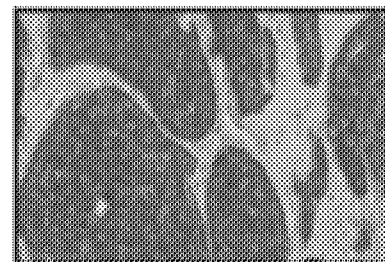
НМРЛ



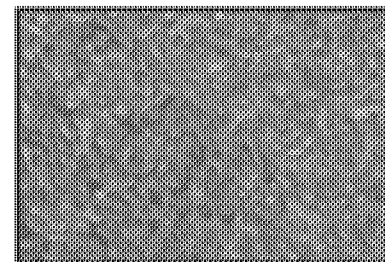
Карцинома яичников



Карцинома
предстательной железы

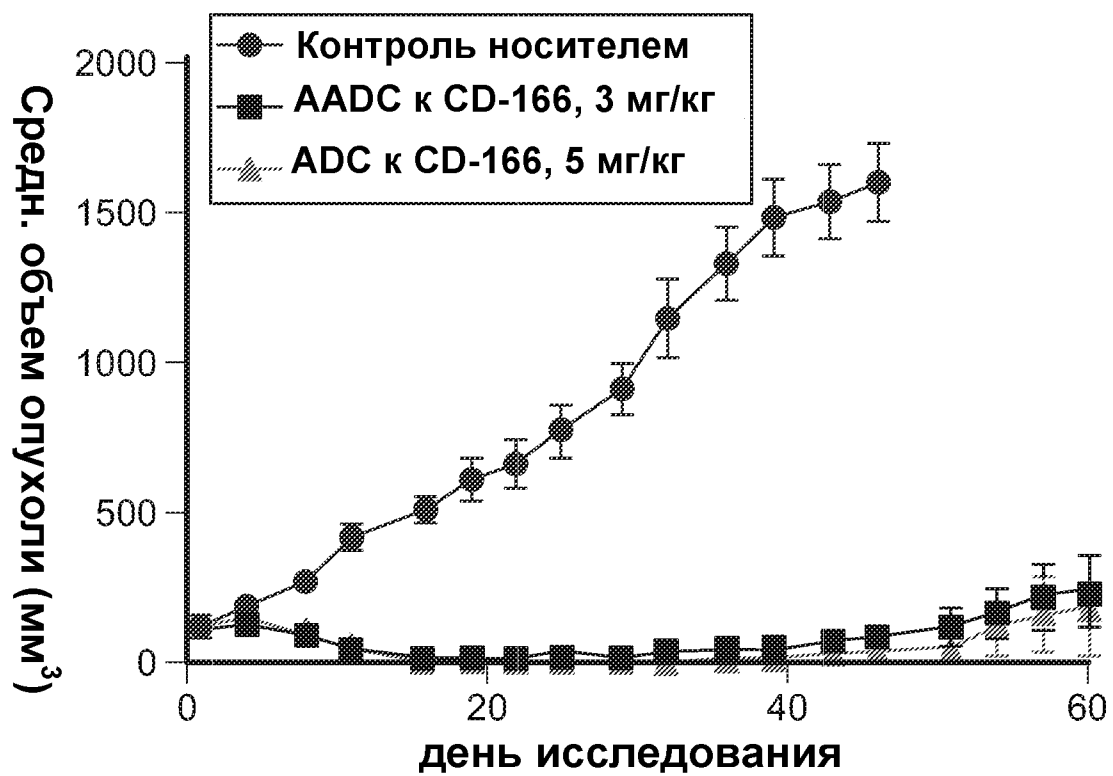


ТНРМЖ

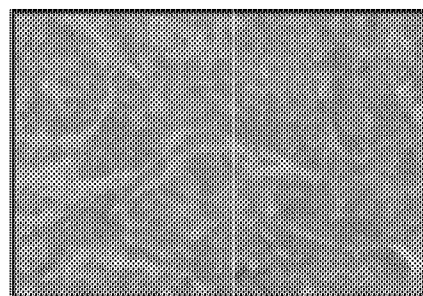


ФИГ. 2

Модель опухоли НСС1806 (ТНРМЖ)

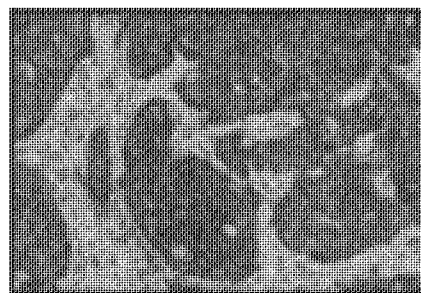
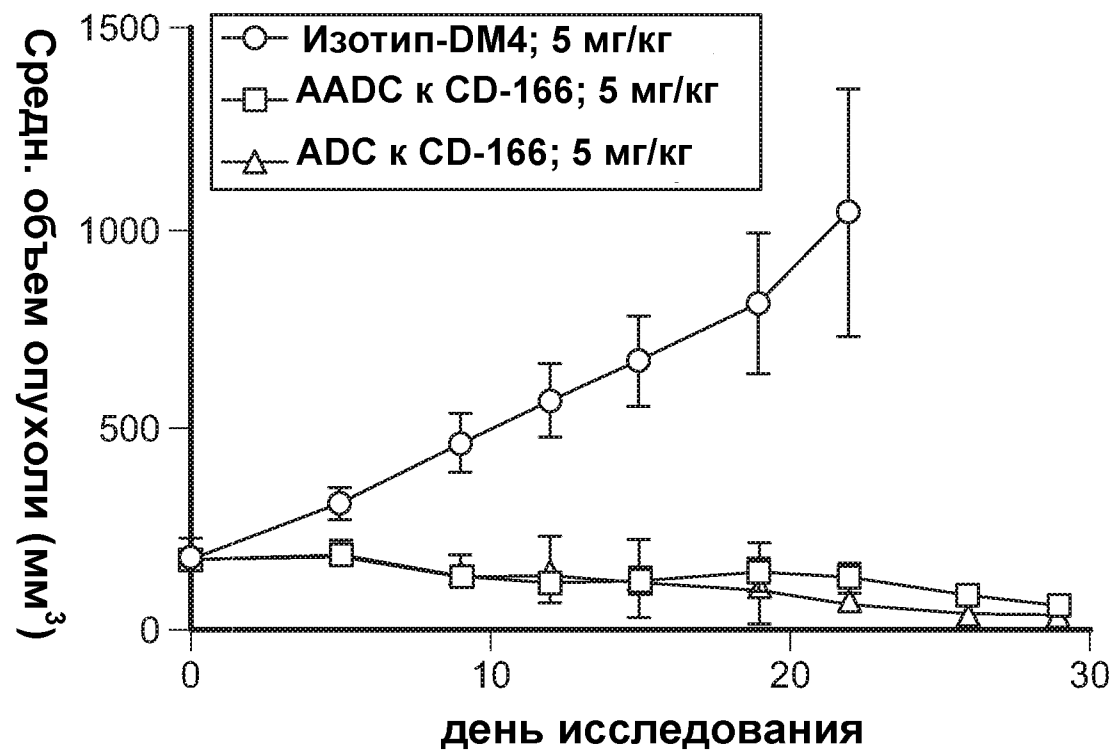


CD166 IHC



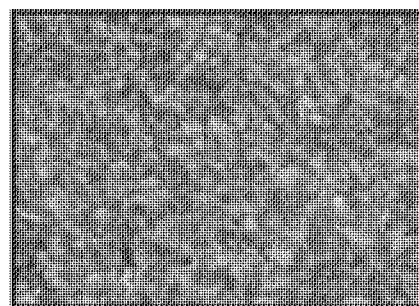
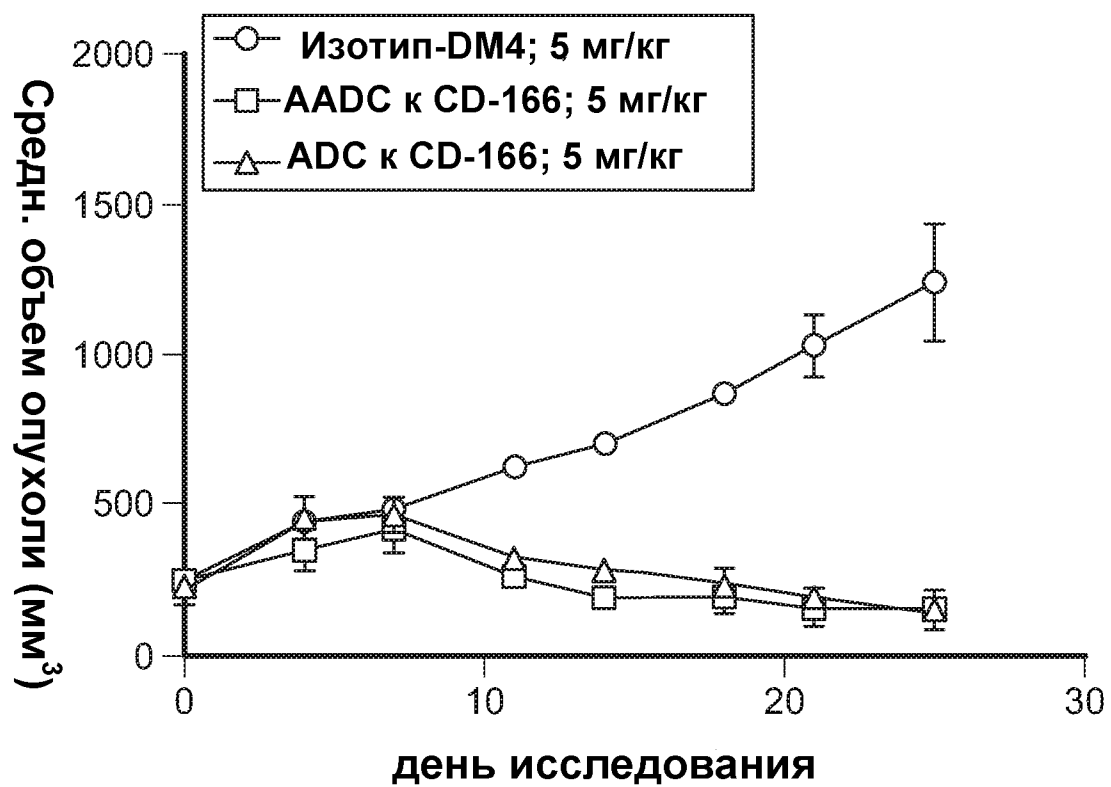
ФИГ. 3

Модель опухоли H292 (НМРЛ)

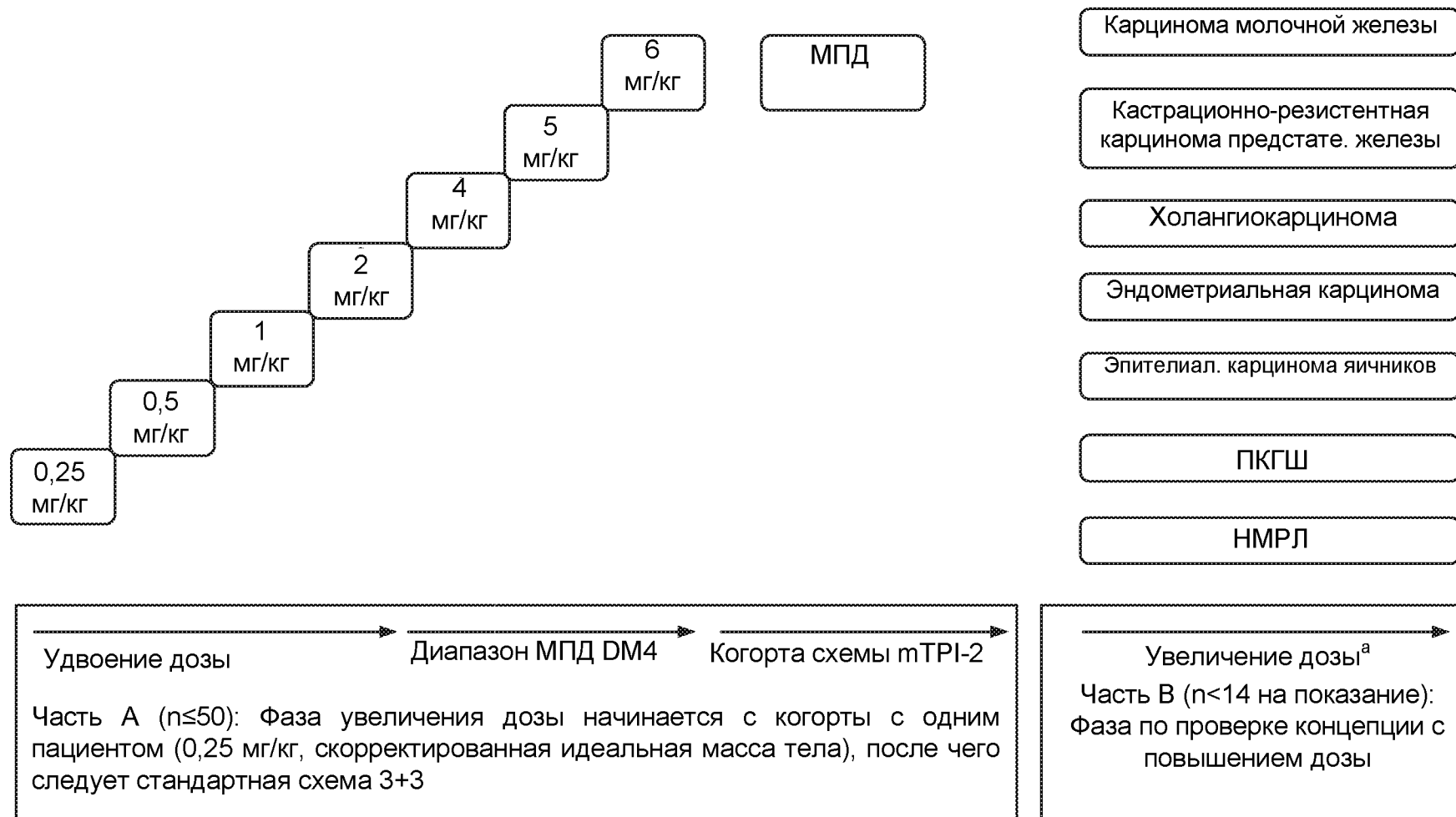


ФИГ. 4

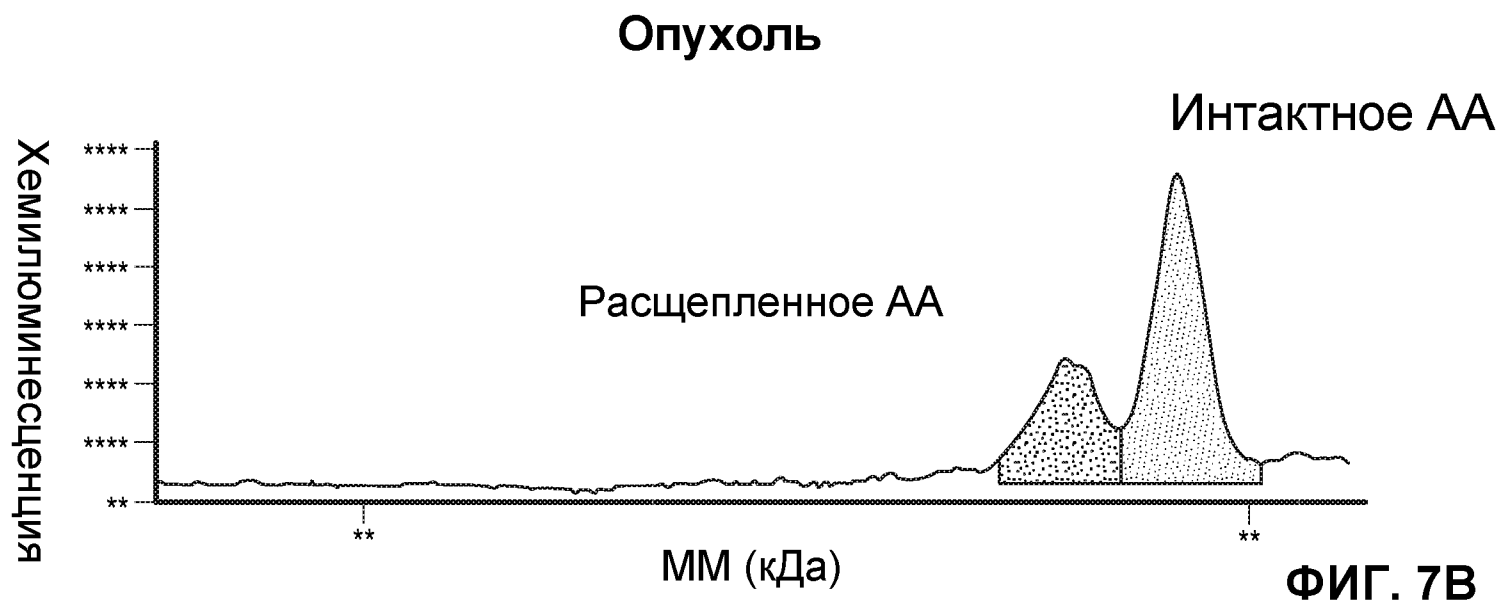
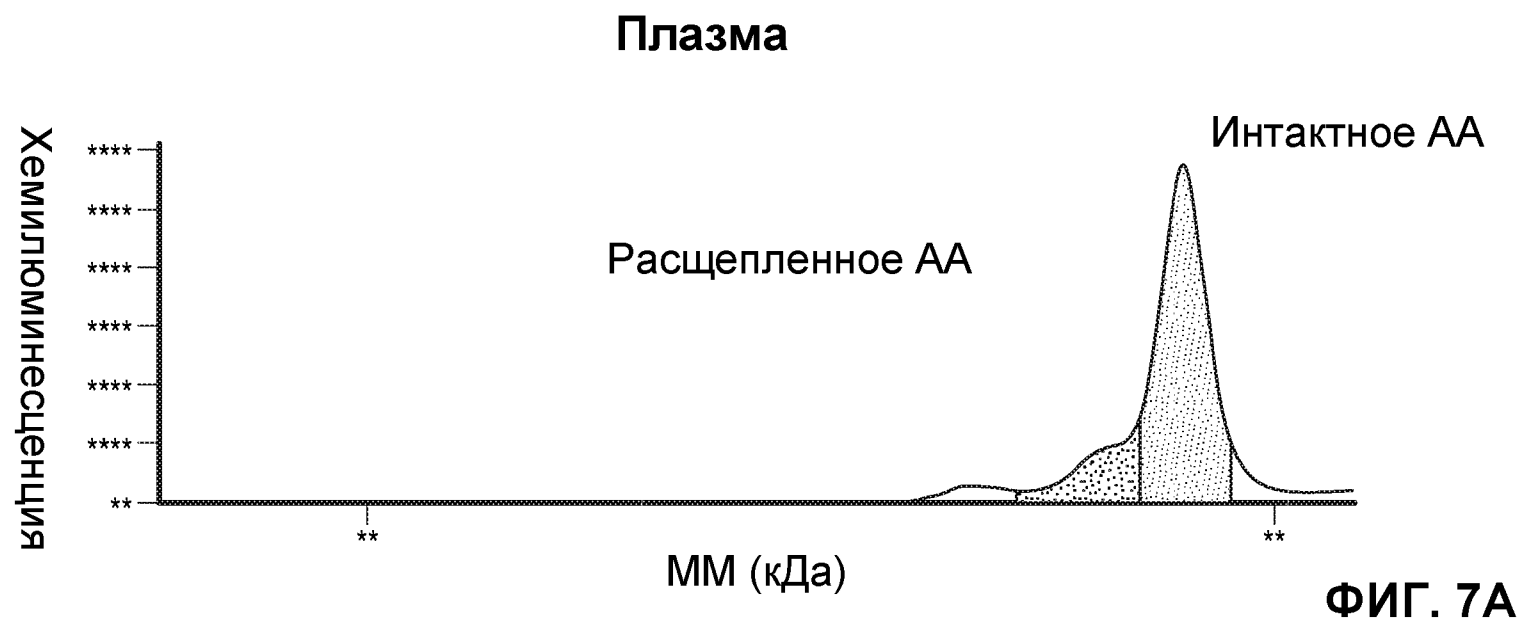
Модель PDX рака яичников



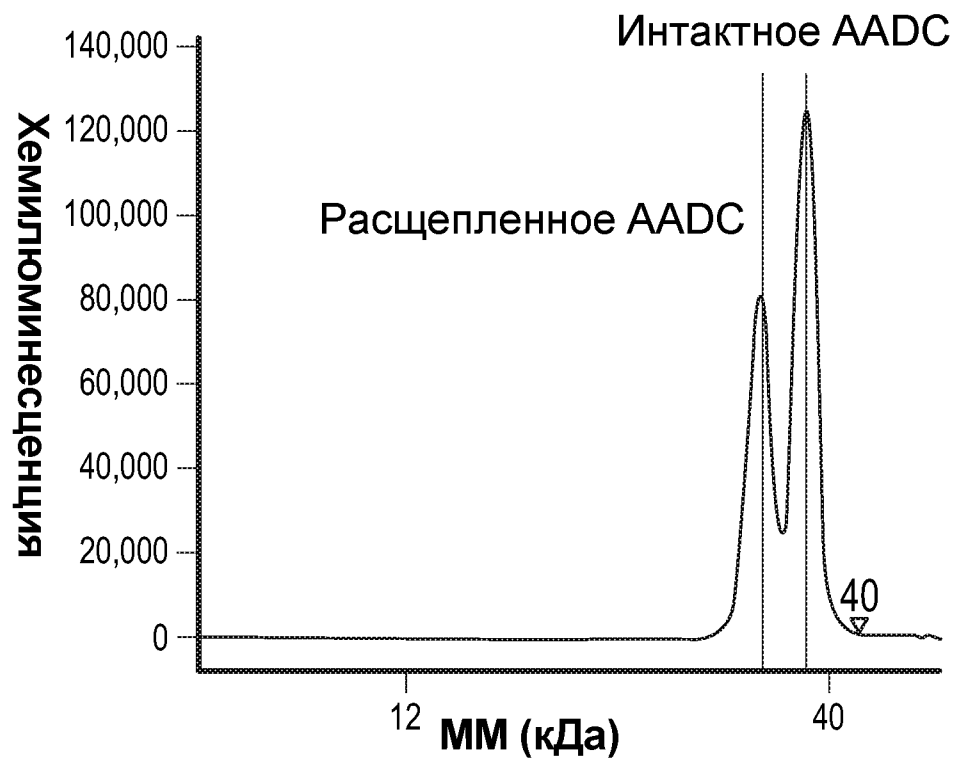
ФИГ. 5



ФИГ. 6

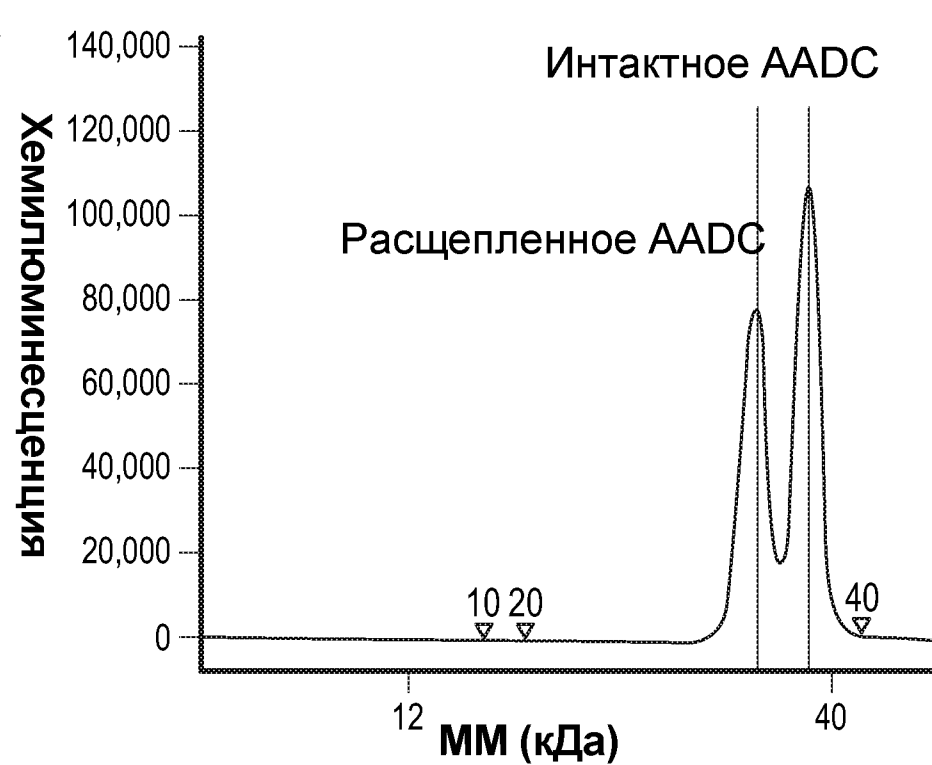


**7614.6-3001-HuCD166, расщепленное
MT-SPI**

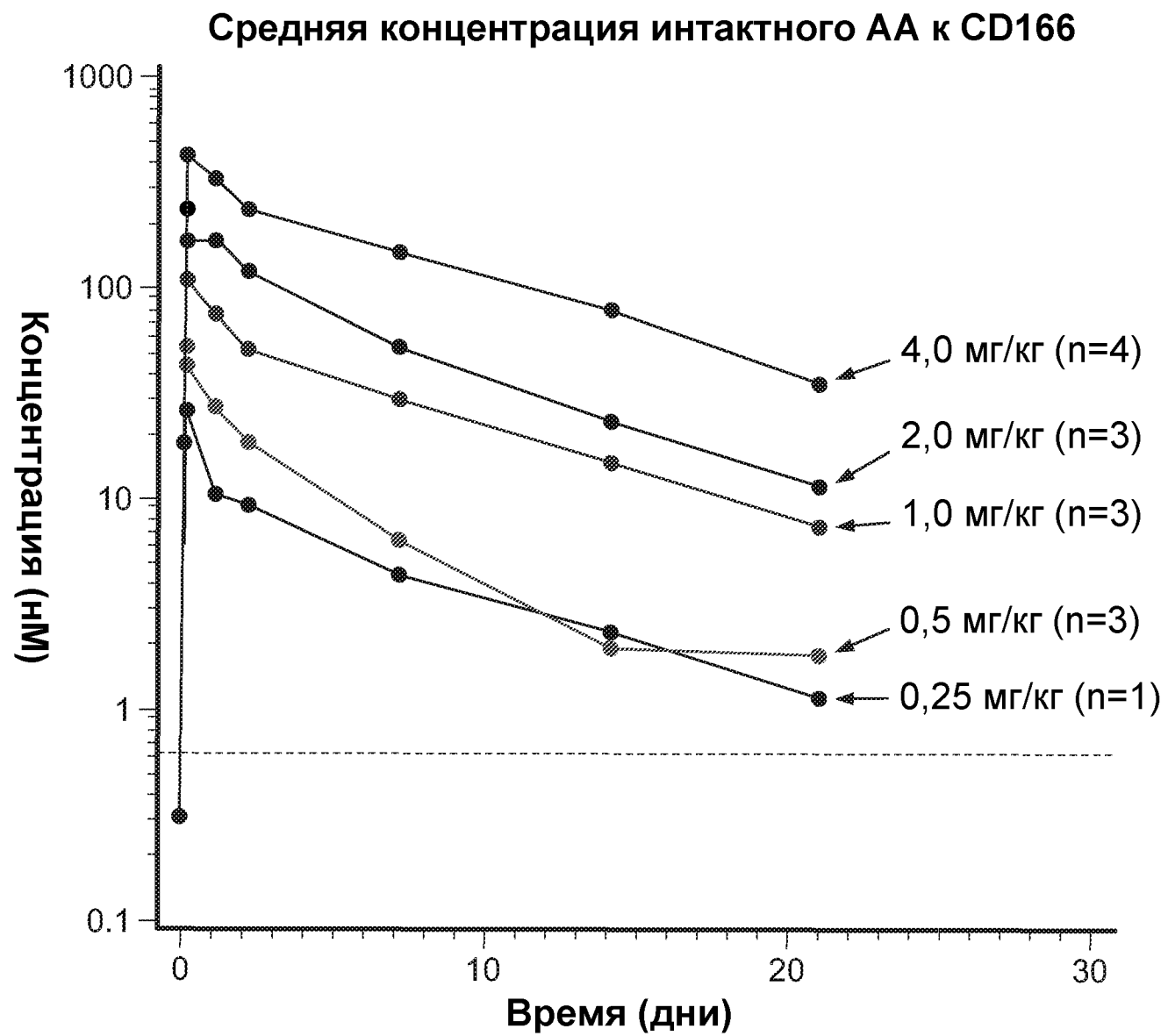


ФИГ. 8А

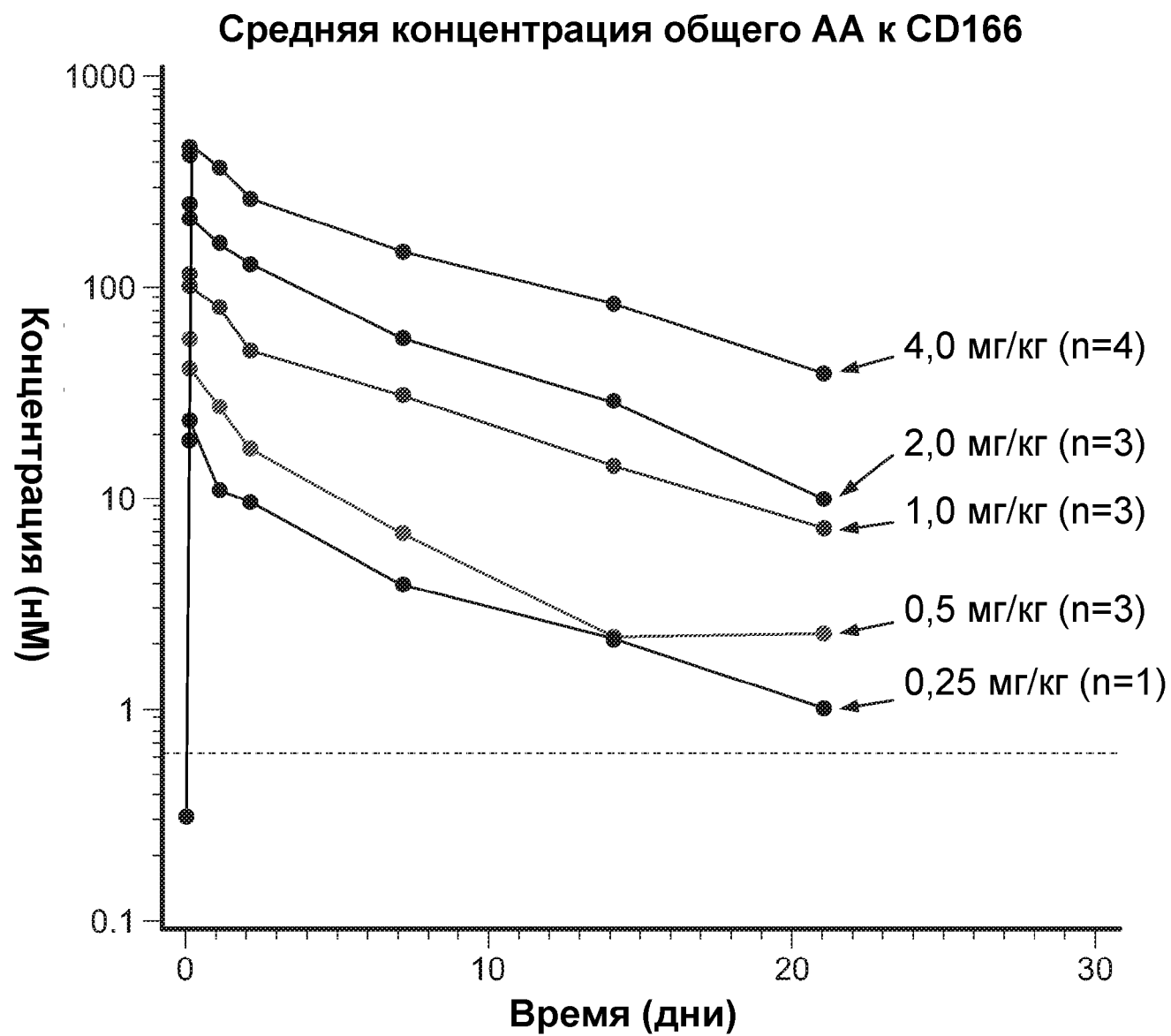
**7614.6-3001-HuCD166,
расщепленное MMP14**

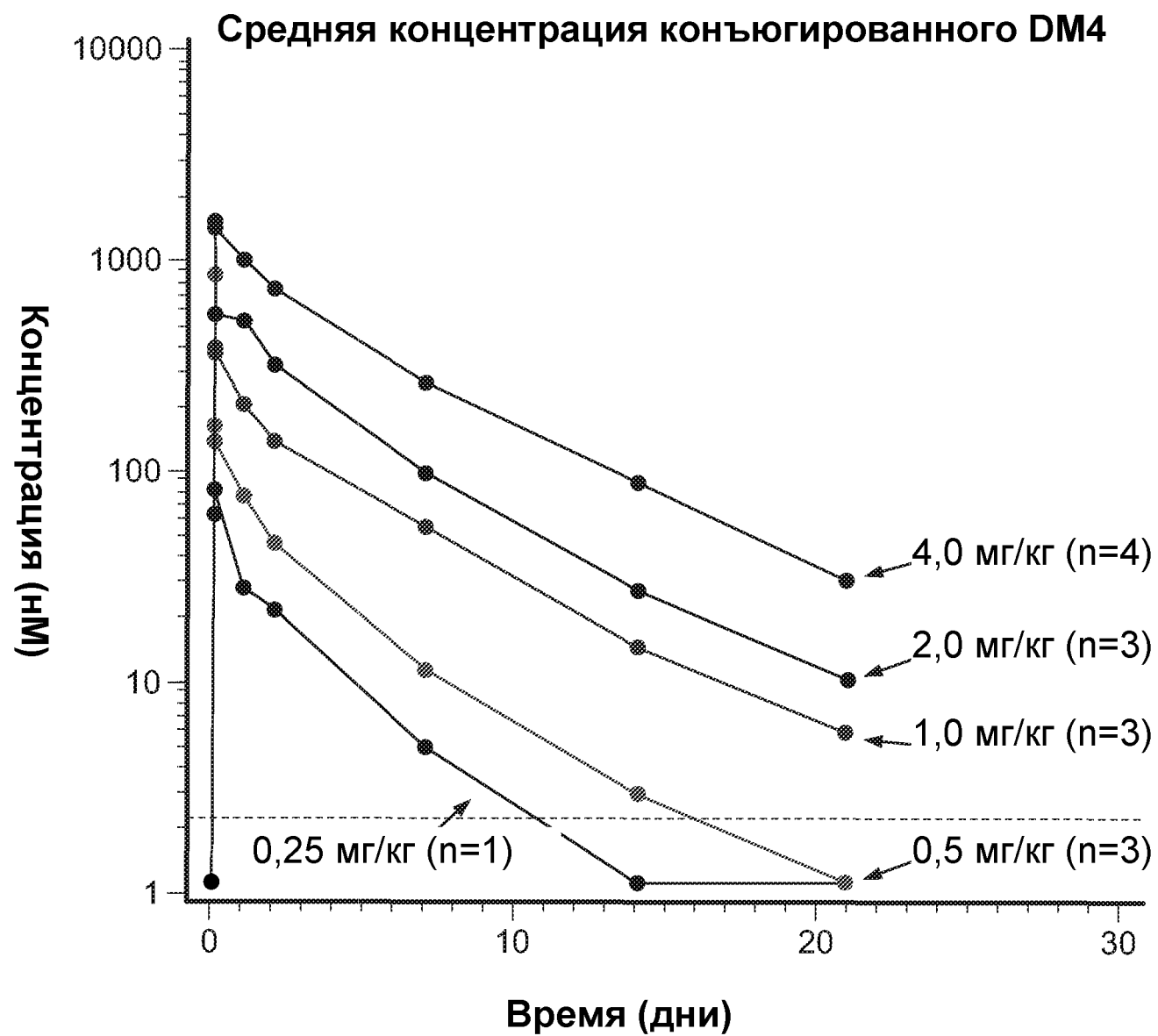


ФИГ. 8В

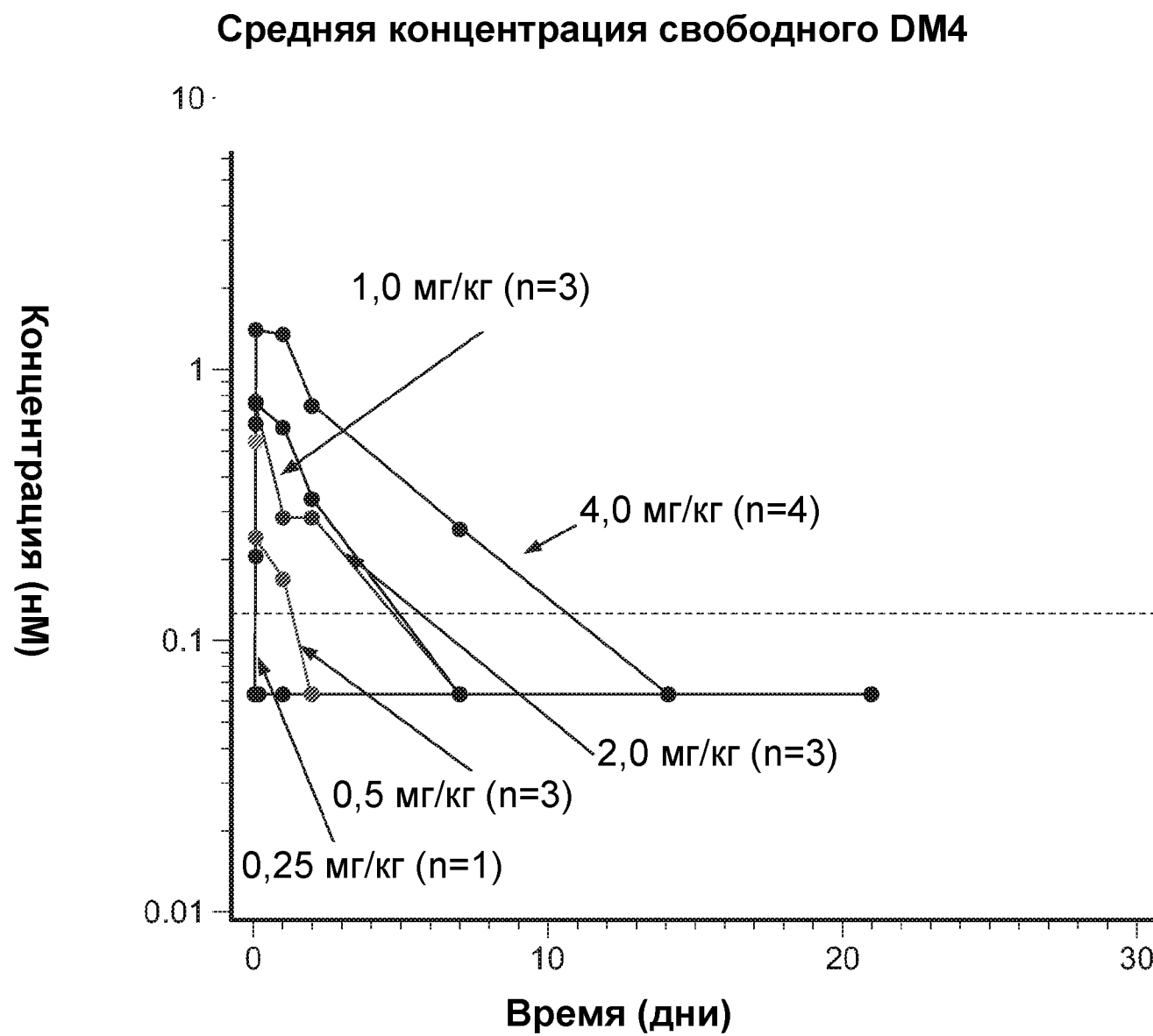


ФИГ. 9А

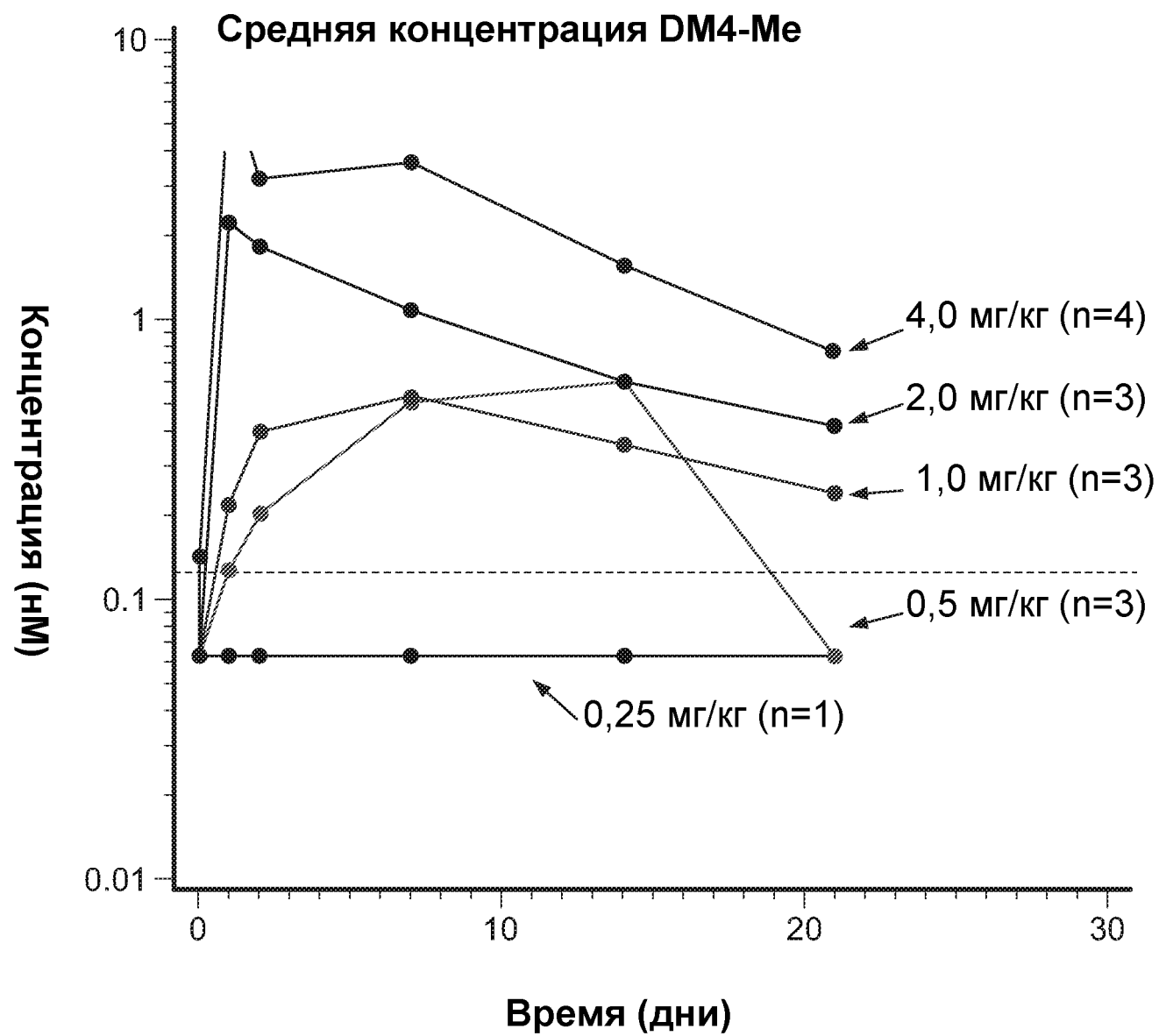
**ФИГ. 9В**



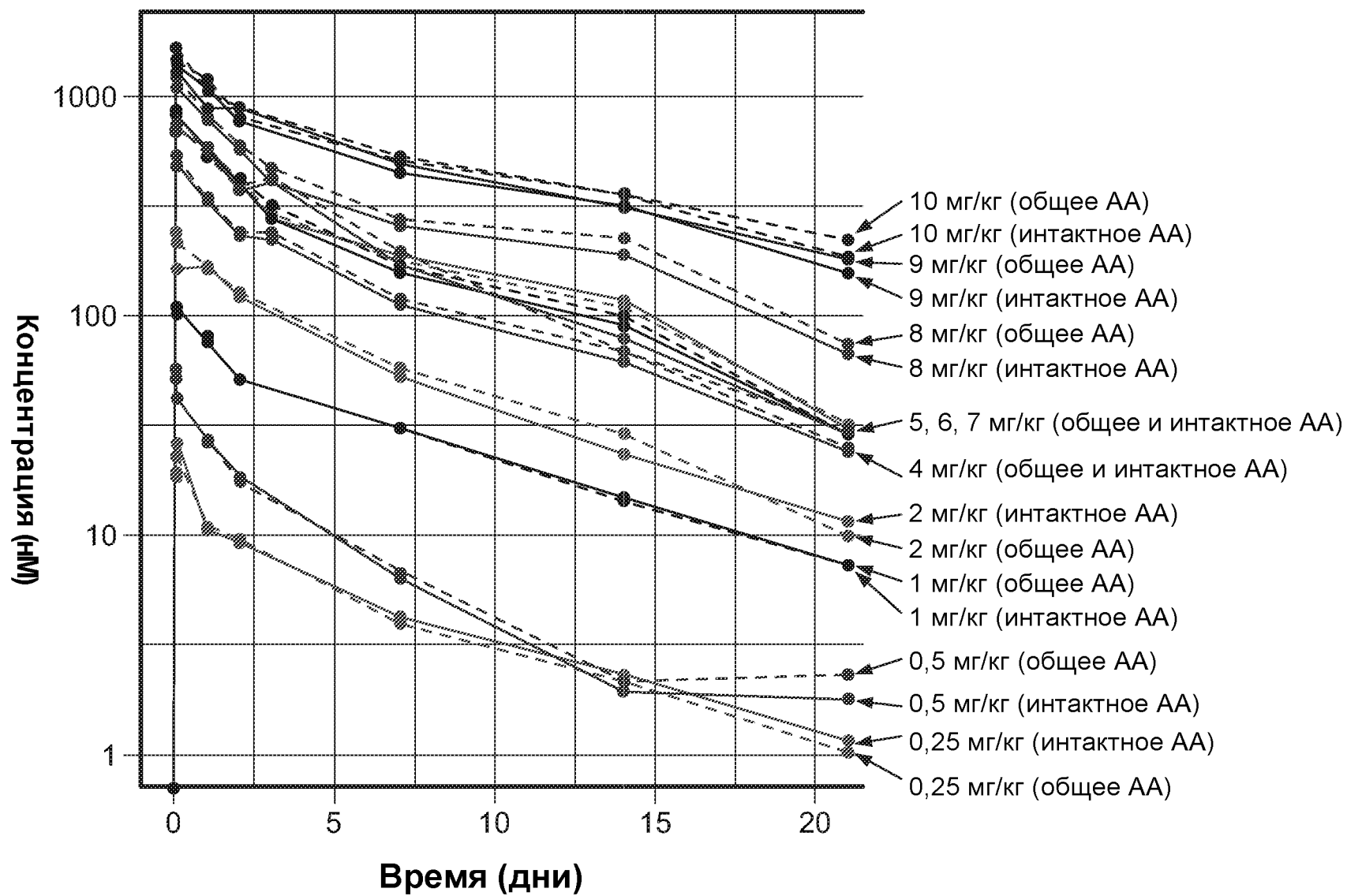
ФИГ. 9С



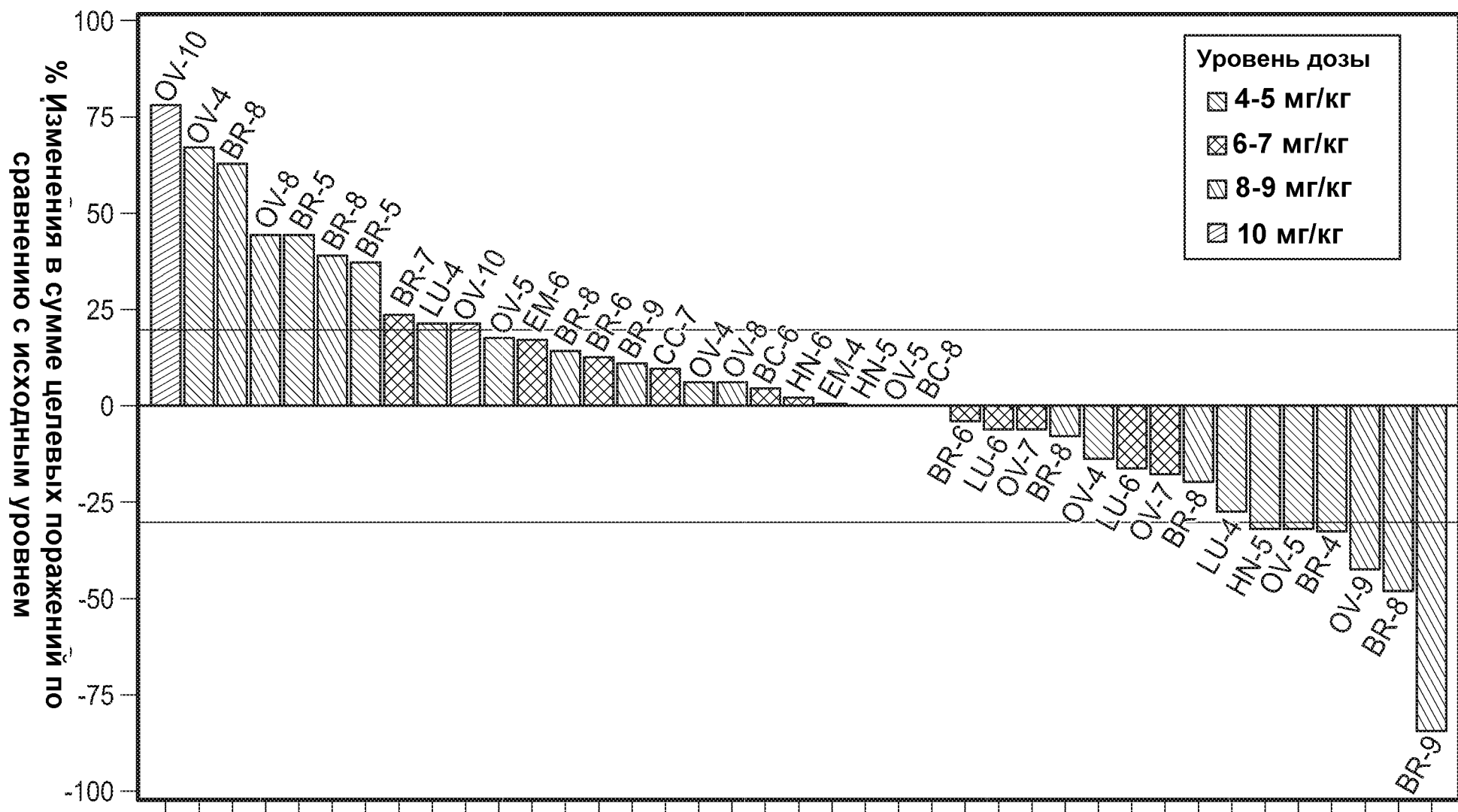
ФИГ. 9D



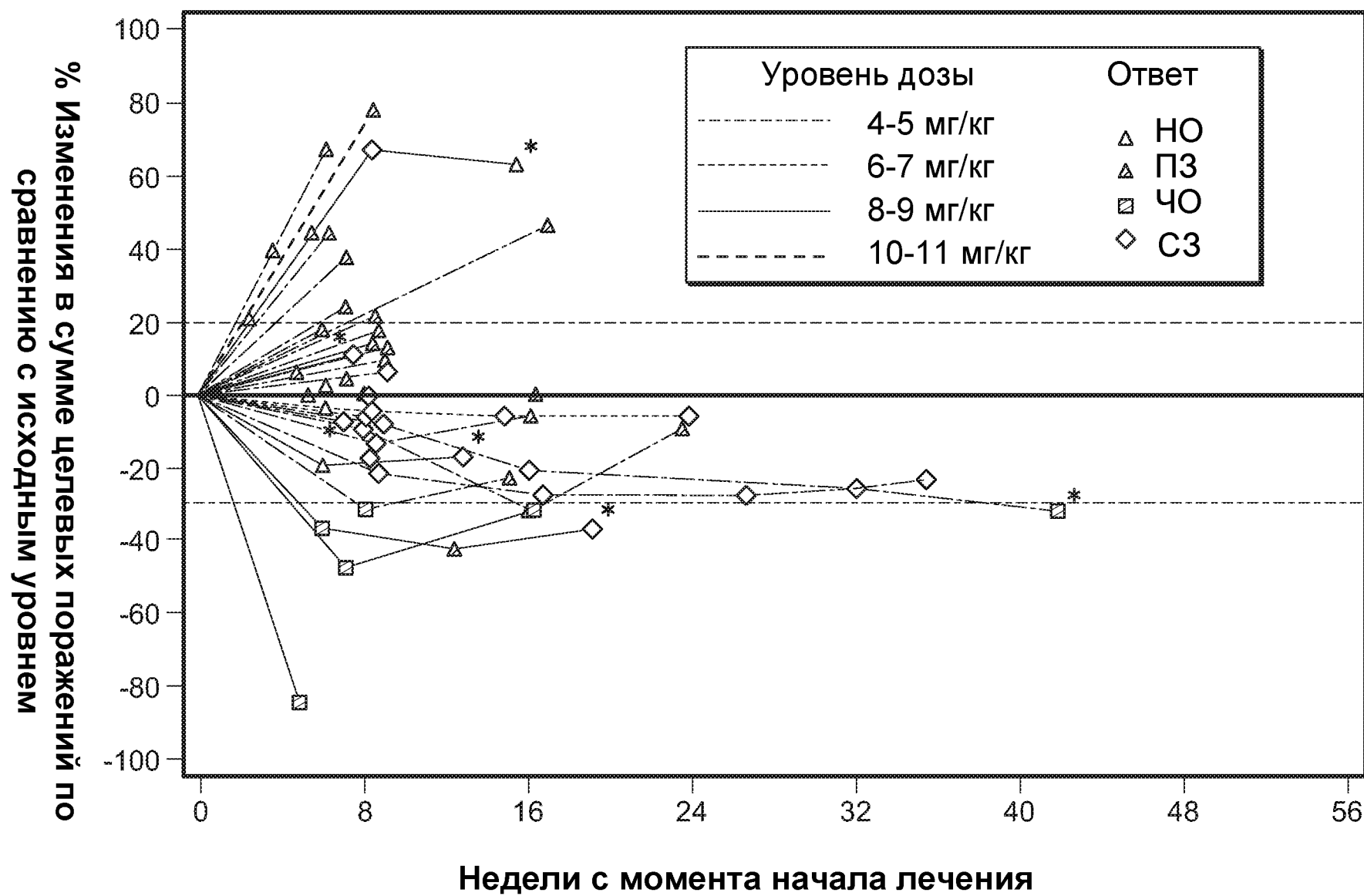
ФИГ. 9Е



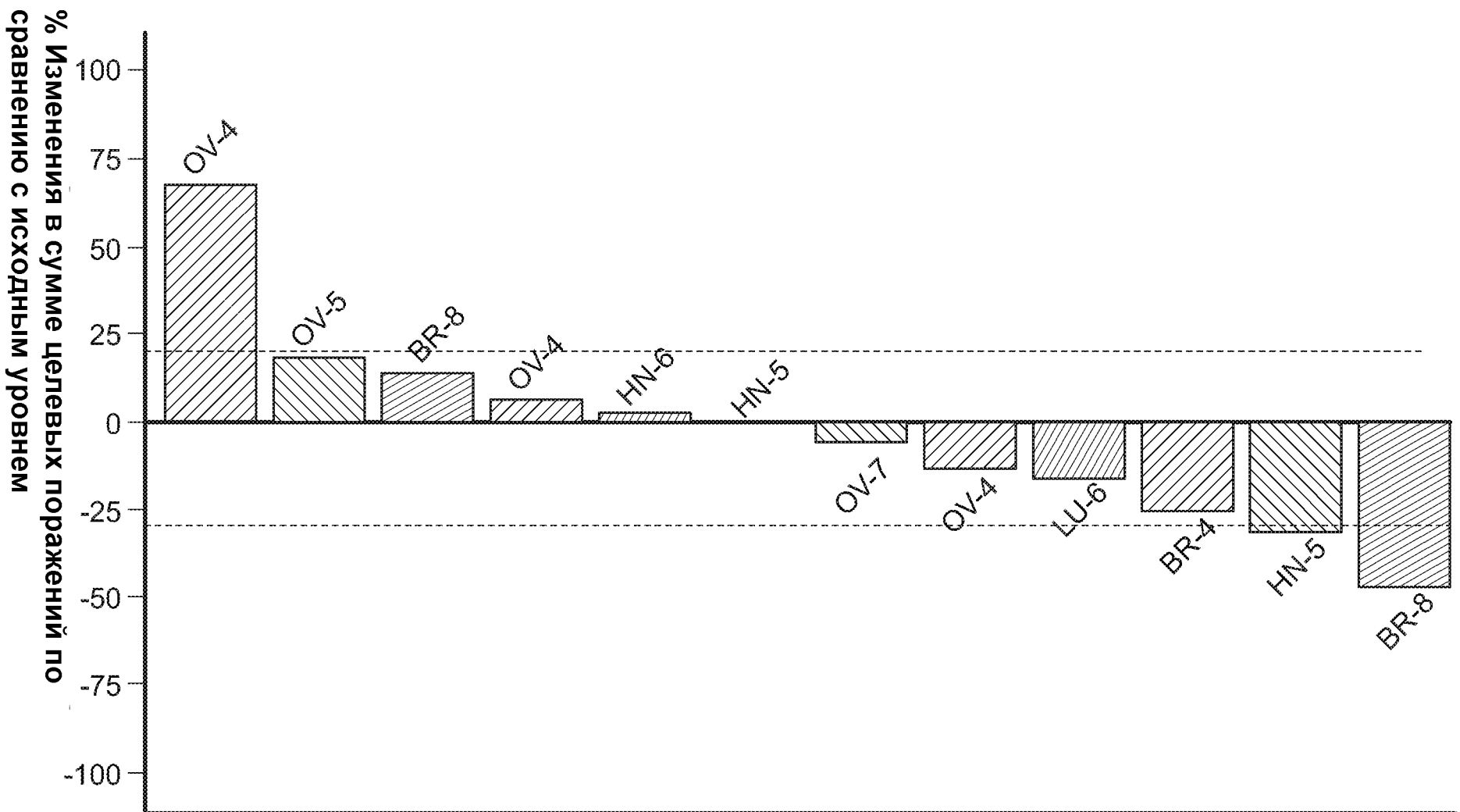
ФИГ. 9F



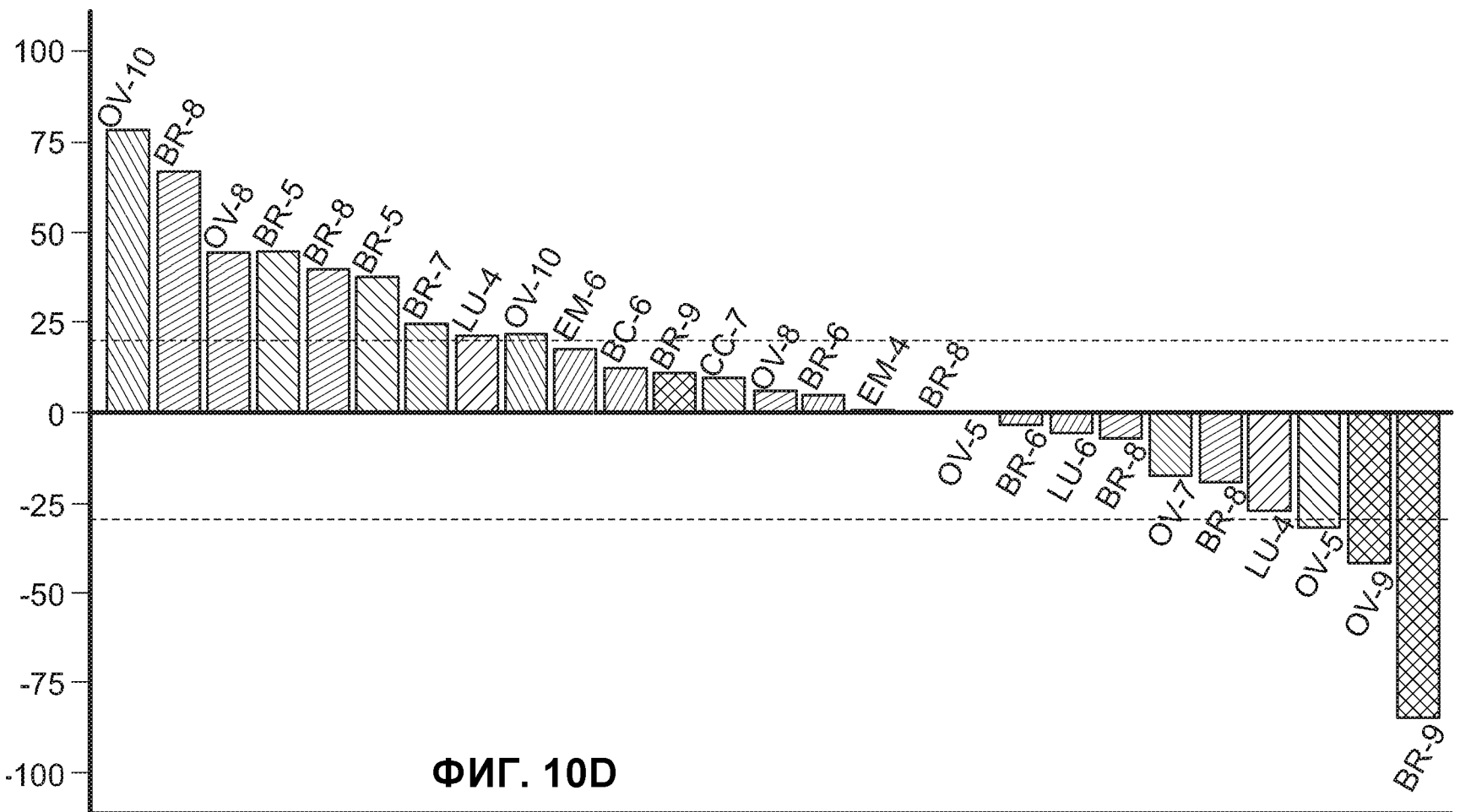
ФИГ. 10А

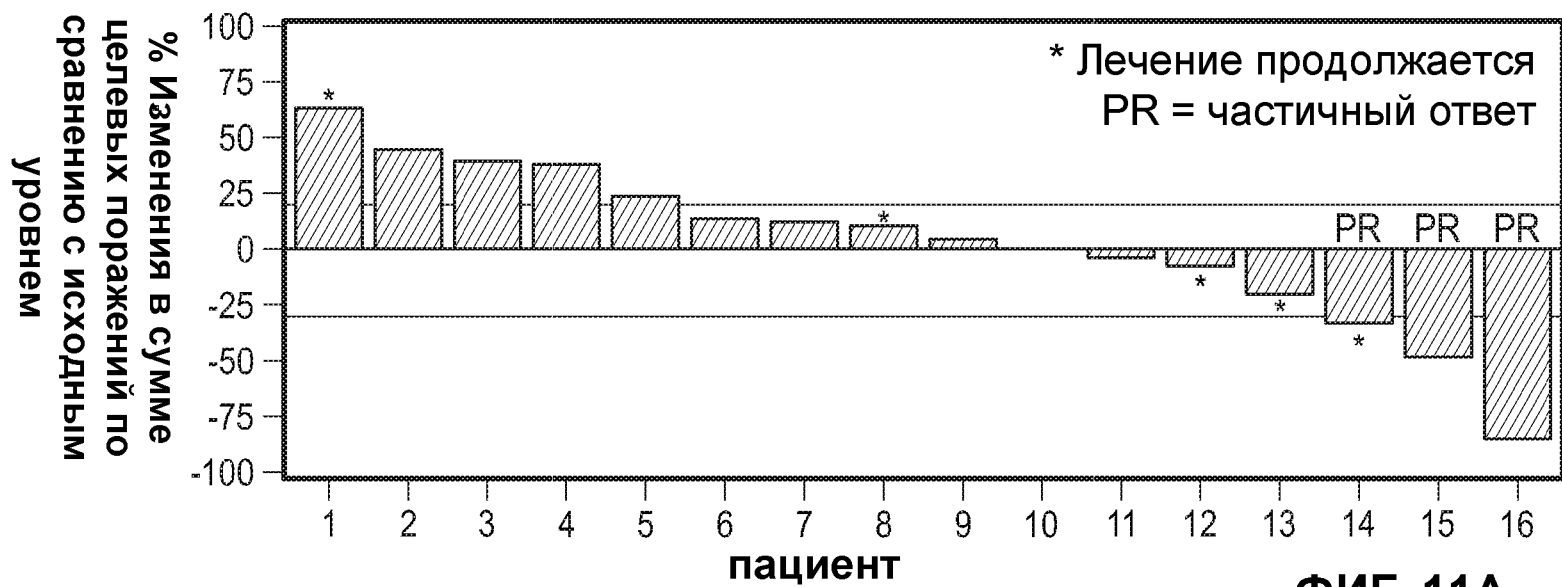


ФИГ. 10В

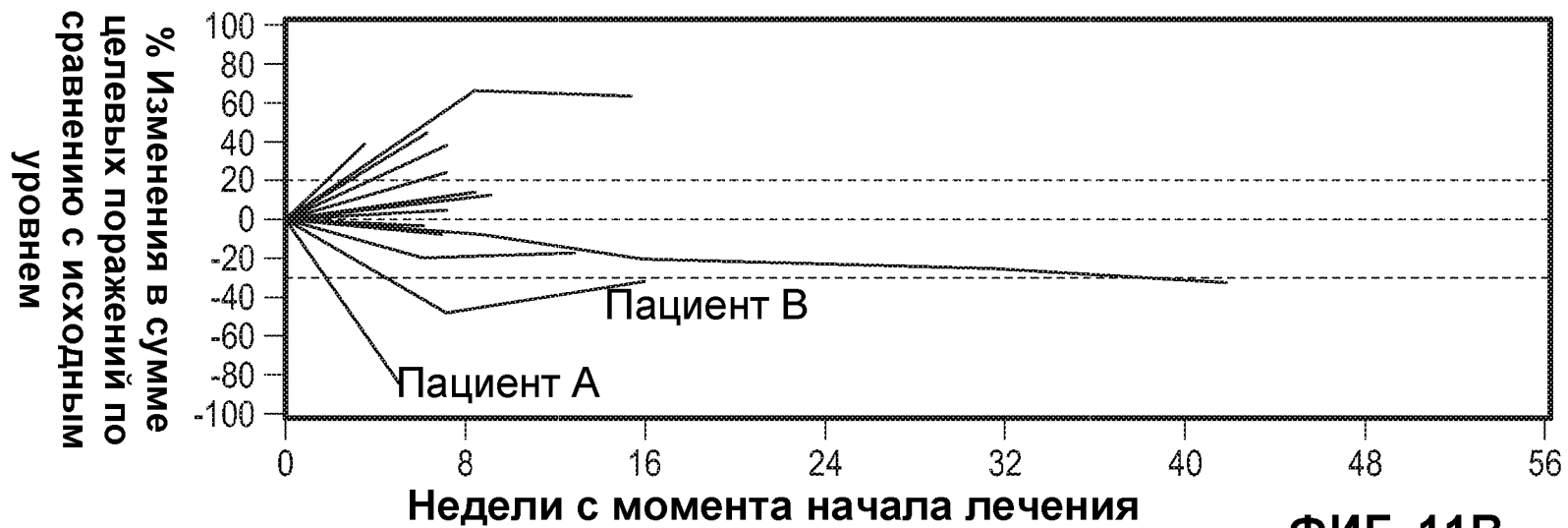


ФИГ. 10С

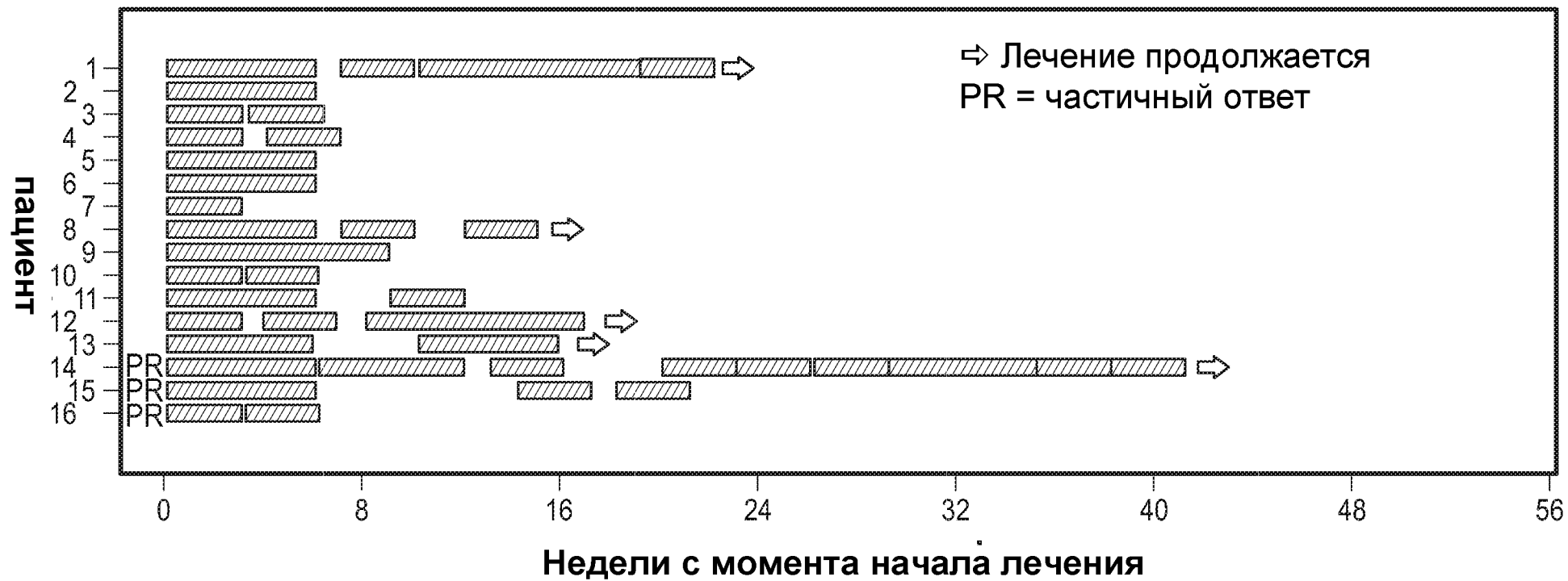




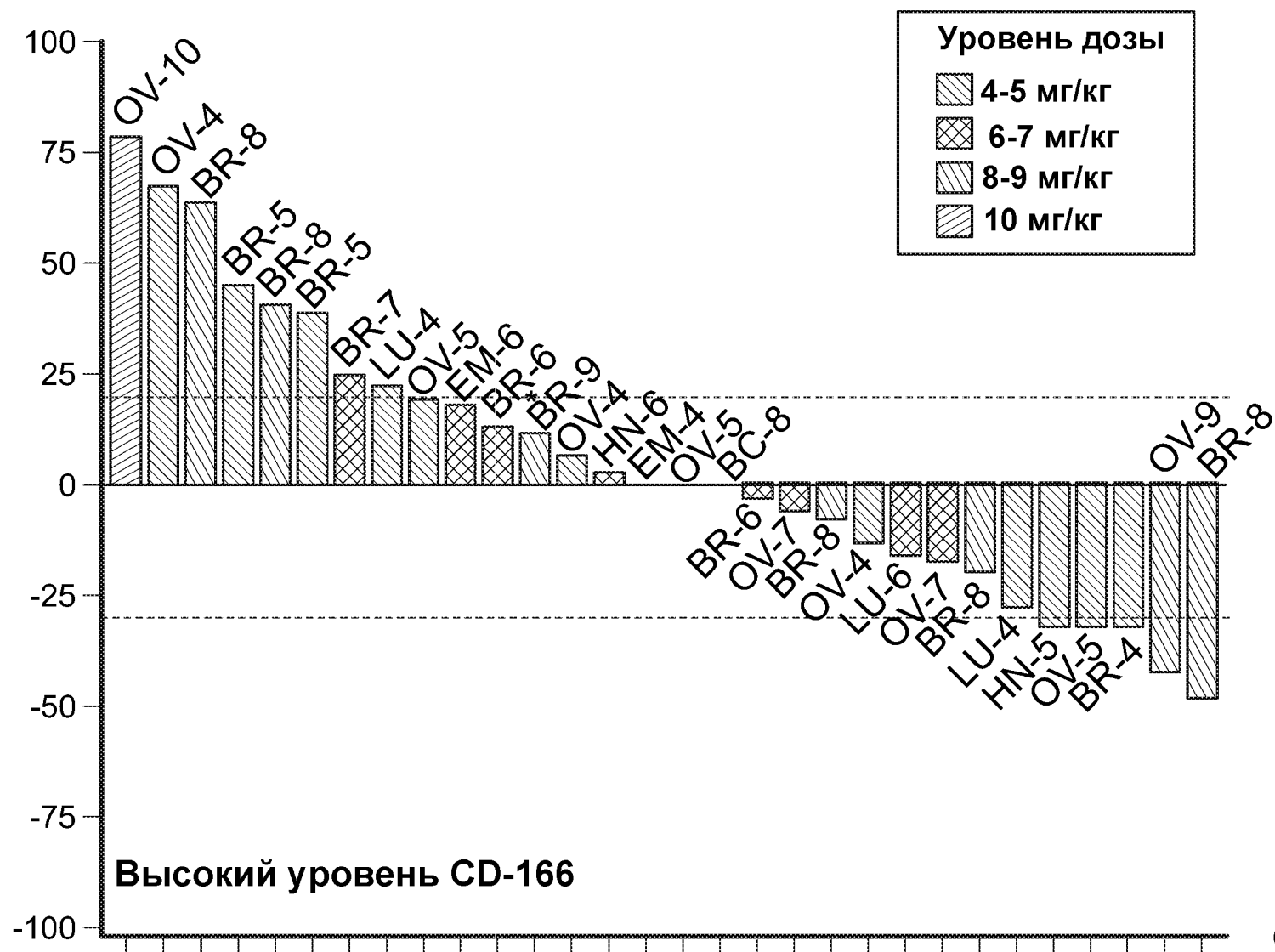
ФИГ. 11А



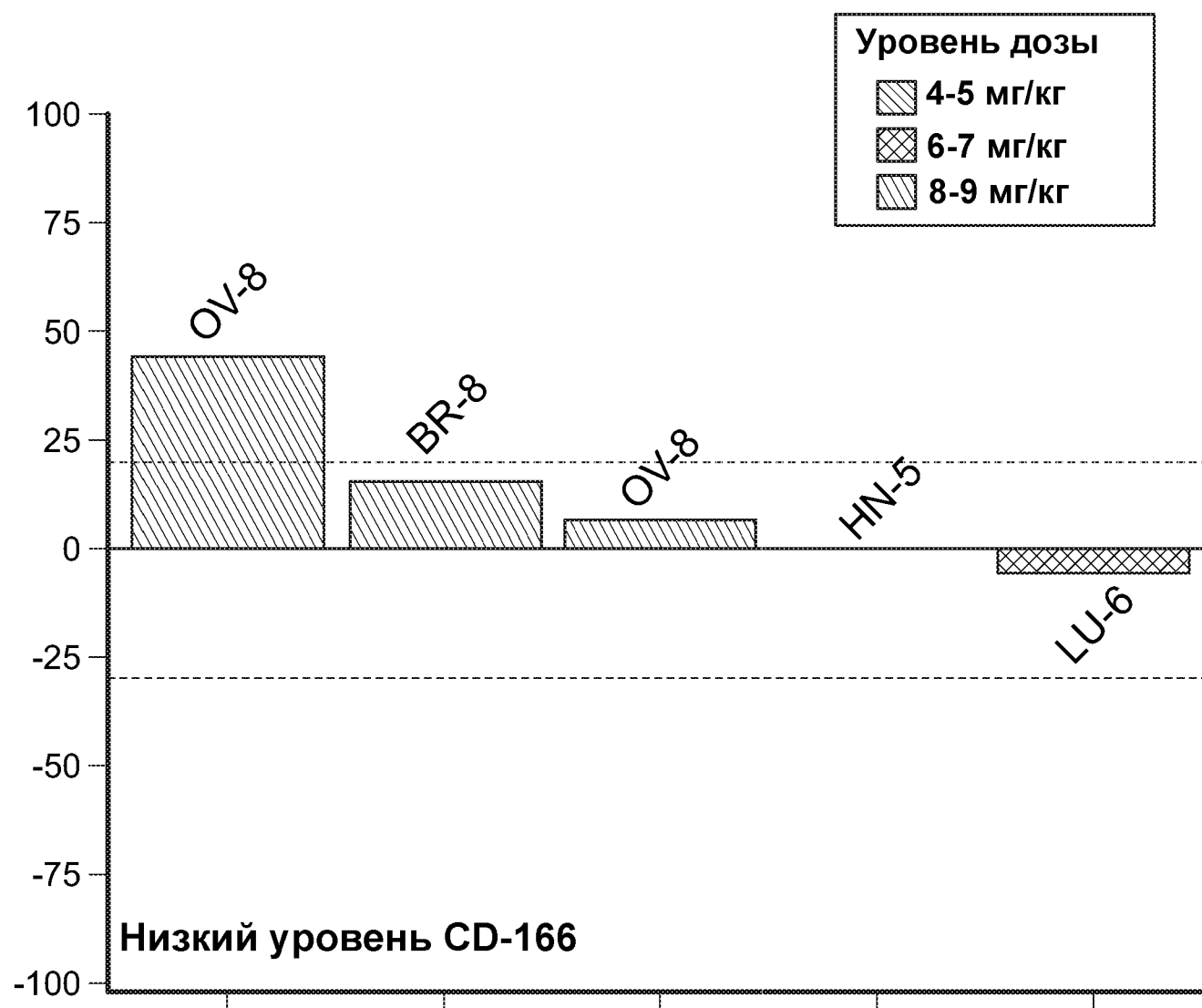
ФИГ. 11В



ФИГ. 11С



ФИГ. 12А



ФИГ. 12В