

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191582** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.09.03

(51) Int. Cl. *A61K 38/05* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.05

(54) **РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗОЙ И РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СЕРИНОВОЙ ИЛИ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕАЗАМИ СУБСТРАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/776,409; 62/778,062**

(32) **2018.12.06; 2018.12.11**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/064779**

(87) **WO 2020/118109 2020.06.11**

(88) **2020.08.13**

(71) Заявитель:

**ЦИТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

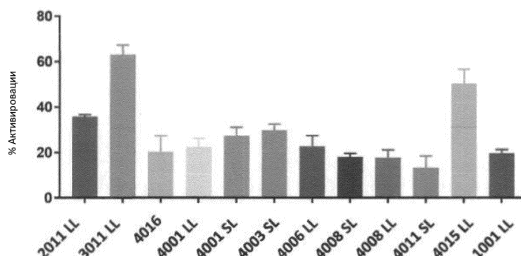
(72) Изобретатель:

**Васильева Ольга, Уинтер Майкл Б.
(US)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение в целом относится к полипептидам, которые содержат по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (ММР), и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) или по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP), к активируемым антителам и другим более крупным молекулам, которые содержат эти полипептиды, которые содержат по меньшей мере СМ1, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы ММР, и по меньшей мере СМ2, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы SP или по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP), и к способам получения и применения этих полипептидов, которые содержат по меньшей мере СМ1, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы ММР, и по меньшей мере СМ2, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы SP или по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP), при различных показаниях в терапевтических, диагностических и профилактических целях.



A1

202191582

202191582

A1

РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗОЙ И РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СЕРИНОВОЙ ИЛИ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕАЗАМИ СУБСТРАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США №№ 62/776409, поданной 06 декабря 2018 г. и 62/778062, поданной 11 декабря 2018 г., содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Изобретение в целом относится к полипептидам, которые содержат по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (ММР) и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) и/или по меньшей мере одной цистеиновой протеазой (CP), к активируемым антителам и другим более крупным молекулам, которые содержат эти полипептиды, которые содержат по меньшей мере СМ1, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы ММР, и СМ2, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы SP и/или по меньшей мере одной протеазы CP, и к способам получения и применения этих полипептидов, которые содержат по меньшей мере СМ1, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы ММР, и СМ2, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы SP и/или по меньшей мере одной протеазы CP, при различных показаниях в терапевтических, диагностических и профилактических целях.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] «Перечень последовательностей», представленный в электронном виде одновременно с данным документом в соответствии со статьей 37 Кодекса Федеральных Законов США § 1.821 в машиночитаемой форме (CFR) посредством EFS-Web в виде файла с именем «CYTX-058-PCT_ST25», включен в данный документ посредством ссылки. Электронная копия перечня последовательностей создана 26 ноября 2019 г., и имеет размер на диске 159 килобайт.

Уровень техники

[0003] Протеазы представляет собой ферменты, которые разрушают белки,

расщепляя пептидные связи между аминокислотными остатками. Протеазы естественным образом встречаются во всех организмах и участвуют во множестве физиологических реакций, от простой деградации до строго регулируемых путей. Известно, что некоторые протеазы разрывают определенные пептидные связи в зависимости от присутствия определенной аминокислотной последовательности в белке.

[0004] Соответственно, существует потребность в идентификации новых субстратов для протеаз и использовании этих субстратов при различных показаниях в терапевтических, диагностических и профилактических целях.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном из аспектов настоящего изобретения в данном документе предложен выделенный полипептид, содержащий тандемный субстрат, причем тандемный субстрат содержит по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (CM1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (MMP), и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (CM2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) или цистеиновой протеазы (CP), где CM1 включает аминокислотную последовательность AHGL или PRQV, и где расположение тандемного субстрата от N-конца к C-концу представляет собой CM1-CM2 или CM2-CM1. В некоторых вариантах осуществления CM1 выделенного полипептида включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), ALAHGL (SEQ ID NO: 52), LAHGLF (SEQ ID NO: 50), LAHGL (SEQ ID NO: 53) и AHGLF (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления CM1 выделенного полипептида включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из HVPRQV (SEQ ID NO: 8) и VPRQV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM1 и CM2, которые связаны через связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 выделенного полипептида напрямую связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который содержит субстрат для фермента CP, и где фермент CP представляет собой легумаин. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает субстрат для фермента SP, выбранного из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы и эластазы нейтрофилов. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает субстрат для фермента SP, выбранный из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы,

эластазы нейтрофилов, и субстрата для фермента CP, и где фермент CP представляет собой легумаин. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM1, который включает субстрат для фермента MMP, выбранного из группы, состоящей из MMP2, MMP9 или MMP14.

[0006] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), ARG, PRS, TFVH (SEQ ID NO: 141), AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 152). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ARGP (SEQ ID NO: 128), TARG (SEQ ID NO: 125) и TARGP (SEQ ID NO: 124). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из APRS (SEQ ID NO: 131), APRSF (SEQ ID NO: 130) и PRSF (SEQ ID NO: 132). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135), GLPTFVH (SEQ ID NO: 136), GLPTFV (SEQ ID NO: 137), LPTFVHL (SEQ ID NO: 138), LPTFVH (SEQ ID NO: 139) и LPTFV (SEQ ID NO: 140). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид согласно настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 152). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит CM2, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 152); и аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110),

LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104).

[0007] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расположение tandemного субстрата от N-конца к C-концу CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расположение tandemного субстрата от N-конца к C-концу CM2-CM1.

[0008] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 85%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 90%.

[0009] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет *in vivo* стабильность первого расщепляемого фрагмента CM1, которая составляет менее 30% активации. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет *in vivo* стабильность первого расщепляемого фрагмента CM1, которая составляет менее 25% активации.

[00010] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 70%.

[00011] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9

и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 15%, и расщепляемость tandemного субстрата с помощью матриптазы составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет способность к расщеплению tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 30%, и расщепляемость tandemного субстрата с помощью матриптазы составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 50%, и расщепляемость tandemного субстрата с помощью матриптазы составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет расщепляемость tandemного субстрата с помощью MMP9 и MMP14, для каждого из которых она составляет по меньшей мере 70%, и расщепляемость tandemного субстрата с помощью матриптазы составляет по меньшей мере 70%.

[00012] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет tandemный субстрат со стабильностью *in vivo* менее 40% активации. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет tandemный субстрат со стабильностью *in vivo* менее 30% активации. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет tandemный субстрат со стабильностью *in vivo* менее 25% активации. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению имеет tandemный субстрат со стабильностью *in vivo* менее 20% активации.

[00013] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит tandemный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит tandemный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит tandemный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33 и 35. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит tandemный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36 и 37. В некоторых вариантах

осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит тандемный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32 и 34. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит тандемный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 33. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит тандемный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35.

[00014] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен выделенный полипептид по настоящему изобретению, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью; по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (CM1), который является субстратом для по меньшей мере одной матричной металлопротеиназы (MMP); и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (CM2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) или цистеиновой протеазы (CP), где CM1 включает аминокислотную последовательность AHGL или PRQV, и где расположение тандемного субстрата от N-конца к C-концу представляет собой CM1-CM2 или CM2-CM1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из MMP, CP и SP совместно локализованы с мишенью в ткани. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела с тяжелыми цепями и однодоменного антитела с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое связано с CM1. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое непосредственно связано с CM1. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое связано с CM1 через связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое связано с CM2. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое непосредственно связано с CM2. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое связано с CM2 через связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB,

которое содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где CM1 или CM2 связаны с N-концом переменной области легкой цепи АВ. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит АВ, которое содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где CM1 или CM2 связаны с N-концом переменной области тяжелой цепи АВ.

[00015] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит маскирующий фрагмент (MM). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, который имеет константу диссоциации в отношении связывания с АВ, которая больше, чем константа диссоциации АВ в отношении связывания с мишенью. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, который представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, который связан с CM1, так что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM1-CM2-AB или АВ-CM2-CM1-MM. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между MM и CM1. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между CM2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между MM и CM1, и связывающий пептид между CM2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, который связан с CM1, так что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-конца: MM-CM2-CM1-AB или АВ-CM1-CM2-MM. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между MM и CM2. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между CM1 и АВ. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит связывающий пептид между MM и CM2, и связывающий пептид между CM1 и АВ.

[00016] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом выделенный полипептид имеет следующее

структурное расположение от N-конца к C-концу в нерасщепленном состоянии: MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид содержит третий связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где LP2 связан с N-концом переменной области легкой цепи AB. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит AB, которое содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где LP2 связан с N-концом переменной области тяжелой цепи AB.

[00017] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, где аминокислотная последовательность MM отличается от аминокислотной последовательности мишени и не более чем на 10% идентична аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию AB. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит MM, который не препятствует связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним в расщепленном состоянии.

[00018] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 400.

[00019] В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложено активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с мишенью, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, где MM ингибирует связывание AB с мишенью, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемый фрагмент (CM), включающий тандемный субстрат в соответствии с любым из тандемных субстратов, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит MM, который имеет константу диссоциации в отношении связывания

с АВ, которая больше, чем константа диссоциации АВ в отношении связывания с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит ММ, который представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает его антигенсвязывающий фрагмент, который выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела с тяжелыми цепями, и однодоменного антитела с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит ММ, который имеет константу диссоциации в отношении связывания с АВ, которая больше, чем константа диссоциации АВ в отношении связывания с мишенью.

[00020] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит ММ, который связан с СМ1, так что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ1-СМ2-АВ или АВ-СМ2-СМ1-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между СМ2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ1, и связывающий пептид между СМ2 и АВ.

[00021] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит ММ, который связан с СМ1, так что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ2-СМ1-АВ или АВ-СМ1-СМ2-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между СМ1 и АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ2, и связывающий пептид между СМ1 и АВ.

[00022] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит АВ, которое содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где СМ1 или СМ2 связаны с N-концом переменной области легкой цепи АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит АВ, которое содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где СМ1 или СМ2 связаны с N-концом переменной области тяжелой легкой цепи АВ.

[00023] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом активируемое антитело имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-

концу в нерасщепленном состоянии: MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB, или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит третий связывающий пептид (LP³) между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит AB, которое содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где LP2 связан с N-концом переменной области легкой цепи AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит AB, которое содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и где LP2 связан с N-концом переменной области тяжелой цепи AB.

[00024] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 400.

[00025] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит MM, который отличается от MM мишени и не более чем на 10% идентичен аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит MM, который не препятствует связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним в расщепленном состоянии.

[00026] В другом аспекте настоящего изобретения в данном документе предложено конъюгированное активируемое антитело, содержащее активируемое антитело, конъюгированное с агентом. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с AB через линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с AB через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с AB через нерасщепляемый линкер.

[00027] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит агент, который представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит агент, который представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит агент, который

представляет собой повреждающий нуклеиновые кислоты агент. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит агент, который представляет собой доластатин или его производное, ауристин или его производное, майтанзиноид или его производное, дуокармицин или его производное, калихеамицин или его производное, ауристин E или его производное, монометилауристин E (ММАЕ), монометилауристин D (ММAD), или майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит агент, который представляет собой обнаруживаемый фрагмент, или диагностический агент.

[00028] В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный полипептид по настоящему изобретению, или активируемое антитело по настоящему изобретению, или конъюгированное активируемое антитело по настоящему изобретению; и носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит дополнительный агент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит дополнительный агент, который является терапевтическим агентом.

[00029] В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенный полипептид по настоящему изобретению или активируемое антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

[00030] В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложен способ получения антитела или активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии выделенного полипептида по настоящему изобретению или активируемого антитела по настоящему изобретению. В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложен способ производства активируемого антитела, которое в активированном состоянии связывает мишень, причем способ включает: культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело по настоящему изобретению, и выделение активируемого антитела.

[00031] В еще одном аспекте настоящего изобретения в данном документе предложен способ лечения, облегчения симптома или замедления прогрессирования нарушения или заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества выделенного полипептида по настоящему изобретению или активируемого антитела по настоящему изобретению, или

конъюгированного активируемого антитела по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту дополнительного агента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00032] На Фиг. 1 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты в виде процента указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению, которые, как наблюдалось, расщеплялись *in vivo* после их введения мышам *nu/nu*. Эти иллюстративные результаты показали, что некоторые из протестированных активируемых антител продемонстрировали более высокую степень стабильности, чем другие субстраты, которые расщепляются множеством ферментов.

[00033] На Фиг. 2А и 2В представлены графики, демонстрирующие иллюстративные результаты связывания *in vitro* с EGFR указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению. Эти иллюстративные результаты продемонстрировали, что субстрат MMP влияет на эффективность маскировки продомена активируемого антитела.

[00034] На Фиг. 3А и 3В представлены графики, демонстрирующие иллюстративные результаты эффективности *in vivo* указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению с использованием мышинной модели ксенотрансплантата H292. Эти иллюстративные результаты продемонстрировали, что активируемые антитела с некоторыми субстратами MMP по настоящему изобретению показали эффективность в этой модели ксенотрансплантата, которая была сопоставима с немаскированным цетуксимабом к EGFR.

[00035] На Фиг. 4 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты в виде процента указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению, которые были активированы во внутриопухолевой ткани после введения в мышиную модель ксенотрансплантата H292.

[00036] На Фиг. 5 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты в виде процента указанных активируемых антител к EGFR с одиночным субстратом MMP или тандемными субстратами по настоящему изобретению, которые, как наблюдалось, расщеплялись *in vivo* после их введения мышам *nu/nu*. Эти иллюстративные результаты показали, что некоторые из протестированных активируемых антител с

тандемными субстратами продемонстрировали более высокую степень стабильности *in vivo*, чем другие субстраты, которые расщепляются множеством ферментов.

[00037] На Фиг. 6 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты эффективности *in vivo* указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению с использованием мышинной модели ксенотрансплантата H292. Эти иллюстративные результаты продемонстрировали, что активируемые антитела с некоторыми субстратами MMP по настоящему изобретению показали эффективность в этой модели ксенотрансплантата, которая была сопоставима с немаскированным антителом цетуксимабом к EGFR.

[00038] На Фиг. 7 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты в виде процента указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению, которые были активированы во внутриопухолевой ткани после введения в мышиную модель ксенотрансплантата H292.

[00039] На Фиг. 8 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты расчетной эффективности маскировки, рассчитанной на основе связывания *in vitro* с EGFR указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению. Эти иллюстративные результаты показали, что тандемные субстраты влияют на эффективность маскировки продомена активируемого антитела.

[00040] На Фиг. 9 представлен график, демонстрирующий иллюстративные результаты в виде процента указанных активируемых антител к EGFR по настоящему изобретению, которые были активированы после инкубации с опухолевой тканью человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00041] В настоящем изобретении предложены аминокислотные последовательности, которые содержат по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (SM1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (MMP), и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (SM2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) и/или по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP). Эти аминокислотные последовательности в совокупности именуется в данном документе «тандемными субстратами». Этот термин не предназначен для передачи каких-либо требований в отношении ориентации или другого структурного расположения первого расщепляемого фрагмента (SM1), который является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеиназы (MMP), и по меньшей мере второго расщепляемого фрагмента (SM2),

который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) и/или по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP). Таким образом, термин «тандемные субстраты» охватывает субстраты CM1-CM2, имеющие следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: CM1-CM2 или CM2-CM1. Термин «тандемные субстраты» также включает субстраты, на которых по меньшей мере часть последовательности CM1 перекрывается с по меньшей мере частью последовательности CM2.

[00042] В некоторых вариантах осуществления CM2 включает по меньшей мере два субстрата. В некоторых вариантах осуществления CM2 включает субстрат для первой сериновой протеазы и субстрат для второй сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления CM2 включает субстрат для сериновой протеазы и субстрат для цистеиновой протеазы.

[00043] Описанные в данном документе субстраты CM1-CM2 полезны при различных показаниях в терапевтических, диагностических и профилактических целях. Например, эти субстраты CM1-CM2 полезны в активируемых антителах, которые содержат антитело или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые содержат продомен. Продомен включает по меньшей мере один маскирующий фрагмент (MM), связанный с по меньшей мере одним антиген- или эпитоп-связывающим доменом AB, так что связывание MM снижает способность AB связывать свою мишень.

[00044] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит по меньшей мере первый CM (CM1) и второй CM (CM2). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть последовательности субстрата CM1 перекрывается с по меньшей мере частью последовательности CM2. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 и последовательность субстрата CM2 имеют общий по меньшей мере один аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 и последовательность субстрата CM2 имеют общих по меньшей мере два аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 и последовательность субстрата CM2 имеют общих по меньшей мере три аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 и последовательность субстрата CM2 имеют три или более общих аминокислотных остатка.

[00045] В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 представляют собой отдельные полипептиды, которые функционально связаны вместе.

[00046] В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 представляют собой отдельные полипептиды, которые непосредственно связаны вместе, т.е. N-конец одного

субстрата связан непосредственно с С-концом другого полипептида субстрата. В некоторых вариантах осуществления N-конец CM1 связан непосредственно с С-концом CM2. В некоторых вариантах осуществления N-конец CM2 связан непосредственно с С-концом CM1.

[00047] В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 представляют собой отдельные полипептиды, которые функционально связаны вместе по меньшей мере через один связывающий фрагмент.

[00048] В некоторых вариантах осуществления первый расщепляемый фрагмент CM1 и второй расщепляемый фрагмент CM2 в активируемом антителе в нерасщепленном состоянии имеют следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB, или AB-CM1-CM2-MM.

[00049] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP'') между маскирующим фрагментом (MM) и CM1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP''') между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP'') между MM и CM1, и связывающий пептид (LP''') между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM1 (LP''), и связывающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP''') между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP'') между MM и CM1, связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP''') между CM2 и AB.

[00050] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP'') между AB и CM1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP''') между CM2 и маскирующим фрагментом (MM). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP'') между AB и CM1, и связывающий пептид (LP''') между CM2 и MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между AB и CM1 (LP''), и связывающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах

осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP'') между CM2 и MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между AB и CM1, связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP'') между CM2 и MM.

[00051] В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO: 218).

[00052] В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной матричной металлопротеиназы (MMP). Примеры MMP включают MMP1; MMP2; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; MMP14; MMP15; MMP16; MMP17; MMP19; MMP20; MMP23; MMP24; MMP26; и MMP27.

[00053] В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP2, MMP9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11 и/или MMP19. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP2. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP9. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP14. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для двух или более MMP. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере MMP9 и MMP14. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере MMP2 и MMP9. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере MMP2 и MMP14. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для трех или более MMP. В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере для MMP2, MMP9 и MMP14. В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит два или более субстратов для одной и той же MMP. В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит по меньшей мере два или более субстратов MMP2. В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит по меньшей мере два или более субстратов MMP9. В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит по меньшей мере два или более субстратов MMP14.

[00054] В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP и включает по меньшей мере последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1); DLANPLL (SEQ ID NO: 2); AFRHLR (SEQ ID NO: 3); PHGFFQ (SEQ ID NO: 4); SVHHLI (SEQ ID NO: 5); RGPPLYW (SEQ ID NO: 6); RFPYGVW (SEQ ID NO: 7); HVPRQV (SEQ ID NO: 8); SNPFKY (SEQ ID NO: 9); RFPLKV (SEQ ID NO: 10); PFHLR (SEQ ID NO: 11);

STV FHM (SEQ ID NO: 12); MGPWFM (SEQ ID NO: 13); RHLAKL (SEQ ID NO: 14); PLGV RGK (SEQ ID NO: 15); и QNQALRIA (SEQ ID NO: 16).

[00055] В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность DLAHPLL (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность AFRHLR (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность PHGFFQ (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность SVHHLI (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает последовательность аминокислот RGP KLYW (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность RFPYGVW (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность HVPRQV (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность SNPFKY (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность RFPLKV (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность PFHL SR (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность STV FHM (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность MGPWFM (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность RHLAKL (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность PLGV RGK (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность QNQALRIA (SEQ ID NO: 16).

[00056] В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность LAHGLF (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность AHGLF (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность ALAHGL (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность LAHGL (SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность AHGL (SEQ ID NO: 54). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность ALAHG (SEQ ID NO: 55). В некоторых вариантах осуществления СМ1 включает аминокислотную последовательность LAHG (SEQ ID NO: 56). В

некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность AHG.

[00057] В некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность VPRQV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность PRQV (SEQ ID NO: 61). В некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность HVPRQ (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность VPRQ (SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления CM1 включает аминокислотную последовательность PRQ.

[00058] В некоторых вариантах осуществления CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления SP выбрана из активатора плазминогена урокиназного типа (uPA, также называемого урокиназой), матриптазы (также обозначаемой в данном документе как MT-SP1 или MTSP1), эластазы нейтрофилов (например, эластазы нейтрофилов человека) и их комбинаций. Примеры других SP, которые расщепляют CM2, описанные в данном документе, включают в качестве неограничивающего примера активированный протеин C; катепсин А; катепсин G; химазу; протеазу фактор свертывания крови, такую как, например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa; эластазу; гранзим В; гуанидинобензоатазу; HtrA1; лактоферрин; марапсин; NS3/4A; PACE4; плазмин; PSA; tPA; тромбин; триптазу; трансмембранную сериновую протеазу типа II (TTSP), такую как, например, DESC1, DPP-4, FAP, хепсин, матриптазу-2, TMPRSS2, TMPRSS3 и/или TMPRSS4.

[00059] Например, подходящие CM2 расщепляются по меньшей мере одной сериновой протеазой и могут включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из следующих аминокислотных последовательностей: LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGR (SEQ ID NO: 73), SGRSDN (SEQ ID NO: 74), SGRSD (SEQ ID NO: 75), SGRS (SEQ ID NO: 76), SGR, LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSGN (SEQ ID NO: 79), LSGRSG (SEQ ID NO: 80), SGRSGNH (SEQ ID NO: 81), SGRSGN (SEQ ID NO: 82), SGRSG (SEQ ID NO: 83), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), SGRSDNI (SEQ ID NO: 85), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDY (SEQ ID NO: 87), SGRSDYH (SEQ ID NO: 88), SGRSDY (SEQ ID NO: 89), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), SGRSDNP (SEQ ID NO: 91), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDT (SEQ ID NO: 93), SGRSDTH (SEQ ID NO: 94), SGRSDT (SEQ ID NO: 95), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDQ (SEQ ID NO: 97), SGRSDQH (SEQ ID NO: 98), SGRSDQ (SEQ ID NO: 99), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100), LSGRSDI (SEQ ID NO: 101), SGRSDIH (SEQ ID NO: 102), SGRSDI (SEQ ID NO: 103), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104),

LSGRSDD (SEQ ID NO: 105), SGRSDDH (SEQ ID NO: 106), SGRSDD (SEQ ID NO: 107), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), SGRSANI (SEQ ID NO: 111), SGRSAN (SEQ ID NO: 112), SGRSA (SEQ ID NO: 113), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114) и SGRSANP (SEQ ID NO: 115).

[00060] В некоторых вариантах осуществления подходящие CM2 расщепляются по меньшей мере одной сериновой протеазой и могут включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из следующих аминокислотных последовательностей: TARGPSFK (SEQ ID NO: 120), ARGPSFK (SEQ ID NO: 121), TARGPSF (SEQ ID NO: 122), TARGPS (SEQ ID NO: 123), TARGP (SEQ ID NO: 124), TARG (SEQ ID NO: 125), ARGPSF (SEQ ID NO: 126), ARGPS (SEQ ID NO: 127), ARGP (SEQ ID NO: 128) и ARG.

[00061] В некоторых вариантах осуществления подходящие CM2 расщепляются по меньшей мере одной сериновой протеазой и могут включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из следующих аминокислотных последовательностей: APRSF (SEQ ID NO: 130), APRS (SEQ ID NO: 131) и PRSF (SEQ ID NO: 132).

[00062] В некоторых вариантах осуществления подходящие CM2 расщепляются по меньшей мере одной сериновой протеазой и могут включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из следующих аминокислотных последовательностей: GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135), GLPTFVH (SEQ ID NO: 136), GLPTFV (SEQ ID NO: 137), LPTFVHL (SEQ ID NO: 138), LPTFVH (SEQ ID NO: 139) и LPTFV (SEQ ID NO: 140).

[00063] В некоторых вариантах осуществления CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной цистеиновой протеазы (CP). В некоторых вариантах осуществления CP представляет собой легумин. В некоторых вариантах осуществления подходящие CM2 расщепляются по меньшей мере одной цистеиновой протеазой и могут включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из следующих аминокислотных последовательностей: AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 152).

[00064] В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), TARGPVPRQV (SEQ ID NO: 30), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO: 33), ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34), GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO: 35), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36), GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37), ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO: 38), AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO: 39), ISSGLLSGRSNIGS (SEQ ID NO: 40), AVGLLAPPGGLSGRSNIGS (SEQ ID NO: 41), ISSGLLSGRSNIG (SEQ ID NO: 42) и

AVGLLAPPGGLSGRSNIG (SEQ ID NO: 43).

[00065] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB, или AB-CM1-CM2-MM.

[00066] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), а антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB, или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[00067] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между маскирующим фрагментом (MM) и CM1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP2) между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между MM и CM1, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM1 (LP1) и связывающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между MM и CM1, связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и AB.

[00068] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между AB и CM1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP2) между CM2 и маскирующим фрагментом (MM). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между AB и CM1, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между AB и CM1

(LP1) и связывающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между AB и CM1, связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и MM.

[00069] В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO: 218).

[00070] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 200) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 201), где n является целым числом, равным по меньшей мере одному.

[00071] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 202), GGSGG (SEQ ID NO: 203), GSGSG (SEQ ID NO: 204), GSGGG (SEQ ID NO: 205), GGGSG (SEQ ID NO: 206) и GSSSG (SEQ ID NO: 207).

[00072] В некоторых вариантах осуществления LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 209), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 210), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 211), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 212) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 213), GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214) и GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 215).

[00073] В некоторых вариантах осуществления LP2 включает аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 216), GSSGT (SEQ ID NO: 217) или GSSG (SEQ ID NO: 218). В некоторых вариантах осуществления LP2 включает аминокислотную последовательность GGS. В некоторых вариантах осуществления LP2 включает аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 216).

[00074] В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP и включает по меньшей мере последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1); DLAHPLL (SEQ ID NO: 2); AFRHLR (SEQ ID NO: 3); PHGFFQ (SEQ ID NO: 4); SVHHLI (SEQ ID NO: 5); RGPPLYW (SEQ ID NO: 6); RFPYGVW (SEQ ID NO: 7); HVPRQV (SEQ ID NO: 8); SNPFKY (SEQ ID NO: 9); RFPLKV (SEQ ID NO: 10); PFHLR (SEQ ID NO: 11); STVFM (SEQ ID NO: 12); MGPWFM (SEQ ID NO: 13); RHLAKL (SEQ ID NO: 14); PLGVRGK (SEQ ID NO: 15); и QNQALRIA (SEQ ID NO: 16).

[00075] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению или активируемое антитело по настоящему изобретению

включает субстрат CM1-CM2 и линкер LP2, где CM1-CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), TARGPVPRQV (SEQ ID NO: 30), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO: 33), ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34), GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO: 35), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36), GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37), ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO: 38), и AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO: 39), а линкер LP2 включает GGGS (SEQ ID NO: 216).

[00076] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению или активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2 и линкер LP2, где CM1-CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), TARGPVPRQV (SEQ ID NO: 30), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO: 33), ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34), GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO: 35), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36), GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37), ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO: 38), и AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO: 39), и линкер LP2 включает GGS.

[00077] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению или активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2 и линкер LP2, где CM1-CM2 и LP2 включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO: 226), ALAHGLFSGRSANGGGS (SEQ ID NO: 227), HVPRQVLSGRSANGGGS (SEQ ID NO: 228), HVPRQVLSGRSANGGGS (SEQ ID NO: 229), TARGPALAHGLFGGGS (SEQ ID NO: 230), TARGPVPRQVGGGS (SEQ ID NO: 231), APRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO: 232), ALAHGLFAPRSFANGGGS (SEQ ID NO: 233), HVPRQVAPRSFANGGGS (SEQ ID NO: 234), ALAHGLPTFVHLGGGS (SEQ ID NO: 235), GLPTFVHLPRQVGGGS (SEQ ID NO: 236), AANALAHGLFANGGGS (SEQ ID NO: 237), GPTNALAHGLFANGGGS (SEQ ID NO: 238), ISSGLLSGRSNANGGGS (SEQ ID NO: 239), и AVGLLAPPGGLSGRSNANGGGS (SEQ ID NO: 240).

[00078] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению или активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2 и линкер LP2, где CM1-CM2 и LP2 включают

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSALAHGLFGGS (SEQ ID NO: 241), ALAHGLFSGRSANGGS (SEQ ID NO: 242), HVPRQVLSGRSGGS (SEQ ID NO: 243), HVPRQVLSGRSANGGS (SEQ ID NO: 244), TARGPALAHGLFGGS (SEQ ID NO: 245), TARGPVPRQVGGGS (SEQ ID NO: 246), APRSALAHGLFGGS (SEQ ID NO: 247), ALAHGLFAPRSFGGS (SEQ ID NO: 248), HVPRQVAPRSFGGS (SEQ ID NO: 249), ALAHGLPTFVHLGGS (SEQ ID NO: 250), GLPTFVHLPRQVGGGS (SEQ ID NO: 251), AANALAHGLFGGS (SEQ ID NO: 252), GPTNALAHGLFGGS (SEQ ID NO: 253), ISSGLLSGRSNIGGS (SEQ ID NO: 254), и AVGLLAPPGGLSGRSNIGGS (SEQ ID NO: 255).

[00079] В некоторых вариантах осуществления АВ имеет константу диссоциации около 100 нМ или менее в отношении связывания с мишенью.

[00080] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления АВ представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления АВ представляет собой иммунологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления АВ представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления АВ 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 такой АВ представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[00081] В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP совместно локализована с мишенью в ткани, и протеаза MMP расщепляет CM1 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза SP совместно локализуется с мишенью в ткани, и протеаза SP расщепляет субстрат CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза CP совместно локализуется с мишенью в ткани, и протеаза CP расщепляет субстрат CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP и/или протеаза SP совместно локализованы с мишенью в ткани, и протеаза MMP и/или протеаза SP расщепляют субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP и протеаза SP совместно локализованы с мишенью в ткани, и по меньшей мере одна из протеазы MMP и протеазы

SP расщепляет субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP и/или протеаза CP совместно локализованы с мишенью в ткани, и протеаза MMP и/или протеаза CP расщепляют субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP и протеаза CP совместно локализованы с мишенью в ткани, и по меньшей мере одна из протеазы MMP и протеазы CP расщепляет субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP, и/или протеаза CP, и/или протеаза SP локализованы вместе с мишенью в ткани, и протеаза MMP, и/или протеаза CP, и/или протеаза SP расщепляют субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза MMP, протеаза CP и протеаза SP совместно локализованы с мишенью в ткани, и по меньшей мере одна из протеазы MMP, протеазы SP и протеазы CP расщепляет субстрат CM1-CM2 в антителе, когда антитело подвергается воздействию протеазы.

[00082] В некоторых вариантах осуществления каждая из последовательности субстрата CM1 и последовательности субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 независимо представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот.

[00083] В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична какой-либо последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного происхождения, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична какой-либо последовательности полипептида, млекопитающего, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида, например, любой последовательности

полипептида животного, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида млекопитающего, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP.

[00084] В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична какой-либо последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида млекопитающих, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP и/или CP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP и/или CP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP и/или CP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида

млекопитающего, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP и/или CP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 из субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и/или одной CP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP и/или CP.

[00085] В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33 и 35. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32 и 34. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, и 33. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35.

[00086] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36, и 37, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое

антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33, и 35, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36, и 37, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32, и 34, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, и 33, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень.

[00087] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43, и антитело к EGFR, содержащее аминокислотную последовательность описанного в данном документе антитела к EGFR. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43, и антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 401 и тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 400.

[00088] В некоторых вариантах CM1-CM2 включен в активируемое антитело, имеющее аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462, и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 400.

[00089] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит субстрат CM1, который является субстратом для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична какой-либо последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного происхождения, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида млекопитающих, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида млекопитающего, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой MMP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1, которая представляет собой субстрат для по меньшей мере одной MMP и включает последовательность полипептида, выбранную из группы, состоящей из: ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), DLAHPLL

(SEQ ID NO: 2), RGPPLYW (SEQ ID NO: 6), RFPYGVW (SEQ ID NO: 7), и QNQALRIA (SEQ ID NO: 16).

[00090] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM1, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), DLAHPLL (SEQ ID NO: 2), RGPPLYW (SEQ ID NO: 6), RFPYGVW (SEQ ID NO: 7) и QNQALRIA (SEQ ID NO: 16), а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень.

[00091] В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид по настоящему изобретению содержит субстрат CM2, который является субстратом для по меньшей мере одной протеазы SP, и содержит последовательность полипептида, которая по существу не идентична какой-либо последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного происхождения, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида млекопитающих, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и включает последовательность полипептида, которая по существу не идентична любой последовательности полипептида человека, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида, например, любой последовательности полипептида животного, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида млекопитающего, которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 представляет собой субстрат для по меньшей мере одной SP и включает последовательность полипептида, которая не более чем на 90% или более идентична любой последовательности полипептида человека,

которая в естественных условиях расщепляется такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2, которая представляет собой субстрат для по меньшей мере одного SP и включает последовательность полипептида, выбранную из группы, состоящей из APRSF (SEQ ID NO: 130) и GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135).

[00092] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из APRSF (SEQ ID NO: 130) и GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135), а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень.

[00093] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему изобретению содержит субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–16, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое связывает мишень, и маскирующий фрагмент (MM), который снижает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связывать свою мишень.

[00094] В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2, CM1 или CM2 также представляют собой субстрат для по меньшей мере одной дополнительной протеазы.

[00095] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой протеазу MMP, отличную от протеазы MMP, которая расщепляет CM1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой протеазу MMP, выбранную из группы, состоящей из MMP1; MMP2; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; MMP14; MMP15; MMP16; MMP17; MMP19; MMP20; MMP23; MMP24; MMP26; и MMP27.

[00096] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой протеазу SP, отличную от протеазы SP, которая расщепляет CM2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза SP выбрана из группы, состоящей из uPA; матриптазы; активированного протеина С; катепсина А; катепсина G; химазы; протеазы фактора свертывания крови, такой как, например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa; эластазы; гранзима В; гуанидинобензоатазы; HtrA1; эластазы нейтрофилов человека; лактоферрина; марапсина; NS3/4A; PACE4; плазмина; PSA; tPA; тромбина; триптазы; трансмембранной

сериновой протеазы типа II (TTSP), такой как, например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптаза-2, TMPRSS2, TMPRSS3 и TMPRSS4.

[00097] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза выбрана из группы, состоящей из тех, что показаны в таблице 6.

Таблица 6. Иллюстративные протеазы и/или ферменты

ADAMS, например, ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	ADAMTS,	Каспазы, например, Каспаза-1 Каспаза-2 Каспаза-3 Каспаза-4 Каспаза-5 Каспаза-6 Каспаза-7 Каспаза-8 Каспаза-9 Каспаза-10 Каспаза-14	Цистеиновые протеиназы, например, Крузипаин Легумаин Отубаин-2
Аспаргатные напрмер, BACE Ренин	протеазы,		KLK, например, KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8 KLK10 KLK11
		Цистеиновые катепсины, например, Катепсин В Катепсин С	KLK13 KLK14
Аспарагиновые катепсины, например, Катепсин D Катепсин E		Катепсин К Катепсин L Катепсин S Катепсин V/L2 Катепсин X/Z/P	Металлопротеиназы, например, Меприн Неприлизин PSMA BMP-1

[00098] В изобретении также предложено, что антитело содержит по меньшей мере первый CM1 и второй CM2 и конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления первый CM1 и второй CM2 представляют собой полипептиды длиной не

более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM1-CM2-AB-агент, агент-AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB-агент, или агент-AB-CM1-CM2-MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: агент-MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM-агент, агент-MM-CM2-CM1-AB, или AB-CM1-CM2-MM-агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: агент-MM-CM1-CM2-AB-агент, агент-AB-CM2-CM1-MM-агент, агент-MM-CM2-CM1-AB-агент, или агент-AB-CM1-CM2-MM-агент.

[00099] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое содержит маскирующий фрагмент (MM), первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB-агент, агент-AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB-агент, или агент-AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[000100] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое содержит маскирующий фрагмент (MM), первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: агент-MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM-агент, агент-MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB, или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM-агент. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[000101] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое содержит маскирующий фрагмент (MM), первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от

N-конца к С-концу: агент-ММ1-LP1-СМ1-СМ2-LP2-АВ-агент, агент-АВ-LP2-СМ2-СМ1-LP1-ММ-агент, агент-ММ1-LP1-СМ2-СМ1-LP2-АВ-агент, или агент-АВ-LP2-СМ1-СМ2-LP1-ММ-агент. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[000102] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между маскирующим фрагментом (ММ) и СМ1. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP2) между СМ2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между ММ и СМ1, и связывающий пептид (LP2) между СМ2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ1 (LP1), и связывающий пептид между СМ1 и СМ2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2, и связывающий пептид (LP2) между СМ2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между ММ и СМ1, связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2, и связывающий пептид (LP2) между СМ2 и АВ.

[000103] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между АВ и СМ1. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP2) между СМ2 и маскирующим фрагментом (ММ). В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между АВ и СМ1, и связывающий пептид (LP2) между СМ2 и ММ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид между АВ и СМ1 (LP1), и связывающий пептид между СМ1 и СМ2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2, и связывающий пептид (LP2) между СМ2 и ММ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP1) между АВ и СМ1, связывающий пептид (LP') между СМ1 и

CM2, и связывающий пептид (LP2) между CM2 и MM.

[000104] В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO: 218).

[000105] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 382), где n является целым числом, равным по меньшей мере одному.

[000106] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 202), GGSGG (SEQ ID NO: 203), GSGSG (SEQ ID NO: 204), GSGGG (SEQ ID NO: 205), GGGSG (SEQ ID NO: 206) и GSSSG (SEQ ID NO: 207).

[000107] В некоторых вариантах осуществления LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 209), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 210), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 211), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 212), или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 213) и GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214).

[000108] В некоторых вариантах осуществления LP2 включает аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 215), GSSGT (SEQ ID NO: 216) или GSSG (SEQ ID NO: 217).

[000109] В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 связан или иным образом присоединен к антителу. Например, CM1-CM2 используется для связывания одного или более агентов с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (AB), которое связывает данную мишень, так что CM1-CM2 расщепляется при воздействии MMP и/или SP, и/или CP, и агент отделяется от AB. Иллюстративные мишени включают, но не ограничиваются ими, мишени, приведенные в таблице 1. Иллюстративные AB включают, но не ограничиваются ими, антитела, приведенные в таблице 2.

[000110] В некоторых вариантах осуществления AB имеет константу диссоциации около 100 нМ или менее в отношении связывания с мишенью.

[000111] В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент, которое связывается с мишенью, 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 иммунологически

активный фрагмент, которое связывает мишень, представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[000112] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации в отношении связывания с АВ, который не превышает константу диссоциации АВ в отношении мишени.

[000113] В некоторых вариантах осуществления ММ не препятствует связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним в расщепленном состоянии.

[000114] В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной от 2 до 40 аминокислот. Например, ММ представляет собой полипептид длиной до около 40 аминокислот.

[000115] В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида ММ отличается от последовательности полипептида любого природного партнера по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах последовательность полипептида ММ не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентична любому природному партнеру по связыванию АВ.

[000116] В некоторых вариантах осуществления агент, конъюгированный с АВ или АВ активируемого антитела, представляет собой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой противоопухолевый агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой токсин или его фрагмент. Используемый в данном документе термин «фрагмент токсина» представляет собой фрагмент, который сохраняет токсическую активность. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через линкер, который содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор 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 агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 3. 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 пирролобензодиазепина.

[000117] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой противовоспалительный агент.

[000118] В некоторых вариантах осуществления антитело и/или активируемое антитело также включает обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[000119] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка включает визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент содержит радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления контрастирующий агент содержит оксид йода, гадолиния или железа. В некоторых вариантах осуществления фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления 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 люминесцентная метка включает производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления метка включает метку Alexa Fluor[®], например, Alex Fluor[®] 680 или Alexa Fluor[®] 750. В некоторых вариантах осуществления метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенов.

[000120] В некоторых вариантах осуществления антитело и/или АВ активируемого антитела в естественных условиях содержат одну или более дисульфидных связей. В

некоторых вариантах осуществления АВ может быть сконструировано так, чтобы содержать одну или более дисульфидных связей.

[000121] В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело являются моноспецифическими. В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело являются полиспецифическими, называемыми в данном документе полиспецифическими антителами и/или конъюгированными полиспецифическими антителами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое антитело является биспецифическим или трифункциональным. В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело создают в виде части молекулы-предшественника привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (про-VITE). В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело создают в виде части Т-клетки, модифицированной предшественником химерного антигенного рецептора (про-CAR), или другого сконструированного рецептора, или другой эффекторной клетки иммунной системы, такой как НК-клетка, модифицированная CAR. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело создают в виде части Т-клетки, модифицированной предшественником химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело создают в виде части НК-клетки, модифицированной предшественником химерным антигенным рецептором (CAR).

[000122] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело является полиспецифическим, называемым в данном документе полиспецифическими активируемыми антителами и/или конъюгированными полиспецифическими активируемыми антителами. Используемые в данном документе термины, такие как «активируемое антитело» и все его грамматические вариации, если не указано иное, предназначены для охвата, но не ограничиваются вариантами осуществления, в которых активируемое антитело представляет собой полиспецифическое активируемое антитело по изобретению. Используемые в данном документе термины, такие как «конъюгированное активируемое антитело» и все его грамматические вариации, если не указано иное, предназначены для охвата, но не ограничиваются вариантами осуществления, в которых конъюгированное активируемое антитело представляет собой конъюгированное полиспецифическое активируемое

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

[000123] В некоторых вариантах осуществления антитела, конъюгаты антител, активируемые антитела, конъюгированные активируемые антитела, полиспецифические активируемые антитела и/или конъюгированные полиспецифические активируемые антитела, описанные в данном документе, используются в сочетании 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 злокачественного новообразования. Например, активируемые антитела, конъюгированные активируемые антитела, полиспецифические активируемые антитела и/или конъюгированные полиспецифические активируемые антитела могут использоваться в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым агентом.

[000124] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой полиспецифическое активируемое антитело. Полиспецифические активируемые антитела, предложенные в данном документе, представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают два или более разных антигенов или эпитопов и содержат по меньшей мере один маскирующий фрагмент (ММ), связанный по меньшей мере с одним антиген- или эпитоп-связывающим доменом полиспецифического антитела, так 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 субстрат CM1-CM2, который функционирует как субстрат для по меньшей мере одной протеазы MMP и по меньшей мере одной протеазы SP. 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.

[000125] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое специфически связывает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, причем по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH выбрана из последовательности CDR1 VH, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO: 220); последовательности CDR2 VH, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность VIWSSGNTDYNTPTFS (SEQ ID NO: 221); последовательности CDR3 VH, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 222); и их комбинации.

[000126] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое специфически связывает EGFR и содержит комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, причем по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL выбрана из последовательности CDR1 VL, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 223); последовательности CDR2 VL, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность KYASESIS (SEQ ID NO: 224); последовательности CDR3 VL, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 225); и их комбинации.

[000127] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое специфически связывает EGFR и содержит комбинацию последовательности CDR1 VH,

последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH выбрана из последовательности CDR1 VH, которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности NYGVH (SEQ ID NO: 220); последовательности CDR2 VH, которая включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности VIWSSGNTDYNTPFST (SEQ ID NO: 221); последовательность VH CDR3, которая включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 222); и их комбинации.

[000128] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1) которое специфически связывает EGFR и содержит комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL выбрана из последовательности CDR1 VL, которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 223); последовательности CDR2 VL, которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности KYASESIS (SEQ ID NO: 224); последовательность VL CDR3, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 225); и их комбинации.

[000129] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое

специфически связывает EGFR и содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где последовательность CDR1 VH включает по меньшей мере аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO: 220); последовательность CDR2 VH включает по меньшей мере аминокислотную последовательность VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO: 221); последовательность CDR3 VH включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 222); последовательность CDR1 VL включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 223); последовательность CDR2 VL включает по меньшей мере аминокислотную последовательность KYASESIS (SEQ ID NO: 224); и последовательность CDR3 VL включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 225).

[000130] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое специфически связывает EGFR и содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где последовательность CDR1 VH включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности NYGVH (SEQ ID NO: 220); последовательность CDR2 VH включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO: 221); последовательность VH CDR3 включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 222); последовательность CDR1 VL включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 223); последовательность VL CDR2 включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности KYASESIS (SEQ ID NO: 224); и

последовательность CDR3 VL включает последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 225).

[000131] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43, и антитело к Jagged, содержащее аминокислотную последовательность антитела к Jagged, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенное в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат субстрат CM1-CM2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43, и антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 401, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 400.

[000132] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предложенные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержат по меньшей мере аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 400 и аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 403–423 и 450–462.

[000133] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело 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 АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор 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 конъюгирован с АВ через линкер, который содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристин E или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин E (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин D (ММАD). 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 пирролобензодиазепина.

[000134] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой противовоспалительный агент.

[000135] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также содержит обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[000136] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка включает визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент содержит радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления контрастирующий агент содержит оксид йода, гадолиния или железа. В некоторых вариантах осуществления фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления 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 люминесцентная метка включает производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления метка включает метку Alexa Fluor[®], например, Alex Fluor[®] 680 или Alexa Fluor[®] 750. В некоторых вариантах осуществления метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптеннов.

[000137] 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 MM активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединен непосредственно к MM активируемого антитела в структурном расположении от N-конца к C-концу спейсер-MM-субстрат CM1-CM2-AB. Примером спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу MM активируемого антитела, является аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из QGQSGQ (SEQ ID NO: 153), GQSGQ (SEQ ID NO: 154), QSGQ (SEQ ID NO: 155), SGQ, GQ и Q. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQ (SEQ ID NO: 153). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GQSGQ (SEQ ID NO: 154). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность QSGQ (SEQ ID NO: 155). В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность SGQ. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GQ. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает по меньшей мере аминокислотную последовательность Q.

[000138] В некоторых вариантах осуществления AB активируемого антитела в естественных условиях содержит одну или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления AB может быть сконструировано так, чтобы содержать одну или более дисульфидных связей.

[000139] В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела больше, чем у соответствующего антитела; например, pK активируемого антитела длиннее, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела к аналогичен периоду полужизни соответствующего антитела. В некоторых вариантах

период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 8 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 6 часов при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 4 часа при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 3 часа при введении в организм.

[000140] В изобретении также предложены композиции и способы, которые включают активируемое антитело, которое включает антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывает данную мишень, где AB соединено с маскирующим фрагментом (MM), который снижает способность AB связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело дополнительно содержит субстрат SM1-SM2, который является субстратом для по меньшей мере одной MMP и по меньшей мере одной SP. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина в AB без ущерба для активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют присоединять один или более агентов к одному или более остаткам цистеина в AB без уменьшения или иного нарушения одной или более дисульфидных связей в MM. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать активируемое антитело, 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 MM активируемого антитела. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать конъюгированные активируемые антитела, в которых MM сохраняет способность эффективно и действенно маскировать AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы, предложенные в данном документе, позволяют получать конъюгированные активируемые антитела, в которых активируемое антитело все еще активировано, т.е. расщепляется, в присутствии MMP, которая может расщеплять субстрат SM1-SM2.

[000141] Активируемые антитела имеют по меньшей мере одну точку конъюгации для агента, но в способах и композициях, предложенных в данном документе, для конъюгации с агентом доступно меньше всех возможных точек конъюгации. В некоторых вариантах осуществления одна или более 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.

[000142] Также предложены способы получения конъюгата активируемого антитела, 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 активируемом антителе 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 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.

[000143] В некоторых вариантах осуществления предложен способ восстановления и конъюгирования агента, например, лекарственного средства, с активируемым антителом, что приводит к селективности размещения агента. Способ, как правило, включает частичное восстановление активируемого антитела восстанавливающим агентом, так что любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другой отличной от АВ части активируемого антитела 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 активируемых антител, в которых ММ сохраняет способность эффективно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу будет варьироваться в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления соотношение восстанавливающего агента к активируемому антителу 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 около 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 8:1 до около 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 2,5:1 до 1:1.

[000144] В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения межцепочечных дисульфидных связей в АВ активируемого антитела 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 активируемого антитела 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 активируемому антителу 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 около 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 8:1 до около 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 2,5:1 до 1:1.

[000145] Тиолсодержащий реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающий агент может представлять собой, например, TCEP. В некоторых вариантах осуществления восстановленное активируемое антитело можно очистить перед конъюгацией, например, с использованием колоночной хроматографии, диализа или диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления восстановленное антитело не очищается после частичного восстановления и до конъюгации.

[000146] В изобретении также предложены частично восстановленные активируемые антитела, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в активируемом антителе была восстановлена восстанавливающим агентом без нарушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат СМ1-СМ2, связанный с АВ, где субстрат СМ1-СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для по меньшей мере одной MMP и одной SP. В некоторых вариантах осуществления ММ связан с АВ через субстрат СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей активируемого антитела не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей ММ в активируемом антителе не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий агент представляет собой TCEP.

[000147] В изобретении также предложены частично восстановленные активируемые антитела, включая, но не ограничиваясь ими, полиспецифические активируемые антитела по изобретению, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в активируемом антителе была восстановлена восстанавливающим агентом без нарушения или иного нарушения активности и/или эффективность активируемого антитела, при этом активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат CM1-CM2, связанный с AB, и субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы. Активность и/или эффективность активируемого антитела, в качестве неограничивающего примера, представляет собой активность маскировки, активацию активируемого антитела и/или связывающую активность активированного активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей активируемого антитела не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей MM в активируемом антителе не нарушаются восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий агент представляет собой TSEP.

[000148] В изобретении также предложены конъюгированные активируемые антитела, которые содержат активируемое антитело, связанное с полезной нагрузкой в виде монометилауристатина D (MMAD), причем активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат CM1-CM2, связанный с AB, и субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для по меньшей мере одной протеазы MMP, и по меньшей мере одной протеазы SP.

[000149] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное с MMAD активируемое антитело может быть конъюгировано с использованием любого из нескольких способов присоединения агентов к AB: (a) присоединение к углеводным группам AB, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам AB, или (c) присоединение к аминогруппам AB или (d) присоединение к карбоксилатным группам

AB.

[000150] 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 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 выбран из группы, состоящей из линкеров, приведенных в таблицах 5 и 6. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны через линкер малеимид капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело 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.

[000151] В изобретении также предложены полипептиды и другие более крупные молекулы, которые содержат одну или более представленных в данном документе последовательностей субстрата CM1-CM2. В изобретении также представлены полипептиды и другие более крупные молекулы, которые содержат одну или более представленных в данном документе последовательностей субстрата CM1-CM2. Эти последовательности субстрата CM1-CM2, представленные в данном документе, также могут быть использованы в зондах и других агентах обнаружения и способах их применения. Например, представленные в данном документе последовательности субстрата CM1-CM2 можно использовать в сочетании с флуорофорами и другими тушителями для получения агентов обнаружения, таких как визуализирующие агенты и/или другие диагностические агенты. Специалисты в данной области техники поймут, что последовательности субстрата CM1-CM2, представленные в данном документе, применимы в любой композиции и/или способе в данной области техники, в которых

использовался бы субстрат, который расщепляется по меньшей мере одной MMP и по меньшей мере одной SP.

[000152] В изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело и/или активируемое антитело, описанные в данном документе, а также векторы, которые содержат эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. В изобретении предложены способы получения антитела и/или активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела, причем клетка содержит такой вектор.

[000153] В изобретении предложен способ производства конъюгированного антитела по изобретению, которое связывается с данной мишенью, путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии антитела, (i) где антитело содержит субстрат CM1-CM2, и (ii) где субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для матриксной металлопротеазы и сериновой протеазы; (b) выделения антитела; и (c) конъюгирования выделенного антитела с одним или более дополнительными агентами.

[000154] В изобретении также предложен способ производства активируемых антител по изобретению, которые связывают в активированном состоянии заданную мишень, путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2 и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывает мишень, (i) где субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который действует как субстрат для MMP и SP; и (ii) где субстрат CM1-CM2 расположен в активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии MM препятствует специфическому связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии MM не препятствует специфическому связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним; и (b) выделения активируемого антитела.

[000155] В изобретении также предложен способ производства конъюгированных активируемых антител по изобретению, которые связывают в активированном состоянии заданную мишень, путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2 и антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывает мишень, (i) где субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который действует как субстрат для MMP и SP и/или CP; и (ii) где субстрат CM1-CM2 расположен в активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии MM препятствует специфическому связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии MM не препятствует специфическому связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним; (b) выделения активируемого антитела; и (c) конъюгирования выделенного антитела с одним или более дополнительными агентами.

[000156] В изобретении предложены способы предотвращения, замедления прогрессирования, лечения, облегчения симптомов или иного снижения интенсивности связанного с мишенью заболевания у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антитела, конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

[000157] В изобретении предложены способы предотвращения, замедления прогрессирования, лечения, облегчения симптома или иного снижения интенсивности воспаления и/или воспалительного нарушения у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В изобретении также предложены способы предотвращения, замедления прогрессирования, лечения, облегчения симптомов или иного снижения интенсивности злокачественного новообразования у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. В изобретении также предложены способы предотвращения, замедления прогрессирования, лечения, облегчения симптома или иного снижения интенсивности аутоиммунного заболевания у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела. здесь субъекту, который в этом нуждается.

[000158] Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используемые в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить на любой стадии заболевания. Например, такое конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить пациенту, страдающему злокачественным новообразованием

любой стадии, от ранней до метастатической. Термины «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[000159] В некоторых вариантах осуществления субъект 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 субъект представляет собой грызуна. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, находящееся на попечении ветеринара.

[000160] Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и их терапевтические композиции вводят субъекту, страдающему или подверженному заболеванию или нарушению, связанному с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, связанному с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, страдающих от злокачественного новообразования или от другого неопластического состояния, 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 нарушение, 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.

[000161] Введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, считается успешным, если достигается какая-либо из множества лабораторных или клинических задач. Например, введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, считается успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчаются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессируют дальше, то есть до худшего состояния. Введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, имеющему заболевание или

нарушение, связанное с аберрантной экспрессией и/или активностью мишени, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в ремиссию или не прогрессирует дальше, т. е. до худшего состояния.

[000162] В некоторых вариантах осуществления антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела, описанные в данном документе, используются в сочетании 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 злокачественного новообразования. Например, антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела можно использовать в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым агентом.

[000163] 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.

[000164] 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)).

[000165] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD-1, PD-1, TIGIT, TIM-3, B7H4, BTLA и Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAF_i, MEK_i и Vtk, 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.

[000166] 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 PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIM-3. 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.

[000167] 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.

[000168] В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят во время и/или после лечения в сочетании с одним или более дополнительными агентами, такими как, например, химиотерапевтический агент, противовоспалительный агент, и/или

иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент составляют в виде единой терапевтической композиции, и антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент являются отдельными друг от друга, например, каждое из них составляют в виде отдельной терапевтической композиции, а антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят одновременно, или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят в разное время в течение курса лечения. Например, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят до введения дополнительного агента, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят после введения дополнительного агента, или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят в чередующемся порядке. Как описано в данном документе, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят в однократных или многократных дозах.

[000169] В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) вводят одновременно. Например, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) могут быть составлены в одной композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) вводят последовательно, или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент вводят в разное время в течение курса лечения.

[000170] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими

как, в качестве неограничивающего примера, противовоспалительный агент, иммунодепрессивный агент, химиотерапевтический агент, 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, Abgaxane®). 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 протеосом, 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 дополнительное средство 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.

[000171] В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело против той же мишени, что и первое конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело против мишени, отличной от мишени первого конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела.

[000172] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) вводят одновременно. Например, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) могут быть составлены в виде одной композиции или введены в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительный агент(-ы) вводят последовательно, или антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительный агент вводят в разное время в течение курса лечения. Например, антитело и/или конъюгированные антитела вводят до введения дополнительного агента, антитело и/или конъюгированные антитела вводят после введения дополнительного агента, или антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительные агенты вводят в чередующемся порядке. Как описано в данном документе, антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительный агент находятся в однократных или многократных дозах.

[000173] В изобретении также предложены способы и наборы для применения конъюгированных антител, активируемых антител и/или конъюгированных активируемых антител при различных диагностических и/или профилактических целях.

[000174] Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению и носитель. Такие фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

[000175] Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывает мишень. Иллюстративные классы мишеней АВ включают, но не обязательно ограничиваются ими, рецепторы клеточной поверхности и секретируемые связывающие белки (например, факторы роста), растворимые ферменты, структурные белки (например, коллаген, фибронектин) и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные антитела и/или активируемые антитела содержат АВ, которое связывает внеклеточную мишень, как правило, внеклеточную белковую мишень. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные антитела и/или активируемые антитела предназначены для клеточного поглощения и могут переключаться внутри клетки.

[000176] В качестве неограничивающего примера АВ является партнером по связыванию для любой мишени, перечисленной в таблице 1.

Таблица 1. Иллюстративные мишени

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
Интегрин альфа-4	CD56	DLK1	Гиалуронидаза	Льюис X	STEAP2
Интегрин альфа-V	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
интегрин альфа4бета1	CD70	DPP-4	ИФН-альфа	LRP4	TAPA1
интегрин альфа4бета7	CD71	DSG1	ИФН-бета	LRRC26	ТФР-бета
AGR2	CD74	EGFR	ИФН-гамма	MCSP	TIGIT
Анти-Льюис-Y		EGFRviii	IgE	Мезотелин	TIM-3
Рецептор апеллина J	CD80	Рецептор эндотелина В (ETBR)	Рецептор IgE (FcεRI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	Муцин-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	ИЛ-1B	Na/K-АТФаза	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	ИЛ-1R	Эластаза нейтрофилов	TLR8
C5 комплемента	CD125	ERBB3	ИЛ-2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (ИЛ-2RG)	F-белок РСВ	ИЛ-11	Никастрин	TMEM31
CA9	CD133	FAP	ИЛ-12	Рецепторы Notch	TNF-альфа
CA19-9 (Льюис а)	CD137	FGF-2	ИЛ-12p40	Notch 1	TNFR

Карбоангидр аза 9	CD138	FGF8	ИЛ-12R, ИЛ-12R бета- 1	Notch 2	TNFRS12 A
CD2	CD166	FGFR1	ИЛ-13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	ИЛ-13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	ИЛ-15	NOV	Трансферр ин
CD9	CDH6	FGFR4	ИЛ-17	OSM-R	Трансферр иновый рецептор
CD11a	СЕАСАМ5 (СЕА)	Рецептор фолата	ИЛ-18	OX-40	TRK-A
CD19	СЕАСАМ6 (NCA-90)	GAL3ST1	ИЛ-21	PAR2	TRK-B
CD20	КЛАУДИН-3	Г-КСФ	ИЛ-23	PDGF-AA	uPAR
CD22	КЛАУДИН-4	Рецептор Г- КСФ	ИЛ-23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	ИЛ-27/ИЛ- 27R (wsx1)	PDGFR- альфа	VCAM-1
CD25	Коллаген	GITR	ИЛ-29	PDGFR-бета	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	ИЛ-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	Рецептор Г- КСФ	GLUT4	ИЛ-31/ИЛ- 31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	ГМ-КСФ	ИЛ-2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	Рецептор ГМ-КСФ	ИЛ-4	Фосфатидилс ерин	VEGF-D
CD38	CTGF	Гликопроте иновые Пб/Ша рецепторы	ИЛ-4R	PlGF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	ИЛ-6, ИЛ-6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	ГРПВ/ША	Рецептор инсулина	PSMA	VEGFR3

CD41	CXCR1	GPNMB	Лиганды Jagged	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	Сфингозин- 1-фосфат	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

[000177] В качестве неограничивающего примера, АВ является антителом, перечисленным в таблице 2, или получено из него.

Таблица 2. Иллюстративные источники АВ

Торговое название антитела (название антитела)	Мишень
Avastin™ (бевацизумаб)	VEGF
Lucentis™ (ранибизумаб)	VEGF
Erbitux™ (цетуксимаб)	EGFR
Vectibix™ (панитумумаб)	EGFR
Remicade™ (инфликсимаб)	TNF α
Humira™ (адалимумаб)	TNF α
Tysabri™ (натализумаб)	Интегрин $\alpha 4$
Simulect™ (базиликсимаб)	ИЛ-2R
Soliris™ (экулизумаб)	C5 компонента
Raptiva™ (эфализумаб)	CD11a
Веххар™ (тозитумомаб)	CD20
Zevalin™ (ибритумомаб тиуксетан)	CD20
Rituxan™ (ритуксимаб)	CD20
Окрелизумаб	CD20
Arzerra™ (офатумумаб)	CD20
Gazyva™ (обинутузумаб)	CD20
Zenarax™ (даклизумаб)	CD25
Adcetris™ (брентуксимаб ведотин)	CD30
Myelotarg™ (гемтузумаб)	CD33
Mylotarg™ (гемтузумаб озогамицин)	CD33
Campath™ (алемтузумаб)	CD52

ReoPro™ (абциксимаб)	Гликопротеиновые IIb/IIIa рецепторы
Xolair™ (омализумаб)	IgE
Herceptin™ (трастузумаб)	Her2
Kadcyla™ (трастузумаб эмтанзин)	Her2
Synagis™ (паливизумаб)	F-белок РСВ
(ипилимумаб)	CTLA-4
(тремелимумаб)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(пертузумаб)	Her2-neu
(эртумаксумаб)	CD3/Her2-neu
Ogencia™ (абатацепт)	CTLA-4
(танезумаб)	NGF
(бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
(залутумумаб)	EGFR
(мапатумумаб)	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
ICR62	EGFR
мкАт 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(эдреколомаб)	ЕрСAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (этанерцепт)	TNF-R
Amevive™ (алефацепт)	1-92-LFA-3
Antril™, Kineret™ (анакинра)	ИЛ-1Ra
GC1008	ТФР-бета
	Notch, например, Notch 1
	Jagged 1 или Jagged 2
(адекатумумаб)	ЕрСAM
(фигитумумаб)	IGF1R
(тоцилизумаб)	Рецептор ИЛ-6
Stelara™ (устекинумаб)	ИЛ-12/ИЛ-23

Prolia™ (деносумаб)	RANKL
---------------------	-------

[000178] Активируемые антитела и композиции активируемых антител, предложенные в данном документе, содержат по меньшей мере антитело или его фрагмент (вместе обозначаемые в тексте описания АВ), которое специфически связывает мишень, например, человеческую мишень, где АВ модифицирован маскирующим фрагментом (ММ).

[000179] В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент выбран для применения со специфическим антителом или фрагментом антитела. Например, подходящие маскирующие фрагменты для применения с антителами, связывающими EGFR, включают ММ, которые содержат последовательность CISPRG (SEQ ID NO: 165). В качестве неограничивающих примеров ММ может включать последовательность, такую как CISPRGC (SEQ ID NO: 166); CISPRGCG (SEQ ID NO: 167); CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 168); CISPRGCPDGPYVM (SEQ ID NO: 169), CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO: 170) и CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO: 171). Другие подходящие маскирующие фрагменты включают любую из масок, специфичных для EGFR, описанных в публикации PCT № WO 2010/081173, например, в качестве неограничивающего примера, GSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 172); CISPRGCGGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 173); CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 174); ADHVFWSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 175); CHHVYWGHCISPRGCPG (SEQ ID NO: 176); CPHFTTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 177); CNHHYHYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 178); CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 179); CPYYTLSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 180); CNHVYFGTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 181); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 182); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 183); YNPCATPMCCISPRGCPG (SEQ ID NO: 184); CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 185); CNHHYHYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 186); CNHVYFGTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 187); CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 188); CPHFTTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 189); CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 190); CHHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 191); CPYYTLSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 192); CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 193); ADHVFWSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 194); YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO: 195); CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 196); C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (SEQ ID NO: 197); CISPRGCGQPIPSVK (SEQ ID NO: 198); CISPRGCTQPYHVSR (SEQ ID NO: 199); и/или CISPRGCNAVSGLGS (SEQ ID NO: 164).

[000180] 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.

[000181] 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, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–10000000 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, по отношению к мишени в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–10000000, или 100000–10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, которое не модифицировано ММ, или исходного АВ по отношению к мишени.

[000182] 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.

[000183] 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*.

[000184] 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 модифицирован или связан 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, по сравнению со связыванием АВ, не модифицированного ММ, исходного АВ или АВ, не связанного с ММ, с мишенью в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vivo* или в анализе *in vitro*.

[000185] Когда АВ соединяется 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.

[000186] АВ, связанное с ММ или модифицированное им, может быть представлено следующими формулами (в порядке от amino (N)-концевой области до карбокси (C)-концевой области):

(ММ)-(АВ)

(АВ)-(ММ)

(ММ)-L-(АВ)

(АВ)-L-(ММ)

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

[000187] 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 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% идентичен любому природному партнеру по связыванию 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.

[000188] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела содержат АВ, которое модифицировано ММ, а также содержат по меньшей мере один расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (ММР), и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). Такие активируемые антитела проявляют активируемое/переключаемое связывание с мишенью АВ. Активируемые антитела, как правило, содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные или связанные с маскирующим фрагментом (ММ) и субстратом СМ1-СМ2.

[000189] Элементы активируемых антител расположены так, чтобы субстрат ММ и СМ1-СМ2 располагался таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени АВ связывает мишень, но когда оно 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.

[000190] K_d АВ, модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, по отношению к мишени в по меньшей мере 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–1000000 или в 100000–10000000 раз больше, чем K_d АВ, которое не модифицировано с помощью ММ и субстрата СМ1-СМ2, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, по отношению к мишени в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000,

10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–1000000, или 100000–10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, которое не модифицировано ММ и субстратом СМ1-СМ2, или исходного АВ по отношению к мишени.

[000191] Когда АВ модифицировано с помощью ММ и субстрата СМ1-СМ2 и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, ММР и SP), специфическое связывание АВ с его мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или связыванием АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, со своей мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации ММ и субстратом СМ1-СМ2 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*.

[000192] Используемый в данном документе термин «расщепленное состояние» относится к состоянию активируемых антител после модификации, т.е. расщепления субстрата СМ1-СМ2, по меньшей мере одной матриксной металлопротеазой и/или по меньшей мере одной сериновой протеазой. Используемый в данном документе термин «нерасщепленное состояние» или «полностью нерасщепленное» относится к состоянию активируемых антител в отсутствие расщепления субстрата СМ1-СМ2 с помощью ММР и/или SP. Как обсуждалось выше, термин «активируемые антитела» используется в данном документе для обозначения активируемого антитела как в его нерасщепленном (нативном) состоянии, так и в его расщепленном состоянии. Активируемое антитело в его расщепленном состоянии также называется в данном документе активированным антителом и/или активированным активируемым антителом. Обычному специалисту в данной области техники будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления расщепленное активируемое антитело может не иметь ММ из-за расщепления субстрата СМ1-СМ2 протеазой, что приводит к высвобождению по меньшей мере ММ.

[000193] Под активируемым или переключаемым подразумевается, что активируемое антитело демонстрирует первый уровень связывания с мишенью, когда оно 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 активируемого антитела больше в присутствии расщепляющего агента, способного расщеплять субстрат CM1-CM2, чем в отсутствие такого расщепляющего агента. Таким образом, когда активируемое антитело 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.

[000194] Субстрат CM1-CM2 и АВ активируемых антител выбираются таким образом, чтобы АВ представляло собой связывающий фрагмент для данной мишени, а субстрат CM1-CM2 представлял собой субстрат для MMP и SP, где MMP и/или SP совместно локализованы с мишенью в подвергаемой лечению области или области диагностического контроля у субъекта. Описанные в данном документе активируемые антитела находят конкретное применение, в котором, например, MMP и SP, каждая из которых способна расщеплять сайт в субстрате CM1-CM2, присутствуют 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).

[000195] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела 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.

[000196] В общем, активируемое антитело может быть сконструировано путем выбора представляющего интерес АВ и конструирования остатка активируемого антитела так, что при ограничении конформационной подвижности MM обеспечивает маскировку АВ или снижение связывания АВ со своей мишенью. Критерии структурного конструирования могут быть приняты во внимание для обеспечения этой функциональной особенности.

[000197] Предложены 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 обнаруживаемого уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии MMP и SP, которые способны расщеплять субстрат SM1-SM2 активируемых антител к (b) минимально обнаруживаемому уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела можно рассчитать как отношение константы диссоциации активируемых антител при обработке расщепляющим агентом (например, ферментом) к константе диссоциации активируемых антител при обработке 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 субстрат SM1-SM2 активируемых антител, чем в отсутствие расщепляющего агента.

[000198] Активируемые антитела могут быть представлены во множестве структурных конфигураций. Иллюстративные формулы активируемых антител представлены ниже. В частности, предполагается, что порядок от N-конца к C-концу АВ, MM и субстрата SM1-SM2 может быть обратным в активируемом антителе. Также конкретно предполагается, что SM и MM могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, так, что субстрат SM1-SM2 по меньшей мере частично содержится в MM.

[000199] Например, активируемые антитела могут быть представлены следующей формулой (в порядке от amino (N)- концевой области до карбокси (C)- концевой области:

(MM)-(субстрат SM1-SM2)-(AB)

(AB)-(субстрат SM1-SM2)-(MM)

где MM представляет собой маскирующий фрагмент, субстрат SM1-SM2 представляет собой расщепляемый фрагмент, а АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Как отмечалось выше, термин «субстрат SM1-SM2» не предназначен для передачи каких-либо требований в отношении ориентации или другого структурного расположения первого расщепляемого фрагмента (SM1), который является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеиназы (MMP), и по меньшей мере второго расщепляемого фрагмента (SM2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой

протеазы (SP). Таким образом, термин «субстраты CM1-CM2» охватывает субстраты CM1-CM2, имеющие следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: CM1-CM2 или CM2-CM1. Термин «субстраты CM1-CM2» также включает субстраты, на которых по меньшей мере часть последовательности CM1 перекрывается с по меньшей мере частью последовательности CM2. Также следует отметить, что хотя MM и субстрат CM1-CM2 указаны как отдельные компоненты в формулах выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в данном документе, предполагается, что аминокислотные последовательности MM и субстрата CM1-CM2 могут перекрываться, например, так, что субстрат CM1-CM2 полностью или частично содержится в MM. Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или C-конце по отношению к элементам активируемых антител.

[000200] В определенных вариантах осуществления MM не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не имеет или практически не имеет гомологии с каким-либо природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM 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 связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не более чем на 20% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления MM не более чем на 10% идентичен любому природному партнеру по связыванию АВ.

[000201] Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить один или более линкеров, например, гибких линкеров, в конструкцию активируемого антитела, чтобы обеспечить гибкость в одном или более соединениях MM-субстрат CM1-CM2, соединениях субстрат CM1-CM2-AB или и в том, и другом. Например, АВ, MM, и/или субстрат CM1-CM2 могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желаемой гибкости. По существу, введение одной или более аминокислот, которое обеспечивает получение гибкого линкера, может иметь полезный эффект на переключаемый фенотип таких конструкций активируемых антител. Кроме того, как описано ниже, когда активируемое

антитело 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.

[000202] Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело 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-(субстрат CM1-CM2)-(AB)

(MM)-(субстрат CM1-CM2)-LP2-(AB)

(MM)-LP1-(субстрат CM1-CM2)-LP2-(AB)

где MM, субстрат CM1-CM2 и AB 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))).

[000203] Субстрат CM1-CM2 специфически расщепляется по меньшей мере одной MMP 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 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ и специфически расщепляется по меньшей мере одной SP 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 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$.

[000204] Для специфического расщепления ферментом обеспечивается контакт между ферментом и субстратом CM1-CM2. Когда активируемое антитело, содержащее AB, связанное с MM и субстратом CM1-CM2, находится в присутствии мишени и достаточной ферментативной активности, субстрат CM1-CM2 может быть отщеплен. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с субстратом CM1-CM2 и влиять на расщепление. Легко предположить, что

фермент может находиться поблизости от субстрата CM1-CM2, но не может расщеплять из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

[000205] Линкеры, подходящие для применения в описанных в данном документе композициях, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированных АВ или активируемых антител 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.

[000206] Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 382), где n представляет собой целое число по меньшей мере от одного), глицин-аланиновых полимеров, аланин-сериновых полимеров и других гибких линкеров, известных в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральным соединением 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: 202), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 203), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 204), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 205), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 206), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 207), и т.п. Обычному специалисту в данной области техники понятно, что конструкция активируемых антител 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 активируемых антител.

[000207] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описанные в данном документе, также включают агент, конъюгированный с активируемым 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.

[000208] 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).

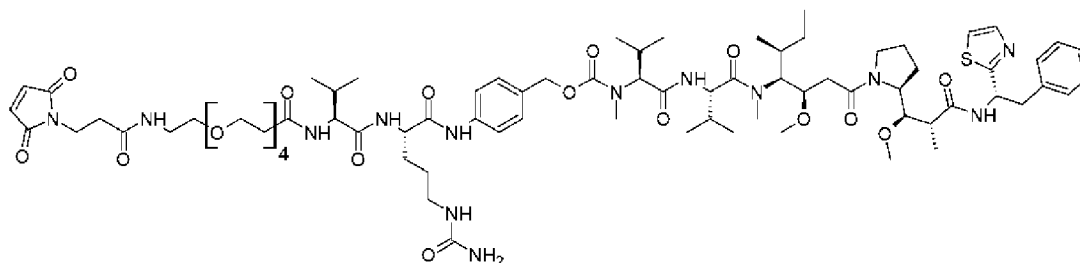
[000209] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой обнаруживаемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, агент представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, одну или более биотинильных групп, которые могут быть обнаружены меченым авидином (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 обнаруживаемые фрагменты присоединены спейсерными молекулами.

[000210] 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, доластатин и их производные (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Например, агент представляет собой монометилауристатин E (MMAE) или монометилауристатин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 3. 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 E 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

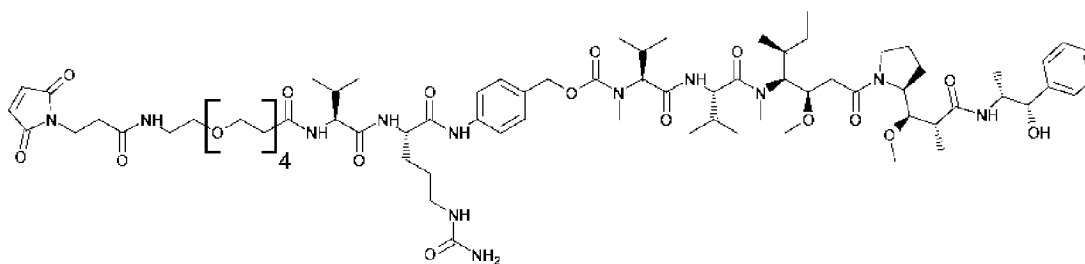
вариантах осуществления агент представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой димер пирролобензодиазепина.

[000211] 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 монометилауристин 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 монометилауристин E (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». Структуры vc-ММАД и vc-ММАЕ показаны ниже:

vc-ММАД:



vc-ММАЕ:



[000212] Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные

фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-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 .

[000213] Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием различных бифункциональных связывающих белок агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), имиотиолан (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 ривин 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).

[000214] В таблице 3 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 3. Примеры фармацевтических агентов для конъюгации

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Ауристатины	Турбостатин
Ауристатин E	Фенстатины
Монометилауристатин 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 ауристатины, например,	Модифицированные бриостатины

их амиды

Ауристин тирамин

Ауристин хинолин

Доластатин

Производные доластатина

Доластатин 16 DmJ

Доластатин 16 Dpv

Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4

Производные майтанзиноидов

Дуокармицин

Производные дуокармицина

Альфа-аманитин

Антрациклины

Доксорубин

Даунорубин

Бриостатины

Камптотецин

Производные камптотецина

7-замещенный камптотецин

10,

диформетилендиоксикамптотецин

Комбретастины

Дебромоаплизинатоксин

Кахалалид-F

Дискодермолит

Эктеинасцидины

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА

Ацикловир

Галокомстатины

Пирролобензимидазолы (PBI)

Цибростатинб

Доксалиформ

Аналоги антрациклина

Аналог цемадотина (CemCH₂-SH)

Вариант токсина A Pseudomonas (PE38)

Вариант токсина A Pseudomonas (ZZ-PE38)

ZJ-101

OSW-1

4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина

Ингибиторы топоизомеразы

Гемиастерлин

Цефалотаксин

Гомогаррингтонин

Пирролобензодиазепин (PBD)

11- Димеры пирролобензодиазепаина (PBD)

Функционализированные

пирролобензодиазепины

Димеры функционализированного пирролобензодиазепаина

Калихеамицины

Подофиллотоксины

Таксаны

Алкалоиды барвинка розового

КОНЬЮГИРУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ

Vira A

Флуоресцеин и его производные

Симметрел

Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)

ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫРАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ

Нистатин

 ^{125}I ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ^{131}I ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ^{89}Zr СРЕДСТВА

Адриамицин

 ^{111}In

Церубидин

 ^{123}I

Блеомицин

 ^{131}In

Алкеран

 ^{99m}Tc

Вельбан

 ^{201}Tl

Онковин

 ^{133}Xe

Фторурацил

 ^{11}C

Метотрексат

 ^{62}Cu

Тиотепа

 ^{18}F

Бисантрен

 ^{68}Ga

Новантрон

 ^{13}N

Тиогуанин

 ^{15}O

Прокарабизин

 ^{38}K

Цитарабин

 ^{82}Rb ^{99m}Tc (Технеций)ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНЫЕСРЕДСТВА

Аминогликозиды

ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Стрептомицин

Барий

Неомицин

Золото

Канамицин

Платина

Амикацин

АНТИМИКОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ

Гентамицин

ПРЕПАРАТЫ

Тобрамицин

Тилозин

Стрептомицин В

Спектиномицин

Спектиномицин

Ампициллин

Сульфаниламид

Полимиксин

Хлорамфеникол

[000215] Специалисты в данной области техники поймут, что большое количество возможных фрагментов может быть связано с полученными антителами по настоящему 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 которых включено в данный документ посредством ссылки).

[000216] 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, сукцинимидные эфиры, 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).

[000217] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к композициям и способам, представленным в данном документе, конъюгированное активируемое антитело также может быть модифицировано для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность активируемого антитела. Эти

модифицированные аминокислотные последовательности предназначены для обеспечения контролируемого размещения и/или количества конъюгированного агента в конъюгированном активируемом антителе. Например, активируемое антитело 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 активируемое антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы включать или иным образом вводить один или более не природных аминокислотных остатков в активируемое антитело для обеспечения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы оно включало или иным образом вводило ферментативно активируемые пептидные последовательности в последовательность активируемого антитела.

[000218] 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) карбодимид 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, сульфо-SMCC, SPDB или сульфо-SPDB.

[000219] 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.

[000220] 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 линкеров являются одинаковыми, т.е. расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкеров является различными, т.е. по меньшей мере один является расщепляемым и по меньшей мере один является нерасщепляемым.

[000221] 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.

[000222] 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).

[000223] Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения ни к окисленным, ни к восстановленным Ат включают линкеры, имеющие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с первичными аминогруппами, присутствующими в немодифицированных остатках лизина в Ат. 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.

[000224] Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения ни к окисленным, ни к восстановленным Ат включают линкеры, имеющие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с группами карбоновых кислот, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в Ат, 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 карбоксиамида. В этих случаях функциональные группы, присутствующие в подходящих линкерах, будут включать первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксилламины и гидразиды.

[000225] 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 субстрату MM, CM1-CM2 и связанным линкерам, а затем присоединяется к линкеру для конъюгации.

[000226] 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.

[000227] 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.

[000228] Расщепляемые линкеры: пептидные линкеры, которые чувствительны к расщеплению ферментами системы комплемента, такими как, помимо прочего, урокиназа, тканевый активатор пламиногена, 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 урокиназа, тканевый активатор пламиногена, плазмин или трипсин. Эти расщепляемые линкеры полезны в конъюгированных активируемых антителах, которые включают внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, приведенных в таблице 3.

[000229] Неограничивающие примеры расщепляемых линкерных последовательностей представлены в таблице 4.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности линкеров для конъюгации

Типы расщепляемых Аминокислотная последовательность последовательностей

Расщепляемые плазмином
последовательности

Проурокиназа

PRFKIIGG (SEQ ID NO: 319)

PRFRIIGG (SEQ ID NO: 320)

ТФР-β	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 321)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 322)
Стафилокиназа	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 323)
	SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 324)
<u>Расщепляемые фактором Ха</u>	IEGR (SEQ ID NO: 325)
<u>последовательности</u>	IDGR (SEQ ID NO: 326)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 327)
<u>Расщепляемые MMP</u>	
<u>последовательности</u>	
Желатиназа А	PLGLWA (SEQ ID NO: 328)
<u>Расщепляемые коллагеназой</u>	
<u>последовательности</u>	
Коллаген кожи телят (цепь α1 (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 329)
Коллаген кожи телят (цепь α2 (I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 330)
Коллаген бычьего хряща (цепь α1 (II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 331)
Коллаген печени человека (цепь α1 (III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 332)
α ₂ M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 333)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 334)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 335)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 336)
α ₁ M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 337)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 338)
α ₂ M крысы	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 339)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 340)
α ₁ I ₃ (2J) крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 341)
α ₁ I ₃ (27J) крысы	SAPAVESE (SEQ ID NO: 342)
Коллагеназа фибробластов человека	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 343)
<u>(аутолитические расщепления)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 344)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 345)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 346)

[000230] 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 субстрат CM1-CM2, также мог бы модифицировать линкер конъюгированного активируемого антитела.

[000231] Спейсеры и расщепляемые элементы: 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.

[000232] 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.

[000233] 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.

[000234] 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 карбокси-концу 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 амино-конец линкера затем используется либо непосредственно, либо после дальнейшей модификации для связывания с АВ, способной активировать комплемент.

[000235] 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.

[000236] 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 3.

[000237] Линкеры для высвобождения без активации комплемента: в еще одном применении направленной доставки желательна 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.

[000238] Биохимические сшивающие агенты: в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело 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 постадийного связывания двух разных белков можно использовать гетеробифункциональные сшивающие агенты, которые устраняют образование нежелательного гомополимера.

[000239] Также применимы пептидные линкеры, расщепляемые лизосомными протеазами, например, Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, могут быть использованы кислотолabile линкеры, расщепляемые в среде лизосомы с низким pH, например: бис-сиалиловый эфир. Другие подходящие линкеры включают labильные по отношению к катепсину субстраты, особенно те, которые демонстрируют оптимальную функцию при кислом pH.

[000240] Иллюстративные гетеробифункциональные сшивающие агенты приведены в таблице 5.

Таблица 5. Иллюстративные гетеробифункциональные сшивающие линкеры

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

		группа		
	Сульфгидрилы	Конъюгация	фермент- антитело	
		Конъюгация	гаптен- белок-носитель	
Сульфо-SMCC	Первичные амины	Стабильная	реакционно- способная к малеимиду	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

[000241] Нерасщепляемые линкеры или 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.

[000242] 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.

[000243] 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.

[000244] 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 патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

[000245] 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.

Определения:

[000246] Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, которые традиционно подразумеваются обычными специалистами в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного грамматического объекта. 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 методы используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения осуществляют в соответствии с указаниями производителя или осуществляют как обычно в данной области техники, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры, как правило, осуществляют в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, 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, используемая в связи с лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанных в данном документе, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов используются стандартные методы.

[000247] Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:

[000248] Используемый в данном документе термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным 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.

[000249] Известно, что основная структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50–70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает варибельную область из около 100–110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, которая в первую очередь отвечает 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.

[000250] 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.

[000251] Термин «антигенсвязывающий сайт» или «связывающая часть» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых варибельных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Три сильно различающихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемые «гиперварибельными 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 гипервариабельных областей в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, а три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепи называются «определяющими комплементарность областями», или «CDR». Присвоение аминокислот каждому домену 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).

[000252] 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 детерминанту белка, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. 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.

[000253] 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 связывающие свойства выбранных полипептидов можно количественно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт / антиген, причем эти скорости зависят от концентраций 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 , мкМ 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.

[000254] 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.

[000255] 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 мыши, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе.

[000256] 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.

[000257] Используемый в данном документе термин «встречающийся в природе» применительно к объекту, относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, последовательность полипептида или полинуклеотида, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории или иным другим образом, является встречающейся в природе.

[000258] Термин «функционально связанный», используемый в данном документе, относится к положениям, в которых описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предполагаемым для них образом. Регуляторная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, связывается таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с регуляторными последовательностями.

[000259] Используемый в данном документе термин «регуляторная последовательность» относится к последовательностям полинуклеотида, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они связаны. 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 «регуляторные 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.

[000260] 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.

[000261] 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 фосфотиоат, фосфородитиоат, фосфороселериоат, фосфородиселениоат, фосфороанилиотиоат, фосфораниладат, 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., патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). При необходимости олигонуклеотид может включать метку для обнаружения.

[000262] 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. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцать стандартных аминокислот, аминокислоты неприродного происхождения, такие как α -, α -бизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота, и другие нестандартные аминокислоты также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают: 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 аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, применяемом в данном документе, левостороннее направление представляет собой аминоконцевое направление, а правостороннее направление представляет собой карбоксиконцевое направление, в соответствии со стандартным применением и условностями.

[000263] Точно так же, 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 РНК-транскриптов называется направлением транскрипции; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК, и которые расположены 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются «вышележащими последовательностями»; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК, и которые расположены 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются «нижележащими последовательностями».

[000264] 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 процентов идентичности последовательностей, и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 99 процентов идентичности последовательностей.

[000265] В некоторых вариантах осуществления неидентичные положения остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами.

[000266] 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, которые, 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. В данном документе подробно описаны анализы. Специалисты в данной области техники могут легко получить фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулинов. Подходящие амино- и карбокси-концы 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.

[000267] 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)); и Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

[000268] 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.

[000269] Используемый в данном документе термин «агент» для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

[000270] Применяемые в данном документе термины «метка» или «меченный» относятся к введению обнаруживаемого маркера, например, путем введения меченной

радиоизотопами аминокислоты или присоединения к полипептиду биотиновых 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, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки). 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 пациенту.

[000271] 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)).

[000272] 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.

[000273] 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.

[000274] Термин «пациент» включает субъектов-людей и ветеринарных субъектов.

[000275] Активируемые антитела по изобретению специфически связываются с заданной мишенью, например, с человеческим белком-мишенью. В изобретение также включены активируемые антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и активируемые антитела, описанные в данном документе.

[000276] Специалисты в данной области техники поймут, что можно определить без излишнего экспериментирования, имеет ли моноклональное антитело (например, мышинное моноклональное или гуманизированное антитело) такую же специфичность, что и моноклональное антитело, используемое в описанных в данном документе способах, путем установления того, препятствует ли первое связыванию последнего с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по изобретению, что показано уменьшением связывания моноклональным антителом по изобретению, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близким эпитопом. Способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по изобретению, заключается в предварительной инкубации моноклонального антитела по изобретению с мишенью и затем добавлении тестируемого моноклонального антитела, чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать мишень. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно имеет такую же или функционально эквивалентную эпитопную специфичность, что и моноклональное антитело по изобретению.

Полиспецифические активируемые антитела

[000277] В изобретении также предложены полиспецифические активируемые антитела. Полиспецифические активируемые антитела, предложенные в данном документе, представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают два или более разных антигенов или эпитопов и содержат по меньшей мере один маскирующий фрагмент (ММ), связанный по меньшей мере с одним антиген- или эпитоп-связывающим доменом полиспецифического антитела, так 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 субстрат CM1-CM2, который функционирует как субстрат для по меньшей мере одной протеазы MMP и по меньшей мере одной SP. 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.

[000278] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, 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 активируемые антитела, которые предназначены для привлечения лейкоцитов, также называются в данном документе привлекающими лейкоциты полиспецифическими активируемыми антителами. В некоторых вариантах осуществления изобретения полиспецифические активируемые антитела, которые предназначены для привлечения Т-клеток, также называются в данном документе привлекающими Т-клетки полиспецифическими активируемыми антителами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела 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 эффекторная клетка иммунной системы 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 активируемые антитела, 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.

[000279] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, привлекающие эффекторные клетки иммунной системы, по изобретению содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент 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 содержит второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. 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 вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления антитело, привлекающее неиммунные эффекторные клетки, представляет собой нацеленное на злокачественное новообразование 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 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 эффекторная клетка иммунной системы 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.

[000280] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, 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 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 содержит второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. 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 вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень.

[000281] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, привлекающие Т-клетки, содержат нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело, привлекающее Т-клетки, или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеленного на злокачественное новообразование 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 нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень. 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 нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000282] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, привлекающие Т-клетки, содержат нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент и scFv, привлекающее Т-клетки, где по меньшей мере одно из нацеленного на злокачественное новообразование антитела IgG 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 нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием

мишень. 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 нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000283] В некоторых вариантах осуществления полиспецифического активируемого антитела, привлекающего эффекторные клетки иммунной системы, один антиген, как правило, представляет собой антиген, присутствующий на поверхности опухолевой клетки или другого типа клеток, связанного с заболеванием, такой как, помимо прочего, любая мишень, перечисленная в таблице 1, такая как, но не ограничиваясь ими, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 или CD71 (трансферриновый рецептор), 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, PD-L1, PD-L2, или

TNFSF9.

[000284] Один вариант осуществления данного изобретения представляет собой полиспецифическое активируемое антитело, которое активируется в микроокружении злокачественного новообразования и которое содержит антитело, например, IgG или scFv, направленное на опухолевую мишень, и агонистическое антитело-агонист, например, IgG или scFv, направленное на костимулирующий рецептор, экспрессируемый на поверхности активированной Т-клетки или НК-клетки, при этом по меньшей мере одно из антитела к раковой мишени и/или агонистического антитела замаскировано. Примеры костимулирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, CD27, CD137, GITR, HVEM, NKG2D и OX40. В этом варианте осуществления полиспецифическое активируемое антитело после активации опухолессоциированными протеазами будет эффективно сшивать и активировать костимулирующие рецепторы, экспрессируемые Т-клеткой или НК-клеткой, зависимым от опухоли образом для повышения активности Т-клеток, которые реагируют на любой опухолевый антиген через их эндогенные Т-клеточные рецепторы для распознавания антигена или активирующие рецепторы НК-клеток. Зависимая от активации природа этих костимулирующих рецепторов Т-клеток или НК-клеток могла бы фокусировать активность активированного полиспецифического активируемого антитела на опухолеспецифических Т-клетках, не активируя все Т-клетки независимо от их антигенной специфичности. В одном варианте осуществления по меньшей мере антитело к костимулирующему рецептору полиспецифического активируемого антитела замаскировано для предотвращения активации аутореактивных Т-клеток, которые могут присутствовать в тканях, которые также экспрессируют антиген, распознаваемый направленным на опухоль антителом в полиспецифическом активируемом антителе, но активность которого ограничена отсутствием взаимодействия с корецептором.

[000285] Один вариант осуществления изобретения представляет собой полиспецифическое активируемое антитело, которое активируется при заболевании, характеризующемся чрезмерной стимуляцией Т-клеток, таком как, помимо прочего, аутоиммунное заболевание или очаг воспалительного заболевания. Такое полиспецифическое активируемое антитело содержит антитело, например, IgG или scFv, направленное на мишень, содержащую поверхностный антиген, экспрессируемый в ткани, на которую нацелена Т-клетка при аутоиммунном или воспалительном заболевании, и антитело, например, IgG или scFv, направленное на ингибирующий рецептор, экспрессируемый на поверхности Т-клетки или НК-клетки, при этом по меньшей мере одно из антитела к связанной с заболеванием ткани-мишени и/или антитела к

ингибирующему рецептору Т-клеток замаскировано. Примеры ингибирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 и KIR, экспрессируемые НК. Примеры тканевого антигена, на который нацеливаются Т-клетки при аутоиммунном заболевании, включают, но не ограничиваются ими, поверхностный антиген, экспрессируемый на миелине или нервных клетках при рассеянном склерозе, или поверхностный антиген, экспрессируемый на островковых клетках поджелудочной железы при диабете 1 типа. В этом варианте осуществления полиспецифическое активируемое антитело, когда оно локализуется в ткани при аутоиммунной атаке или воспалении, активируется и совместно взаимодействует с ингибирующим рецептором Т-лимфоцитов или НК-клеток для подавления активности аутореактивных Т-клеток, отвечающих на любые связанные с заболеванием тканевые антигены через их эндогенные TCR или активирующие рецепторы. В одном варианте осуществления по меньшей мере одно или более антител замаскированы для предотвращения подавления Т-клеточных ответов в тканях, которые не связаны с заболеванием, где также может экспрессироваться целевой антиген.

[000286] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело 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 содержит второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. 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 вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает

способность АВ2 связывать вторую мишень.

[000287] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело содержит scFv к CD3ε и нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv к CD3ε и/или нацеленного на злокачественное новообразование антитела или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), так что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2), так что соединение ММ2 снижает способность АВ2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), таким образом, что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать CD3ε, и нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2), таким образом, что связывание ММ2 снижает способность АВ2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000288] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое привлекающее Т-клетки активируемое антитело содержит scFv к CD3ε и нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv к CD3ε и/или нацеленного на злокачественного новообразование антитела IgG или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), так что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на злокачественное новообразование

антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень. 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), таким образом, что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), таким образом, что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000289] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело содержит scFv к CD3-эпсилон (CD3ε), который получен из ОКТ3, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или scFv ОКТ3 или полученного из ОКТ3 scFv замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv 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 содержит второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления ОКТ3 scFv или полученный из ОКТ3 scFv 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 вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает

способность АВ2 связывать вторую мишень.

[000290] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело содержит scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv и нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv ОКТ3 или полученного из ОКТ3 scFv и/или нацеленного на злокачественное новообразование антитела или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), так что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2), так что соединение ММ2 снижает способность АВ2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень. В некоторых вариантах осуществления scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), таким образом, что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать CD3ε, и нацеленное на злокачественное новообразование антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2), таким образом, что связывание ММ2 снижает способность АВ2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000291] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело содержит scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv и нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv ОКТ3 или полученного из ОКТ3 scFv и/или нацеленного на злокачественное новообразование антитела IgG или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которое связывает CD3ε, где АВ1

присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень. В некоторых вариантах осуществления scFv ОКТ3 или полученный из ОКТ3 scFv включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CD3ε, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), таким образом, что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеленное на злокачественное новообразование антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), таким образом, что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую связанную со злокачественным новообразованием мишень.

[000292] В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки полиспецифическое активируемое антитело содержит scFv к CTLA-4, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или scFv к CTLA-4 замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CTLA-4, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CTLA-4, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CTLA-4, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

(AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень.

[000293] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое привлекающее Т-клетки активируемое антитело содержит scFv к CTLA-4 и нацеливающее антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv к CTLA-4 и/или нацеливающего антитела IgG или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CTLA-4, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которое связывает CTLA-4, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1), так что связывание MM1 снижает способность AB1 связывать CTLA-4, и нацеливающее антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которое включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которое связывает вторую мишень, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что связывание MM2 снижает способность AB2 связывать вторую мишень.

[000294] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела 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 активируемые антитела связывают две или более разных мишеней. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела 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 активируемые антитела связывают комбинацию двух

или более разных мишеней и двух или более разных эпитопов на одной и той же мишени.

[000295] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, содержащее IgG, имеет замаскированные переменные домены IgG. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, содержащее scFv, имеет замаскированные домены scFv. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело имеет как переменные домены IgG, так и домены scFv, где по меньшей мере один из переменных доменов IgG связан с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело имеет как переменные домены IgG, так и домены scFv, где по меньшей мере один из доменов scFv связан с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело 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 активируемое антитело 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 активируемого антитела 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 активируемого антитела 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 активируемого антитела имеет специфичность в отношении эпитопа антигена-мишени, а другой домен антитела имеет специфичность в отношении другого эпитопа антигена-мишени.

[000296] 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 субстратом CM1-CM2, присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (ММ), связанный с субстратом CM1-CM2, присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (ММ), связанный с субстратом CM1-CM2, присоединен к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его, а маскирующий фрагмент (ММ), связанный с субстратом CM1-CM2, присоединен к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его.

[000297] В изобретении предложены примеры структур полиспецифических активируемых антител, которые включают, но не ограничиваются, следующее: (VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂; (VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂; (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂; (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL-CL)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂; (VL-CL)₂:(ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL)₂:(ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL-CL)₂:(VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL-CL)₂:(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (ММ-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-ММ)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-

MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; или (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂, где: VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепи с первой специфичностью, содержащиеся в IgG; VL* и VH* представляют собой переменные домены со второй специфичностью, содержащиеся в scFv; LP1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующий фрагмент (MM) и субстрат CM1-CM2; LP2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий субстрат CM1-CM2 и антитело; L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные домены scFv; L4 представляет собой линкерный пептид, соединяющий антитело с первой специфичностью с антителом со второй специфичностью; 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.

[000298] В некоторых вариантах осуществления привлекающего Т-клетки полиспецифического активируемого антитела один антиген, как правило, представляет собой антиген, присутствующий на поверхности опухолевой клетки или другого типа клеток, связанного с заболеванием, такой как, помимо прочего, любая мишень, перечисленная в таблице 1, такая как, но не ограничиваясь ими, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 или CD71 (трансферриновый рецептор), и еще один антиген, который, как правило, представляет собой стимулирующий (также называемый в данном документе как активирующий) 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 как 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, таким как, но не ограничиваясь ими, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2, или TNFSF9. В некоторых вариантах осуществления нацеленного на множество антигенов активируемого антитела один антиген выбран из группы мишеней, перечисленных в таблице 1, а другой антиген выбран из группы мишеней, перечисленных в таблице 1.

[000299] В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой антитело к EGFR. В некоторых вариантах осуществления

нацеливающее антитело представляет собой C225v5, которое специфично в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой C225, которое специфично в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой C225v4, которое специфично в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой C225v6, которое специфично в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой антитело к Jagged. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой 4D11, которое специфично в отношении связывания с человеческими и мышинными Jagged 1 и Jagged 2. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой 4D11v2, которое специфично в отношении связывания с человеческими и мышинными Jagged 1 и Jagged 2.

[000300] В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело может быть в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv может быть в форме про-scFv (см., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

[000301] В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен в отношении связывания CD3ε и является или получен из антитела или его фрагмента, которое связывает CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, ОКТ3, 2C11, УСНТ1 или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv специфичен в отношении связывания CTLA-4 (также называемый в данном документе как CTLA и CTLA4).

[000302] В некоторых вариантах осуществления scFv к CTLA-4 включает аминокислотную последовательность:

```
GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW  
YQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPL  
TFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNYVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAASG  
STFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN  
SLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 347)
```

[000303] 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: 347.

[000304] В некоторых вариантах осуществления scFv к CD3ε включает аминокислотную последовательность:

GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM
HWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAIMASAPG
EKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPAHFRGSGSGTSSYSLTIS
GMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 349)

[000305] 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: 349.

[000306] 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 в отношении связывания с мишенью, 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.

[000307] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело 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 активируемым антителом через линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через линкер, который содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор 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 4. 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 E или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин E (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 некоторых вариантах осуществления агент представляет собой димер пирролобензодиазепина.

[000308] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело также содержит обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[000309] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело в естественных условиях содержит одну или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело может быть сконструировано так, чтобы содержать одну или более дисульфидных связей.

[000310] В изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полиспецифическое активируемое антитело, описанное в данном документе, а также векторы, которые содержат эти последовательности выделенной нуклеиновой кислоты. В изобретении предложены способы получения полиспецифического активируемого антитела 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.

[000311] В изобретении также предложен способ получения полиспецифических активируемых антител по изобретению путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полиспецифическое активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии полиспецифического активируемого антитела, и (b) выделения полиспецифического активируемого антитела.

[000312] В изобретении также предложены полиспецифические активируемые антитела и/или композиции полиспецифических активируемых антител, 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 АВ1 связано или иным образом присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1), так что связывание ММ1 снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ1 соединен с АВ1 через субстрат СМ1-СМ2 для ММР и SP, где по меньшей мере одна из ММР и SP совместно локализована с мишенью АВ1 в подвергаемой лечению области или области диагностического контроля у субъекта. Полиспецифические активируемые 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 АВ1, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим немодифицированным полиспецифическим антителом.

[000313] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ1 и субстратом СМ1-СМ2.

[000314] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит связывающий пептид между субстратом СМ1-СМ2 и АВ1.

[000315] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и по меньшей мере часть полиспецифического активируемого антитела имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу в нерасщепленном состоянии: ММ1-LP1-субстрат СМ1-СМ2-LP2-АВ1 или АВ1-LP2-субстрат СМ1-СМ2-LP1-ММ1. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[000316] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 381) и $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 382), где n является целым числом, равным по меньшей мере одному. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 383), GGSGG (SEQ ID NO: 384), GSGSG (SEQ ID NO: 385), GSGGG (SEQ ID NO: 386), GGGSG (SEQ ID NO: 387), и GSSSG (SEQ ID NO: 388).

[000317] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2.

[000318] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1), второй связывающий пептид (LP2) и связывающий пептид (LP') между СМ1 и СМ2, и по меньшей мере часть полиспецифического активируемого антитела имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-

концу в нерасщепленном состоянии: MM1-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-AB1 или AB1-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-MM1. В некоторых вариантах осуществления связывающие пептиды не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[000319] В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO: 218).

[000320] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит 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 специфически связывает второй целевой или второй эпитоп. В некоторых вариантах осуществления каждое из АВ в полиспецифическом активируемом антителе независимо выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, доменного антитела, одноцепочечного фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела с тяжелыми цепями и однодоменное антитело с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления каждое из АВ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой моноклональное антитело грызуна (например, мыши или крысы), химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[000321] В некоторых вариантах осуществления каждое из АВ в полиспецифическом активируемом антителе имеет константу диссоциации около 100 нМ или менее в отношении связывания с его соответствующей мишенью или эпитопом.

[000322] В некоторых вариантах осуществления MM1 имеет константу диссоциации в отношении связывания с его соответствующим АВ, которая больше, чем константа диссоциации для АВ с его соответствующей мишенью или эпитопом.

[000323] В некоторых вариантах осуществления MM1 имеет константу диссоциации в отношении связывания с его соответствующим АВ, которая не превышает константу диссоциации для АВ с его соответствующей мишенью или эпитопом.

[000324] В некоторых вариантах осуществления MM1 не препятствует и не конкурирует с его соответствующим АВ за связывание с соответствующей мишенью или эпитопом, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

[000325] В некоторых вариантах осуществления MM1 представляет собой полипептид длиной от около 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый из MM в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

[000326] В некоторых вариантах осуществления MM1 имеет последовательность

полипептида, отличную от последовательности мишени соответствующего АВ.

[000327] В некоторых вариантах осуществления ММ1 имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ1 имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 25% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ1 имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 10% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ.

[000328] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ1 снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ1 по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 20 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ1, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000329] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ1 снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ1 по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 40 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ1, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000330] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ1 снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ1 по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 100 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ1, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000331] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ1 снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ1 по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 1000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ1, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000332] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ1 снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ1 по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 10000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ1, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000333] В некоторых вариантах осуществления ММ1 представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из ММ, описанных в данном

документе.

[000334] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит по меньшей мере второй маскирующий фрагмент (ММ2), который ингибирует связывание АВ2 с его мишенью, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, и дополнительный расщепляемый фрагмент (СМ'), связанный с АВ2, где СМ' представляет собой или субстрат СМ1-СМ2, или полипептид, который функционирует как субстрат для второй протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ' представляет собой полипептид, состоящий не более чем из 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ' представляет собой субстрат СМ1-СМ2, где каждый из СМ1 и СМ2 в субстрате СМ1-СМ2 независимо имеет длину не более 15 аминокислот.

[000335] В некоторых вариантах осуществления протеаза ММР, протеаза SP и/или вторая протеаза совместно локализованы со второй мишенью или эпитопом в ткани, и при этом протеаза ММР, протеаза SP и/или вторая протеаза расщепляют СМ' в полиспецифическом активируемом антителе, когда полиспецифическое активируемое антитело подвергается воздействию протеазы ММР, протеазы SP и/или второй протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза ММР, протеаза SP и/или вторая протеаза совместно локализованы с первой мишенью или эпитопом и второй мишенью или эпитопом в ткани. В некоторых вариантах осуществления протеаза ММР, протеаза SP и/или вторая протеаза представляют собой такую же протеазу ММР и такую же протеазу SP. В некоторых вариантах осуществления протеаза ММР, протеаза SP и/или вторая протеаза не являются такой же протеазой ММР и не является такой же протеазой SP. В некоторых вариантах осуществления субстрат СМ1-СМ2 и СМ' являются разными субстратами для одной и той же протеазы ММР и одной и той же протеазы SP. В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет СМ', выбрана из группы, состоящей из тех, что показаны в таблице 6.

[000336] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе, например, ММ1 и по меньшей мере ММ2, имеет константу диссоциации в отношении связывания с его соответствующим АВ, которая больше, чем константа диссоциации для АВ с его соответствующей мишенью или эпитопом.

[000337] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет константу диссоциации в отношении связывания с его соответствующим АВ, которая не превышает константу диссоциации для АВ с его соответствующей мишенью или эпитопом.

[000338] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе не препятствует или не конкурирует с его соответствующим АВ за связывание с соответствующей мишенью или эпитопом, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

[000339] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид длиной от около 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

[000340] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет последовательность полипептида, которая отличается от последовательности мишени соответствующего АВ.

[000341] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 25% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет последовательность полипептида, которая не более чем на 10% идентична любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ.

[000342] В некоторых вариантах осуществления связывание каждого из ММ снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 20 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000343] В некоторых вариантах осуществления связывание каждого из ММ снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 40 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000344] В некоторых вариантах осуществления связывание каждого из ММ снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к его соответствующей

мишени или эпитопу по меньшей мере в 100 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000345] В некоторых вариантах осуществления связывание каждого из ММ снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 1000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000346] В некоторых вариантах осуществления связывание каждого из ММ снижает способность соответствующего АВ связывать свою мишень или эпитоп, так что константа диссоциации (K_d) АВ при связывании с ММ по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу по меньшей мере в 10000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ, по отношению к его соответствующей мишени или эпитопу.

[000347] В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из ММ, описанных в данном документе.

[000348] В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет последовательность субстрата СМ1-СМ2, совместно локализована с мишенью АВ1 из полиспецифического активируемого антитела в ткани и протеазой ММР и/или протеазой SP, т.е. по меньшей мере одна из протеазы ММР и протеазы SP расщепляет субстрат СМ1-СМ2 в полиспецифическом активируемом антителе, когда полиспецифическое активируемое антитело подвергается воздействию протеаз.

[000349] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более одной последовательности субстрата СМ1-СМ2, и протеаза ММР и/или протеаза SP, которая расщепляет по меньшей мере одну последовательность субстрата СМ1-СМ2, локализована совместно с мишенью по меньшей мере одной из областей АВ из полиспецифического активируемого антитела в ткани, и протеаза ММР и/или протеаза SP расщепляет субстрат СМ1-СМ2 в полиспецифическом активируемом антителе, когда полиспецифическое активируемое антитело подвергается воздействию протеаз.

[000350] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат СМ1-СМ2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в два раза превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает

свою мишень.

[000351] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в три раза превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000352] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в четыре раза превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000353] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в пять раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000354] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в десять раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000355] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в 20 раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает

свою мишень.

[000356] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в 40 раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000357] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в 50 раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000358] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в 100 раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000359] В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 расположен в полиспецифическом активируемом антителе таким образом, что в нерасщепленном состоянии связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ снижается до константы диссоциации, которая по меньшей мере в 200 раз превышает константу диссоциации немодифицированного АВ, связывающегося со своей мишенью, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывает свою мишень.

[000360] В изобретении также предложены композиции и способы, которые включают полиспецифическое активируемое антитело, 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 активируемом антителе связано с маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых

вариантах осуществления каждое АВ соединено с ММ, что снижает способность соответствующего АВ связывать каждую мишень. Например, в вариантах осуществления биспецифических активируемых антител 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 активируемое антитело 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.

[000361] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело дополнительно содержит по меньшей мере один субстрат СМ1-СМ2, который является субстратом для протеазы ММР и протеазы SP, где субстрат СМ1-СМ2 связывает ММ с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело 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 первый АВ в полиспецифическом активируемом антителе соединено через первый субстрат СМ1-СМ2 с маскирующим фрагментом (ММ1), который снижает способность АВ1 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления биспецифических активируемых антител АВ1 соединено через первый субстрат СМ1-СМ2 с ММ1, а АВ2 соединено через второй субстрат СМ1-СМ2 со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который снижает способность АВ2 связывать свою мишень. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления АВ1 соединено через первый субстрат СМ1-СМ2 с ММ1, АВ2 соединено через второй субстрат СМ1-СМ2 с ММ2, а АВ3 соединено через третий субстрат СМ1-СМ2 с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), что снижает способность АВ3 связывать свою мишень, и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе.

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

[000362] В изобретении также представлены активируемые антитела, 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. Предлагаемые в данном документе активируемые антитела включают, например, активируемое антитело, которое содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB), субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), которое связывает мишень; активируемое антитело, которое содержит партнера по связыванию для несвязывающего стерического фрагмента (BP), субстрат CM1-CM2 и AB; и активируемое антитело, которое содержит BP, к которому был рекрутирован NB, субстрат CM1-CM2 и AB, которое связывает мишень. Активируемые антитела, в которых NB ковалентно связан с субстратом CM1-CM2 и AB активируемого антитела, или связан путем взаимодействия с BP, который ковалентно связан с субстратом CM1-CM2 и AB активируемого антитела, в данном документе называются «содержащими NB активируемыми антителами». Под активируемым или переключаемым подразумевается, что активируемое антитело демонстрирует первый уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, замаскированном или нерасщепленном состоянии (т.е. в первой конформации), и второй уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело 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 активируемых антител могут проявлять повышенную биодоступность и более благоприятное биораспределение по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител.

[000363] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела 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 AB не были замаскированы или иным образом не ингибировались от связывания в такой области.

[000364] В одном варианте осуществления активируемое антитело содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB); субстрат CM1-CM2; и антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где NB представляет собой полипептид, который не связывается специфически с AB; субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует

связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью; и NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Используемый в данном документе и повсюду термин «полипептид» относится к любому полипептиду, который включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, включая более крупные полипептиды, полноразмерные белки и их фрагменты, а термин «полипептид» не ограничивается одноцепочечными полипептидами и может включать мультиединичные, например, многоцепочечные полипептиды. В случаях, когда полипептид имеет более короткую длину, например, всего менее 50 аминокислот, термины пептид и полипептид используются в данном документе взаимозаменяемо, и в случаях, когда полипептид имеет более длинную длину, например, 50 аминокислот или больше, термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[000365] В одном варианте активируемое антитело содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB); субстрат CM1-CM2; и антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид, который не связывается специфически с AB; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид длиной до 50 аминокислот, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью; и (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Например, каждая из последовательности субстрата CM1 и последовательности субстрата CM2 в субстрате CM1-CM2 независимо имеет длину до 15 аминокислот.

[000366] В одном варианте осуществления активируемое антитело содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB); субстрат CM1-CM2; и антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид, который не связывается специфически с AB; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью; (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом; и (v) активируемое антитело имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу в нерасщепленном состоянии: NB-субстрат CM1-CM2-AB или АВ-субстрат CM1-CM2-NB.

[000367] В одном варианте осуществления активируемое антитело содержит несвязывающий стерический фрагмент (NB); субстрат CM1-CM2; и антитело или

фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид, который не связывается специфически с AB; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию AB с мишенью, и при этом NB в нерасщепленном активируемом антителе снижает способность AB связывать мишень на по меньшей мере 50%, например, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 100% по сравнению со способностью расщепленного AB связывать мишень; и (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Снижение способности AB связывать мишень определяется, например, с помощью анализа, описанного в данном документе, или анализа замещения мишени *in vitro*, такого как, например, анализ, описанный в публикациях PCT №№ WO 2009/025846 и WO 2010/081173.

[000368] В одном варианте осуществления активируемое антитело содержит партнера по связыванию (BP) для несвязывающего стерического фрагмента (NB); субстрат CM1-CM2; и антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где BP представляет собой полипептид, который связывается с NB при воздействии на него; NB не связывается специфически с AB; субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии в присутствии NB указанное NB препятствует связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию AB с мишенью, и BP не препятствует связыванию AB с мишенью; и NB и BP не ингибируют расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. В некоторых примерах этого варианта осуществления BP активируемого антитела необязательно связывается с NB. В одном варианте осуществления NB рекрутируется BP активируемого антитела *in vivo*.

[000369] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело составлено в виде композиции. В некоторых из этих вариантов осуществления композиция также содержит NB, где NB составлен совместно с активируемым антителом, которое содержит BP, субстрат CM1-CM2 и AB. В некоторых примерах этого варианта осуществления BP выбран из группы, состоящей из пептида, связывающего альбумин, пептида, связывающего фибриноген, пептида, связывающего фибронектин, пептида, связывающего гемоглобин, пептида,

связывающего трансферрин, пептида, связывающего домен иммуноглобулина, и других пептидов, связывающих сывороточные белки.

[000370] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител NB представляет собой растворимый глобулярный белок. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител NB представляет собой белок, циркулирующий в кровотоке. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител NB выбран из группы, состоящей из альбумина, фибриногена, фибронектина, гемоглобина, трансферрина, домена иммуноглобулина и других белков сыворотки.

[000371] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для протеазы. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител протеаза совместно локализована в ткани, и протеаза расщепляет субстрат CM1-CM2 в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид длиной до 50 аминокислот. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) длиной до 15 аминокислот, например, длиной 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот, 10 аминокислот, 11 аминокислот, 12 аминокислот, 13 аминокислот, 14 аминокислот или длиной 15 аминокислот.

[000372] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител активируемое антитело имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу в нерасщепленном состоянии: NB-субстрат CM1-CM2-AB, AB-субстрат CM1-CM2-NB, BP-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-BP. В вариантах осуществления, где активируемое антитело содержит BP, а активируемое антитело находится в присутствии соответствующего NB, активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: NB:BP-CM1-CM2-AB, NB:BP-CM2-CM1-AB, AB-CM1-CM2-BP:NB или AB-CM2-CM1-BP:NB, где «:» представляет взаимодействие, например, связывание, между NB и BP.

[000373] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с данной мишенью и

представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечный фрагмент Fab, F(ab')₂, scFv, scab, dAb, однодоменное антитело с тяжелыми цепями или однодоменного антитела с легкими цепями. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его иммунологически активный фрагмент, которое связывает мишень, представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[000374] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи, содержащей представленную в данном документе аминокислотную последовательность, и вариабельной области легкой цепи, содержащей представленную в данном документе аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в данном документе, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в данном документе.

[000375] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело 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 АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор 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 агент представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ауристин или его производное. В некоторых вариантах

осуществления агент представляет собой ауристин E или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин E (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин 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 некоторых вариантах осуществления агент представляет собой димер пирролобензодиазепина.

[000376] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело также содержит обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[000377] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело также содержит спейсер. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело также содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид конъюгирован с активируемым антителом через спейсер. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела спейсер присоединен непосредственно к MM активируемого антитела.

[000378] В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела больше, чем у соответствующего антитела; например, pK активируемого антитела длиннее, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела к аналогичен периоду полужизни соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 15 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 12 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 11 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 10 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления период полужизни активируемого антитела в

[000379] В изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любое из этих активируемых антител, а также векторы, которые содержат эти последовательности выделенной нуклеиновой кислоты. В изобретении предложены способы получения активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит такую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

[000380] Константа диссоциации (K_d) содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени больше, чем K_d АВ по отношению к мишени, когда оно не связано с NB или NB:BP. Константа диссоциации (K_d) содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени больше, чем K_d исходного АВ по отношению к мишени. Например, K_d содержащего NB активируемого антитела 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 в 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–1000000, или 100000–10000000 раз больше, чем K_d АВ, когда оно не связано с NB или NB: BP или K_d исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени ниже, чем аффинность связывания АВ, когда оно не связано с NB или NB:BP, или ниже, чем аффинность связывания исходного АВ по отношению к мишени. Например, аффинность связывания содержащего NB активируемого антитела 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, 100000000 или больше, или в 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–1000000, или в 100000–10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, когда оно не связано с NB или NB:BP, или ниже, чем аффинность связывания исходного АВ по отношению к мишени.

[000381] Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, когда оно не связано с NB или NB:BP. Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со

специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не связанного с NB или NB:BP, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность содержащего NB активируемого антитела связывать мишень снижается, например, на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vitro* и/или *in vivo*.

[000382] Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, протеазы или другого фермента), специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, когда оно не связано с NB или NB:BP. Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, протеазы, другого фермента, восстанавливающего агента или света), специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не связанного с NB или NB:BP, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность содержащего NB активируемого антитела связывать мишень снижается, например, на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vitro* и/или *in vivo*.

[000383] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело содержит агент, конъюгированный с АВ, для получения конъюгата активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела агент представляет собой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой диагностический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой обнаруживаемый маркер. В некоторых вариантах осуществления конъюгат активируемого антитела агент представляет собой противоопухолевый агент. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела агент представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела агент конъюгирован с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через нерасщепляемый линкер. В

некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор 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 агент представляет собой агент, выбранный из группы, указанной в таблице 3. 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 E или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристатин E (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 некоторых вариантах осуществления агент представляет собой димер пирролобензодиазепина.

[000384] В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемых антител активируемые антитела представляют собой активируемые антитела, связывающие две мишени. Такие связывающие активируемые антитела, связывающие две мишени, два Ат, которые могут связываться с одними и теми же или разными мишенями. В конкретных вариантах осуществления активируемые антитела с двойным нацеливанием содержат биспецифические антитела или фрагменты антител.

[000385] Активируемые антитела, связывающие две мишени сконструированы таким образом, чтобы иметь субстрат CM1-CM2, расщепляемый расщепляющим агентом, который локализован в ткани-мишени совместно с одной или обеими мишенями, способными связываться с АВ активируемых антител. Активируемые антитела, связывающие две мишени с более чем одним АВ с одной и той же или разными мишенями, могут быть сконструированы так, чтобы иметь более одного субстрата CM1-CM2, где первый субстрат CM1-CM2 расщепляется расщепляющим агентом в первой ткани-мишени и где второй субстрат CM1-CM2 расщепляется расщепляющим агентом во второй ткани-мишени, при этом одна или более мишеней связываются с АВ активируемых антител. В одном варианте осуществления первая и вторая ткани-мишени пространственно разделены, например, в разных областях организма. В одном варианте

осуществления первая и вторая ткани-мишени представляют собой одну и ту же ткань, разделенную во времени, например, одну и ту же ткань в два разных момента времени, например, первая временная точка относится к временной точки, когда ткань является опухолью на ранней стадии, а вторая временная точка относится к временной точки, когда ткань является опухолью на поздней стадии.

[000386] В изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие активируемые антитела, описанные в данном документе. В изобретении также предложены векторы, которые содержат эти нуклеиновые кислоты. Описанные в данном документе активируемые антитела получают путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит эти молекулы нуклеиновой кислоты или векторы.

[000387] В изобретении также предложены способы производства активируемых антител. В одном варианте осуществления способ включает стадии (а) культивирования клетки, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит (i) несвязывающийся стерический фрагмент (NB); (ii) субстрат CM1-CM2; и (iii) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (1) NB не связывается специфически с AB; (2) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (3) субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию AB с мишенью; и (4) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом; и (b) выделения активируемого антитела.

[000388] В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии (а) культивирования клетки, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит (i) партнер по связыванию (BP) для несвязывающего стерического фрагмента (NB); (ii) субстрат CM1-CM2; и (iii) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (1) NB не связывается специфически с AB; (2) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (3) субстрат CM1-CM2 расположен так, что в нерасщепленном состоянии в присутствии NB, указанный NB препятствует связыванию AB с мишенью, а в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию AB с мишенью, и BP не препятствует связыванию AB с

мишенью; и (4) NB и BP не ингибируют расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом; и (b) выделения активируемого антитела. В некоторых примерах этого варианта осуществления BP активируемого антитела связывается с NB.

Применение активируемых антител и конъюгированных активируемых антител

[000389] 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 фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15-е изд., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), особенно в главе 87, написанной Blaug, Seymour. 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.

[000390] Терапевтические составы по изобретению, которые содержат конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используются для предотвращения, лечения или иного снижения интенсивности заболевания или нарушения, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические составы по изобретению, которые включают конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используются для лечения или иного снижения интенсивности воспаления, воспалительного нарушения, аутоиммунного заболевания и/или злокачественного

новообразования или другого неопластического состояния. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль, в которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль, в которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, в которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в паренхиме (например, при злокачественном новообразовании, в части органа или ткани, которая часто выполняет функцию(-и) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на клетке, в ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в строме (т.е. соединительном поддерживающем каркасе клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в эндотелии (сосудистой сети). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на раковой стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления агент, с которым конъюгировано активируемое антитело, представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления агент, с которым конъюгировано активируемое антитело, представляет собой повреждающий нуклеиновые кислоты агент.

[000391] Эффективность профилактики, снижения интенсивности или лечения определяют в связи с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, таким как, например, аберрантная экспрессия и/или активность мишени. Продление выживаемости субъекта или иное замедление прогрессирования заболевания или нарушения, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, например, аберрантной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта указывает на то, что конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемое антитело дает клиническую пользу.

[000392] Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и рекомендации, связанные с приготовлением таких композиций, а также руководство 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; и Peptide And Protein Drug Delivery

(Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

[000393] В некоторых вариантах осуществления, где используются фрагменты антител, выбирается наименьший фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основе последовательностей варибельной области антитела могут быть сконструированы пептидные молекулы, которые сохраняют способность связываться с последовательностью белка-мишени. Такие пептиды можно синтезировать химическим путем и/или получить с помощью технологии рекомбинантных ДНК. (См., Например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889–7893 (1993)). Состав также может содержать более одного активного соединения, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, например, в некоторых вариантах осуществления, соединения с дополнительными активностями, которые не влияют отрицательно 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 использования по назначению.

[000394] Активные ингредиенты также можно помещать в микрокапсулы, полученные, например, методом коацервации или межфазной полимеризации, например, в микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно; в коллоидные системы для доставки лекарственных средств (например, в липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии.

[000395] Составы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

[000396] Могут быть приготовлены 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 поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата

лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. 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.

[000397] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит обнаруживаемую 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) обнаруживаемой субстанции с зондом или антителом, а также непрямого мечения зонда или антитела по реактивности с другим реагентом, который непосредственно помечен. Примеры непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с использованием вторичного антитела с флуоресцентной меткой и концевое мечение ДНК-зонда биотином, чтобы его можно было обнаруживать с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина. Термин «биологический образец» включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные от субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, присутствующие внутри субъекта. Таким образом, термин «биологический образец» включает кровь и фракцию или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. То есть способ обнаружения по изобретению может использоваться для обнаружения мРНК, белка или геномной ДНК анализируемого вещества в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, способы обнаружения мРНК анализируемого вещества *in vitro* включают Нозерн-гибридизацию и гибридизацию *in situ*. Методы обнаружения 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 Саузерн-гибридизацию. 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; и “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 можно пометить радиоактивным маркером, присутствие и расположение которого у субъекта можно определить стандартными методами визуализации.

[000398] Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению также могут быть использованы в различных диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят пациентам, которые подвержены риску развития одного или более из вышеупомянутых нарушений. Предрасположенность пациента или органа к одному или более из вышеупомянутых нарушений может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[000399] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят людям, у которых диагностировано клиническое проявление, связанное с одним или более из вышеупомянутых нарушений. После постановки диагноза вводят конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, чтобы смягчить или реверсировать эффекты клинического проявления.

[000400] Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению также могут использоваться для обнаружения мишени в образцах пациентов и, соответственно, полезны в качестве диагностики. Например, антитела и/или активируемые антитела и их конъюгированные версии по изобретению используются в анализах *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения целевых уровней в образце пациента.

[000401] В одном варианте осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению иммобилизовано на твердой подложке (например, лунке(-ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело служит захватывающим антителом для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением в контакт иммобилизованного антитела с образцом пациента твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

[000402] Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, подозреваемого в наличии уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После промывки исследуемого образца или стандарта

твердую подложку обрабатывают вторым антителом, метку которого можно обнаружить. Меченое вторичное антитело служит детектирующим антителом. Уровень обнаруживаемой метки измеряют, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют путем сравнения со стандартной кривой, построенной для стандартных образцов.

[000403] Следует принимать во внимание, что на основе результатов, полученных с использованием антител по изобретению и их конъюгированных версий, в диагностическом анализе *in vitro* можно определить стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания берут образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или различные моменты терапевтического лечения заболевания. Используя совокупность образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, определяют диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристикой каждой стадии.

[000404] Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело также можно использовать в методах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, содержащие ферментативно расщепляемый субстрат CM1-CM2, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять субстрат CM1-CM2. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать обнаружение *in vivo* (например, качественное или количественное) ферментативной активности (или, в некоторых вариантах осуществления, среду с повышенным восстановительным потенциалом, такую как та, которая может обеспечить 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 субстрата CM1-CM2), но также и на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

[000405] Например, субстрат CM1-CM2 может быть выбран в качестве субстрата для

матриксной металлопротеазы (ММП) и сериновой протеазы (SP), обнаруженных в опухолевом очаге, очаге вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченной области (например, при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может быть тем, которое связывает антиген-мишень. Используя методы, как описано в данном документе, или, когда это уместно, методы, знакомые специалисту в данной области техники, детектируемая метка (например, флуоресцентная метка, или радиоактивная метка, или радиоактивный индикатор) может быть конъюгирована с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Подходящие обнаруживаемые метки обсуждаются в контексте вышеупомянутых методов скрининга, а дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При использовании АВ, специфичного к белку или пептиду болезненного состояния, наряду с ММП, активность которой повышена в представляющей интерес связанной с заболеванием ткани, активируемые антитела будут демонстрировать повышенную скорость связывания со связанной с заболеванием тканью по сравнению с тканями, в которых специфический к субстрату СМ1-СМ2 фермент не присутствует на обнаруживаемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в связанной с заболеванием ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, а также потому, что фермент, специфический для субстрата СМ1-СМ2, не присутствует на обнаруживаемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в тканях, которые не связаны с заболеванием, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в связанной с заболеванием ткани увеличивается по сравнению с тканями, которые не связаны с заболеванием.

[000406] В еще одном примере активируемые антитела можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если активируемые антитела содержат субстрат СМ1-СМ2, чувствительный к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В еще одном примере, когда активируемые антитела содержат субстрат СМ1-СМ2, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, активируемые антитела можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) наличия восстанавливающих условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих методах, активируемые антитела могут быть помечены обнаруживаемой меткой и могут быть связаны с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Обнаруживаемая метка может быть расположена на части активируемого антитела, которая не высвобождается после

расщепления, например, обнаруживаемая метка может быть погашенной флуоресцентной меткой или другой меткой, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может быть проведен, например, путем приведения в контакт иммобилизованных, обнаруживаемых меченных активируемых антител с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для расщепления, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивается по изменению обнаруживаемого сигнала активируемых антител перед приведением в контакт с образцом, например, по наличию и/или увеличению обнаруживаемого сигнала из-за расщепления активируемого антитела расщепляющим агентом в образце.

[000407] Такие методы обнаружения могут быть адаптированы для обнаружения присутствия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ активируемых антител 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 обнаруживаемой метки активируемых антител, как описано выше, а присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем обнаружения комплекса мишень-АВ, например, с использованием обнаруживаемого меченого антитела к мишени.

[000408] Активируемые антитела также применимы для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемых антител, 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 обнаруживаемой метки (например, флуоресцентной метки).

[000409] Эти методы применимы для любых замороженных клеток или тканей, полученных из очага заболевания (например, опухолевой ткани) или нормальных тканей. Эти методы также полезны для свежих образцов клеток или тканей.

[000410] В этих методах активируемое антитело метят обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), поглощающий в ближней ИК-области краситель (NIR) (например,

нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и усиливающий реагент, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

[000411] Обнаружение метки в образце, который был инкубирован с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и матриксную металлопротеазу (MMP) и одну сериновую протеазу (SP), которые специфичны для субстрата CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие MMP может быть подтверждено с использованием ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с помощью агента, который специфичен для протеазы, например, антитела, такого как A11, которое специфично для протеазы матриптазы (MT-SP1) и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; см., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 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 MMP и SP, специфичных для субстрата CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, например, другого антитела, или обнаруживаемой метки может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченое активируемое антитело с обнаружением меченым вторичным антителом или более сложной системой обнаружения.

[000412] Подобные методы также полезны для визуализации *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, например, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что очаг заболевания содержит мишень и содержит MMP и SP, которые специфичны для субстрата CM1-CM2 активируемого антитела.

[000413] Эти методы также применимы в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфического к протеазе субстрата CM1-CM2 в активируемом антителе.

[000414] В изобретении предложены способы применения антител и/или активируемых антител при различных диагностических и/или профилактических целях. Например, в изобретении предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и представляющей интерес мишени у субъекта или образца посредством (i) приведения в контакт активируемого антитела с субъектом или образцом, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2,

который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), которое специфически связывает представляющий интерес мишень, причем активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не имеет аминокислотную последовательность 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 специфическому связыванию AB с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии MM не препятствует специфическому связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, при этом определяемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в образце и при этом необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент, мишень или как расщепляющий агент, так и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000415] В изобретении также предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) приведения в контакт активируемого антитела с субъектом или образцом в присутствии представляющей интерес мишени, например, мишени, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), которое специфически связывает представляет собой мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное

расположение от N-конца к C-концу: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не имеет аминокислотную последовательность 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 специфическому связыванию AB с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии MM не препятствует специфическому связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и где необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела 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 активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000416] В изобретении также предложены наборы для применения в методах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере активируемое антитело, содержащее маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), которое специфически связывает представляющее интерес мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не имеет аминокислотную последовательность встречающегося в природе партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой

природного партнера по связыванию АВ; и (b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где определяемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и где необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела 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 активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000417] В изобретении также предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) приведения в контакт активируемого антитела с субъектом или образцом, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим агентом, антигенсвязывающий домен (АВ), который специфически связывается с мишенью, и обнаруживаемая метка, при этом активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ; где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотную последовательность встречающегося в природе партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном, активированном состоянии ММ не препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью и не конкурирует с ним; и где обнаруживаемая метка

расположена в части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2; и (ii) измерения уровня обнаруживаемой метки у субъекта или в образце, где определяемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце, и где необнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000418] В изобретении также предложены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело (например, активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент), описанные в данном документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом и средства для определения уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела 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, например, что целевое связывание мишени и/или протеазное расщепление для активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце.

[000419] В изобретении также предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) приведения в

контакт активируемого антитела с субъектом или биологическим образцом в присутствии мишени и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и при этом необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на обнаруживаемом уровне, так что протеазное расщепление активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывает мишень, при этом активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-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 активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к расщепляемому фрагменту на N-конце сайта расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления единственный антигенсвязывающий сайт АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт замаскирован и по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие сайты связывания замаскированы. В некоторых вариантах осуществления этап измерения включает применение вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

[000420] В изобретении также предложены наборы для применения в способах

обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или образца, где наборы содержат по меньшей мере активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные в данном документе, для применения при приведении в контакт активируемого антитела с субъектом или биологическим образцом в присутствии мишени, и измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, при этом обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и при этом необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на обнаруживаемом уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно обнаружить у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывает мишень, при этом активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-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 активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к расщепляемому фрагменту на N-конце сайта расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления единственный антигенсвязывающий сайт АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт замаскирован и по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт не замаскирован. В

некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие сайты связывания замаскированы. В некоторых вариантах осуществления этап измерения включает применение вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

[000421] В изобретении также предложены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные в данном документе, для применения в приведении в контакт активируемого антитела с субъектом или биологическим образцом в присутствии мишени и измерение уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, при этом обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий субстрат CM1-CM2 присутствует у субъекта или в биологическом образце, и при этом необнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на обнаруживаемом уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно обнаружить у субъекта или в биологическом образце.

[000422] В изобретении предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце посредством (i) приведения в контакт активируемого антитела с субъектом или биологическим образцом, при этом активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку, которая расположена в части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2, и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, при этом обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела 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 активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и при этом сниженный поддающийся обнаружению уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекте или в биологическом образце. Сниженный уровень детектируемой метки относится, например, к 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% снижению. Такое активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывает мишень, при этом активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-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 активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000423] В изобретении также предложены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные в данном документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом и средства для определения уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела 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 активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в

биологическом образце, и при этом сниженный обнаруживаемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Сниженный уровень детектируемой метки относится, например, к 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% снижению.

[000424] В изобретении также предложены способы обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце посредством (i) приведения в контакт активируемого антитела с субъектом или биологическим образцом, где активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку, которая расположена в части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2; и (ii) измерения уровня обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце, при этом обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует в субъекте или биологическом образце на обнаруживаемом уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где сниженный обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце. Сниженный уровень детектируемой метки относится, например, к 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% снижению. Такое активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (MM), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), который специфически связывает мишень, при этом активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-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 (b) где MM активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию AB с мишенью, и где MM активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует специфическому связыванию AB с мишенью или не конкурирует с ним. В некоторых

вариантах осуществления активированное антитело представляет собой активированное антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000425] В изобретении также предложены наборы для применения в способах обнаружения присутствия или отсутствия представляющего интерес расщепляющего агента у субъекта или образце, где наборы содержат по меньшей мере активированное антитело и/или конъюгированное активированное антитело, описанные в данном документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом и средства для определения уровня активированного активированного антитела и/или конъюгированного активированного антитела у субъекта или в биологическом образце, где активированное антитело содержит обнаруживаемую метку, которая расположена в части активированного антитела, которая высвобождается после расщепления субстрата СМ1-СМ2, где обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки 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 активированного антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где сниженный обнаруживаемый уровень обнаруживаемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Сниженный уровень детектируемой метки относится, например, к 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% снижению.

[000426] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активированное антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов обнаруживаемая метка включает визуализирующий агент, контрастирующий агент, фермент, флуоресцентную метку,

хромофор, краситель, один или более 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 содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка включает 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 более гаптенов.

[000427] 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 отличное от человека млекопитающее, такое как отличный от человека примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное из зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

[000428] 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*.

[000429] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* полезны в способах определения того, каких пациентов следует лечить. Например, при визуализации *in situ* активируемые антитела используются для скрининга образцов пациентов, чтобы идентифицировать пациентов, имеющих соответствующую протеазу(-ы) и мишень(-и) в соответствующей области, например, в опухолевом очаге.

[000430] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 тестируемого активируемого антитела (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. Аналогичным образом, пациенты, у которых был отрицательный результат теста на одну или обе мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, у которых тест на первое активируемое антитело отрицательный, можно исследовать с помощью других активируемых антител, содержащих различные субстраты СМ1-СМ2, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество конъюгированного активируемого антитела, на которое у пациента тест был положительным.

[000431] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 тестируемого активируемого антитела (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. Точно так же пациенты с отрицательным результатом теста могут быть определены как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, у которых тест на первое активируемое антитело отрицательный, можно исследовать с помощью других активируемых антител, содержащих различные субстраты СМ1-СМ2, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления

пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество конъюгированного активируемого антитела, на которое у пациента тест был положительным.

[000432] В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ или набор используются для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 активируемого антитела, тестируемого этими способами, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. Аналогичным образом, пациенты, у которых был отрицательный результат теста на обе мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с помощью других активируемых антител до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенты с отрицательным результатом теста на любую из мишеней (например, мишени) идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления пациенты с отрицательным результатом теста на любую из мишеней (например, мишени) идентифицируются как неподходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с помощью других активируемых антител до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце выполняется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, причем реагент содержит

обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее обнаруживаемую метку.

[000433] В некоторых вариантах осуществления способ или набор используются для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом к мишени и/или конъюгированным активируемым антителом (например, активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент) по изобретению с последующим лечением путем введения этого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела субъекту, нуждающемуся в этом. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишени (например, мишень), так и на протеазу, которая расщепляет субстрат CM1-CM2 активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, тестируемых этими способами, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения с помощью такого антитела и/или такого конъюгированного активируемого антитела, содержащих такой субстрат CM1-CM2, и пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество тестируемого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела. Аналогичным образом, пациенты, у которых был отрицательный результат теста на одну или обе мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с помощью другого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного антитела, на которое у пациента тест был положительным.

[000434] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов MM представляет собой пептид, имеющий длину от около 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между MM и субстратом CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между AB и субстратом CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный

пептид (LP2), причем первый линкерный пептид расположен между MM и субстратом CM1-CM2, и второй линкерный пептид расположен между AB и субстратом CM1-CM2. 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 из LP1 и LP2 содержат глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из LP1 и LP2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 382), 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 включает 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 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 383), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 384), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 385), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 386), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 387) и Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 388).

[000435] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов AB содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из представленных в данном документе последовательностей перекрестно-реагирующих антител. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов AB содержит фрагмент Fab, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

[000436] В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов расщепляющий агент представляет собой протеазу, которая совместно локализована у субъекта или в образце с мишенью, а субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы, при этом протеаза расщепляет субстрат CM1-CM2 в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов каждая из последовательности субстрата CM1 и последовательности субстрата CM2 в субстрате CM1-CM2 независимо представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субстрат CM1-CM2 соединен с N-концом AB. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субстрат CM1-CM2 связан с C-концом AB. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субстрат CM1-CM2 связан с N-концом VL цепи

AB.

[000437] Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению используются в диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления активируемое антитело вводят пациентам, которые подвержены риску развития одного или более из вышеупомянутых воспалений, воспалительных нарушений, злокачественных новообразований или других нарушений.

[000438] Предрасположенность пациента или органа к одному или более из вышеупомянутых нарушений может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[000439] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированные активируемые антитела вводят людям, у которых диагностировано клиническое проявление, связанное с одним или более из вышеупомянутых нарушений. После постановки диагноза вводят активируемое антитело и/или конъюгированные активируемые антитела, чтобы смягчить или реверсировать эффекты клинического проявления.

[000440] Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по настоящему изобретению также полезны при обнаружении мишени в образцах пациентов и, соответственно, полезны в качестве диагностики. Например, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению используются в анализах *in vitro*, например, ИФА, для обнаружения целевых уровней в образце пациента.

[000441] В одном варианте осуществления активируемое антитело по изобретению иммобилизовано на твердой подложке (например, лунке(-ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное активируемое антитело служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением в контакт иммобилизованного антитела с образцом пациента твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

[000442] Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, подозреваемого в наличии уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После промывки исследуемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, метку которого можно обнаружить. Меченое вторичное антитело служит детектирующим антителом. Уровень

обнаруживаемой метки измеряют, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют путем сравнения со стандартной кривой, построенной для стандартных образцов.

[000443] Следует принимать во внимание, что на основе результатов, полученных с использованием антител по изобретению в диагностическом анализе *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта на основе уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания берут образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии прогрессирования заболевания и/или различные моменты терапевтического лечения заболевания. Используя совокупность образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, определяют диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристикой каждой стадии.

[000444] Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела также можно использовать в методах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие методы представляют собой методы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, содержащие ферментативно расщепляемый субстрат CM1-CM2, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять субстрат CM1-CM2. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать обнаружение *in vivo* (например, качественное или количественное) ферментативной активности (или, в некоторых вариантах осуществления, среду с повышенным восстановительным потенциалом, такую как та, которая может обеспечить 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 субстрата CM1-CM2), но также и на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

[000445] Например, субстрат CM1-CM2 может быть выбран в качестве протеазного субстрата для протеазы, обнаруженной в опухолевом очаге, очаге вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченной области (например, такой как абсцесс, в органе и т.п.) и т.п. АВ может быть тем, которое связывает антиген-мишень.

Используя способы, известные специалисту в данной области техники, обнаруживаемую метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку, или радиоактивный индикатор) можно конъюгировать с АВ или другой областью активируемого антитела. Подходящие обнаруживаемые метки обсуждаются в контексте вышеупомянутых методов скрининга, а дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При использовании АВ, специфичного к белку или пептиду болезненного состояния, наряду с протеазой, активность которой повышена в представляющей интерес связанной с заболеванием ткани, активируемые антитела будут демонстрировать повышенную скорость связывания со связанной с заболеванием тканью по сравнению с тканями, в которых специфический к субстрату СМ1-СМ2 фермент не присутствует на обнаруживаемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в связанной с заболеванием ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, а также потому, что фермент, специфический для субстрата СМ1-СМ2, не присутствует на обнаруживаемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в тканях, которые не связаны с заболеванием, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в связанной с заболеванием ткани увеличивается по сравнению с тканями, которые не связаны с заболеванием.

[000446] В еще одном примере активируемые антитела можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия расщепляющего агента в образце. Например, если активируемые антитела содержат субстрат СМ1-СМ2, чувствительный к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В еще одном примере, когда активируемые антитела содержат субстрат СМ1-СМ2, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, активируемые антитела можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) наличия восстанавливающих условий в образце. Чтобы облегчить анализ в этих методах, активируемые антитела могут быть помечены обнаруживаемой меткой и могут быть связаны с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Обнаруживаемая метка может быть расположена на части активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, обнаруживаемая метка может быть погашенной флуоресцентной меткой или другой меткой, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может быть проведен, например, путем приведения в контакт иммобилизованных, обнаруживаемых меченных активируемых антител с образцом,

предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для расщепления, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивается по изменению обнаруживаемого сигнала активируемых антител перед приведением в контакт с образцом, например, по наличию и/или увеличению обнаруживаемого сигнала из-за расщепления активируемого антитела расщепляющим агентом в образце.

[000447] Такие методы обнаружения могут быть адаптированы для обнаружения присутствия или отсутствия мишени, которая способна связывать АВ активируемых антител 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 обнаруживаемой метки активируемых антител, как описано выше, а присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем обнаружения комплекса мишень-АВ, например, с использованием обнаруживаемого меченого антитела к мишени.

[000448] Активируемые антитела также применимы для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемых антител, 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 обнаруживаемой метки (например, флуоресцентной метки).

[000449] Эти методы применимы для любых замороженных клеток или тканей, полученных из очага заболевания (например, опухолевой ткани) или нормальных тканей. Эти методы также полезны для свежих образцов клеток или тканей.

[000450] В этих методах активируемое антитело метят обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), поглощающий в ближней ИК-области краситель (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и усиливающий реагент, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

[000451] Обнаружение метки в образце, который был инкубирован с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и протеазу,

специфичную для субстрата CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с использованием ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с помощью агента, который специфичен для протеазы, например, антитела, такого как A11, которое специфично для протеазы матриптазы (MT-SP1) и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; см., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 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, специфичных для субстрата CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, например, другого антитела, или обнаруживаемой метки может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченое активируемое антитело с обнаружением меченым вторичным антителом или более сложной системой обнаружения.

[000452] Подобные способы также полезны 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 субстрата CM1-CM2 активируемого антитела.

[000453] Эти методы также применимы в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфического к протеазе субстрата CM1-CM2 в активируемом антителе.

[000454] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* полезны в способах определения того, каких пациентов следует лечить. Например, при визуализации *in situ* активируемые антитела используются для скрининга образцов пациентов, чтобы идентифицировать пациентов, имеющих соответствующую протеазу(-ы) и мишень(-и) в соответствующей области, например, в опухолевом очаге.

[000455] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень, так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (субстрате CM1-CM2) тестируемого активируемого антитела

(например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. Аналогичным образом, пациенты с отрицательным результатом теста на одну или обе мишени и протеазу, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, идентифицируются как подходящие кандидаты для другой формы терапии (т.е. не подходят для лечения тестируемым активируемым антителом). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, у которых тест на первое активируемое антитело отрицательный, можно исследовать с помощью других активируемых антител, содержащих различные CM, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания).

[000456] В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты с положительным результатом теста как на мишень, так и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (субстрате CM1-CM2) тестируемого активируемого антитела (например, накапливают активированные антитела в очаге заболевания), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. Аналогичным образом, пациенты с отрицательным результатом теста идентифицируются как подходящие кандидаты для другой формы терапии (то есть не подходят для лечения тестируемым активируемым антителом). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, у которых тест на первое активируемое антитело отрицательный, можно исследовать с помощью других активируемых антител, содержащих различные CM, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется пациентом в очаге заболевания).

Фармацевтические композиции

[000457] Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению (также называемые в данном документе «активными соединениями») и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для

введения. Такие композиции, как правило, содержат конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе 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 техники, 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. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным соединением, предполагается его применение в композициях. Также в композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

[000458] Фармацевтическая композиция по изобретению составлена таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Примеры способов введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (то есть местное), чрескожное и ректальное введение. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение рН можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы.

[000459] Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимости) 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, Stermophor EL™ (BASF, Парсиппани, штат Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить посредством шприца. 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, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов можно выполнять посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенатов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. В некоторых вариантах осуществления желательно включить в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как манит, сорбит, хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию вещества, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[000460] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или несколькими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрования. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный базовый раствор, 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 приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

[000461] Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Их можно заключать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения активное

соединение может быть объединено с эксципиентами и использовано в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также могут быть получены с использованием жидкости-носителя для использования в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяют перорально, полоскают им рот и выплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связывающие вещества и/или адьювантные материалы могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений подобного рода: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подслащивающее вещество, такое как сахароза или сахарин; или вкусовой агент, такое как мятное масло, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[000462] Для введения путем ингаляции соединения доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или из распылителя.

[000463] Системное введение также может осуществляться через слизистые оболочки или через кожу. Для трансмукозального или чрескожного введения в составе применяют смачивающие средства, подходящие для проницаемого барьера. Такие смачивающие вещества обычно известны в данной области техники, и включают в себя, например, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Введение через слизистую может быть осуществлено за счет использования назальных спреев или суппозиторий. Для трансдермального введения активные соединения изготавливают в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как в целом известно в данной области техники.

[000464] Соединения также могут быть приготовлены в форме суппозиторий (например, с обычными основами для суппозиторий, таких как масло какао и другие глицериды) или клизм с удержанием для ректальной доставки.

[000465] В некоторых вариантах осуществления активные соединения получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды,

полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны специалистам в данной области техники. Материалы также могут быть получены коммерческим путем от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

[000466] В частности, может быть выгодным приготовление композиций для перорального или парентерального введения в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозировки. В контексте данного документа единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозровок для подлежащего лечению субъекта; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимое терапевтическое действие, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для единичных дозированных форм по 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 индивидуумов.

[000467] Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкцией по применению.

[000468] Изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Активируемые антитела и субстраты, расщепляемые матриксной металлопротеиназой (ММП)

[000469] В исследованиях, представленных в данном документе, описываются иллюстративные субстраты матриксной металлопротеиназы (ММП) по настоящему изобретению и иллюстративные активируемые антитела, которые включают субстраты ММП по настоящему изобретению.

[000470] Иллюстративные активируемые антитела были сконструированы таким образом, что каждое из них содержит один из субстратов ММП, перечисленных в таблице 1. Иллюстративные активируемые антитела по настоящему изобретению,

последовательности которых перечислены в таблице 2, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое основано на химерном моноклональном антителе мыши/человека, которое специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Иллюстративные активируемые антитела также содержат продомен, связанный с N-концом легкой цепи АВ. Каждый продомен содержит маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ), а СМ содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата MMP из таблицы 1.

Таблица 1. Субстраты матриксной металлопротеиназы (MMP)

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
4001	ALAHGLF	1
4002	DLAHPLL	2
4003	AFRHLR	3
4004	PHGFFQ	4
4005	SVHHLI	5
4006	RGPKLYW	6
4007	RFPYGVW	7
4008	HVPRQV	8
4009	SNPFKY	9
4010	RFPLKV	10
4011	PFHLSR	11
4012	STVFHM	12
4013	MGPWFM	13
4014	RHLAKL	14
4015	PLGVRGK	15
4016	QNQALRIA	16

Таблица 2. Последовательности активируемых антител

Тяжелая цепь активируемого антитела к EGFR (с225v5) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 400)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTD
 YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVT
 VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 399)

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS
GSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPRFAKVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 401)

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS
GSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPRFAKVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-NSUB) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 402)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGGSGGGSGGSDILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVE
SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPRFAKVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4001SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 403)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSSALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDI
ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
FAKVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4001LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 404)

последовательность) (SEQ ID NO: 404)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIA YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4002SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 405)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSDLAHPLLGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIA YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4003SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 406)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAFRHLRGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSF
SCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIA YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4004LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 407)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGGSGGSGPHGFFQGGGSQILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIA YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4005SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 408)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSVHHLIGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSF
SCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIA

YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4006SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 409)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRGPKLYWGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI
ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4006LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 410)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGGSGRGPPLYWGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4007SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 411)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRFPYGVWGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI
ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4008SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 412)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVSF
SCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI
DYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
LSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4008LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 413)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGHVPRQVGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVE SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4009SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 414)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSNPFKYGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4010SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 415)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRFPLKVGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4011SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 416)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSPFHLSRGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4012SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 417)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSTVFHMGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSF
SCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVEEDIA
DYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4013SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 418)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSMPWFMMGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVEEDI
ADYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4013LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 419)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGS SGGSGGSGGSGMGPWFMMGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSV
EEDIADY CQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4014SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 420)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRHLAKLGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSF
SCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVEEDIA
DYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4015SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 421)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSPLGVRGKGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVEEDI
ADY CQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4015LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 422)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGPLGVRGKGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDYADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-4016) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 423)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGQNQALRIAGGGSQILLTQSPVILSVS
PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS
VESEDYADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-2011LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 480)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSDNPGGGSQILLTQSPVI
LSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF
LSINSVESEDYADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-3011LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 481)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGGSQIL
LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSG
SGTDFTLINSVESEDYADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1001SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 482)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSISSGLLSSGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVVS
FSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDI
ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1001LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 483)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGISSGLLSSGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1004SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 484)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAVGLLAPPGGGSQILLTQSPVILSVSPGERV
SFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESED
IADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1004LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 485)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGPAVGLLAPPGGGSQILLTQSPVILSV
SPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLIN
SVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1005SL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 486)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGPSHLVLTGGGSQILLTQSPVILSVSPGERV

SFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESED
IADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-1005LL) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 487)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGGSPSHL VLTGGGSQILLTQSPVILSVS
PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS
VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПРИМЕР 2. Стабильность активируемых антител с расщепляемыми MMP субстратами in vitro

[000471] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают стабильность in vitro активируемых антител, содержащих субстраты матриксной металлопротеиназы (MMP) по настоящему изобретению.

[000472] Стабильность активируемых антител по настоящему изобретению измеряли в присутствии или рекомбинантной матриксной металлопротеазы MMP9, или рекомбинантной матриксной металлопротеазы MMP14. Каждое активируемое антитело (100 мкг/мл) инкубировали с 50 мМ указанной рекомбинантной протеазы в течение 24 часов при 37 °С, и фракцию активируемого антитела, которая была расщеплена, измеряли при помощи капиллярного электрофореза для каждого протеазного фермента. Иллюстративные результаты этого исследования in vitro приведены в таблице 3.

[000473] Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что субстраты по настоящему изобретению демонстрируют диапазон расщепления ферментами MMP9 или MMP14. Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 85%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), DLAHPLL (SEQ ID NO: 2) или RGPPLYW (SEQ ID NO: 6).

[000474] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 90%. В некоторых

вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1).

Таблица 3. Активация *in vitro* расщепляемых MMP активируемых антител

Субстрат в активируемом антителе	Субстрат	Субстрат, SEQ ID NO.	Расщепляемость MMP14 (%)	Расщепляемость MMP9 (%)
c225v5-3954-4001-SL	ALAHGLF	1	96,5	94,5
c225v5-3954-4001-LL	ALAHGLF	1	100	100,0
c225v5-3954-4002-SL	DLAHPLL	2	85,9	87,5
c225v5-3954-4003-SL	AFRHLR	3	53,1	6,0
c225v5-3954-4004-LL	PHGFFQ	4	46,2	29,8
c225v5-3954-4005-SL	SVHHLI	5	24,4	70,5
c225v5-3954-4006-LL	RGPKLYW	6	84,2	90,8
c225v5-3954-4006-SL	RGPKLYW	6	85,7	92,9
c225v5-3954-4007-SL	RFPYGVW	7	0,0	69,5
c225v5-3954-4008-LL	HVPRQV	8	0,0	55,2
c225v5-3954-4009-SL	SNPFKY	9	0,0	22,1
c225v5-3954-4010-SL	RFPLKV	10	0,0	18,0
c225v5-3954-4011-SL	PFHLSR	11	9,9	78,8
c225v5-3954-4012-SL	STVFHM	12	0,0	56,5
c225v5-3954-4014-SL	RHLAKL	14	30,5	0,0
c225v5-3954-4015-LL	PLGVRGK	15	0,0	90,0

ПРИМЕР 3. Стабильность активируемых антител с расщепляемыми MMP субстратами *in vivo*

[000475] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают стабильность *in vivo* активируемых антител, содержащих субстраты матриксной металлопротеиназы (MMP) по настоящему изобретению.

[000476] В этих иллюстративных исследованиях измеряли стабильность активируемых антител, содержащих субстраты MMP по настоящему изобретению, путем введения дозы активируемых антител мышам и затем измерения с помощью вестерн-блоттинга фракции активируемого антитела в плазме, которая, как наблюдали, расщеплялась. Стабильность сравнивали с другими известными активируемыми

антителами, которые имеют субстраты, например 2011 (ISSGLLSGRSDNP, SEQ ID NO: 21) и 3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP, SEQ ID NO: 22), которые содержат по меньшей мере один субстрат MMP и по меньшей мере субстрат сериновой протеазы или субстрат 1001 (ISSGLLSS, SEQ ID NO: 17), который включает по меньшей мере один субстрат MMP.

[000477] В этом исследовании мышам pu/pu в возрасте около 7–8 недель внутрибрюшинно вводили указанный исследуемый препарат в дозе 12,5 мг/кг. Через 7 дней после введения конечную кровь собирали при помощи пункции сердца и выделяли плазму в течение 1 часа после сбора. Собранный образец разбавляли 1:100 фосфатно-солевым буферным раствором, денатурировали и анализировали с использованием протокола вестерн-блоттинга WES (Protein Simple) с использованием козьих антител к человеческому IgG A110UK (American Qualex) и вторичных козьих антител (Jackson ImmunoResearch). Фракцию расщепленного активируемого антитела определяли путем количественного определения фракции полипептида с более высокой подвижностью, соответствующего расщепленному активируемому антителу. Результаты этих иллюстративных анализов приведены в таблице 4 и на Фиг. 1.

Таблица 4. Стабильность активируемых антител in vivo

Исследуемый препарат	% активированных через 7 дней
C225v5-3954-2011-LL	35,80
C225v5-3954-3011-LL	62,85
C225v5-3954-4016	20,30
C225v5-3954-4001-LL	22,37
C225v5-3954-4001-SL	27,23
C225v5-3954-4003-SL	29,70
C225v5-3954-4006-LL	22,70
C225v5-3954-4008-SL	17,93
C225v5-3954-4008-LL	17,77
C225v5-3954-4012-SL	13,20
C225v5-3954-4015-LL	50,43
C225v5-3954-1001-LL	19,77

[000478] Эти иллюстративные результаты показали, что некоторые активируемые антитела, которые содержат субстраты MMP по настоящему изобретению,

продemonстрировали более высокую стабильность *in vivo*, чем активируемые антитела с субстратами как для сериновой протеазы, так и для MMP.

[000479] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых стабильность активации *in vivo* составляет менее 30%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1) или RGPKLYW (SEQ ID NO: 6).

[000480] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых стабильность активации *in vivo* составляет менее 25%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1) или RGPKLYW (SEQ ID NO: 6).

ПРИМЕР 4. Эффективность маскировки активируемых антител с помощью расщепляемых MMP субстратов

[000481] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают эффективность маскировки *in vitro* активируемых антител, которые содержат субстраты матричной металлопротеиназы (MMP) по настоящему изобретению.

[000482] В этих исследованиях использовали твердофазный анализ связывания (ИФА) для демонстрации аффинности связывания активируемых антител к EGFR, которые содержат субстраты MMP по настоящему изобретению, с рекомбинантным EGFR. Как показано на Фиг. 2А и 2В, была измерена аффинность связывания с EGFR активируемых антител с указанным субстратом по настоящему изобретению и проведено сравнение с исходным антителом c225v5. Эффективность маскировки сравнивали с другими активируемыми антителами, имеющими известные субстраты, например 2001 (ISSGLLSGRSDNH, SEQ ID NO: 23), который содержит по меньшей мере один субстрат MMP и по меньшей мере субстрат сериновой протеазы или субстрат 1001 (ISSGLLSS, SEQ ID NO: 17), 1004 (AVGLLAPP, SEQ ID NO: 18) и 1005 (GPSHLVLT, SEQ ID NO: 19), который включает по меньшей мере один субстрат MMP. Сводка этих иллюстративных результатов показана в таблице 5 и на Фиг. 2А и 2В.

[000483] Эти иллюстративные результаты показали, что субстрат MMP оказывает влияние на эффективность маскировки маскирующего фрагмента в активируемом антителе, в некоторых случаях увеличивая очевидную эффективность маскировки маскирующего фрагмента в продомене активируемого антитела.

[000484] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов,

у которых эффективность маскировки больше 70. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), RGPPLYW (SEQ ID NO: 6) или RFPYGVW (SEQ ID NO: 7).

[000485] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, у которых эффективность маскировки больше 160. Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которой эффективность маскировки составляет от 160 до 350. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1) или RFPYGVW (SEQ ID NO: 7).

Таблица 5. Активность связывания и эффективность маскировки активируемых антител *in vitro*

Исследуемый препарат	K_{Da} (нМ)	Эффективность маскировки
Исходное антитело C225v5 (Фиг. 2A)	0,094	1
C225v5-3954-2001 (Фиг. 2A)	3,71	39,5
C225v5-3954-1004-LL	1,51	16,1
C225v5-3954-1001-LL	3,83	40,7
C225v5-3954-4001-LL	15,8	168
C225v5-3954-4001-SL	32,9	350
Исходное антитело C225v5 (Фиг. 2B)	0,082	1
C225v5-3954-2001 (Фиг. 2B)	3,23	39,4
C225v5-3954-4006-LL	6,12	74,6
C225v5-3954-4008-SL	22,2	271
C225v5-3954-4007-SL	22,6	276
C225v5-3954-1005-LL	36,6	446

ПРИМЕР 5. Эффективность активируемых антител к EGFR *in vivo*

[000486] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают эффективность активируемых антител *in vivo*, которые содержат субстраты матриксной металлопротеазы (ММП) по настоящему изобретению, с использованием мышинной модели ксенотрансплантата H292 (линия клеток злокачественного новообразования

легкого человека).

[000487] В этих исследованиях опухоли подкожного ксенотрансплантата H292 (линия клеток, полученных из злокачественного новообразования легкого человека) у самок мышей nu/nu в возрасте 6–8 недель выращивали до среднего объема 180–260 мм³. Линия клеток H292 чувствительна к антителу к EGFR цетуксимабу. Затем мышей рандомизировали на группы по 7 мышей в каждой, и каждой группе внутрибрюшинно в 1-й день вводили 10 мг/кг указанного исследуемого препарата. Средний объем опухоли ± СОС наносили на график для каждой временной точки после введения исследуемого препарата, как показано на Фиг. 3А. На Фиг. 3В показано распределение абсолютных объемов опухоли на 28-й день для каждой мыши, получавшей активированные антитела с указанными субстратами или контроль цетуксимабом или иммуноглобулином (IVIg). Эффективность определяли с активируемыми антителами, имеющими известные субстраты, например 1001 (ISSGLLSS), 1004 (AVGLLAPP) и 1005 (GPSHLVLT), которые содержат по меньшей мере один субстрат MMP, или нерасщепляемый глицин-сериновый линкер (NSUB).

[000488] Как показано на Фиг. 3А и 3В, некоторые из активируемых антител с субстратами MMP по настоящему изобретению продемонстрировали эффективность *in vivo*, сравнимую с цетуксимабом, в котором отсутствует продомен.

ПРИМЕР 6. Внутриопухолевая активация активируемых антител к EGFR *in vivo*

[000489] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают внутриопухолевую активацию *in vivo* активируемых антител, которые содержат субстраты матриксной металлопротеазы (MMP) по настоящему изобретению, после введения в мышиную модель ксенотрансплантата H292 (линия клеток злокачественного новообразования легкого человека).

[000490] В этих исследованиях опухоли подкожного ксенотрансплантата H292 (линия клеток, полученных из злокачественного новообразования легкого человека) у самок мышей nu/nu в возрасте 6–8 недель выращивали до среднего объема 180–260 мм³. Линия клеток H292 чувствительна к антителу к EGFR цетуксимабу. Затем мышей рандомизировали на группы по 7 мышей в каждой, и каждой группе внутрибрюшинно в 1-й день вводили 10 мг/кг указанного исследуемого препарата. Каждую мышь лечили активированными антителами с указанными субстратами или контролем цетуксимабом или иммуноглобулином (IVIg). Эффективность определяли с активируемыми антителами, имеющими известные субстраты, например, 1001 (ISSGLLSS, SEQ ID NO: 17), 1004 (AVGLLAPP, SEQ ID NO: 18) и 1005 (GPSHLVLT, SEQ ID NO: 19), которые содержат по

меньшей мере один субстрат MMP, или нерасщепляемый глицин-сериновый линкер (NSUB).

[000491] Опухоли и плазму собирали у мышей через 4 дня после введения дозы. Ткань опухоли лизировали буфером для иммунопреципитации (Pierce), содержащим смесь ингибиторов протеазы HALT (Thermo Fisher) и ЭДТА, и лизировали с использованием Barocycler (Pressure Bioscience). Образец анализировали с использованием протокола вестерн-блоттинга WES (Protein Simple) с использованием козьих антител против человеческого IgG A110UK (American Qualex) и вторичных козьих антител (Jackson ImmunoResearch). Фракцию расщепленного активируемого антитела определяли путем количественного определения фракции полипептида с более высокой подвижностью, соответствующего расщепленному активируемому антителу. Результаты этих иллюстративных анализов приведены в таблице 6 и на Фиг. 4.

[000492] Сводка свойств некоторых активируемых антител с субстратами MMP по настоящему изобретению приведена в Таблице 6. Стабильность *in vivo* указанных исследуемых препаратов из Примера 3, таблицы 4 представлена для сравнения. Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что субстрат MMP 4001 продемонстрировал желаемые свойства, включая расщепляемость как MMP9, так и MMP14. Некоторые субстраты также продемонстрировали более высокую относительную стабильность, чем другие эталонные субстраты MMP (1001 и 1004).

[000493] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых неопухолевая и/или внутриопухолевая стабильность *in vivo* составляет менее 30% активации. Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых неопухолевая и/или внутриопухолевая стабильность *in vivo* составляет от 20% до 30% активации. Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых неопухолевая и/или внутриопухолевая стабильность *in vivo* составляет от 22% до 27% активации. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность ALANGLF (SEQ ID NO: 1), RGPPLYW (SEQ ID NO: 6) или RFPYGVW (SEQ ID NO: 7).

Таблица 6. Сводка характеристик субстрата MMP

Субстрат	Последовательность субстрата	Субстрат, SEQ ID NO	Стабильность (неопухолевая) <i>in vivo</i>	Стабильность (внутриопухолевая) <i>in vivo</i>

2001	ISSGLLSGRSDNH	23	30%	Не тестировали
4001-LL	ALAHGLF	1	22%	27%
4001-SL	ALAHGLF	1	27%	25%
4007-SL	RFPYGVW	7	Н/Д	22%
4006-LL	RGPKLYW	6	23%	26%
4008-SL	HVPRQV	8	18%	14%
1005-LL	GPSHLVLT	19	11%	16%
1001-LL	ISSGLLSS	17	20%	20%
1004-LL	AVGLLAPP	18	Не определяли	37%

ПРИМЕР 7. Активируемые антитела и расщепляемые тандемные субстраты

[000494] В исследовании, представленных в данном документе, описаны иллюстративные тандемные субстраты по настоящему изобретению, которые содержат по меньшей мере один субстрат, расщепляемый матриксной металлопротеазой (ММР) по настоящему изобретению, и по меньшей мере один субстрат, расщепляемый сериновой протеазой.

[000495] Иллюстративные активируемые антитела были сконструированы таким образом, что каждое из них содержит один из тандемных субстратов, перечисленных в таблице 7. Иллюстративные активируемые антитела по настоящему изобретению, последовательности которых перечислены в таблице 7, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое основано на химерном моноклональном антителе мыши/человека, которое специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Иллюстративные активируемые антитела также содержат продомен, связанный с N-концом легкой цепи АВ. Каждый продомен содержит маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ), а СМ содержит по меньшей мере одну последовательность тандемного субстрата из таблицы 7.

Таблица 7. Тандемные субстраты ММР/сериновой протеазы

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
5001	LSGRSALAHGLF	25

5002	ALAHGLFSGRSAN	26
5003	HVPRQVLSGRS	27
5004	HVPRQVLSGRSAN	28
5005	TARGPALAHGLF	29
5006	TARGPVPRQV	30
5007	APRSALAHGLF	31
5008	ALAHGLFAPRSF	32
5009	HVPRQVAPRSF	33
5010	ALAHGLPTFVHL	34
5011	GLPTFVHLPRQV	35
5012	AANALAHGLF	36
5013	GPTNALAHGLF	37
5014	ISSGLLSGRSNI	38
5015	AVGLLAPPGGLSGRSNI	39
5016	ISSGLLSGRSNIGS	40
5017	AVGLLAPPGGLSGRSNIGS	41
5018	ISSGLLSGRSNIG	42
5019	AVGLLAPPGGLSGRSNIG	43

Таблица 7. Последовательности активируемых антител

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5001) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 450)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSLSGRSALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSP
 GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV
 ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5002) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 451)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSALAHGLFSGRSANGGGSQILLTQSPVILSVS
 PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYAC

EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5003) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 452)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVLSGRSAGGGQILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVE
SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5004) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 453)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVLSGRSANGGGQILLTQSPVILSVS
PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS
VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5005) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 454)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSTARGPALAHGLFGGGQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5006) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 455)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSTARGPVPRQVGGGQILLTQSPVILSVSPGE
RVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVES
EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5007) (аминокислотная

последовательность) (SEQ ID NO: 456)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAPRSALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVE
SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5008) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 457)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSALAHGLFAPRSFGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5009) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 458)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGS SHVPRQVAPRSFGGGSQILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVE
SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5010) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 459)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSALAHGLPTFVHLGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5011) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 460)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGLPTFVHLPRQVGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV

ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5012) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 461)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAANALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSPGE
RVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVES
EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-5013) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 462)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGPTNALAHGLFGGGSQILLTQSPVILSVSPG
ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVE
SEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-2001) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 488)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS
VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-2001TT) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 489)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSQILLTQSPVILSVSP
GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSV
ESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь активируемого антитела к EGFR (c225v5-3954-3001) (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 490)

QGGSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNHGGGSQILLTQSP
VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF
TLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПРИМЕР 8. Стабильность активируемых антител с тандемными субстратами *in vitro*

[000496] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают стабильность активируемых антител *in vitro*, содержащих иллюстративные тандемные субстраты по настоящему изобретению, которые содержит по меньшей мере один субстрат, расщепляемый матриксной металлопротеазой (ММР), и по меньшей мере один субстрат, расщепляемый сериновой протеазой.

[000497] Стабильность активируемых антител по настоящему изобретению измеряли в присутствии указанных рекомбинантных протеаз (матриптазы, легумаина, эластазы нейтрофилов, ММР2, ММР9 и ММР14). Каждое активируемое антитело (250 нМ / 38,5 мкг/мл) инкубировали с 10 мМ указанной протеазы в течение 24 часов при 37 ° С, и фракцию расщепленного активируемого антитела измеряли при помощи капиллярного электрофореза для каждого протеазного фермента. Образец анализировали с использованием протокола вестерн-блоттинга WES (Protein Simple) с использованием козьих антител против человеческого IgG A110UK (American Qualex) и вторичных козьих антител (Jackson ImmunoResearch). Фракцию расщепленного активируемого антитела определяли путем количественного определения фракции полипептида с более высокой подвижностью, соответствующего расщепленному активируемому антителу. Иллюстративные результаты этого исследования *in vitro* приведены в таблице 8А.

[000498] Кроме того, приведено иллюстративное исследование для определения кинетики расщепления (т.е. K_{cat} / K_m ($M^{-1} s^{-1}$)) указанных субстратов по настоящему изобретению указанными протеазными ферментами. Иллюстративные результаты этого исследования *in vitro* приведены в таблице 8А.

[000499] Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что субстраты по настоящему изобретению демонстрируют диапазон расщепления указанными протеазами.

[000500] Эти иллюстративные результаты демонстрируют, что тандемные субстраты по настоящему изобретению демонстрируют диапазон расщепления матриптазой, ММР9, ММР14, легумаином и/или эластазой нейтрофилов. Эти иллюстративные результаты

также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

[000501] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

[000502] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25) или APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31).

[000503] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 15%, а расщепляемость матриптазой составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31) или ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32).

[000504] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 15%, а расщепляемость эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

[000505] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 30%, а расщепляемость эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

[000506] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 50%, а расщепляемость эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

[000507] Эти иллюстративные результаты также демонстрируют группу субстратов, в которых расщепляемость MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 70%, а расщепляемость эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах осуществления такие субстраты могут включать выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25) или APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31).

Таблица 8А. Активация активируемых антител с тандемными субстратами *in vitro*

Субстрат активируемого антитела	Субстрат (SEQ ID NO)	Расщепляемость (%)				
		Матрипта за	MMP14	MMP9	Легумин	Эластаза нейтрофилов
2001	ISSGLLSGRSDNH (23)	53	58	22	5	18
3001	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (24)	Н/Т	Н/Т	Н/Т	0	52
4001	ALAHGLF (1)	0	77	100	0	37
4008	HVPRQV	40	6	100	0	28

	(8)					
5001	LSGRSALAHGLF (25)	100	76	76	0	88
5002	ALAHGLFSGRSAN (26)	100	58	37	21	67
5003	HVPRQVLSGRS (27)	99	20	100	0	77
5004	HVPRQVLSGRSAN (28)	75	19	86	27	84
5005	TARGPALAHGLF (29)	6	34	72	0	81
5006	TARGPVPRQV (30)	100	6	81	0	30
5007	APRSALAHGLF (31)	100	90	77	0	74
5008	ALAHGLFAPRSF (32)	98	55	100	0	66
5009	HVPRQVAPRSF (33)	100	9	78	0	31
5010	ALAHGLPTFVHL (34)	0	11	0	0	100
5011	GLPTFVHLPRQV (35)	80	7	55	0	100
5012	AANALAHGLF (36)	0	72	52	7	55
5013	GPTNALAHGLF (37)	0	78	62	9	56

Н/Т = не тестировали

Таблица 8В. Активация активируемых антител с тандемными субстратами in vitro

Субстрат активируе мого антитела	Субстрат (SEQ ID NO)	Kcat / Km (M ⁻¹ c ⁻¹)				
		Матрипта за	MMP1 4	MMP9	MMP2	Эластаза нейтроф илов
2001	ISSGLLSGRSDNH	2.55	6.33	3.94	1.32	3.17

	(23)	E+03	E+03	E+02	E+04	E+03
3001	AVGLLAPPGGLSGR SDNH (24)	5,35 E+03	1,70 E+04	5,05 E+04	3,10 E+05	1,91 E+04
4001	ALAHGLF (1)	0,00 E+00	6,01 E+03	8,84 E+03	5,76 E+04	H/O
5007	APRSALAHGLF (31)	2,72 E+04	9,25 E+03	2,53 E+04	9,83 E+04	2,42 E+04
5013	GPTNALAHGLF (37)	0,00	7,77 E+03	1,04 E+04	7,65 E+04	H/O
4008	HVPRQV (8)	4,76 E+02	2,30 E+02	1,87 E+04	1,30 E+04	H/O
5006	TARGPVPRQV (30)	5,37 E+03	5,64 E+02	3,39 E+04	3,69 E+04	H/O
5011	GLPTFVHLPRQV (35)	1,43 E+03	4,44 E+02	4,18 E+03	3,38 E+03	6,65 E+05

H/O = не определяли

ПРИМЕР 9. Эффективность активируемых антител к EGFR с тандемными субстратами *in vivo*

[000508] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают *in vivo* эффективность активируемых антител по настоящему изобретению, которые содержат субстраты матриксной металлопротеазы (MMP) и по меньшей мере один субстрат сериновой протеазы, с использованием мышинной модели ксенотрансплантата H292 (линия клеток злокачественного новообразования легкого человека).

[000509] В этих исследованиях опухоли подкожного ксенотрансплантата H292 (линия клеток, полученных из злокачественного новообразования легкого человека) у самок мышей *nu/nu* в возрасте 6–8 недель выращивали до среднего объема 180–260 мм³. Линия клеток H292 чувствительна к антителу к EGFR цетуксимабу. Затем мышей рандомизировали на группы по 7 мышей в каждой, и каждой группе внутрибрюшинно в 1-й день вводили 12,5 мг/кг указанного исследуемого препарата. Средний объем опухоли ± СОС был нанесен на график для каждой временной точки после введения исследуемого препарата, как показано на Фиг. 6. Каждую мышь лечили активированными антителами с указанными субстратами или контролем цетуксимабом или иммуноглобулином (IVIG).

Эффективность определяли с активлируемыми антителами, имеющими известные субстраты, например, 2001 (ISSGLLSGRSDNH) и 3001 (AVGLLAPPGLSGRSDNH).

[000510] В дополнение к анализу стабильности *in vivo* проводили внутриопухольный анализ с использованием указанных активлируемых антител, как показано на Фиг. 7. Опухоли и плазму собирали у мышей через 4 дня после введения дозы. Ткань опухоли лизировали буфером для иммунопреципитации (Pierce), содержащим смесь ингибиторов протеазы HALT (Thermo Fisher) и ЭДТА, и лизировали с использованием Varocycler (Pressure Bioscience). Образец анализировали с использованием протокола вестерн-блоттинга WES (Protein Simple) с использованием козьих антител против человеческого IgG A110UK (American Qualex) и вторичных козьих антител (Jackson ImmunoResearch). Фракцию расщепленного активлируемого антитела определяли путем количественного определения фракции полипептида с более высокой подвижностью, соответствующего расщепленному активлируемому антителу. Результаты этих иллюстративных анализов приведены на Фиг. 7.

[000511] Как показано на Фиг. 6, некоторые из активлируемых антител с тандемными субстратами MMP и сериновой протеазы по настоящему изобретению продемонстрировали эффективность *in vivo*, сравнимую с цетуксимабом, в котором отсутствует продомен.

ПРИМЕР 10. Эффективность маскировки активлируемых антител с тандемными субстратами

[000512] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают эффективность маскировки *in vitro* активлируемых антител по настоящему изобретению, которые содержат тандемные субстраты матриксной металлопротеиназы (MMP) и сериновой протеазы.

[000513] В этих исследованиях использовали твердофазный анализ связывания (ИФА) для демонстрации аффинности связывания активлируемых антител к EGFR, которые содержат субстраты MMP по настоящему изобретению, с рекомбинантным EGFR. Аффинность связывания с EGFR активлируемых антител с указанным субстратом по настоящему изобретению измеряли и сравнивали с исходным антителом c225v5. Сводка этих иллюстративных результатов показана в таблице 9 и на Фиг. 8.

[000514] Эти иллюстративные результаты продемонстрировали, что тандемные субстраты оказывали влияние на повышение очевидной эффективности маскировки маскирующего фрагмента в активлируемом антителе.

Таблица 9. Активность связывания и эффективность маскировки активируемых антител *in vitro*

Исследуемый препарат	K_{Da} в нМ (станд. ошибка)	Эффективность маскировки
Исходное антитело C225v5	0,1585 (0,01978)	1
C225v5-3954-2001	5,062 (0,8141)	32
C225v5-3954-3001	9,095 (1,598)	57
C225v5-3954-4008	32,11 (6,39)	203
C225v5-3954-5007	26,61 (3,946)	168
C225v5-3954-5006	19,08 (3,15)	120
C225v5-3954-5013	29,85 (4,287)	188
C225v5-3954-5010	34,26 (4,212)	216
C225v5-3954-5011	29,03 (2,524)	183
C225v5-3954-5001	17,13 (2,538)	108

ПРИМЕР 11. Стабильность активируемых антител с тандемными субстратами *in vivo*

[000515] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают стабильность активируемых антител *in vivo*, содержащих иллюстративные тандемные субстраты по настоящему изобретению, которые содержит по меньшей мере один субстрат, расщепляемый матриксной металлопротеазой (ММР), и по меньшей мере один субстрат, расщепляемый сериновой и/или цистеиновой протеазой.

[000516] В этих иллюстративных исследованиях измеряли стабильность активируемых антител, содержащих субстраты ММР по настоящему изобретению, путем введения дозы активируемых антител мышам и затем измерения с помощью вестерн-блоттинга фракции активируемого антитела в плазме, которая, как наблюдали, расщеплялась. Стабильность сравнивали с другими известными активируемыми антителами, которые имеют субстраты, например, 2001 (ISSGLLSGRSDNH) и 3001 (AVGLLAPPGLSGRSDNH), которые содержат по меньшей мере один субстрат ММР и по меньшей мере субстрат сериновой протеазы.

[000517] В этом исследовании мышам *pu/pu* в возрасте около 7–8 недель внутривенно вводили указанный тестируемый препарат в дозе 12,5 мг/кг. Через 7 дней после введения конечную кровь собирали при помощи пункции сердца и выделяли плазму в течение 1 часа после сбора. Собранный образец разбавляли 1:100 фосфатно-

солевым буферным раствором, денатурировали и анализировали с использованием протокола вестерн-блоттинга WES (Protein Simple) с использованием козьих антител к человеческому IgG A110UK (American Qualex) и вторичных козьих антител (Jackson ImmunoResearch). Фракцию расщепленного активируемого антитела определяли путем количественного определения фракции полипептида с более высокой подвижностью, соответствующего расщепленному активируемому антителу. Результаты этих иллюстративных анализов приведены в Таблице 10.

[000518] Эти иллюстративные результаты показали, что некоторые активируемые антитела, которые содержат тандемные субстраты по настоящему изобретению, продемонстрировали более высокую стабильность *in vivo*, чем активируемые антитела с субстратами как для сериновой протеазы, так и для MMP.

Таблица 10. Стабильность активируемых антител с тандемными субстратами *in vivo*

Антитела к EpCAM	Субстрат	Субстрат SEQ ID NO	% расщепленных
c225v5-3954-2001	ISSGLLSGRSDNH	23	36% (DNP)
c225v5-3954-4001	ALAHGLF	1	27%
c225v5-3954-4008	HVPRQV	8	18%
c225v5-3954-5001	LSGRSALAHGLF	25	54%
c225v5-3954-5002	ALAHGLFSGRSAN	26	70%
c225v5-3954-5003	HVPRQVLSGRS	27	55%
c225v5-3954-5004	HVPRQVLSGRSAN	28	65%
c225v5-3954-5005	TARGPALAHGLF	29	40%
c225v5-3954-5006	TARGPVPRQV	30	36%
c225v5-3954-5007	APRSALAHGLF	31	37%
c225v5-3954-5008	ALAHGLFAPRSF	32	70%
c225v5-3954-5009	HVPRQVAPRSF	33	55%
c225v5-3954-5010	ALAHGLPTFVHL	34	12%
c225v5-3954-5011	GLPTFVHLPRQV	35	21%
c225v5-3954-5012	AANALAHGLF	36	24%
c225v5-3954-5013	GPTNALAHGLF	37	21%

ПРИМЕР 12. Активация опухолевой тканью активируемых антител к EGFR *in vivo*

[000519] В исследованиях, представленных в данном документе, оценивают

активацию *in vitro* активируемых антител, которые содержат tandemные субстраты по настоящему изобретению, с помощью лизатов опухолей человека.

[000520] В этих исследованиях опухолевые ткани человека (злокачественное новообразование головы и шеи или злокачественное новообразование поджелудочной железы) инкубировали с активируемыми антителами к EGFR с субстратами, указанными на Фиг. 9. Иллюстративные результаты показали, что активируемые антитела с субстратом 5007 (APRSALAHGLF; SEQ ID NO: 31) продемонстрировали более высокий уровень активации по сравнению с активируемыми антителами, имеющими tandemный субстрат 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SEQ ID NO: 23) или 3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH; SEQ ID NO: 24).

[000521] В другом исследовании аналогичное исследование активации активируемых антител с tandemным субстратом 5007 по настоящему изобретению (APRSALAHGLF; SEQ ID NO: 31) с помощью ткани опухоли головы и шеи или ткани опухоли поджелудочной железы было выполнено с класс-специфическим ингибитором протеазы, выбранным из галардина, ЭДТА, апротинина или сивелестата. Исследования продемонстрировали, что апротинин, который является ингибитором сериновой протеазы широкого спектра действия, снижает степень активации до $\leq 5\%$. Для сравнения, лечение тремя другими ингибиторами показало активацию на уровне, сопоставимом с контрольным исследованием без ингибиторов. Эти иллюстративные результаты показали, что эта активация не ингибируется ингибиторами MMP (галардин, ЭДТА) или эластазы нейтрофилов (сивелестат).

Другие варианты осуществления

[000522] 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. Выделенный полипептид, содержащий tandemный субстрат, причем tandemный субстрат содержит по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (CM1 – англ.: first cleavable moiety), который является субстратом для по меньшей мере одной матричной металлопротеиназы (MMP – англ.: matrix metalloprotease), и по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (CM2 – англ.: second cleavable moiety), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP – англ.: serine protease) или цистеиновой протеазы (CP – англ.: cysteine protease),

при этом CM1 включает аминокислотную последовательность AHGL (SEQ ID NO: 54) или PRQV (SEQ ID NO: 61), и

при этом расположение от N-конца к C-концу tandemного субстрата представляет собой CM1-CM2 или CM2-CM1.

2. Выделенный полипептид по п. 1, в котором CM1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), ALAHGL (SEQ ID NO: 52), LAHGLF (SEQ ID NO: 50), LAHGL (SEQ ID NO: 53) и AHGLF (SEQ ID NO: 51).

3. Выделенный полипептид по п. 1, в котором CM1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из HVPRQV (SEQ ID NO: 8) и VPRQV (SEQ ID NO: 60).

4. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–3, в котором CM1 и CM2 связаны через связывающий пептид.

5. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–3, в котором CM1 и CM2 непосредственно связаны друг с другом.

6. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–5, в котором CM2 представляет собой субстрат для фермента CP, и причем фермент CP представляет собой лемуаин.

7. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–6, в котором CM2 включает субстрат для фермента SP, выбранного из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы и эластазы нейтрофилов.

8. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–7, в котором CM2 включает субстрат для фермента SP, выбранный из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы и эластазы нейтрофилов; и субстрат для фермента CP, и при этом фермент CP представляет собой легумин.
9. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–8, в котором MMP представляет собой MMP2, MMP9 или MMP14.
10. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–9, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), ARG, PRS, TFVH (SEQ ID NO: 141), AAN, SAN, LPTFV (SEQ ID NO: 140) и GPTN (SEQ ID NO: 152).
11. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104).
12. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ARGP (SEQ ID NO: 128), TARG (SEQ ID NO: 125) и TARGP (SEQ ID NO: 124).
13. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из APRSF (SEQ ID NO: 130), APRS (SEQ ID NO: 131) и PRSF (SEQ ID NO: 132).
14. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 150).

15. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135), GLPTFVH (SEQ ID NO: 136), GLPTFV (SEQ ID NO: 137), LPTFVHL (SEQ ID NO: 138), LPTFVH (SEQ ID NO: 139) и LPTFV (SEQ ID NO: 140).

16. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–10, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 150); и

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104).

17. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–16, в котором расположение от N-конца к C-концу tandemного субстрата представляет собой CM1-CM2.

18. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–16, в котором расположение от N-конца к C-концу tandemного субстрата представляет собой CM2-CM1.

19. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–18, в котором tandemный субстрат включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43;

(b) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36 и 37;

(c) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33 и 35;

(d) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36 и 37;

(e) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32 и 34;

(f) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ

ID NO: 27, 28 и 33; и

(g) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35.

20. Выделенный полипептид, содержащий:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ - англ.: antibody), которое специфически связывается с мишенью;

по меньшей мере первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (ММР); и

по меньшей мере второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP) или цистеиновой протеазы (CP),

при этом СМ1 включает аминокислотную последовательность АНGL (SEQ ID NO: 54) или PRQV (SEQ ID NO: 61), и

при этом расположение от N-конца к С-концу tandemного субстрата представляет собой СМ1-СМ2 или СМ2-СМ1

21. Выделенный полипептид по п. 20, в котором СМ1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из АLАНGLF (SEQ ID NO: 1), АLАНGL (SEQ ID NO: 52), LАНGLF (SEQ ID NO: 50), LАНGL (SEQ ID NO: 53) и АНGLF (SEQ ID NO: 51).

22. Выделенный полипептид по п. 20, в котором СМ1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из НVPRQV (SEQ ID NO: 8) и VPRQV (SEQ ID NO: 60).

23. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–22, в котором СМ1 и СМ2 связаны через связывающий пептид.

24. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–22, в котором СМ1 и СМ2 непосредственно связаны друг с другом.

25. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–24, в котором СМ2 представляет собой субстрат для фермента CP, а фермент CP представляет собой легумаин.

26. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–25, в котором CM2 включает субстрат для фермента SP, выбранного из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы и эластазы нейтрофилов.
27. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–26, в котором CM2 включает субстрат для фермента SP, выбранный из группы, состоящей из урокиназы, матриптазы и эластазы нейтрофилов; и субстрат для фермента CP, и при этом фермент CP представляет собой легумаин.
28. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–27, в котором MMP представляет собой MMP2, MMP9 или MMP14.
29. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–28, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), ARG, PRS, TFVH (SEQ ID NO: 141), LPTFV (SEQ ID NO: 140), AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 152).
30. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104).
31. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ARGP (SEQ ID NO: 128), TARG (SEQ ID NO: 125) и TARGP (SEQ ID NO: 124).
32. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из APRSF (SEQ ID NO: 130), APRS (SEQ ID NO: 131) и PRSF (SEQ ID NO: 132).
33. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GLPTFVHL (SEQ ID NO: 135), GLPTFVH (SEQ ID NO: 136), GLPTFV (SEQ ID NO: 137), LPTFVHL (SEQ ID NO: 138), LPTFVH (SEQ ID NO: 139) и LPTFV (SEQ ID NO: 140).

34. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 150).

35. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–29, в котором CM2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAN, SAN и GPTN (SEQ ID NO: 150); и

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SGR, LSGR (SEQ ID NO: 73), LSGRS (SEQ ID NO: 72), LSGRSD (SEQ ID NO: 71), LSGRSA (SEQ ID NO: 110), LSGRSDN (SEQ ID NO: 70), LSGRSAN (SEQ ID NO: 109), LSGRSDNH (SEQ ID NO: 20), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 78), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 90), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 84), LSGRSANI (SEQ ID NO: 108), LSGRSANP (SEQ ID NO: 114), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 86), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 92), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 100) и LSGRSDDH (SEQ ID NO: 104).

36. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–35, в котором расположение от N-конца к C-концу tandemного субстрата представляет собой CM1-CM2.

37. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–35, в котором расположение от N-конца к C-концу tandemного субстрата представляет собой CM2-CM1.

38. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–37, в котором tandemный субстрат включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43;

(b) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36 и 37;

(c) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33 и 35;

(d) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36 и 37;

(e) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32 и 34;

(f) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 33; и

(g) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35.

39. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–38, в котором по меньшей мере один из MMP, CP и SP совместно локализован с мишенью в ткани.

40. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–39, в котором его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела из тяжелых цепей и однодоменного антитела из легких цепей.

41. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–40, в котором АВ связано с CM1.

42. Выделенный полипептид по п. 41, в котором АВ связано непосредственно с CM1.

43. Выделенный полипептид по п. 41, в котором АВ связано с CM1 через связывающий пептид.

44. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–40, в котором АВ связано с CM2.

45. Выделенный полипептид по п. 44, в котором АВ связано непосредственно с CM2.

46. Выделенный полипептид по п. 44, в котором АВ связано с CM2 через связывающий пептид.

47. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–46, в котором АВ содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором CM1 или CM2 связаны с N-концом переменной области легкой цепи АВ.

48. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–46,

в котором АВ содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

в котором СМ1 или СМ2 связаны с N-концом вариабельной области тяжелой цепи АВ.

49. Выделенный полипептид по любому из пп. 20–48, в котором выделенный полипептид содержит маскирующий фрагмент (ММ – англ.: masking moiety).

50. Выделенный полипептид по любому из пп. 49, в котором ММ имеет константу диссоциации в отношении связывания с АВ, которая больше, чем константа диссоциации для АВ в отношении связывания с мишенью.

51. Выделенный полипептид по пп. 49 или 50, в котором ММ представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

52. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–51, в котором ММ связан с СМ1 таким образом, что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ1-СМ2-АВ или АВ-СМ2-СМ1-ММ.

53. Выделенный полипептид по п. 52, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между ММ и СМ1.

54. Выделенный полипептид по п. 52, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между СМ2 и АВ.

55. Выделенный полипептид по п. 52, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между ММ и СМ1; и связывающий пептид между СМ2 и АВ.

56. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–51, в котором ММ связан с СМ2 таким образом, что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ2-СМ1-АВ или АВ-СМ1-СМ2-ММ.

57. Выделенный полипептид по п. 56, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между MM и CM2.
58. Выделенный полипептид по п. 56, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между CM1 и AB.
59. Выделенный полипептид по п. 56, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между MM и CM2; и связывающий пептид между CM1 и AB.
60. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–59, в котором AB содержит вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором CM1 или CM2 связаны с N-концом вариабельной области легкой цепи AB.
61. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–59, в котором AB содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором CM1 или CM2 связаны с N-концом вариабельной области тяжелой цепи AB.
62. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–51, в котором выделенный полипептид содержит первый связывающий пептид (LP1 – англ.: first linking peptide) и второй связывающий пептид (LP2 – англ.: second linking peptide), и при этом выделенный полипептид имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу в нерасщепленном состоянии: MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB, или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM.
63. Выделенный полипептид по п. 62, в котором два связывающих пептида не идентичны друг другу.
64. Выделенный полипептид по пп. 62 или 63, в котором каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот.

65. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–64, в котором выделенный полипептид содержит третий связывающий пептид (LP' – англ.: linking peptide) между CM1 и CM2.

66. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–65, в котором LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность GGSG (SEQ ID NO: 202), GGSGG (SEQ ID NO: 203), GSGSG (SEQ ID NO: 204), GSGGG (SEQ ID NO: 205), GGGSG (SEQ ID NO: 206) и GSSSG (SEQ ID NO: 207).

67. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–66, в котором LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 209), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 210), GSSGGSGGSGGGGS (SEQ ID NO: 211), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 212) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 213), GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214) и GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 215).

68. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–67, в котором LP2 включает аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 216), GSSGT (SEQ ID NO: 217) или GSSG (SEQ ID NO: 218).

69. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–68, в котором LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208) или GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214), и при этом LP2 включает аминокислотную последовательность GGS или GGGS (SEQ ID NO: 216).

70. Выделенный полипептид по любому из пп. 62–69, в котором АВ содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором LP2 связан с N-концом переменной области легкой цепи АВ.

71. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–59, в котором АВ содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором LP2 связан с N-концом переменной области тяжелой цепи АВ.

72. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–71, в котором аминокислотная последовательность ММ отличается от аминокислотной последовательности мишени и не более чем на 10% идентична аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию АВ.

73. Выделенный полипептид по любому из пп. 49–72, в котором ММ не препятствует связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним в расщепленном состоянии.

74. Конъюгированный полипептид, содержащий выделенный полипептид по любому из пп. 19–73, конъюгированный с агентом.

75. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с мишенью, содержащее:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с мишенью;

маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, при этом ММ ингибирует связывание АВ с мишенью, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

расщепляемый фрагмент (СМ1-СМ2), включающий tandemный субстрат по любому из пп. 1–19.

76. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с мишенью, содержащее:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с мишенью;

маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, при этом ММ ингибирует связывание АВ с мишенью, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

расщепляемый фрагмент (СМ1-СМ2), включающий tandemный субстрат, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25–43;

(b) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 29, 31, 32, 34, 36 и 37;

(c) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 33 и 35;

(d) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 31, 36 и 37;

(e) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 32 и 34;

(f) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28 и 33; и

(g) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 35.

77. Активируемое антитело по пп. 75 или 76, в котором MM имеет константу диссоциации в отношении связывания с АВ, которая больше, чем константа диссоциации для АВ в отношении связывания с мишенью.

78. Активируемое антитело по любому из пп. 75–77, в котором MM представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

79. Активируемое антитело по любому из пп. 75–78, в котором его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела из тяжелых цепей и однодоменного антитела из легких цепей.

80. Активируемое антитело по любому из пп. 75–79, в котором MM связан с CM1 таким образом, что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM1-CM2-AB или AB-CM2-CM1-MM.

81. Активируемое антитело по п. 80, в котором активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM1.

82. Активируемое антитело по п. 80, в котором активируемое антитело содержит связывающий пептид между CM2 и АВ.

83. Активируемое антитело по п. 80, в котором активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM1; и

связывающий пептид между CM2 и АВ.

84. Активируемое антитело по любому из пп. 75–79, в котором MM связан с CM2 таким образом, что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-CM2-CM1-AB или AB-CM1-CM2-MM.

85. Активируемое антитело по п. 84, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между MM и CM2.

86. Активируемое антитело по п. 84, в котором выделенный полипептид содержит связывающий пептид между CM1 и АВ.

87. Активируемое антитело по п. 86, в котором активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM2; и связывающий пептид между CM1 и АВ.

88. Активируемое антитело по любому из пп. 75–87, в котором АВ содержит вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором CM1 или CM2 связаны с N-концом вариабельной области легкой цепи АВ.

89. Активируемое антитело по любому из пп. 75–87, в котором АВ содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором CM1 или CM2 связаны с N-концом вариабельной области тяжелой цепи АВ.

90. Активируемое антитело по любому из пп. 75–79, в котором активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM.

91. Активируемое антитело по п. 90, в котором два связывающих пептида не идентичны друг другу.
92. Активируемое антитело по пп. 90 или 91, в котором каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от около 1 до 20 аминокислот.
93. Активируемое антитело по любому из пп. 90–92, в котором активируемое антитело содержит третий связывающий пептид (LP') между CM1 и CM2.
94. Активируемое антитело по любому из пп. 90–93, в котором LP1 или LP2 включает аминокислотную последовательность GGSG (SEQ ID NO: 202), GGSGG (SEQ ID NO: 203), GSGSG (SEQ ID NO: 204), GSGGG (SEQ ID NO: 205), GGGSG (SEQ ID NO: 206) и GSSSG (SEQ ID NO: 207).
95. Активируемое антитело по любому из пп. 90–94, в котором LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 209), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 210), GSSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 211), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 212) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 213), GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214) и GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 215).
96. Активируемое антитело по любому из пп. 90–95, в котором LP2 включает аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 216), GSSGT (SEQ ID NO: 217) или GSSG (SEQ ID NO: 218).
97. Активируемое антитело по любому из пп. 90–96, в котором LP1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 208) или GGGSSGGS (SEQ ID NO: 214), и при этом LP2 включает аминокислотную последовательность GGS или GGGS (SEQ ID NO: 216).
98. Активируемое антитело по любому из пп. 90–97,
в котором АВ содержит переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и
в котором LP2 связан с N-концом переменной области легкой цепи АВ.

99. Активируемое антитело по любому из пп. 90–97, в котором АВ содержит переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и в котором LP2 связан с N-концом переменной области тяжелой цепи АВ.
100. Активируемое антитело по любому из пп. 75–99, в котором аминокислотная последовательность MM отличается от аминокислотной последовательности мишени и не более чем на 10% идентична аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию АВ.
101. Активируемое антитело по любому из пп. 75–100, в котором MM не препятствует связыванию АВ с мишенью или не конкурирует с ним в расщепленном состоянии.
102. Активируемое антитело по любому из пп. 75–101, в котором активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 450–462, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 400.
103. Конъюгированное активируемое антитело, содержащее активируемое антитело по любому из пп. 75–102, конъюгированное с агентом.
104. Конъюгированное активируемое антитело по п. 103, в котором агент конъюгирован с АВ через линкер.
105. Конъюгированное активируемое антитело по п. 104, в котором линкер представляет собой расщепляемый линкер.
106. Конъюгированное активируемое антитело по п. 104, в котором линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.
107. Конъюгированное активируемое антитело по любому из пп. 103–106, в котором агент представляет собой токсин или его фрагмент.
108. Конъюгированное активируемое антитело по любому из пп. 103–106, в котором агент представляет собой ингибитор микротрубочек.

109. Конъюгированное активируемое антитело по любому из пп. 103–106, в котором агент представляет собой повреждающий нуклеиновые кислоты агент.

110. Конъюгированное активируемое антитело по п. 109, в котором агент выбран из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристатина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного и калихеамицина или его производного.

111. Конъюгированное активируемое антитело по п. 110, в котором агент представляет собой ауристатин E или его производное.

112. Конъюгированное активируемое антитело по п. 110, в котором агент представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ – англ.: monomethyl auristatin E).

113. Конъюгированное активируемое антитело по п. 110, в котором агент представляет собой монометилауристатин D (ММАД – англ.: monomethyl auristatin D).

114. Конъюгированное активируемое антитело по п. 110, в котором агент представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

115. Конъюгированное активируемое антитело по любому из пп. 103–106, в котором агент представляет собой обнаруживаемый фрагмент.

116. Конъюгированное активируемое антитело по п. 115, в котором обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

117. Фармацевтическая композиция, содержащая
выделенный полипептид по любому из пп. 20–73 или активируемое антитело по любому из пп. 75–102, или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп. 103–116; и
носитель.

118. Фармацевтическая композиция по п. 117, содержащая дополнительный агент.

119. Фармацевтическая композиция по п. 118, в котором дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.

120. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенный полипептид по любому из пп. 20–73 или активируемое антитело по любому из пп. 75–102.

121. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 120.

122. Способ получения антитела или активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии выделенного полипептида по любому из пп. 20–73 или активируемого антитела по любому из пп. 75–102, в котором клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 120.

123. Способ производства активируемого антитела, которое в активированном состоянии связывает мишень, включающий:

(a) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело по любому из пп. 75–102;

и

(b) выделение активируемого антитела.

124. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества выделенного полипептида по любому из пп. 20–73 или активируемого антитела по любому из пп. 75–102, или конъюгированного активируемого антитела по любому из пп. 103–116, или фармацевтической композиции по любому из пп. 117–119.

125. Способ по п. 124, в котором нарушение или заболевание представляет собой рак.

126. Способ по пп. 124 или 125, в котором способ включает введение субъекту дополнительного агента.

127. Способ по п. 126, в котором дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.

128. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 80%.

129. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 85%.

130. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость первого расщепляемого фрагмента CM1 с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 90%.

131. Выделенный полипептид по любому из пп. 128–130, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1), DLANPLL (SEQ ID NO: 2) или RGPPLYW (SEQ ID NO: 6).

132. Выделенный полипептид по любому из пп. 128–130, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1) и DLANPLL (SEQ ID NO: 2).

133. Выделенный полипептид по любому из пп. 128–130, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1).

134. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором стабильность *in vivo* первого расщепляемого фрагмента CM1 составляет менее 30% активации.

135. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором стабильность *in vivo* первого расщепляемого фрагмента CM1 составляет менее 25% активации.

136. Выделенный полипептид по пп. 134 или 135, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLF (SEQ ID NO: 1) или RGPPLYW (SEQ ID NO: 6).

137. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость тандемного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 30%.

138. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость тандемного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 50%.

139. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость тандемного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 70%.

140. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–139, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

141. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–139, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

142. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–139, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25) или APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31).

143. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость тандемного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 15%, а расщепляемость тандемного субстрата матриптазой составляет по меньшей мере 50%.

144. Выделенный полипептид по п. 143, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27),

HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31) или ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32).

145. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость tandemного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 15%, а расщепляемость tandemного субстрата эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 30%.

146. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость tandemного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 30%, а расщепляемость tandemного субстрата эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 30%.

147. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость tandemного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 50%, а расщепляемость tandemного субстрата эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 50%.

148. Выделенный полипептид по любому из пп. 1–73, в котором расщепляемость tandemного субстрата с помощью каждого из MMP9 и MMP14 составляет по меньшей мере 70%, а расщепляемость tandemного субстрата эластазой нейтрофилов составляет по меньшей мере 70%.

149. Выделенный полипептид по любому из пп. 145–148, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO: 27), HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO: 28), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

150. Выделенный полипептид по любому из пп. 145–148, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO: 26), TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

151. Выделенный полипептид по любому из пп. 145–148, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO: 32), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

152. Выделенный полипептид по любому из пп. 145–148, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO: 25) или APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31).

153. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–152, в котором стабильность *in vivo* составляет менее 40% активации.

154. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–152, в котором стабильность *in vivo* составляет менее 30% активации.

155. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–152, в котором стабильность *in vivo* составляет менее 25% активации.

156. Выделенный полипептид по любому из пп. 137–152, в котором стабильность *in vivo* составляет менее 20% активации.

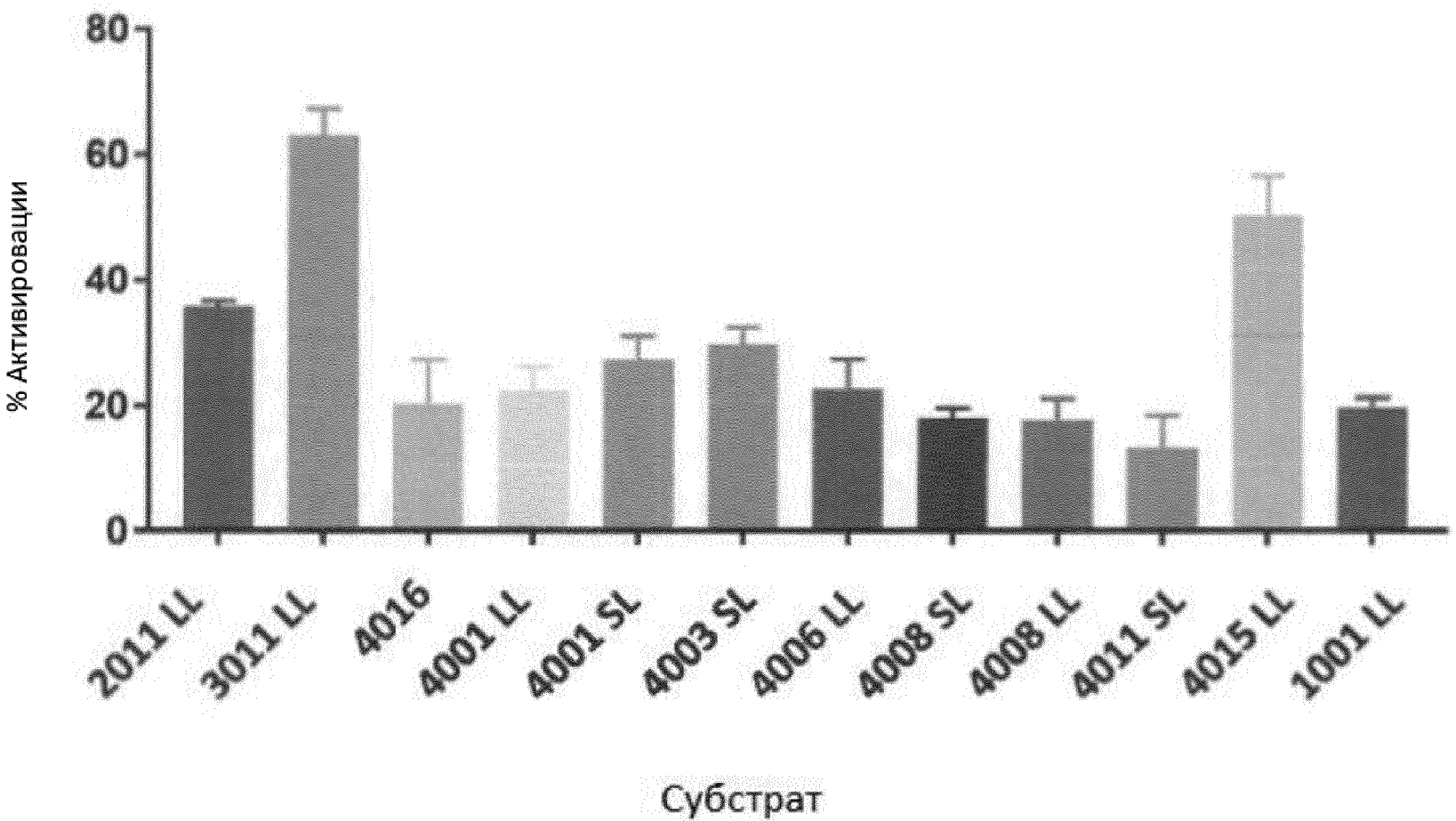
157. Выделенный полипептид по любому из пп. 153–156, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность TARGPALAHGLF (SEQ ID NO: 29), TARGPVPRQV (SEQ ID NO: 30), APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 31), ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34), GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO: 35), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

158. Выделенный полипептид по любому из пп. 153–156, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34), GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO: 35), AANALAHGLF (SEQ ID NO: 36) или GPTNALAHGLF (SEQ ID NO: 37).

159. Выделенный полипептид по любому из пп. 153–156, в котором выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO: 34).

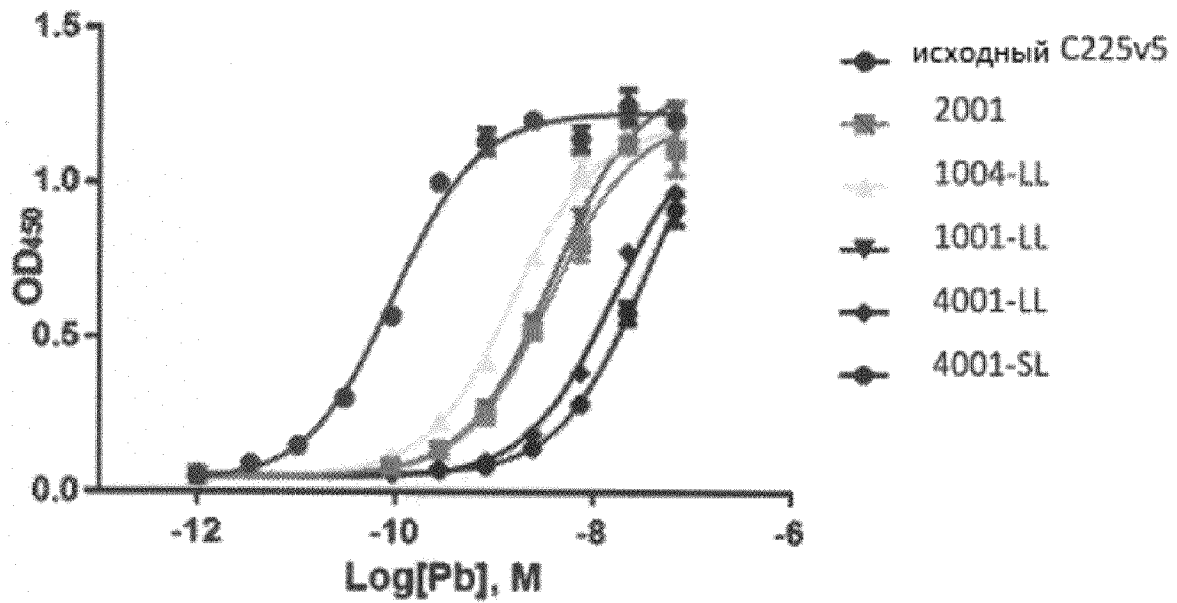
Расщепляемые матриксной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 1

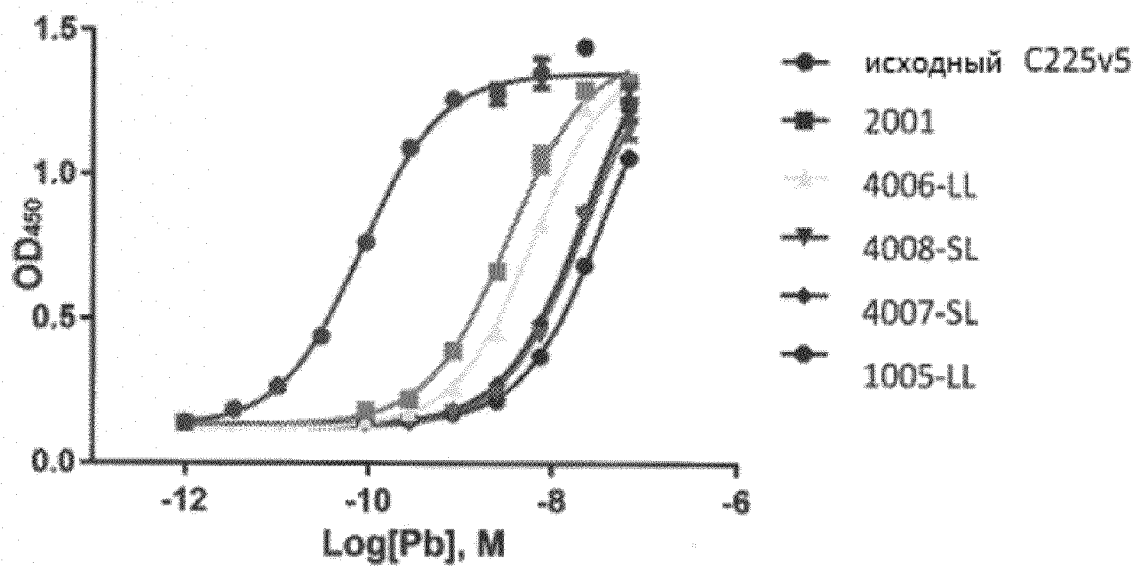


Расщепляемые матричной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 2А

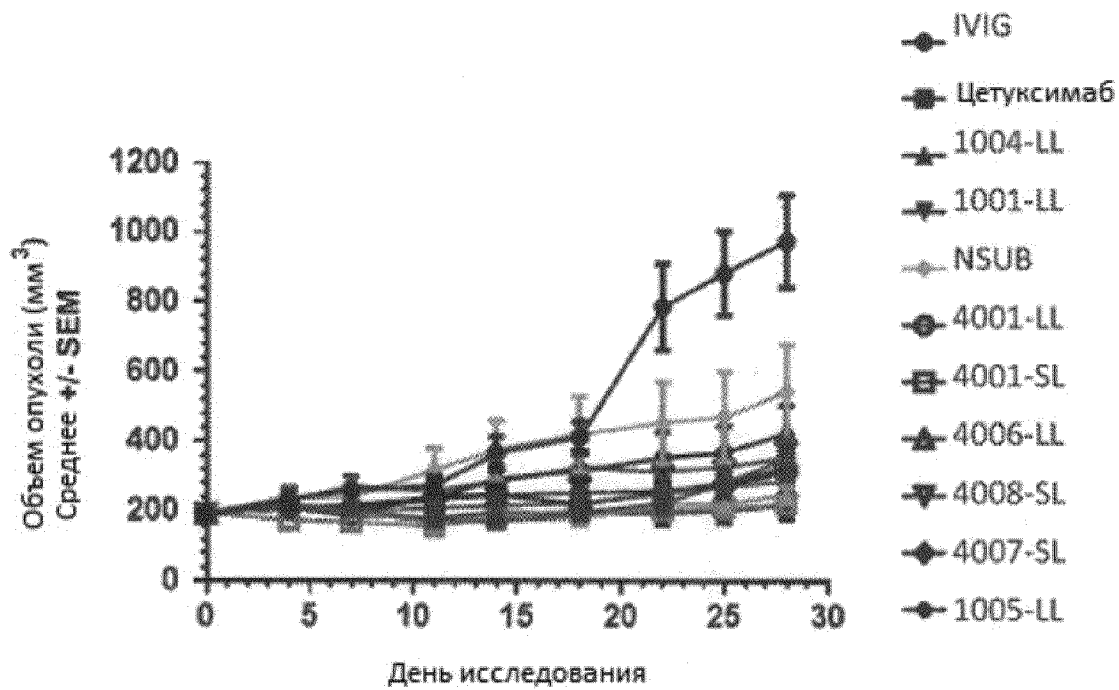


Фиг. 2А

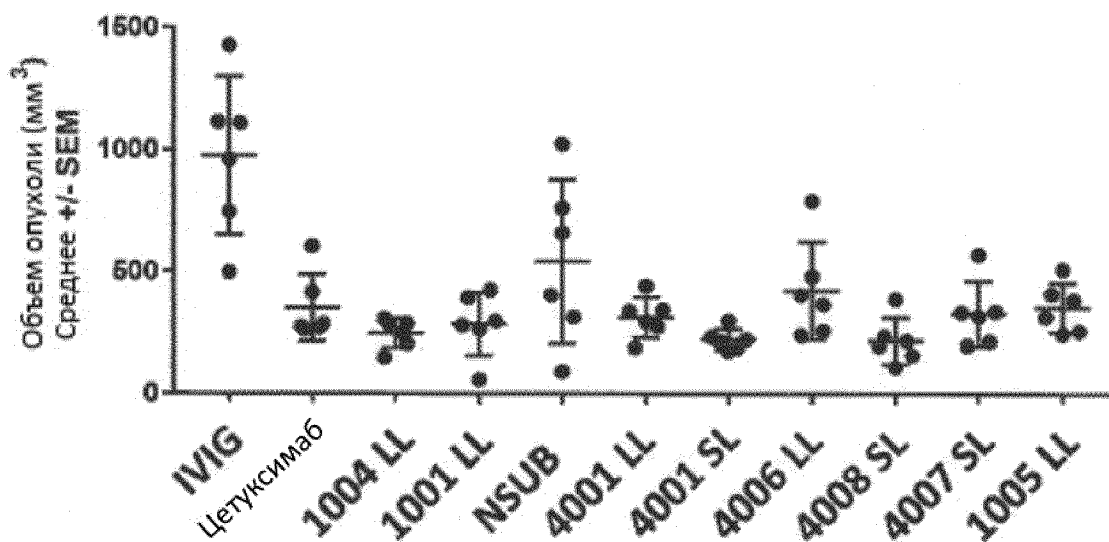


Расщепляемые матричной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 3А

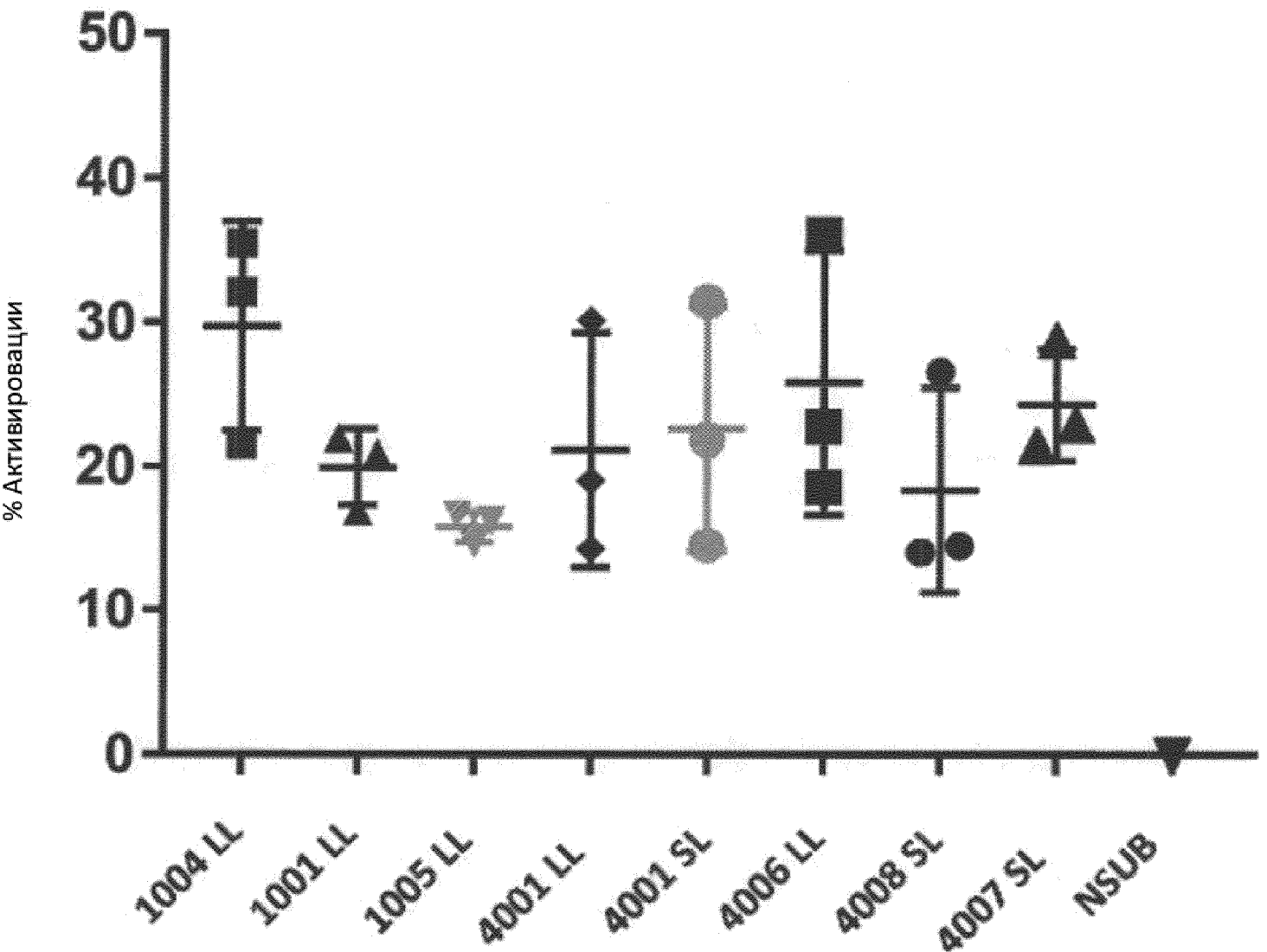


Фиг. 3В



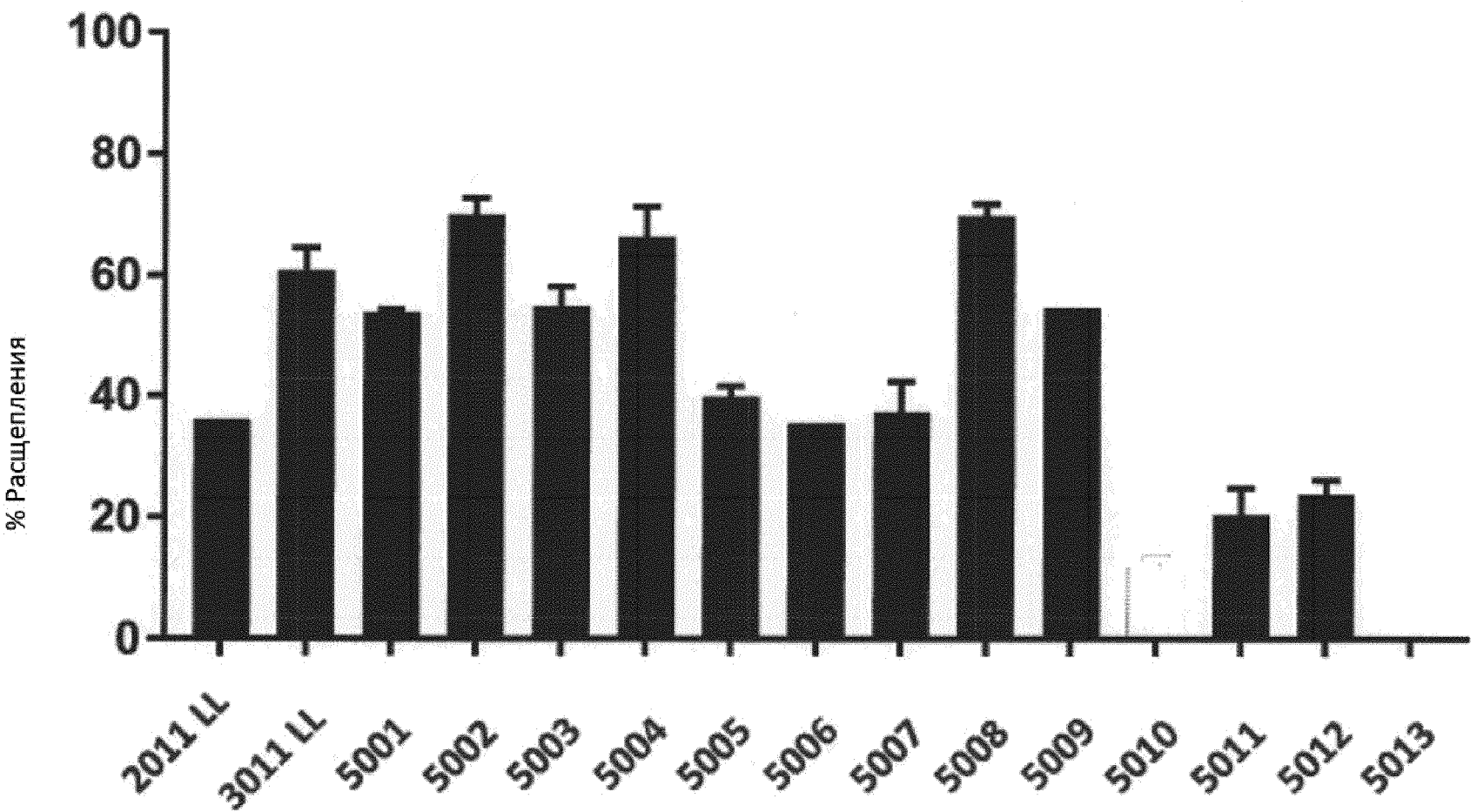
Расщепляемые матриксной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 4



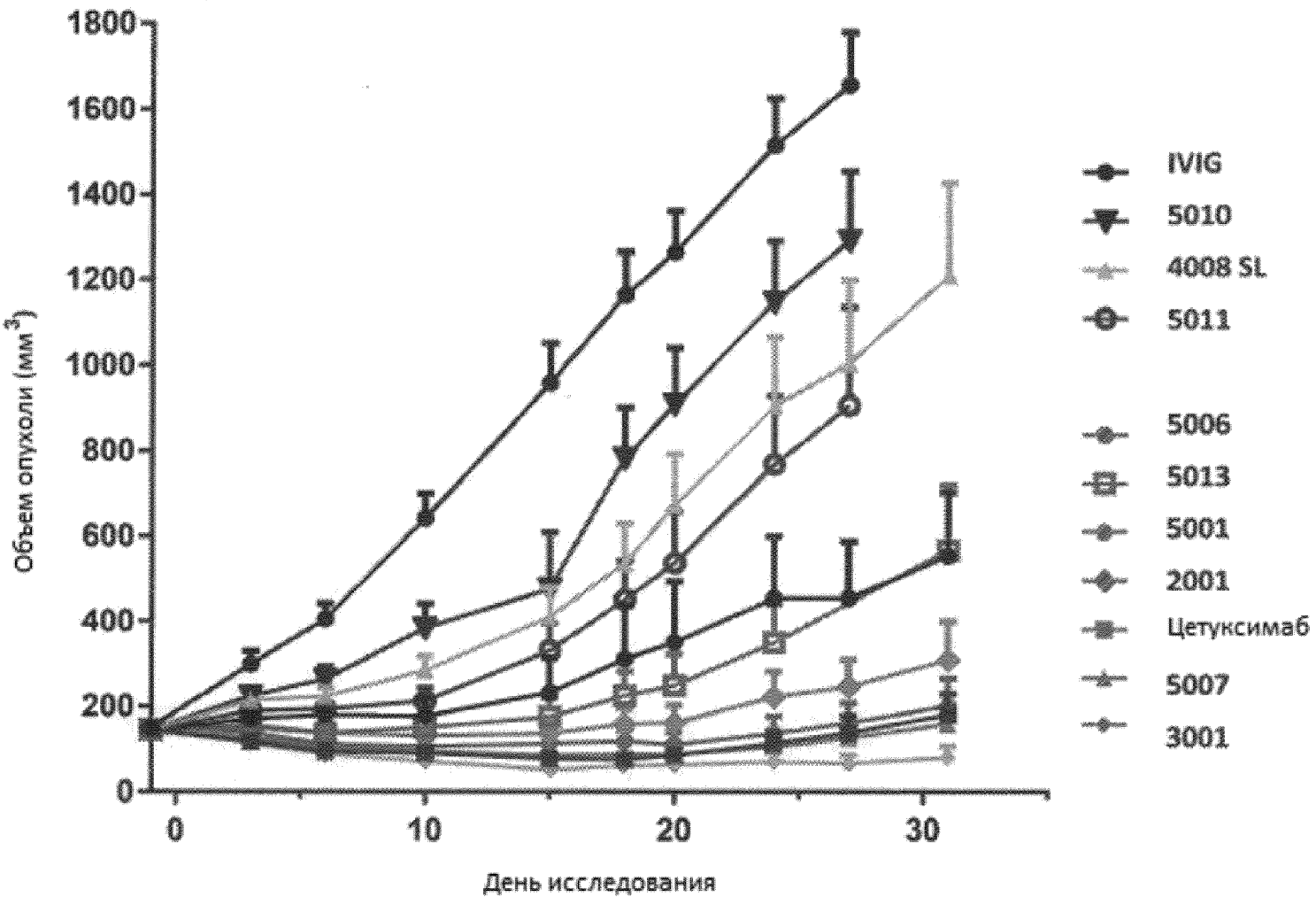
Расщепляемые матриксной металлотеоптеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 5



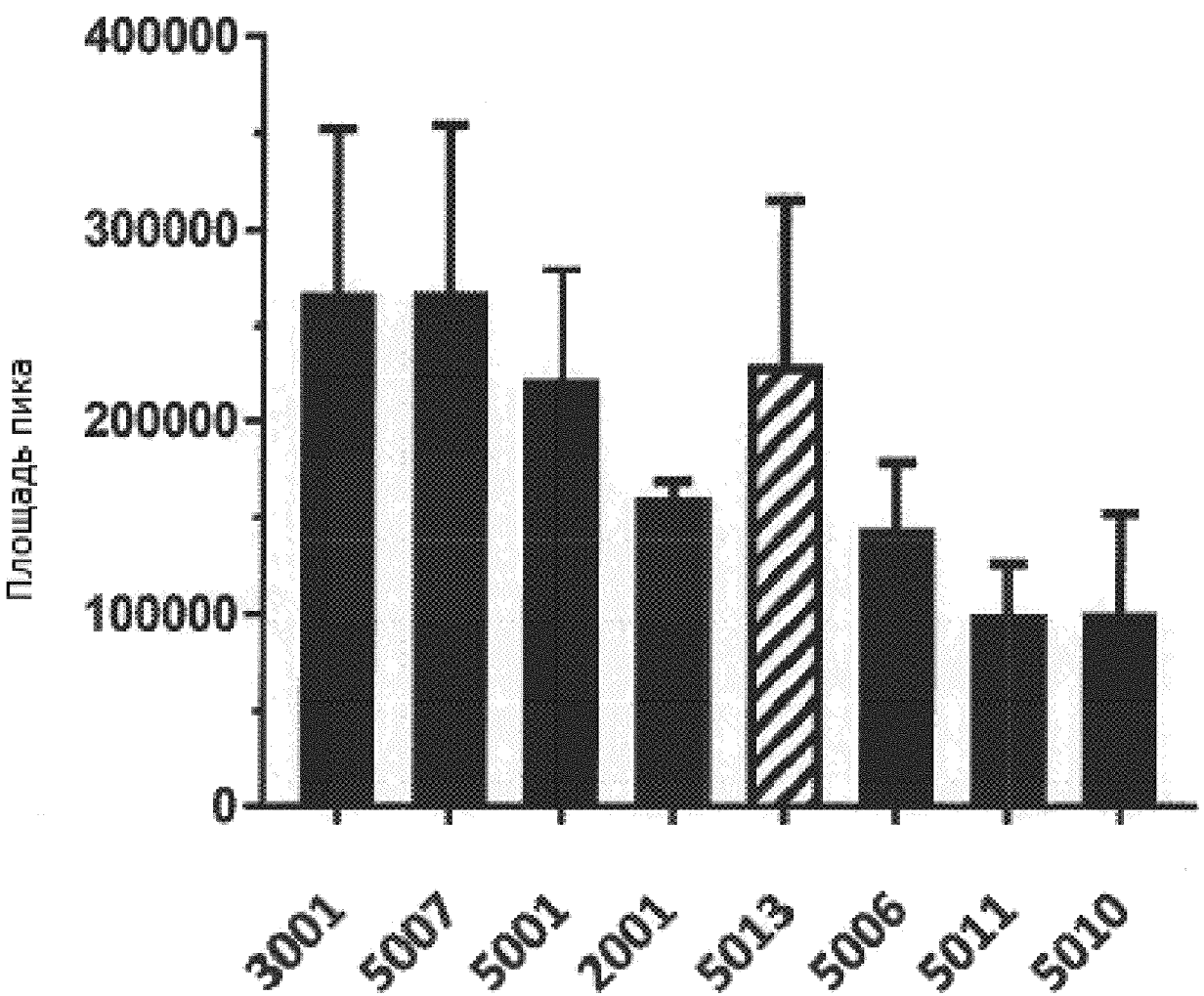
Расщепляемые матриксной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 6



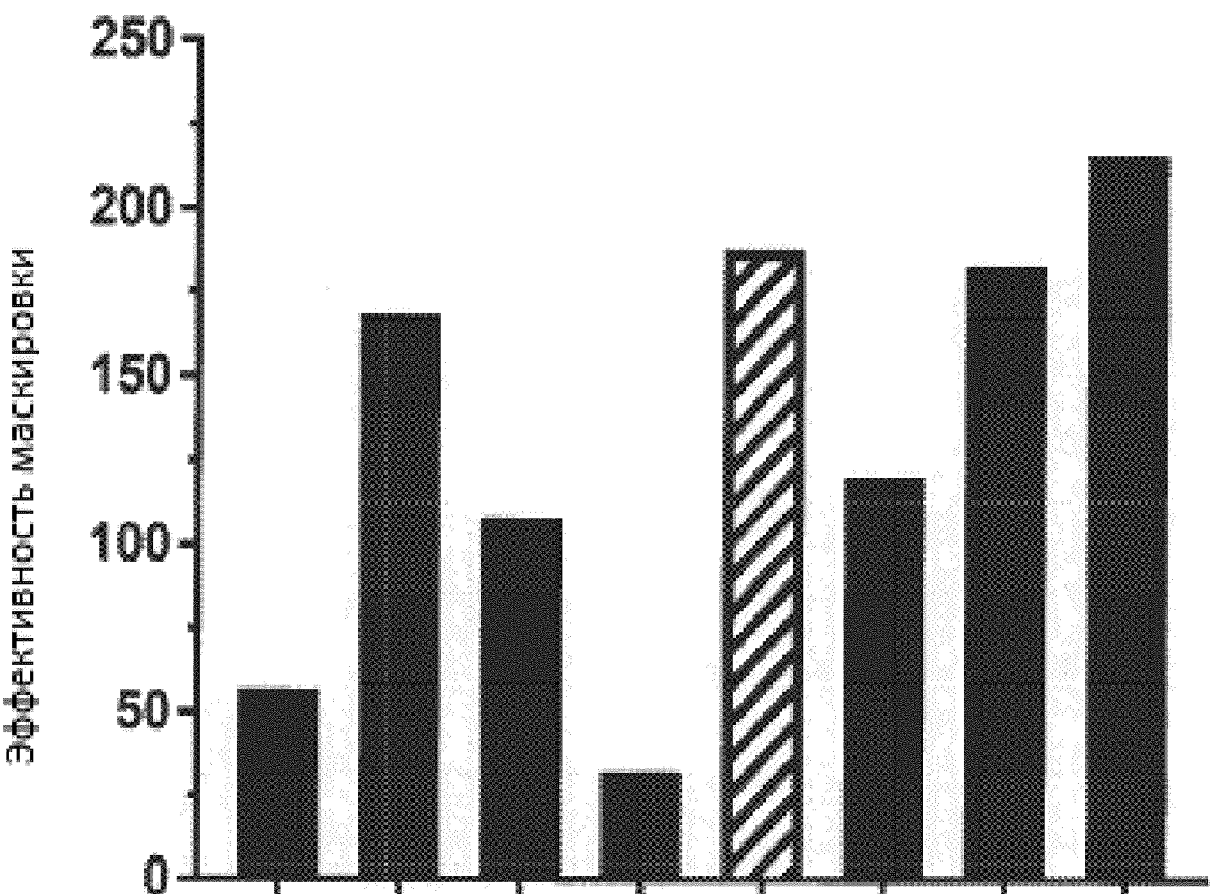
Расщепляемые матриксной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 7



Расщепляемые матричной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 8



Расщепляемые матриксной металлопротеазой и
расщепляемые сериновой или цистеиновой протеазами
субстраты и способы их применения

Фиг. 9

