



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.19

(21) Номер заявки
201792414

(22) Дата подачи заявки
2016.05.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD166, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD166 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/156,835; 62/220,805

(32) 2015.05.04; 2015.09.18

(33) US

(43) 2018.06.29

(86) PCT/US2016/030785

(87) WO 2016/179285 2016.11.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Уэст Джеймс Уилльям, Сэйджерт
Джейсон Гэри, Терретт Джонатан
Александр, Уивер Энни Янг, Денуаер
Люк Ролан, Сингх Швета (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KE H. ET AL.: "Derivation, characterization and gene modification of cynomolgus monkey mesenchymal stem cells", DIFFERENTIATION, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 77, № 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 256-262, XP025967596, ISSN: 0301-4681, DOI: 10.1016/J.DIFF.2008.09.021 [retrieved on 2008-12-02], page 256, paragraph 2.3, page 258, right-hand column, paragraph 2
WO-A2-2010081173
WO-A1-2014197612

MERETE THUNE WIIGER ET AL.: "A novel human recombinant single-chain antibody targeting CD166/ALCAM inhibits cancer cell invasion in vitro and in vivo tumour growth", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 59, № 11, 16 July 2010 (2010-07-16), pages 1665-1674, XP019842235, ISSN: 1432-0851

PIAZZA T. ET AL.: "Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain

recombinant antibody", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 118, № 7, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 1515-1525, XP003013680, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/JCS.02280, page 1523, right-hand column, last paragraph

WO-A1-2008117049

WO-A2-2009039192

STRASSBERGER VERENA ET AL.: "A comprehensive surface proteome analysis of myeloid leukemia cell lines for therapeutic antibody development", JOURNAL OF PROTEOMICS, vol. 99, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 138-151, XP028625153, ISSN: 1874-3919, DOI: 10.1016/J.JPROT.2014.01.022, figure 7

WO-A1-2012155021

ORAN ERSTER ET AL.: "Site-specific targeting of antibody activity mediated by disease-associated proteases", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 161, № 3, 17 May 2012 (2012-05-17), pages 804-812, XP028409044, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2012.05.035 [retrieved on 2012-05-23]

KRISHNA R. POLU ET AL.: "Probody therapeutics for targeting antibodies to diseased tissue", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 14, № 8, 1 August 2014 (2014-08-01), pages 1049-1053, XP055228738, ASHLEY, LONDON, GB, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.2014.920814

ANNIE YANG WEAVER ET AL.: "Development of a Probody™ Drug Conjugate (PDC) Targeting CD166 for the Treatment of Multiple Cancers", 4 November 2015 (2015-11-04), XP055291290, retrieved from the Internet: URL: http://cytomx.com/wp-content/uploads/2015/11/2015_1104_CD166_AACR_NCI_EORTC_poster_TO_PRINT_FINAL.pdf [retrieved on 2016-07-26]

ANNIE YANG WEAVER ET AL.: "Abstract C165: Development of a probody drug conjugate (PDC) against CD166 for the treatment of multiple cancers", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 14, № 12 Supplement 2, 1 December 2015 (2015-12-01), pages C165-C165, XP055291304, US, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.TARG-15-C165

(57) Изобретение относится главным образом к антителам, связывающим CD166, активируемым антителам, специфически связывающим CD166, и способам получения и применения этих антител против CD166 и активируемых антител против CD166 при множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

Родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США № 62/156835, поданной 4 мая 2015 г.; и 62/220805, поданной 18 сентября 2015 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится главным образом к антителам, связывающим CD166, активируемым антителам, специфически связывающим CD166, и способам получения и применения этих антител против CD166 и активируемых антител против CD166 при множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

Уровень техники для изобретения

Доказано, что способы терапии на основе антител являются эффективными для лечения нескольких заболеваний, но в некоторых случаях токсичность из-за широкой экспрессии мишени ограничивает их терапевтическую эффективность. Кроме того, лекарственные средства на основе антител обладают другими ограничениями, такими как быстрое выведение из кровотока после введения.

В сфере низкомолекулярных лекарственных средств разработаны способы предоставления пролекарств активного химического соединения. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство подвергается метаболизму *in vivo* до активного соединения. Такие способы с использованием пролекарства могут обеспечивать увеличенную избирательность лекарственного средства для намеченной для него мишени и для уменьшения неблагоприятных эффектов.

Соответственно в области лекарственных средств на основе антител существует постоянная необходимость в антителах, имитирующих желательные характеристики низкомолекулярного пролекарства.

Сущность изобретения

Описание относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, специфически связывающим CD166, известный также как кластер дифференцировки 166, молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов (ALCAM) и/или MEMD. Применение термина "CD166" предназначено, чтобы охватывать все его варианты, такие как в качестве неограничивающего примера CD-166 и/или CD 166, и все варианты применяют в настоящем документе взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывающий CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий CD166, представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD166, представляют собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизованное или полностью человеческое моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 121 или 122. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 122.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121 или 122, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, и аминокис-

94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит переменную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антиген против CD166, содержащее аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122, и аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126.

Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антиген против CD166, содержащее

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSSEDKH (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 131);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антиген против CD166, содержащее

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSSEDKH (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антигеном против CD166, содержащим аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122, и аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126.

Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антигеном против CD166, содержащим аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 122, и аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 123. Пригодные антигена против CD166 по этому описанию включают в себя также антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антигеном против CD166, содержащим аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 121, и аминокислотную последовательность вариативной области легкой це-

пи, содержащую SEQ ID NO: 123.

Пригодные антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSSEDKH (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 131);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Пригодные антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSSEDKH (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Описание относится также к активируемым антителам, включающим в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие CD166, присоединенные к маскирующей группе (ММ), такой, что присоединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166.

В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют посредством последовательности, содержащей субстрат для протеазы, например протеазы, которая является активной в пораженной заболеванием ткани, и/или протеазы, локализованной совместно с CD166 в участке лечения у субъекта. Активируемые антитела против CD166, представленные в настоящем документе, также обозначенные в настоящем документе взаимозаменяемо как активируемые антитела против CD166 или активируемые антитела к CD166, являются стабильными в кровотоке, активируемыми в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, например, здоровой, ткани или другой ткани, не намеченной для лечения и/или диагностики, и, при активации, обладают связыванием с CD166, по меньшей мере сравнимым с соответствующим немодифицированным антителом, также обозначаемым в настоящем документе как исходное антитело.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью CD166, у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD166, в частности активируемых антител, связывающих и нейтрализующих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности CD166 и/или опосредованной CD166 передачи сигналов.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток с экспрессией CD166 или измененной экспрессией CD166 у субъекта, с использованием активируемых антител, связывающих CD166, в частности активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности клеток с экспрессией или измененной экспрессией CD166.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, экспрессирующих CD166, у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD166, в частности активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один

вид биологической активности клеток, экспрессирующих CD166.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток с измененной экспрессией CD166 у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD166, в частности активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности клеток с измененной экспрессией CD166.

Активируемые антитела в активированном состоянии связывают CD166 и включают в себя

- (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD166;
- (ii) маскирующую группу (MM), которая, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ингибирует связывание AB с CD166; и
- (iii) расщепляемую группу (CM), присоединенную к AB, где CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между CM и AB.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число по меньшей мере один.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GSGG (SEQ ID NO: 3), GSGGG (SEQ ID NO: 4), GSGSG (SEQ ID NO: 5), GSGGG (SEQ ID NO: 6), GGGSG (SEQ ID NO: 7) и GSSSG (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 9), GSSGGSGSGG (SEQ ID NO: 10), GSSGGSGSGGS (SEQ ID NO: 11), GSSGGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 12), GSSGGSGSGG (SEQ ID NO: 13) или GSSGGSGSGGS (SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 15), GSSGT (SEQ ID NO: 16) или GSSG (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 100 нМ или менее для связывания с CD166.

В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 100 нМ или менее для связывания с CD166 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 10 нМ или менее для связывания с CD166 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 5 нМ или менее для связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 1 нМ или менее для связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 0,5 нМ или менее для связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 0,1 нМ или менее для связывания с CD166. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации 0,01-100, 0,01-10, 0,01-5, 0,01-1, 0,01-0,5, 0,01-0,1, 0,01-0,05, 0,05-100, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-1, 0,05-0,5, 0,05-0,1, 0,1-100, 0,1-10, 0,1-5, 0,1-1, 0,1-0,5, 0,5-100, 0,5-10, 0,5-5, 0,5-1, 1-100, 1-10, 1-5, 5-100, 5-10 или 10-100 нМ для связывания с CD166 млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD166, представляют собой моноклональное антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD166, представляют собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации, меньшей или равной 1 нМ, меньшей или равной 5 нМ, меньшей или равной 10 нМ, меньшей или равной 15 нМ, меньшей или равной

20 нМ, меньшей или равной 25 нМ, меньшей или равной 50 нМ, меньшей или равной 100 нМ, меньшей или равной 150 нМ, меньшей или равной 250 нМ, меньшей или равной 500 нМ, меньшей или равной 750 нМ, меньшей или равной 1000 нМ и/или меньшей или равной 2000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации, большей или равной 1 нМ, большей или равной 5 нМ, большей или равной 10 нМ, большей или равной 15 нМ, большей или равной 20 нМ, большей или равной 25 нМ, большей или равной 50 нМ, большей или равной 100 нМ, большей или равной 150 нМ, большей или равной 250 нМ, большей или равной 500 нМ, большей или равной 750 нМ, большей или равной 1000 нМ и/или меньшей или равной 2000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации в диапазоне 1-2000, 1-1000, 1-750, 1-500, 1-250, 1-150, 1-100, 1-50, 1-25, 1-15, 1-10, 1-5, 5-2000, 5-1000, 5-750, 5-500, 5-250, 5-150, 5-100, 5-50, 5-25, 5-15, 5-10, 10-2000, 10-1000, 10-750, 10-500, 10-250, 10-150, 10-100, 10-50, 10-25, 10-15, 15-2000, 15-1000, 15-750, 15-500, 15-250, 15-150, 15-100, 15-50, 15-25, 25-2000, 25-1000, 25-750, 25-500, 25-250, 25-150, 25-100, 25-50, 50-2000, 50-1000, 50-750, 50-500, 50-250, 50-150, 50-100, 100-2000, 100-1000, 100-750, 100-500, 100-250, 100-150, 150-2000, 150-1000, 150-750, 150-500, 150-250, 250-2000, 250-1000, 250-750, 250-500, 500-2000, 500-1000, 500-750, 500-500, 500-250, 500-150, 500-100, 500-50, 750-2000, 750-1000 или 1000-2000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации, меньшей или равной 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 или 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации, большей или равной 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 или 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывает CD166 млекопитающих с константой диссоциации в диапазоне 0,01-100, 0,01-10, 0,01-5, 0,01-1, 0,01-0,5, 0,01-0,1, 0,01-0,05, 0,05-100, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-1, 0,05-0,5, 0,05-0,1, 0,1-100, 0,1-10, 0,1-5, 0,1-1, 0,1-0,5, 0,5-100, 0,5-10, 0,5-5, 0,5-1, 1-100, 1-10, 1-5, 5-100, 5-10 или 10-100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающих выбран из группы, состоящей из CD166 человека и CD166 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления АВ специфически связывает CD166 человека, или CD166 яванского макака с константой диссоциации менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающих представляет собой CD166 человека. В некоторых вариантах осуществления CD166 млекопитающих представляет собой CD166 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления АВ обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (a) АВ специфически связывает CD166 человека; и
- (b) АВ специфически связывает CD166 человека и CD166 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления АВ обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (a) АВ специфически связывает CD166 человека и CD166 яванского макака;
- (b) АВ ингибирует связывание CD6 млекопитающих с CD166 млекопитающих;
- (c) АВ ингибирует связывание CD6 человека с CD166 человека; и
- (d) АВ ингибирует связывание CD6 яванского макака с CD166 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда или рецептора связывать CD166 млекопитающих с EC50, меньшей или равной 5 нМ, меньшей или равной 10 нМ, меньшей или равной 50 нМ, меньшей или равной 100 нМ, меньшей или равной 500 нМ и/или меньшей или равной 1000 нМ.

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

В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда связывать CD166 млекопитающих с EC50 5-1000, 5-500, 5-100 5-50, 5-10, 10-1000, 10-500, 10-100, 10-50, 50-1000, 50-500, 50-100, 100-1000, 100-500, 500-1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность CD6 млекопитающих связывать CD166 млекопитающих с EC50 5-1000, 5-500, 5-100, 5-50, 5-10, 10-1000, 10-500, 10-100, 10-50, 50-1000, 50-500, 50-100, 100-1000, 100-500, 500-1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд или рецептор CD166 представляет собой CD6.

В некоторых вариантах осуществления АВ по настоящему описанию ингибирует или уменьшает рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающих. Без намерения связывания с какой-либо теорией АВ по настоящему описанию может ингибировать или уменьшать рост, пролиферацию и/или метастазирование клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающих.

92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную последовательности CDR2 VL, показанной в табл. 13; и

последовательности CDR3 VL, включающей в себя последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную последовательности CDR3 VL, показанной в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может содержать один или несколько полипептидов, включающих в себя комбинацию последовательностей в данной строке табл. А, или любую комбинацию маскирующей последовательности (ММ), субстратной последовательности (СМ), последовательности вариабельного домена легкой цепи или последовательностей CDR вариабельного домена легкой цепи и последовательности вариабельного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR вариабельного домена тяжелой цепи из табл. В.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC) и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) могут содержать один или несколько полипептидов, включающих комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности вариабельного домена легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, линкера и токсина в данной строке из табл. С, или любую комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности вариабельного домена легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, линкера и токсина из табл. С.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является большей, чем константа диссоциации АВ от CD166.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является не большей, чем константа диссоциации АВ от CD166.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является меньшей, чем константа диссоциации АВ от CD166.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ не более, чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 раз или более, или в 1-5, 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 раз или более превышает константу диссоциации АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления ММ не создает помехи или конкуренцию связыванию АВ с CD166, когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной приблизительно 2-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной вплоть до приблизительно 40 аминокислот.

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

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в два раза превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в пять раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 10 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 20 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 40 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 100 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 1000 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD166, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD166 при присоединении ММ по меньшей мере в 10000 раз превышает K_d АВ по отношению к CD166 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления в присутствии CD166, ММ уменьшает способность АВ связывать CD166 по меньшей мере на 90%, когда СМ является нерасщепленной, по сравнению с тем, когда СМ является расщепленной, при анализе *in vitro* с использованием анализа вытеснения мишени например, такого как анализ, описанный в публикации РСТ № WO 2010/081173, полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135-238.

В некоторых вариантах осуществления протеаза, расщепляющая СМ, является активной, например, подвергается повышающей регуляции или в ином случае не подвергается регуляции в пораженной заболеванием ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления протеаза является локализованной совместно с CD166 в ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в два раза превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии) АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в пять раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии) АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом,

что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 10 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии) АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 20 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии) АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 40 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 50 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 100 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD166 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 200 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD166, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид, который содержит первую расщепляемую группу (СМ1), являющуюся субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (ММР), и вторую расщепляемую группу (СМ2), являющуюся субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления каждая из субстратной последовательности СМ1 субстратной последовательности и субстратной последовательности СМ2 субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, которая подвергается или, как считают, подвергается повышающей регуляции или в ином случае не подвергается регуляции в злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, которая подвергается или, как считают, подвергается повышающей регуляции при воспалении. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, которая подвергается или, как считают, подвергается повышающей регуляции при аутоиммунитете.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из матриксной металлопротеиназы (ММР), тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, легумаина и сериновой протеазы, такой как матриптаза (MT-SP1) и урокиназа (uPA). Без связи с теорией, считают, что эти протеазы подвергаются повышающей регуляции или в ином случае не подвергаются регуляции по меньшей мере в одном случае злокачественной опухоли, воспаления и/или аутоиммунитета.

Иллюстративные субстраты включают в себя, но без ограничения, субстраты, расщепляемые одним или несколькими из следующих ферментов или протеаз, перечисленных в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбирают для использования с конкретной протеазой, например, с протеазой, как известно, локализованной совместно с мишенью активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной ММР. Примеры ММР включают в себя ММР, перечисленные в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ММР9, ММР14, ММР1, ММР3, ММР13, ММР17, ММР11 и ММР19. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР9. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР14.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат, содержащий последова-

тельность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 18); SARGPSRW (SEQ ID NO: 19); TARGPSFK (SEQ ID NO: 20); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 22); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 23); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 24); AARGPAIH (SEQ ID NO: 25); RGPANPM (SEQ ID NO: 26); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 27); RGPATPIM (SEQ ID NO: 28); RGPA (SEQ ID NO: 29); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 30); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 31); VHMLPLGFLGP (SEQ ID NO: 32); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 33); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 34); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 35); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 36); PLGL (SEQ ID NO: 37); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318); SGRSANPRG (SEQ ID NO: 319); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 320); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 321); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 322); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 323); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 324); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 325); LSGRSANP (SEQ ID NO: 326); LSGRSANI (SEQ ID NO: 327); LSGRSDNI (SEQ ID NO: 328); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 329); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 330); WATPRPMR (SEQ ID NO: 331); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 332); ISSGL (SEQ ID NO: 333); ISSGLS (SEQ ID NO: 334); и/или ISSGLL (SEQ ID NO: 335).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PLTGRSGG (SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность VHMLPLGFLGP (SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PLGL (SEQ ID NO: 37). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SARGPSRW (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TARGPSFK (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GGWHTGRN (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность HTGRSGAL (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность AARGPAIH (SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RGPANPM (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SSRGPAYL (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RGPATPIM (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RGPA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SGRSANPRG (SEQ ID NO: 319). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDDH (SEQ ID NO: 320). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDIH (SEQ ID NO: 321). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDQH (SEQ ID NO: 322). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDTH (SEQ ID NO: 323). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDYH (SEQ ID NO: 324). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNP (SEQ ID NO: 325). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSANP (SEQ ID NO: 326). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSANI (SEQ ID NO: 327). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNI (SEQ ID NO: 328). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность MIAPVAYR (SEQ ID NO: 329). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RPSPMWAY (SEQ ID NO: 330). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность WATPRPMR (SEQ ID NO: 331). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность FRLLDWQW (SEQ ID NO: 332). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGL (SEQ ID NO: 333). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLS (SEQ ID NO: 334). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLL (SEQ ID NO: 335).

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для MMP и содержит последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 38); QNQLRMA (SEQ ID NO: 39); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 40); STFPFGMF (SEQ ID NO: 41); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 42); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 43); ISSGLSS (SEQ ID NO: 44); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 45); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 46); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 47); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 48); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 49); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 50); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 51); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 53); и/или PAGLWLDP (SEQ ID NO: 54).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 38). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную по-

следовательность QNQALRMA (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность AQNLLGMV (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность STFPFGMF (SEQ ID NO: 41). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PVGYTSSL (SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность DWLYWPGI (SEQ ID NO: 43). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LKAAPRWA (SEQ ID NO: 45). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GPSHLVLT (SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LPGGLSPW (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность MGLFSEAG (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SPLPLRVP (SEQ ID NO: 49). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RMHLRSLG (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LAAPLGLL (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LLAPSHRA (SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PAGLWLDP (SEQ ID NO: 54).

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для тромбина. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для тромбина и содержит последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 55) или GPRSFG (SEQ ID NO: 56). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GPRSFG (SEQ ID NO: 58).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 59); NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 60); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61); TSGRSANP (SEQ ID NO: 62); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 63); WPEGRRS (SEQ ID NO: 64); ILPRSPAF (SEQ ID NO: 65); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 66); QGRAITFI (SEQ ID NO: 67); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 68); и SMLRSMPL (SEQ ID NO: 69).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TSGRSANP (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность VAGRSMRP (SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность WPEGRRS (SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ILPRSPAF (SEQ ID NO: 65). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность MVLGRSLL (SEQ ID NO: 66). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность QGRAITFI (SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SPRSIMLA (SEQ ID NO: 68). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SMLRSMPL (SEQ ID NO: 69).

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для эластазы нейтрофилов. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для легумина. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для цистеиновой протеазы, такой как катепсин.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат СМ1-СМ2 и содержит последовательность

ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2001;

ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71);

AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 72);

TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 73);

VHMPLGFLPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 74);

TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 75);

AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3001;

LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 77);

VHMPGLGFLPGGSLGRSDNH (SEQ ID NO: 78);
 LSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 79);
 LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 80);
 LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 81);
 ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 82);
 LSGRSDNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 83);
 QNQLRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 84);
 LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 85);
 QNQLRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 86);
 ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87);
 GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 336);
 GLSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 337);
 ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2003;
 AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2004;
 AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2005;
 ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2006;
 ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2007;
 ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2008;
 ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2009;
 ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2010;
 ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2011;
 ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2012;
 ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2013;
 AVGLLAPPGGSLGRSDDH (SEQ ID NO: 349), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3006;
 AVGLLAPPGGSLGRSDIH (SEQ ID NO: 350), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3007;
 AVGLLAPPGGSLGRSDQH (SEQ ID NO: 351), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3008;
 AVGLLAPPGGSLGRSDTH (SEQ ID NO: 352), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3009;
 AVGLLAPPGGSLGRSDYH (SEQ ID NO: 353), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3010;
 AVGLLAPPGGSLGRSDNP (SEQ ID NO: 354), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3011;
 AVGLLAPPGGSLGRSANP (SEQ ID NO: 355), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3012;
 AVGLLAPPGGSLGRSANI (SEQ ID NO: 356), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3013;
 ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2014; и/или
 AVGLLAPPGGSLGRSDNI (SEQ ID NO: 358), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3014.

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 73). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность VHMPGLGFLPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 74). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 75). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGSLGRSDNH (SEQ ID NO: 76). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 77). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность VHMPGLGFLPGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 78). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 79). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 80). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит по-

следовательность LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 81). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 83). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность QNQUALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 84). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 85). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность QNQUALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 86). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 336). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность и/или GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 337). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSANP (SEQ ID NO: 347). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLSGRSANI (SEQ ID NO: 348). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356), ISSGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358).

В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз. В некоторых вариантах осуществления каждая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз, где одна из протеаз выбрана из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, лемуаина и матриптазы, и другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз, выбранных из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, лемуаина и матриптазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит по меньшей мере первую CM и вторую CM. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой CM и второй CM представляют собой полипептиды длиной не более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первая CM и вторая CM в активируемом антителе в нерасщепленном состоянии обладают следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM1-CM2-AB или AB-CM2-CM1-MM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой CM и второй CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы, выбранной из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, лемуаина и матриптазы. В некоторых вариантах осуществления первую CM расщепляют посредством первого расщепляющего средства, выбранного из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, лемуаина и матриптазы в ткани-мишени, и вторую CM расщепляют посредством второго расщепляющего средства в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, лемуаина и матриптазы, и первая CM и вторая CM представляют собой различные субстраты для фер-

мента. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой различные протеазы. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство локализованы совместно в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления первая СМ и вторая СМ расщепляются посредством по меньшей мере одного расщепляющего средства в ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело подвергают воздействию протеазы и расщеплению протеазой таким образом, что, в активированном или расщепленном состоянии, активированное антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую по меньшей мере часть последовательности LP2 и/или СМ после расщепления СМ протеазой.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антитело против CD166, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антитело против CD166, содержащее

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSKDKN (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 131);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антитело против CD166, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, показанных в табл. 12, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области легкой цепи, показанных в табл. 12.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD166 человека и/или CD166 яванского макака, что и антитело против CD166, содержащее комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим

последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность NIWWSKDKN (SEQ ID NO: 128);

последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 131);

GITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLHNSGITYLY (SEQ ID NO: 131);

последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей варибельной области тяжелой цепи, показанных в табл. 12, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей варибельной области легкой цепи, показанных в табл. 12.

Пригодные активируемые антитела против CD166 по этому описанию включают в себя также анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD166 человека и/или CD166 яванского макака с антителом против CD166, содержащим комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство, конъюгированное с АВ или АВ активируемого антитела, представляет собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ап антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. Как применяют в настоящем документе, фрагмент токсина представляет собой фрагмент, сохраняющий токсическую активность. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера, содержащего по меньшей мере одну субстратную последовательность CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством нерасщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера, расщепляемого во внутриклеточном или лизосомальном окружении. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство, такое как алкилирующее ДНК средство, расщепляющее ДНК средство, перекрестно сшивающее ДНК средство, интеркалирующее в ДНК средство или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы перечисленных в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с одним или несколькими эквивалентами средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с одним эквивалентом средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более, чем десятью эквивалентами средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является частью смеси активируемых антител, обладающих одинаковым количеством эквивалентов конъюгированных средств. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является частью смеси активируемых антител, обладающих неодинаковым количеством эквивалентов конъюгированных средств. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител является такой, что среднее количество средств, конъюгированных с каждым активируемым антителом составляет между нулем и одним, между одним и двумя, между двумя и тремя, между тремя и четырьмя, между четырьмя и пятью, между пятью и шестью, между шестью и семью, между семью и восемью, между восемью и девятью, между девятью и десятью, и десятью и более. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител является такой, что среднее количество средств, конъюгированных с каждым активируемым антителом, составляет один, два, три, четыре, пять, шесть,

семь, восемь, девять, десять или более. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит одну или несколько сайт-специфических модификаций аминокислотной последовательности, так что количество остатков лизина и/или цистеина увеличивают или уменьшают по отношению к исходной аминокислотной последовательности активируемого антитела, таким образом, в некоторых вариантах осуществления соответственно увеличивая или уменьшая количество средств, которые можно конъюгировать с активируемым антителом, или В некоторых вариантах осуществления ограничивая конъюгацию средств с активируемым антителом сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное активируемое антитело модифицируют с использованием одной или нескольких неприродных аминокислот сайт-специфическим образом, таким образом В некоторых вариантах осуществления ограничивая конъюгацию средств только участками неприродных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой противовоспалительное средство.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также подающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления подающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является конъюгированным с активируемым антителом посредством спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер является конъюгированным с активируемым антителом в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединяют непосредственно к ММ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединяют непосредственно к ММ активируемого антитела в структурной аранжировке от N-конца к С-концу спейсер-ММ-СМ-АВ. Примером спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, является QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, включают в себя QGQSGQG (SEQ ID NO: 305), QGQSG (SEQ ID NO: 306), QGQS (SEQ ID NO: 307), QGQ (SEQ ID NO: 308), QG (SEQ ID NO: 309) и Q. Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, включают в себя GQSGQG (SEQ ID NO: 359), QSGQG (SEQ ID NO: 360), SGQG (SEQ ID NO: 361), GQG (SEQ ID NO: 362) и G. В некоторых вариантах осуществления спейсер не присоединяют к N-концу ММ. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 305). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQSG (SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQS (SEQ ID NO: 307). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QGQ (SEQ ID NO: 308). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QG (SEQ ID NO: 309). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотный остаток Q. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность GQSGQG (SEQ ID NO: 359). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность QSGQG (SEQ ID NO: 360). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SGQG (SEQ ID NO: 361). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность GQG (SEQ ID NO: 362). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность G. В некоторых вариантах осуществления спейсер отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления АВ активируемого антитела естественным образом содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления АВ можно конструировать для включения одной или нескольких дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 121 и 122. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 121 или 122.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120 и 123-126. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126.

нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит один или несколько полипептидов, содержащих комбинацию последовательностей в данной строке табл. А или любую комбинацию маскирующей последовательности (ММ), субстратной последовательности (СМ), последовательности вариабельного домена легкой цепи или последовательностей CDR вариабельного домена легкой цепи и последовательности вариабельного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR вариабельного домена тяжелой цепи из табл. В.

Таблица А

Комбинации активируемых антител против CD166

№. комбинации	Маскирующая последовательность (ММ)	Субстратная последовательность (СМ)	CDR VL, SEQ ID NO	CDR VH, SEQ ID NO
1	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21)	130, 132, 134	127, 128, 129
2	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44)	130, 132, 134	127, 128, 129
3	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318)	130, 132, 134	127, 128, 129
4	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52)	130, 132, 134	127, 128, 129
5	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 32)	130, 132, 134	127, 128, 129
6	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61)	130, 132, 134	127, 128, 129

7	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 39)	130, 132, 134	127, 128, 129
8	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)	130, 132, 134	127, 128, 129
9	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87)	130, 132, 134	127, 128, 129
10	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338)	130, 132, 134	127, 128, 129
11	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339)	130, 132, 134	127, 128, 129
12	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340)	130, 132, 134	127, 128, 129
13	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341)	130, 132, 134	127, 128, 129
14	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342)	130, 132, 134	127, 128, 129
15	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343)	130, 132, 134	127, 128, 129
16	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344)	130, 132, 134	127, 128, 129
17	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345)	130, 132, 134	127, 128, 129
18	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346)	130, 132, 134	127, 128, 129
19	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347)	130, 132, 134	127, 128, 129
20	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348)	130, 132, 134	127, 128, 129
21	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357)	130, 132, 134	127, 128, 129
22	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)	130, 132, 134	127, 128, 129
23	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349)	130, 132, 134	127, 128, 129
24	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350)	130, 132, 134	127, 128, 129
25	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351)	130, 132, 134	127, 128, 129
26	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352)	130, 132, 134	127, 128, 129
27	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353)	130, 132, 134	127, 128, 129
28	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354)	130, 132, 134	127, 128, 129
29	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355)	130, 132, 134	127, 128, 129
30	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356)	130, 132, 134	127, 128, 129
31	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358)	130, 132, 134	127, 128, 129

32	LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	ISSGLLSSGGSGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71)	130, 132, 134	127, 128, 129
33	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21)	130, 132, 134	127, 128, 129
34	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44)	130, 132, 134	127, 128, 129
35	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318)	130, 132, 134	127, 128, 129
36	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52)	130, 132, 134	127, 128, 129
37	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	VHMP LGFLGP (SEQ ID NO: 32)	130, 132, 134	127, 128, 129
38	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61)	130, 132, 134	127, 128, 129
39	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 39)	130, 132, 134	127, 128, 129
40	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)	130, 132, 134	127, 128, 129
41	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87)	130, 132, 134	127, 128, 129
42	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338)	130, 132, 134	127, 128, 129
43	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339)	130, 132, 134	127, 128, 129
44	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340)	130, 132, 134	127, 128, 129
45	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341)	130, 132, 134	127, 128, 129
46	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342)	130, 132, 134	127, 128, 129
47	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343)	130, 132, 134	127, 128, 129
48	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344)	130, 132, 134	127, 128, 129
49	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345)	130, 132, 134	127, 128, 129
50	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346)	130, 132, 134	127, 128, 129
51	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347)	130, 132, 134	127, 128, 129
52	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348)	130, 132, 134	127, 128, 129
53	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357)	130, 132, 134	127, 128, 129
54	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)	130, 132, 134	127, 128, 129
55	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349)	130, 132, 134	127, 128, 129
56	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350)	130, 132, 134	127, 128, 129

57	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351)	130, 132, 134	127, 128, 129
58	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352)	130, 132, 134	127, 128, 129
59	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353)	130, 132, 134	127, 128, 129
60	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354)	130, 132, 134	127, 128, 129
61	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355)	130, 132, 134	127, 128, 129
62	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356)	130, 132, 134	127, 128, 129
63	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358)	130, 132, 134	127, 128, 129
64	LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	ISSGLSSGGSGGSLGRSDNH (SEQ ID NO: 71)	130, 132, 134	127, 128, 129
65	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21)	130, 132, 134	127, 128, 129
66	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44)	130, 132, 134	127, 128, 129
67	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318)	130, 132, 134	127, 128, 129
68	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52)	130, 132, 134	127, 128, 129
69	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 32)	130, 132, 134	127, 128, 129
70	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61)	130, 132, 134	127, 128, 129
71	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 39)	130, 132, 134	127, 128, 129
72	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)	130, 132, 134	127, 128, 129
73	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87)	130, 132, 134	127, 128, 129
74	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338)	130, 132, 134	127, 128, 129
75	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339)	130, 132, 134	127, 128, 129
76	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340)	130, 132, 134	127, 128, 129
77	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341)	130, 132, 134	127, 128, 129
78	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342)	130, 132, 134	127, 128, 129
79	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343)	130, 132, 134	127, 128, 129
80	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344)	130, 132, 134	127, 128, 129
81	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345)	130, 132, 134	127, 128, 129

82	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346)	130, 132, 134	127, 128, 129
83	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347)	130, 132, 134	127, 128, 129
84	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348)	130, 132, 134	127, 128, 129
85	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357)	130, 132, 134	127, 128, 129
86	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)	130, 132, 134	127, 128, 129
87	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349)	130, 132, 134	127, 128, 129
88	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350)	130, 132, 134	127, 128, 129
89	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351)	130, 132, 134	127, 128, 129
90	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352)	130, 132, 134	127, 128, 129
91	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353)	130, 132, 134	127, 128, 129
92	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354)	130, 132, 134	127, 128, 129
93	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355)	130, 132, 134	127, 128, 129
94	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356)	130, 132, 134	127, 128, 129
95	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358)	130, 132, 134	127, 128, 129
96	LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71)	130, 132, 134	127, 128, 129
97	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21)	130, 132, 134	127, 128, 129
98	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44)	130, 132, 134	127, 128, 129
99	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318)	130, 132, 134	127, 128, 129
100	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52)	130, 132, 134	127, 128, 129
101	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	VHMLPGFLGP (SEQ ID NO: 32)	130, 132, 134	127, 128, 129
102	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61)	130, 132, 134	127, 128, 129
103	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 39)	130, 132, 134	127, 128, 129
104	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)	130, 132, 134	127, 128, 129
105	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 87)	130, 132, 134	127, 128, 129
106	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338)	130, 132, 134	127, 128, 129

041958

107	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339)	130, 132, 134	127, 128, 129
108	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340)	130, 132, 134	127, 128, 129
109	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341)	130, 132, 134	127, 128, 129
110	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342)	130, 132, 134	127, 128, 129
111	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343)	130, 132, 134	127, 128, 129
112	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344)	130, 132, 134	127, 128, 129
113	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345)	130, 132, 134	127, 128, 129
114	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346)	130, 132, 134	127, 128, 129
115	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347)	130, 132, 134	127, 128, 129
116	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348)	130, 132, 134	127, 128, 129
117	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357)	130, 132, 134	127, 128, 129
118	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)	130, 132, 134	127, 128, 129
119	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349)	130, 132, 134	127, 128, 129
120	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350)	130, 132, 134	127, 128, 129
121	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351)	130, 132, 134	127, 128, 129
122	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352)	130, 132, 134	127, 128, 129
123	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353)	130, 132, 134	127, 128, 129
124	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354)	130, 132, 134	127, 128, 129
125	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355)	130, 132, 134	127, 128, 129
126	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356)	130, 132, 134	127, 128, 129
127	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358)	130, 132, 134	127, 128, 129
128	LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	ISSGLLSGGSGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71)	130, 132, 134	127, 128, 129

Компоненты активируемых антител против CD166

Маскирующая последовательность (ММ)	Субстратная последовательность (СМ)	VL или CDR VL	VH или CDR VH
LCHPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 219)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 130, 132, 134	SEQ ID NO: 127, 128, 129
LCAPLVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 220)	TGRGPSWV (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 121
LCHALVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 221)	PLTGRSGG (SEQ ID NO: 24)	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 122
LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)	TARGPSFK (SEQ ID NO: 20)	SEQ ID NO: 125	
LCHPLALSAWESCSS (SEQ ID NO: 223)	NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 59)	SEQ ID NO: 126	
LCHPLVASAWESCSS (SEQ ID NO: 224)	NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 60)	SEQ ID NO: 131, 133, 134	
LCHPLVLSAAESCSS (SEQ ID NO: 225)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 61)		
LCHPLVLSAWASCSS (SEQ ID NO: 226)	TSGRSANP (SEQ ID NO: 62)		
HPLVL (SEQ ID NO: 228)	VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 32)		
HPL (SEQ ID NO: 229)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 52)		
LEGWCLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 230)	AQNLLGMV (SEQ ID NO: 40)		
LEGACLHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 231)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 39)		
LEGWCAHPLCLWGAG (SEQ ID NO: 232)	LAAPLGLL (SEQ ID NO: 51)		
LEGWCLAPLCLWGAG (SEQ ID NO: 233)	STFPFGMF (SEQ ID NO: 41)		
LEGWCLHALCLWGAG (SEQ ID NO: 234)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 44)		
LEGWCLHPACLWGAG (SEQ ID NO: 235)	PAGLWLDP (SEQ ID NO: 54)		
LEGWCLHPLCAWGAG (SEQ ID NO: 236)	VAGRSMRP (SEQ ID NO: 63)		
LEGWCLHPLCLAGAG (SEQ ID NO: 237)	VVPEGRRS (SEQ ID NO: 64)		
CLHPLC (SEQ ID NO: 238)	ILPRSPAF (SEQ ID NO: 65)		
	MVLGRSLL (SEQ ID NO: 66)		
	QGRAITFI (SEQ ID NO: 67)		
	SPRSIMLA (SEQ ID NO: 68)		
	SMLRSMPL (SEQ ID NO: 69)		
	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)		
	ISSGLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 71)		
	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 318)		

	SGRSANPRG (SEQ ID NO: 319)		
	LSGRSDDH (SEQ ID NO: 320)		
	LSGRSDIH (SEQ ID NO: 321)		
	LSGRSDQH (SEQ ID NO: 322)		
	LSGRSDTH (SEQ ID NO: 323)		
	LSGRSDYH (SEQ ID NO: 324)		
	LSGRSDNP (SEQ ID NO: 325)		
	LSGRSANP (SEQ ID NO: 326)		
	LSGRSANI (SEQ ID NO: 327)		
	LSGRSDNI (SEQ ID NO: 328)		
	MIAPVAYR (SEQ ID NO: 329)		
	RPSPMWAY (SEQ ID NO: 330)		
	WATPRPMR (SEQ ID NO: 331)		
	FRLLDWQW (SEQ ID NO: 332)		
	ISSGL (SEQ ID NO: 333)		
	ISSGLLS (SEQ ID NO: 334)		
	ISSGLL (SEQ ID NO: 335)		
	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 338)		
	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 339)		
	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 340)		
	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 341)		
	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 342)		
	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 343)		
	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 344)		
	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 345)		
	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 346)		
	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 347)		
	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 348)		
	AVGLLAPPGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 349)		
	AVGLLAPPGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 350)		
	AVGLLAPPGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 351)		
	AVGLLAPPGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 352)		
	AVGLLAPPGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 353)		
	AVGLLAPPGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 354)		
	AVGLLAPPGLSGRSANP (SEQ ID NO: 355)		
	AVGLLAPPGLSGRSANI (SEQ ID NO: 356)		
	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 357)		
	AVGLLAPPGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 358)		
	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 336)		
	GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 337)		

В некоторых вариантах осуществления активируемое антигено по настоящему описанию содержит один или несколько полипептидов, содержащих комбинацию последовательностей, выбранных из табл. А или В, где полипептид содержит комбинацию маскирующей последовательности, выбранной из столбца, озаглавленного "Маскирующая последовательность (ММ)", из табл. А или В, субстратной последовательности из столбца, озаглавленного "Субстратная последовательность (СМ)", из табл. А или В, варибельного домена легкой цепи или CDR легкой цепи из столбца, озаглавленного "VL или CDR VL" или "CDR VL, SEQ ID NO", из табл. А или В, и варибельного домена тяжелой цепи или CDR тяжелой

цепи из столбца, озаглавленного "VH или CDR VH" или "CDR VH, SEQ ID NO", из табл. А или В. Например, активируемое антитело по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации № 54, включающие в себя маскирующую последовательность из SEQ ID NO: 222, субстратную последовательность из SEQ ID NO: 76, переменный домен легкой цепи, включающий в себя последовательности CDR VL из SEQ ID NO: 130, 132 и 134, и переменный домен тяжелой цепи, включающий в себя последовательности CDR VH из SEQ ID NO: 127, 128 и 129. Таким образом, активируемое антитело, содержащее по меньшей мере комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. А, описано в настоящем документе. Подобным образом, любая комбинация маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (SM), последовательности переменного домена легкой цепи или последовательностей CDR переменного домена легкой цепи и последовательности переменного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR переменного домена тяжелой цепи из табл. В, описано в настоящем документе. Активируемое антитело, содержащее по меньшей мере любую комбинацию маскирующей последовательности, субстратной последовательности, переменного домена тяжелой цепи или CDR переменного домена тяжелой цепи, и переменного домена легкой цепи или CDR переменного домена легкой цепи, выбранных из соответствующих столбцов табл. А или В, также описано в настоящем документе. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, активируемое антитело, содержащее по меньшей мере комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. А или любую комбинацию из маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (SM), последовательности переменного домена легкой цепи или последовательностей CDR переменного домена легкой цепи и последовательности переменного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR переменного домена тяжелой цепи из табл. В, можно комбинировать с одним или несколькими токсинами, включая доластин или его производное, ауристатин или его производное, майтанзиноид или его производное, дуокармицин или его производное, калихеамицин или его производное, или пирролобензодиазепин или его производное. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, активируемое антитело, содержащее по меньшей мере комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. А или любую комбинацию маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (SM), последовательности переменного домена легкой цепи или последовательностей CDR переменного домена легкой цепи, и последовательности переменного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR переменного домена тяжелой цепи из табл. В, можно комбинировать с одним или несколькими токсинами, включая ауристатин Е, монометилауристатин F (MMAF), монометилауристатин Е (MMAE), монометилауристатин D (MMAD), майтанзиноид DM4, майтанзиноид DM1, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина и/или дуокармицин.

Любые из комбинаций в табл. А или В, как описано выше, можно комбинировать с константными областями иммуноглобулина человека для получения полностью человеческих IgG, включая IgG1, IgG2, IgG4, или с мутантными константными областями для получения IgG человека с измененными функциями, такими как IgG1 N297A, IgG1 N297Q или IgG4 S228P. Комбинации, описанные в табл. А или В, не являются ограниченными конкретными комбинациями, показанными в любой данной строке, и таким образом, могут включать в себя любую маскирующую последовательность из столбца 2 из табл. А (или столбца 1 из табл. В), комбинированную с любой субстратной последовательностью из столбца 3 из табл. А (или столбца 2 из табл. В), комбинированную с любой последовательностью VL или набором последовательностей CDR VL из столбца 4 из табл. А (или столбца 3 из табл. В), комбинированную с любой последовательностью VH или набором последовательностей CDR VH из столбца 5 из табл. А (или столбца 4 из табл. В). В дополнение к маскирующим последовательностям, описанным в столбце 2 из табл. А или столбце 1 из табл. В, любую маскирующую последовательность, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к субстратным последовательностям, описанным в столбце 3 из табл. А или столбце 2 из табл. В, любую SM, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к последовательности переменного домена легкой цепи или последовательностям CDR легкой цепи, описанным в столбце 4 из табл. А или столбце 3 из табл. В, любую последовательность переменного домена легкой цепи или последовательности CDR легкой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к последовательности переменного домена тяжелой цепи или последовательностям CDR тяжелой цепи, описанным в столбце 5 из табл. А или столбце 4 из табл. В, любую последовательность переменного домена тяжелой цепи или последовательности CDR тяжелой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC) и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) могут содержать один или несколько полипептидов, включающих комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности переменного домена легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи или последовательности переменного домена тяжелой цепи, линкера и токсина в данной строке из табл. С или любую комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности переменного домена легкой цепи и последовательности тяжелой цепи или последовательности переменного домена тяжелой цепи, линкера и токсина из табл. С.

Таблица С

Комбинации антител против CD166 ADC и активируемых антител против CD166 ADC

№. комбинации	Тяжелая цепь (НС) или переменная область НС, SEQ ID NO.	Легкая цепь (LC) или переменная область LC, SEQ ID NO.	Линкер	Токсин
1	122	123	vc	MMAD
2	122	123	PEG2-vc	MMAD
3	122	123	vc	ММАЕ
4	122	123	vc	дуокармицин
5	122	123	spdb	DM4
6	239	240	vc	MMAD
7	239	240	PEG2-vc	MMAD
8	239	240	vc	ММАЕ
9	239	240	vc	дуокармицин
10	239	240	spdb	DM4
11	239	242	vc	MMAD
12	239	242	PEG2-vc	MMAD
13	239	242	vc	ММАЕ
14	239	242	vc	дуокармицин
15	239	242	spdb	DM4
16	239	310	vc	MMAD
17	239	310	PEG2-vc	MMAD
18	239	310	vc	ММАЕ
19	239	310	vc	дуокармицин
20	239	310	spdb	DM4
21	122	363	vc	MMAD
22	122	363	PEG2-vc	MMAD
23	122	363	vc	ММАЕ
24	122	363	vc	дуокармицин
25	122	363	spdb	DM4
26	122	364	vc	MMAD
27	122	364	PEG2-vc	MMAD
28	122	364	vc	ММАЕ
29	122	364	vc	дуокармицин
30	122	364	spdb	DM4
31	239	244	vc	MMAD
32	239	244	PEG2-vc	MMAD
33	239	244	vc	ММАЕ
34	239	244	vc	дуокармицин

35	239	244	spdb	DM4
36	239	312	vc	MMAD
37	239	312	PEG2-vc	MMAD
38	239	312	vc	ММАЕ
39	239	312	vc	дуокармицин
40	239	312	spdb	DM4
41	122	365	vc	MMAD
42	122	365	PEG2-vc	MMAD
43	122	365	vc	ММАЕ
44	122	365	vc	дуокармицин
45	122	365	spdb	DM4
46	122	366	vc	MMAD
47	122	366	PEG2-vc	MMAD
48	122	366	vc	ММАЕ
49	122	366	vc	дуокармицин
50	122	366	spdb	DM4
51	239	246	vc	MMAD
52	239	246	PEG2-vc	MMAD
53	239	246	vc	ММАЕ
54	239	246	vc	дуокармицин
55	239	246	spdb	DM4
56	239	314	vc	MMAD
57	239	314	PEG2-vc	MMAD
58	239	314	vc	ММАЕ
59	239	314	vc	дуокармицин
60	239	314	spdb	DM4
61	122	367	vc	MMAD
62	122	367	PEG2-vc	MMAD
63	122	367	vc	ММАЕ
64	122	367	vc	дуокармицин
65	122	367	spdb	DM4
66	122	368	vc	MMAD
67	122	368	PEG2-vc	MMAD
68	122	368	vc	ММАЕ
69	122	368	vc	дуокармицин
70	122	368	spdb	DM4
71	239	303	vc	MMAD
72	239	303	PEG2-vc	MMAD
73	239	303	vc	ММАЕ
74	239	303	vc	дуокармицин
75	239	303	spdb	DM4
76	239	316	vc	MMAD
77	239	316	PEG2-vc	MMAD
78	239	316	vc	ММАЕ
79	239	316	vc	дуокармицин
80	239	316	spdb	DM4
81	122	369	vc	MMAD
82	122	369	PEG2-vc	MMAD
83	122	369	vc	ММАЕ

84	122	369	vc	дуокармицин
85	122	369	spdb	DM4
86	122	370	vc	MMAD
87	122	370	PEG2-vc	MMAD
88	122	370	vc	ММАЕ
89	122	370	vc	дуокармицин
90	122	370	spdb	DM4
91	239	387	vc	MMAD
92	239	387	PEG2-vc	MMAD
93	239	387	vc	ММАЕ
94	239	387	vc	дуокармицин
95	239	387	spdb	DM4
96	239	388	vc	MMAD
97	239	388	PEG2-vc	MMAD
98	239	388	vc	ММАЕ
99	239	388	vc	дуокармицин
100	239	388	spdb	DM4
101	122	389	vc	MMAD
102	122	389	PEG2-vc	MMAD
103	122	389	vc	ММАЕ
104	122	389	vc	дуокармицин
105	122	389	spdb	DM4
106	122	390	vc	MMAD
107	122	390	PEG2-vc	MMAD
108	122	390	vc	ММАЕ
109	122	390	vc	дуокармицин
110	122	390	spdb	DM4
111	239	391	vc	MMAD
112	239	391	PEG2-vc	MMAD
113	239	391	vc	ММАЕ
114	239	391	vc	дуокармицин
115	239	391	spdb	DM4
116	239	392	vc	MMAD
117	239	392	PEG2-vc	MMAD
118	239	392	vc	ММАЕ
119	239	392	vc	дуокармицин
120	239	392	spdb	DM4
121	122	393	vc	MMAD
122	122	393	PEG2-vc	MMAD
123	122	393	vc	ММАЕ
124	122	393	vc	дуокармицин
125	122	393	spdb	DM4
126	122	394	vc	MMAD
127	122	394	PEG2-vc	MMAD
128	122	394	vc	ММАЕ
129	122	394	vc	дуокармицин
130	122	394	spdb	DM4
131	239	395	vc	MMAD
132	239	395	PEG2-vc	MMAD

133	239	395	vc	ММАЕ
134	239	395	vc	дуокармицин
135	239	395	spdb	DM4
136	239	396	vc	ММАД
137	239	396	PEG2-vc	ММАД
138	239	396	vc	ММАЕ
139	239	396	vc	дуокармицин
140	239	396	spdb	DM4
141	122	397	vc	ММАД
142	122	397	PEG2-vc	ММАД
143	122	397	vc	ММАЕ
144	122	397	vc	дуокармицин
145	122	397	spdb	DM4
146	122	398	vc	ММАД
147	122	398	PEG2-vc	ММАД
148	122	398	vc	ММАЕ
149	122	398	vc	дуокармицин
150	122	398	spdb	DM4
151	239	399	vc	ММАД
152	239	399	PEG2-vc	ММАД
153	239	399	vc	ММАЕ
154	239	399	vc	дуокармицин
155	239	399	spdb	DM4
156	239	400	vc	ММАД
157	239	400	PEG2-vc	ММАД
158	239	400	vc	ММАЕ
159	239	400	vc	дуокармицин
160	239	400	spdb	DM4
161	122	401	vc	ММАД
162	122	401	PEG2-vc	ММАД
163	122	401	vc	ММАЕ
164	122	401	vc	дуокармицин
165	122	401	spdb	DM4
166	122	402	vc	ММАД
167	122	402	PEG2-vc	ММАД
168	122	402	vc	ММАЕ
169	122	402	vc	дуокармицин
170	122	402	spdb	DM4
171	239	427	vc	ММАД
172	239	427	PEG2-vc	ММАД
173	239	427	vc	ММАЕ
174	239	427	vc	дуокармицин
175	239	427	spdb	DM4
176	239	428	vc	ММАД
177	239	428	PEG2-vc	ММАД
178	239	428	vc	ММАЕ
179	239	428	vc	дуокармицин
180	239	428	spdb	DM4
181	122	429	vc	ММАД

182	122	429	PEG2-vc	MMAD
183	122	429	vc	ММАЕ
184	122	429	vc	дуокармицин
185	122	429	spdb	DM4
186	122	430	vc	MMAD
187	122	430	PEG2-vc	MMAD
188	122	430	vc	ММАЕ
189	122	430	vc	дуокармицин
190	122	430	spdb	DM4
191	239	431	vc	MMAD
192	239	431	PEG2-vc	MMAD
193	239	431	vc	ММАЕ
194	239	431	vc	дуокармицин
195	239	431	spdb	DM4
196	239	432	vc	MMAD
197	239	432	PEG2-vc	MMAD
198	239	432	vc	ММАЕ
199	239	432	vc	дуокармицин
200	239	432	spdb	DM4
201	122	433	vc	MMAD
202	122	433	PEG2-vc	MMAD
203	122	433	vc	ММАЕ
204	122	433	vc	дуокармицин
205	122	433	spdb	DM4
206	122	434	vc	MMAD
207	122	434	PEG2-vc	MMAD
208	122	434	vc	ММАЕ
209	122	434	vc	дуокармицин
210	122	434	spdb	DM4
211	239	435	vc	MMAD
212	239	435	PEG2-vc	MMAD
213	239	435	vc	ММАЕ
214	239	435	vc	дуокармицин
215	239	435	spdb	DM4
216	239	436	vc	MMAD
217	239	436	PEG2-vc	MMAD
218	239	436	vc	ММАЕ
219	239	436	vc	дуокармицин
220	239	436	spdb	DM4
221	122	437	vc	MMAD
222	122	437	PEG2-vc	MMAD
223	122	437	vc	ММАЕ
224	122	437	vc	дуокармицин
225	122	437	spdb	DM4
226	122	438	vc	MMAD
227	122	438	PEG2-vc	MMAD
228	122	438	vc	ММАЕ
229	122	438	vc	дуокармицин
230	122	438	spdb	DM4

231	239	439	vc	MMAD
232	239	439	PEG2-vc	MMAD
233	239	439	vc	ММАЕ
234	239	439	vc	дуокармицин
235	239	439	spdb	DM4
236	239	440	vc	MMAD
237	239	440	PEG2-vc	MMAD
238	239	440	vc	ММАЕ
239	239	440	vc	дуокармицин
240	239	440	spdb	DM4
241	122	441	vc	MMAD
242	122	441	PEG2-vc	MMAD
243	122	441	vc	ММАЕ
244	122	441	vc	дуокармицин
245	122	441	spdb	DM4
246	122	442	vc	MMAD
247	122	442	PEG2-vc	MMAD
248	122	442	vc	ММАЕ
249	122	442	vc	дуокармицин
250	122	442	spdb	DM4
251	239	451	vc	MMAD
252	239	451	PEG2-vc	MMAD
253	239	451	vc	ММАЕ
254	239	451	vc	дуокармицин
255	239	451	spdb	DM4
256	239	452	vc	MMAD
257	239	452	PEG2-vc	MMAD
258	239	452	vc	ММАЕ
259	239	452	vc	дуокармицин
260	239	452	spdb	DM4
261	122	453	vc	MMAD
262	122	453	PEG2-vc	MMAD
263	122	453	vc	ММАЕ
264	122	453	vc	дуокармицин
265	122	453	spdb	DM4
266	122	454	vc	MMAD
267	122	454	PEG2-vc	MMAD
268	122	454	vc	ММАЕ
269	122	454	vc	дуокармицин
270	122	454	spdb	DM4
271	239	455	vc	MMAD
272	239	455	PEG2-vc	MMAD
273	239	455	vc	ММАЕ
274	239	455	vc	дуокармицин
275	239	455	spdb	DM4
276	239	456	vc	MMAD
277	239	456	PEG2-vc	MMAD
278	239	456	vc	ММАЕ
279	239	456	vc	дуокармицин

280	239	456	spdb	DM4
281	122	457	vc	MMAD
282	122	457	PEG2-vc	MMAD
283	122	457	vc	ММАЕ
284	122	457	vc	дуокармицин
285	122	457	spdb	DM4
286	122	458	vc	MMAD
287	122	458	PEG2-vc	MMAD
288	122	458	vc	ММАЕ
289	122	458	vc	дуокармицин
290	122	458	spdb	DM4
291	239	459	vc	MMAD
292	239	459	PEG2-vc	MMAD
293	239	459	vc	ММАЕ
294	239	459	vc	дуокармицин
295	239	459	spdb	DM4
296	239	460	vc	MMAD
297	239	460	PEG2-vc	MMAD
298	239	460	vc	ММАЕ
299	239	460	vc	дуокармицин
300	239	460	spdb	DM4
301	122	461	vc	MMAD
302	122	461	PEG2-vc	MMAD
303	122	461	vc	ММАЕ
304	122	461	vc	дуокармицин
305	122	461	spdb	DM4
306	122	462	vc	MMAD
307	122	462	PEG2-vc	MMAD
308	122	462	vc	ММАЕ
309	122	462	vc	дуокармицин
310	122	462	spdb	DM4
311	239	463	vc	MMAD
312	239	463	PEG2-vc	MMAD
313	239	463	vc	ММАЕ
314	239	463	vc	дуокармицин
315	239	463	spdb	DM4
316	239	464	vc	MMAD
317	239	464	PEG2-vc	MMAD
318	239	464	vc	ММАЕ
319	239	464	vc	дуокармицин
320	239	464	spdb	DM4
321	122	465	vc	MMAD
322	122	465	PEG2-vc	MMAD
323	122	465	vc	ММАЕ
324	122	465	vc	дуокармицин
325	122	465	spdb	DM4
326	122	466	vc	MMAD
327	122	466	PEG2-vc	MMAD
328	122	466	vc	ММАЕ

329	122	466	vc	дуокармицин
330	122	466	spdb	DM4
331	239	467	vc	MMAD
332	239	467	PEG2-vc	MMAD
333	239	467	vc	ММАЕ
334	239	467	vc	дуокармицин
335	239	467	spdb	DM4
336	239	468	vc	MMAD
337	239	468	PEG2-vc	MMAD
338	239	468	vc	ММАЕ
339	239	468	vc	дуокармицин
340	239	468	spdb	DM4
341	122	469	vc	MMAD
342	122	469	PEG2-vc	MMAD
343	122	469	vc	ММАЕ
344	122	469	vc	дуокармицин
345	122	469	spdb	DM4
346	122	470	vc	MMAD
347	122	470	PEG2-vc	MMAD
348	122	470	vc	ММАЕ
349	122	470	vc	дуокармицин
350	122	470	spdb	DM4
351	239	471	vc	MMAD
352	239	471	PEG2-vc	MMAD
353	239	471	vc	ММАЕ
354	239	471	vc	дуокармицин
355	239	471	spdb	DM4
356	239	472	vc	MMAD
357	239	472	PEG2-vc	MMAD
358	239	472	vc	ММАЕ
359	239	472	vc	дуокармицин
360	239	472	spdb	DM4
361	122	473	vc	MMAD
362	122	473	PEG2-vc	MMAD
363	122	473	vc	ММАЕ
364	122	473	vc	дуокармицин
365	122	473	spdb	DM4
366	122	474	vc	MMAD
367	122	474	PEG2-vc	MMAD
368	122	474	vc	ММАЕ
369	122	474	vc	дуокармицин
370	122	474	spdb	DM4

Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию или конъюгат активированного антитела с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию может содержать один или несколько полипептидов, включающих в себя комбинацию аминокислотных последовательностей, линкера и токсина, перечисленных в данной строке из табл. С. Таким образом, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию или конъюгат активированного антитела с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию, включающий в себя комбинацию аминокислотных последовательностей, линкера и токсина, перечисленных в данной строке или представленных в форме конкретной комбинации, описан в настоящем документе. Например, конъюгат активированного антитела с лекарственным средством по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации № 55, включающей в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 239, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 246, и линкер-токсин spdb-DM4. В другом примере AADC, раскрытых и описанных в настоящем документе, конъюгат активированного антитела с лекарственным средством по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации по. 33, включающей в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 239, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 244, и линкер-токсин vc-ММАЕ.

Любую из комбинаций в табл. С, где перечислены переменные области тяжелой цепи и легкой

ческим или трифункциональным. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 составляют в форме части промоллекулы привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 составляют в форме части химерного прорецептора антигена (CAR), модифицированной Т-клетки или другого сконструированного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в мультиспецифическое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо мультиспецифического активируемого антитела специфически связывает CD166. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо биспецифического активируемого антитела специфически связывает CD166.

В некоторых вариантах осуществления антитела против CD166, конъюгированные антитела против CD166, активируемые антитела против CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD166, описанные в настоящем документе, используют в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами или комбинацией дополнительных средств. Пригодные дополнительные средства включают в себя современные фармацевтические и/или хирургические терапевтические средства для намеченного применения, например, такого как против злокачественной опухоли. Например, антитела против CD166, конъюгированные антитела против CD166, активируемые антитела против CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD166 можно использовать в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или антинеопластическим средством.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) представляет собой химиотерапевтическое средство, такое как химиотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из доцетаксела, паклитаксела, абраксана (т.е. конъюгированного с альбумином паклитаксела), доксорубина, оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, иринотекана и гемцитабина.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное(ые) средство(средства) представляет(ют) собой ингибитор контрольной точки, ингибитор киназы, ингибиторы нацеливания средства в микроокружении опухолей и/или агониста Т-клеток или NK. В некоторых вариантах осуществления дополнительное(ые) средство(а) представляет(ют) собой радиотерапию, отдельно или в комбинации с другим дополнительным(ыми) средством(ами), такими как химиотерапевтическое средство или антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное(ые) средство(а) представляет(ют) собой вакцину, онковирус, и/или активирующее DC средство, такое как, в качестве неограничивающего примера, агонист toll-подобного рецептора (TLR) и/или α -CD40. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(средства) представляет собой нацеленное на опухоли антитело, разработанное для уничтожения опухоли посредством ADCC или посредством прямой конъюгации с токсином (например, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC)).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD-1, CD166, TIGIT, TIM-3, B7H4 и Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAF_i, MEK_i и Vtk, таких как ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор микроокружения опухолей выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора α -CSF1R, ингибитора α -CCR4, TGF-бета, супрессорной клетки миелоидного происхождения или регуляторной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления агонист выбран из группы, состоящей из OX40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CD166. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой 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-RAF_i. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор MEK_i. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Vtk. 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 TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществле-

ния ингибитор представляет собой регуляторную Т-клетку.

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.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, например, такими как химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство, и/или иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство составляют в одной терапевтической композиции, и антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят одновременно. Альтернативно, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство отделяют друг от друга, например, каждое составляют в отдельной терапевтической композиции, и антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство вводят одновременно, или антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство вводят в различные периоды времени в ходе режима лечения. Например, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят до введения дополнительного средства, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят после введения дополнительного средства, или антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство вводят в режиме чередования. Как описано в настоящем документе, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство вводят в однократных дозах или в множественных дозах.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное(ые) средство(а) вводят одновременно. Например, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное(ые) средство(а) можно составлять в одной композиции или вводить в форме двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство(а) вводят последовательно, или антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство вводят в различные периоды времени в ходе режима лечения.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами такими как, в качестве неограничивающего примера, химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство, такое как алкилирующее средство, антимабиолит, средство против микротрубочек, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический антибиотик и/или любое другое повреждающее нуклеиновую кислоту средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой таксан, такой как паклитаксел (например, абраксан®). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антимабиолит, такой как гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой алкилирующее средство, такое как химиотерапевтическое средство на основе платины, такое как карбоплатин или цисплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой нацеливающее средство, такое как ингибитор киназы, например сорафениб или эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой нацеливающее средство, такое как другое антитело, например моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор протеосомы, такой как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуномодули-

рующее средство, такое как ленолидомид или IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой радиоактивное облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, рассматриваемое специалистами в данной области как стандарт лечения. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство, хорошо известное специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против той же мишени, что и первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, первое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, против CD166. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против мишени, отличной от мишени первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, первого конъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В качестве неограничивающего примера, антитело или антигенсвязывающий фрагмент и/или АВ активируемого антитела является партнером по связыванию для любой мишени из перечисленных в табл. 1.

Таблица 1

Иллюстративные мишени

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
Интегрин альфа-4	CD56	DLK1	Гиалуронидаза	Lewis X	STEAP2
Интегрин альфа-V	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
Интегрин альфа4бета1	CD70	DPP-4	IFNальфа	LRP4	TAPA1
Интегрин альфа4бета7	CD71	DSG1	IFNбета	LRRC26	TGFбета
AGR2	CD74	EGFR	IFNгамма	MCSP	TIGIT
Анти-Lewis-Y		EGFRviii	IgE	Мезотелин	TIM-3
Рецептор апелина J	CD80	Рецептор эндотелина B (ETBR)	Рецептор IgE	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	ЕрсАМ	IGF1R	Муцин-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K АТФаза	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	Эластаза нейтрофилов	TLR8
Компонент комплемента C5	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	F белок of RSV	IL11	Никастрин	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Рецепторы Notch	TNFальфа
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
Карбоангидраза 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rбета1	Notch 2	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	Трансферрин
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	Рецептор трансферрина

CD11a	СЕАСАМ5 (СЕА) Рецептор фолата		IL18	OX-40	TRK-A
CD19	СЕАСАМ6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	КЛАУДИН-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	КЛАУДИН-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFRальфа	VCAM-1
CD25	Коллаген	GITR	IL29	PDGFRбета	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	Фосфатидил-серин	VEGF-D
CD38	CTGF	Рецепторы I Ib/IIIa	GF IL4R	PIGF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIb/IIIa	Рецептор инсулина	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GNMB	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			

В качестве неограничивающего примера, антитело или антигенсвязывающий фрагмент и/или АВ активируемого антитела представляет собой антитело или происходит из антитела из перечисленных в табл. 2.

Таблица 2

Иллюстративные источники Аб

Торговое наименование антитела (наименование антитела)	Мишень
Авастин™ (бевацизумаб)	VEGF
Люцентис™ (ранибизумаб)	VEGF
Эрбитукс™ (цетуксимаб)	EGFR
Вектибикс™ (панитумумаб)	EGFR
Ремикейд™ (инфликсимаб)	TNF α
Хумира™ (адалимумаб)	TNF α
Тисабри™ (натализумаб)	Интегрин α 4
Симулект™ (базиликсимаб)	IL2R
Солирис™ (экулизумаб)	Компонент комплемента C5
Раптива™ (эфализумаб)	CD11a
Вексар™ (тозитумомаб)	CD20
Зевалин™ (тиуксетан ибритутумаба)	CD20
Ритуксан™ (ритуксимаб)	CD20
Окрелизумаб	CD20
Арзерра™ (офатумумаб)	CD20
Газива™ (обинутузумаб)	CD20
Зенапакс™ (даклизумаб)	CD25
Адцетрис™ (ведотин брентуксимаба)	CD30
Миелотарг™ (гемтузумаб)	CD33
Милотарг™ (озогамицин гемтузумаба)	CD33
Кампат™ (алемтузумаб)	CD52
РеоPro™ (абциксимаб)	Рецептор гликопротеина I Ib/IIIa
Ксолар™ (омализумаб)	IgE
Герцептин™ (трастузумаб)	Her2

Кадсила™ (эмтанзин трастузумаба)	Her2
Синагис™ (паливизумаб) (ипилимумаб)	Белок F RSV CTLA-4
(тремелимумаб)	CTLA-4
Hu5c8 (пертузумаб)	CD40L Her2-neu
(эртумаксумаб)	CD3/Her2-neu
Оренсия™ (абатацепт) (танезумаб)	CTLA-4 NGF
(бавитуксумаб)	Фосфатидилсерин
(залутумумаб)	EGFR
(мапатумумаб)	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(эдреколомаб)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Энбрел™ (этанерцепт)	TNF-R
Амевив™ (алефацепт)	1-92-LFA-3
Антрил™, Кинерет™ (анакинра)	IL-1Ra
GC1008	TGFβeta
	Notch, например, Notch 1
	Jagged 1 или Jagged 2
(адекатумумаб)	EpCAM
(фигитумумаб)	IGF1R
(тоцилизумаб)	Рецептор IL-6
Стелара™ (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Пролиа™ (деносумаб)	RANKL

В некоторых вариантах осуществления дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональные антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

Описание относится также к способам получения полипептида антитела против CD166 и/или активируемого антитела против CD166 посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанное в настоящем документе, и/или векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Описание относится к способам получения антитела и/или активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела и/или активируемого антитела, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанное в настоящем документе, и/или векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты.

Изобретение относится также к способу изготовления активируемых антител, которые в активированном состоянии связывают CD166, посредством

(а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD166,

(i) где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы; и

(ii) где СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ММ мешает специфическому связыванию АВ с CD166, и в расщепленном состоянии ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с CD166; и

(b) выделения активируемого антитела. Пригодные АВ, ММ, и/или СМ включают в себя любые из

AB, MM и/или CM, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между CM и AB. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: спейсер-MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM-спейсер.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число по меньшей мере один.

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

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 9), GSSGSGSGG (SEQ ID NO: 10), GSSGSGSGS (SEQ ID NO: 11), GSSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 12), GSSGSGSG (SEQ ID NO: 13) или GSSGSGSGS (SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 15), GSSGT (SEQ ID NO: 16) или GSSG (SEQ ID NO: 17).

Изобретение относится к способам предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, уменьшения симптома или облегчения иным образом опосредованного CD166 заболевания у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту.

Изобретение относится также к способам предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, уменьшения симптома или облегчения иным образом злокачественной опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Известно, что CD166 экспрессируется во множестве злокачественных опухолей, таких как, в качестве неограничивающего примера, любая эпителиальная или плоскоклеточная злокачественная опухоль, любая карциноидная и/или нейроэндокринная злокачественная опухоль. Примеры злокачественных опухолей включают в себя, но без ограничения, аденокарциному, злокачественную опухоль желчных протоков (билиарную), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, например трижды отрицательный рак молочной железы, отрицательный по Her2 рак молочной железы, положительный по рецептору эстрогенов рак молочной железы, карциноидную злокачественную опухоль; рак шейки матки; холангиокарциному; колоректальную; эндометриальную; глиому; рак головы и шеи, например, плоскоклеточный рак головы и шеи; лейкоз; рак печени; рак легкого, например, NSCLC, SCLC; лимфому; меланому; рак ротоглотки; рак яичника; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы, например, метастазирующую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы; рак почки; рак кожи; плоскоклеточный рак, рак желудка; рак яичка; рак щитовидной железы; и уротелиальный рак.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой любую эпителиальную или плоскоклеточную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак шейки матки, рак ротоглотки и/или рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноидную злокачественную опухоль, рак шейки матки, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак эндометрия, эпителиальную злокачественную опухоль, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, меланому, рак ротоглотки, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеполовой системы и/или уротелиальный рак.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из трижды отрицательного рака молочной железы (TNBC), мелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), мутантной по Ras колоректальной карциномы, редких типов эпителиальных злокачественных опухолей, рака ротоглотки, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), и/или рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления зло-

качественная опухоль ассоциирована с экспрессирующей CD166 опухолью. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль обусловлена экспрессирующей CD166 опухолью.

Антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166, используемые в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить на любой стадии заболевания. Например, такое антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 можно вводить пациенту, страдающему злокачественной опухолью на любой стадии, от ранней до метастазирующей. Термины субъект и пациент используют взаимозаменяемо в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающего, такого как человек, нечеловекообразный примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное-компаньона. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное под наблюдением ветеринара.

Антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, ассоциированному с измененной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением или чувствительного к заболеванию или нарушению, ассоциированному с измененной экспрессией и/или активностью CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

Введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD166, считают успешным, если достигают любой из множества лабораторных или клинических целей. Например, введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD166, считают успешным, если один или несколько симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, облегчены, уменьшены, ингибированы или не прогрессируют до следующего, т.е. худшего, состояния. Введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD166, считают успешным, если заболевание или нарушение достигает ремиссии или не прогрессирует до следующего, т.е. худшего, состояния.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, такому как субъекты, страдающие злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, где пораженные заболеванием клетки субъекта экспрессируют CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, или чувствительного к заболеванию или нарушению, где пораженные заболеванием клетки субъекта, экспрессирующие CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против

CD166 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, экспрессирующими CD166, или с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью таких клеток, такому как субъекты, страдающие злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением или чувствительного к заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, экспрессирующими CD166, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

Введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считают успешным, если достигают любой из множества лабораторных или клинических целей. Например, введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считают успешным, если один или несколько симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, облегчены, уменьшены, ингибированы или не прогрессируют до следующего, т.е. худшего, состояния. Введение антитела против CD166, конъюгированного антитела против CD166, активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD166, считают успешным, если заболевание или нарушение достигает ремиссии или не прогрессирует до следующего, т.е. худшего, состояния.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, например, такими как химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство, и/или иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство (средства) вводят одновременно. Например, антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство(средства) можно составлять в одной композиции или вводить в форме двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166, конъюгированное антитело против CD166, активируемое антитело против CD166 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD166 и дополнительное средство (средства) вводят последовательно.

Изобретение относится также к способам и наборам для применения активируемых антител против CD166 и/или конъюгированных активируемых антител против CD166 при множестве диагностических и/или профилактических показаний. Например, изобретение относится к способам и наборам для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и представляющей интерес мишени у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом против CD166, где активируемое антитело против CD166 содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело против CD166 в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с CD166, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и

(б) где, когда АВ находится в нерасщепленном, неактивированном состоянии, ММ мешает специфическому связыванию АВ с CD166, и когда АВ находится в расщепленном, активированном состоянии, ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с CD166; и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела против CD166 у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела против CD166 у

субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство и CD166 присутствуют у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела против CD166 у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство, CD166 или как расщепляющее средство, так и CD166 отсутствуют у субъекта или в образце.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 представляет собой активируемое антитело против CD166, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела против CD166 у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело против CD166 содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов поддающаяся детекции метка включает в себя средство для визуализации, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов средство для визуализации содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастирующее средство содержит иод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент содержит 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), t-димер-2 красного флуоресцентного белка (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридиния. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка содержит метку Alexa Fluor®, такую Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптенев.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих способов субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой не относящегося к человеку млекопитающего, такого как нечеловекообразный примат, животное-компаньона (например, кошку, собаку, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

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

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ используют для идентификации или в ином случае уточнения популяции пациентов, подходящих для лечения с использованием активируемого антитела против CD166 по этому описанию, с последующим лечением посредством введения этого активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166 нуждающемуся в этом субъекту. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, CD166), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела против CD166, при тестировании этими способами идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела против CD166, содержащего такую СМ, и затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела против CD166 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD166, которое тестировали. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени (например, CD166) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, тестированных с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител против CD166, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело против CD166 для лечения (например, активируемое антитело против CD166, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого и/или конъюгированного антитела против CD166, для которого пациент тестирован как положительный. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя

любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать антитело по изобретению и носитель. Эти фармацевтические композиции можно включать в наборы, например такие как диагностические наборы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий связывание различных антител против CD166 по настоящему с белком CD166 человека.

Фиг. 2 представляет собой схематическое представление схемы отбора маскирующих пептидов для антител против CD166 по настоящему описанию. Прямоугольники показывают популяции с параметрами сортировки, указанными между прямоугольниками. Все сортировки FACS проводили в 0,5% BSA с избытком антител против изотипа мыши для блокирования неспецифического связывания с меченным Alexa Fluor 488 Mab M9 (VH из SEQ ID NO: 119, VL из SEQ ID NO: 120).

Фиг. 3А и 3В представляют собой серию графиков, показывающих способность антитела против CD166 CD166 M9 vK1/HcB (VH из SEQ ID NO: 121, VL из SEQ ID NO: 123) по настоящему описанию и различных активируемых антител против CD166 по настоящему описанию связывать CD166 человека.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий способность различных активируемых антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека при протеолитической активации.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий способность различных конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека при протеолитической активации.

Фиг. 6А-6D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 является активированным (т.е. расщепленным) в образцах ткани злокачественных опухолей ободочной кишки и активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 6А и 6С изображены результаты ИНС анализа образцов опухолей и здоровых тканей, и на фиг. 6В и 6D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов опухолей и здоровых тканей.

Фиг. 7А-7D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 является активированным (т.е. расщепленным) в образцах ткани злокачественных опухолей легких, и активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 7А и 7С изображены результаты ИНС анализа образцов опухолей и здоровых тканей, и на фиг. 7В и 7D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов опухолей и здоровых тканей.

Фиг. 8А-8D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 8А и 8С изображены результаты ИНС анализа образцов здоровых тканей, и на фиг. 8В и 8D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов здоровых тканей.

Фиг. 9 представляет собой серию графиков, показывающих активность конъюгированного антитела против CD166 по этому описанию против линии клеток рака молочной железы, линии клеток рака предстательной железы, линии клеток рака поджелудочной железы, линии клеток плоскоклеточного рака головы и шеи и линии клеток без CD166 в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 10 представляет собой график, показывающий эффективность конъюгированного активируемого антитела против CD166 (AADC, комплекс активируемого антитела с лекарственным средством (Activatable Antibody Drug Complex)) по этому описанию в модели рака молочной железы.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий эффективность конъюгата CD166 AADC DM4 по этому описанию в модели H292 немелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий эффективность конъюгата CD166 AADC DM4 по этому описанию в модели H1975 немелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий способность антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека и яванского макака с равной аффинностью.

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий результаты исследования переносимости у яванских макаков с использованием активируемого антитела против CD166 по этому описанию.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий, что конъюгированное активируемое антитело против CD166 по настоящему описанию является хорошо переносимым в планируемой терапевтической дозе.

Фиг. 16А, 16В и 16С представляют собой серию графиков, показывающих способность различных конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека, когда такие конъюгированные активируемые антитела протеолитически активированы.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий способность антител против CD166 по настоящему описанию связывать клетки H292 человека и эпителиальные клетки первичной почки яванского макака со сравнимой аффинностью.

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий способность антител против CD166 по настоящему описанию ингибировать связывание клеток HuT-78 человека с рецептором CD6.

Фиг. 19А-19С представляют собой графики, показывающие способность конъюгатов активируемо-

го антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию связывать CD166 и клетки человека в активированной протеазой (расщепленной) и не активированной (нерасщепленной) формах.

Фиг. 20А и 20В представляют собой графики, показывающие иллюстративный анализ цитотоксичности конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию для клеток H292 и HCC1806 человека.

Фиг. 21А-21D представляют собой графики, показывающие способность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию индуцировать иммунологический ответ в клетках.

Фиг. 22 представляет собой график, показывающий способность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию индуцировать зависимую от антитела клеточную цитотоксичность в клетках.

Фиг. 23 представляет собой графики, показывающие эффективность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против множества моделей ксенотрансплантатов опухолей, полученных из клеток и полученных от пациентов.

Фиг. 24А-24D представляют собой графики, показывающие цитотоксичность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против множества линий клеток, полученных из злокачественных опухолей эндометрия, и анализ, показывающий уровни экспрессии CD166 в полученных из злокачественных опухолей эндометрия клетках.

Фиг. 25А и 25В изображают иллюстративные исследования связывания *in situ* антител против CD166 по настоящему описанию в модели ксенотрансплантата рака легкого.

Фиг. 26 представляет собой график, показывающий эффективность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против модели на мышах ксенотрансплантата злокачественной опухоли легкого.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам (mAb) и активируемым моноклональным антителам, специфически связывающим CD166, известный также как молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов (ALCAM). В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела и активируемые моноклональные антитела интернализуются содержащими CD166 клетками. CD166 представляет собой молекулу клеточной адгезии, связывающую CD6, рецептор клеточной поверхности, принадлежащий к суперсемейству (SRCRSF) богатых цистеином белков рецепторов-мусорщиков (SRCR). Известно, что CD166 ассоциирован с взаимодействиями клетка-клетка и клетка-матрикс, адгезией клеток, миграцией клеток и активацией и пролиферацией Т-клеток. Измененная экспрессия и/или активность CD166 и связанная с CD166 передача сигналов вовлечены в патогенез многих заболеваний и нарушений, таких как злокачественные опухоли, воспаление и аутоиммунитет. Например, CD166 экспрессируется на высоком уровне во множестве типов злокачественных опухолей, например, таких как, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, такой как NSCLC и/или SCLC, рак ротоглотки, рак шейки матки и рак головы и шеи, такой как HNSCC.

Это описание относится к антителам против CD166, конъюгированным антителам против CD166, активируемым антителам против CD166 и/или конъюгированным активируемым антителам против CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела против CD166 используют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Это описание относится к антителам против CD166, конъюгированным антителам против CD166, активируемым антителам против CD166 и/или конъюгированным активируемым антителам против CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела против CD166 используют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Это описание относится к антителам против CD166, конъюгированным антителам против CD166, активируемым антителам против CD166 и/или конъюгированным активируемым антителам против CD166, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, при которых пораженные заболеванием клетки экспрессируют CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD166. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD166. Например, активируемые антитела против CD166 используют в способах лечения,

предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Активируемые антитела против CD166 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD166 содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие CD166, присоединенные к маскирующей группе (ММ), так что присоединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют посредством последовательности, содержащей субстрат для протеазы, например, протеазы, локализованной совместно с CD166 в участке лечения у субъекта.

Иллюстративные активируемые антитела против CD166 по изобретению включают в себя, например, активируемые антитела, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, представляющие собой или происходящие из последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, показанных ниже (последовательности CDR, определенные в соответствии с определением AbM, представленным на веб-узле Др. Andrew C.R. Martin, доступном на [www bioinf org uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/), показаны жирным шрифтом и подчеркнуты).

VH_muM9:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFS**GFSLSTYGMGVC**WIRQPSGKGLEWLANI**WWSEDK**
 HYN**SALKSRLTISKDTSNNQVFLKISSVDTADTATYYCVQIDYGNDYAF**TYWGQGLVTVSA
 (SEQ ID NO: 119)

VL muM9:

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASIS**CRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL**
ASGV**PD**RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG**VYYCAQNLELPY**TFGGG**TKLEIKR** (SEQ ID
 NO: 120)

VH huM9b:

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSTYGMGVC**WIRQPPGKALEWLANI**WWSEDK**
 HYSPLK**SRLTITKDTSKNQVVL**TMTNMDPVD**TATYYCVQIDYGNDYAF**TYWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 121)

VH huM9c:

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSTYGMGVC**WIRQPPGKALEWLANI**WWSEDK**
 HYSPLK**SRLTITKDTSKNQVVL**TITNVD**PVDTATYYCVQIDYGNDYAF**TYWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 122)

VL hM9vK-1:

DIVMTQSPLSLPVT**PGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL**
ASGV**PD**RFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG**VYYCAQNLELPY**TFGGG**TKLEIK** (SEQ ID
 NO: 123)

VL hM9vK-2:

DIVMTQSPLSLPVT**PGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL**
ASGV**PD**RFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG**VYYCAQNLELPY**TFGGG**TKLEIK** (SEQ ID
 NO: 124)

VL hM9vK-3a:

DIVMTQSPLSLPVT**PGEPASISCRSSQSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNR**
ASGV**PD**RFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG**VYYCAQNLELPY**TFGGG**TKLEIK** (SEQ ID
 NO: 125)

VL hM9vK-3b:

DIVMTQSPLSLPVT**PGEPASISCRSSQSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNR**
ASGV**PD**RFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG**VYYCAQNLELPY**TFGGG**TKLEIK** (SEQ ID
 NO: 126)

Иллюстративные активируемые антитела против CD166 по изобретению включают в себя, например, активируемые антитела, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, представляющие собой или происходящие из последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, показанных ниже:

HuCD166_HcC

Аминокислотная последовательность.

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMVGVIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
 HYSPLSKSLRLTITKDTSKNQVVLTIITNVPVDVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGLTVTVSSAS
 TKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPFVAVLQSSGLYLSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 239)

HuCD166_Lc1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL
 ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPTYFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVLCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)

Иллюстративные активируемые антитела против CD166 по изобретению включают в себя, например, активируемые антитела, содержащие комбинацию последовательности определяющей комплементарности области 1 варибельной области тяжелой цепи (CDR1 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH1), последовательности определяющей комплементарность области 2 варибельной области тяжелой цепи (CDR2 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH2), последовательности определяющей комплементарность области 3 варибельной области тяжелой цепи (CDR3 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH3), последовательности определяющей комплементарность области 1 варибельной области легкой цепи (CDR1 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL1), последовательности определяющей комплементарность области 2 варибельной области легкой цепи (CDR2 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL2) и последовательности определяющей комплементарность области 3 варибельной области легкой цепи (CDR3 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL3), где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из

последовательности CDR1 VH, содержащей аминокислотную последовательность GFSLSTYGMVGVG (SEQ ID NO: 127);

последовательности CDR2 VH, содержащей аминокислотную последовательность NIWWSEDKH (SEQ ID NO: 128);

последовательности CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

последовательности CDR1 VL, содержащей аминокислотную последовательность RSSKSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 131);

последовательности CDR2 VL, содержащей аминокислотную последовательность QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

последовательности CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит тяжелую цепь, содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в Публикациях патентных заявок США № 20150071937, 20090070890 и/или 20090203538, полное содержание каждой из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и/или CDR3 VL содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности CDR, показанной в Публикациях патентных заявок США № 20150071937, 20090070890 и/или 20090203538, полное содержание каждой из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит тяжелую цепь, содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит легкую цепь, содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности легкой цепи, показанной в табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит тяжелую цепь, содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в табл. 12, и легкую цепь, содержащую или происходящую из аминокислотной последовательности легкой цепи, показанной в табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит комбинацию последовательностей варибельной области тяжелой це-

VL	DIRMTQSPSFLSASVGRVTITCRASODISSYFAWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>TLRS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QOSYSTPRIT</u> FGQGRLEIK (SEQ ID NO: 253)
Группа C	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIVATSWGQGLVTVSR (SEQ ID NO: 254)
VH	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFNFVYGMNWRQVPGKLEWVSLINGDGGRLRYADSVKGRFTVSRDN SRNSLYLQMNSLRSEDALYYCVKGNFQWQGLVTVSR (SEQ ID NO: 255)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKLEWVSLISGDGGSTYYADSVKDRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYFDYWGQGLVTVSR (SEQ ID NO: 256)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARVMPSSYYYYGMDVWGQGTVTVSR (SEQ ID NO: 257)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYGMVWQGTVTVSR (SEQ ID NO: 258)
VL	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNKIGSKSVHWYQQKQGPVAVLVIYLDLDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTITRVEAEDEADYYCHLWDSGSDQVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 259)
VL	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIGSKSVHWYQQKPGQAPVAVIYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSDDHVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 260)
VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNIGSKNVHWYQQKPGQAPVAVIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVAQAGDEADYYCQVWDSVVFVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 261)
VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDSERPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTQDEADYYCQSYDGVNWFVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 262)
VL	DIQMTQSPSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QOSYSTPVT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 263)
Группа D	
VH/VL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKDNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASRSLLDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGNFMLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPLLVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 475)
VH/VL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKDNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASRSLLDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGNFMLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPLLVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 476)

В некоторых вариантах осуществления активизируемое антитело против CD166 содержит последовательность CDR, показанную в табл. 13, комбинацию последовательностей CDR VL (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в одной строке табл. 13, комбинацию последовательностей CDR VH (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в табл. 13, или комбинацию последовательностей CDR VL и CDR VH (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в табл. 13.

Таблица 13

Последовательности CDR для антител и активируемых антител, связывающих CD166

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
QGDSLRSYYAS (264)	YGKNNRPS (265)	NSRDSSGNP (266)	SYAMS (267)	AISGGGGSTYYADSVK (268)	RSLLDY (269)
QGDSLRSYYAS (264)	YGKNNRPS (265)	NSRDSSGNP (266)	SYAMG (477)	AISGGGGSTYYADSVK (268)	RSLLDY (269)
RASQDISSYFA (270)	AASTLRS (271)	QQSYSTPRIT (272)	SYAMS (267)	AISGGGGSTYYADSVK (268)	GGGVVEF (273)
GGNKIGSKSVH (274)	LDRDRPS (275)	HLWDSSGD (276)	SYAMS (267)	TISGGGGSTYYADSVK (277)	GIVATS (278)
GGNIGSKSVH (279)	YDSRPS (280)	QVWDSSDH (281)	VYGMN (282)	LINGDGGGLRYYADSVK (283)	GNFQQ (284)
GGNIGSKNVH (285)	RDSNRPS (286)	QVWDSS (287)	DYAMH (288)	LISGGGGSTYYADSVK (289)	GNFYDY (290)
TGSSGSIASNY VQ (291)	EDSERPS (292)	QSYDGVN (293)	SYSMN (294)	YISSSSSTIYYADSVK (295)	VMPSYYYYGMDV (296)
RASQSISSYLN (297)	AASSLQS (298)	QQSYSTP (299)	SYGMH (300)	VISYDGNKYYADSVK (301)	YGMDV (302)

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит антитело или происходит из антитела, изготовленного, секретированного или иным образом продуцированного посредством гибридомы, например, такой как гибридома(ы), описанная в публикации патентной заявки США № 20040048319 и депонированная в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером депозита РТА-4478. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит антитело или происходит из антитела, изготовленного, секретированного или иным образом продуцированного посредством гибридомы, например, такой как гибридома(ы), описанная в патенте США № 6022540 и депонированная в ATCC под номером депозита НВ 11789.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 содержит антитело или происходит из антитела, изготовленного, секретированного или иным образом продуцированного посредством гибридомы, например, такой как гибридома(ы), описанная в патенте США № 5998172 и депонированная в ATCC под номером депозита НВ 12136, НВ 12137, НВ 12138, НВ12139, НВ 12140 и/или НВ 12141.

Антитела против CD166 и АВ в активируемых антителах по этому описанию специфически связывают мишень CD166, например, такую как CD166 млекопитающих и/или CD166 человека. В это описание включены также антитела и АВ против CD166, связывающие тот же эпитоп CD166, что и антитело по этому описанию и/или активированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе. В это описание включены также антитела и АВ против CD166, конкурирующие с антителом против CD166 и/или активированным активируемым антителом против CD166, описанным в настоящем документе, за связывание с мишенью CD166, например CD166 человека. В это описание включены также антитела и АВ против CD166, проявляющие перекрестную конкуренцию с антителом против CD166 и/или активированным активируемым антителом против CD166, описанным в настоящем документе, за связывание с мишенью CD166, например CD166 человека.

Активируемые антитела против CD166, представленные в настоящем документе, содержат маскирующую группу. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа представляет собой аминокислотную последовательность, присоединенную или иным образом прикрепленную к антителу против CD166 и расположенную внутри конструкции активируемого антитела против CD166, так что маскирующая группа уменьшает способность антитела против CD166 специфически связывать CD166. Пригодные маскирующие группы идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные маскирующие группы идентифицируют с использованием способов, описанных в публикации РСТ № WO 2009/025846 от Daugherty et al., полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Активируемые антитела против CD166, представленные в настоящем документе, содержат расщепляемую группу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа содержит аминокислотную последовательность, являющуюся субстратом для протеазы, как правило, внеклеточной протеазы. Пригодные субстраты идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные субстраты идентифицируют с использованием способов, описанных в патенте США № 7666817 от Daugherty et al.; в патенте США № 8563269 от Stagliano et al.; и в публикации РСТ № WO 2014/026136 от La Porte et al., полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки (см. также Boulware et al., "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics", *Biotechnol Bioeng.*, 106.3(2010):339-46).

Иллюстративные субстраты включают в себя без ограничения субстраты, расщепляемые посредством одного или нескольких из следующих ферментов или протеаз, перечисленных в табл. 4.

Иллюстративные протеазы и/или ферменты

ADAMS, ADAMTS, например	Цистеиновые протеазы, например,	Сериновые протеазы, например,
ADAM8	Крузипаин	Активированный белок С
ADAM9	Легумаин	Катепсин А
ADAM10	Отубаин-2	Катепсин G
ADAM12		Химаза
ADAM15	KLK, например,	протеазы - факторы свертывания крови
ADAM17/TACE	KLK4	(например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1	KLK5	Эластаза
ADAMTS1	KLK6	Гранзим В
ADAMTS4	KLK7	Гуанидинобензоатаза
ADAMTS5	KLK8	HtrA1
	KLK10	Эластаза нейтрофилов человека
Аспартатные протеазы, например,	KLK11	
ВАСЕ		Лактоферрин
Ранин	KLK13	Марапсин
	KLK14	NS3/4A
		РАСЕ4
Аспартатные катепсины, например,	Металлопротеазы, например,	Плазмин
Катепсин D	Меприн	PSA
Катепсин E	Неприлизин	tPA
	PSMA	Тромбин
Каспазы, например,	BMP-1	Триптаза
Каспаза 1		uPA
Каспаза 2	MMP, например,	
Каспаза 3	MMP1	Трансмембранные сериновые протеазы типа II (TTSP), например,
Каспаза 4	MMP2	DESC1
Каспаза 5	MMP3	DEP-4
Каспаза 6	MMP7	FAP
Каспаза 7	MMP8	Гепсин
Каспаза 8	MMP9	Матриптаза-2
Каспаза 9	MMP10	
Каспаза 10	MMP11	
Каспаза 14	MMP12	MT-SP1/Матриптаза
	MMP13	TMPRSS2
Цистеиновые катепсины, например,	MMP14	TMPRSS3
Катепсин В	MMP15	TMPRSS4
Катепсин С	MMP16	
Катепсин К	MMP17	
Катепсин L	MMP19	
Катепсин S	MMP20	
Катепсин V/L2	MMP23	
Катепсин X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

Активируемые антитела против CD166, описанные в настоящем документе, преодолевают ограничение лекарственных средств на основе антител, в частности, лекарственных средств на основе антител, как известно, токсичных *in vivo*, по меньшей мере, до некоторой степени. Опосредованная мишенью токсичность составляет основное ограничение для разработки терапевтических антител. Активируемые антитела против CD166, представленные в настоящем документе, разработаны для борьбы с токсичностью, ассоциированной с ингибированием мишени в нормальных тканях посредством традиционных терапевтических антител. Эти активируемые антитела против CD166 остаются замаскированными до протеолитической активации в участке заболевания. Начиная с антитела против CD166 в качестве исходного терапевтического антитела, активируемые антитела против CD166 по изобретению конструировали посредством присоединения антитела к ингибирующей маске посредством линкера, содержащего субстрат для протеазы.

Когда АВ модифицировано с использованием ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано, по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью.

K_d АВ, модифицированного с использованием ММ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 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 превышает K_d АВ, не модифицированного с использованием ММ, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с использованием ММ, по отношению к мишени по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000 или 10000 0-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с использованием ММ, или исходного АВ по отношению к мишени.

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

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ является приблизительно равной K_d АВ по отношению к мишени. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ не превышает константу диссоциации АВ по отношению к мишени.

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

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

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не превышающей K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не меньшей, чем K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, приблизительно равной K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, меньшей, чем K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, превышающей K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не более, чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз превышающей K_d для связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, в промежутке между 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1,000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз превышающей K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, не превышающей аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, приблизительно равной аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, не меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, превышающей аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в промежутке между 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000, или 100-1000 раз меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в 2-20 раз меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ не является ковалентно связанной с АВ и при эквимолярной концентрации с АВ не ингибирует связывание АВ с мишенью.

Когда АВ является модифицированным с использованием ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации с использованием ММ можно уменьшать по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, 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*.

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 является модифицированным или связанным с ММ и находится в присутствии мишени, отсутствует связывание или в основном отсутствует связывание АВ с мишенью, или присутствует 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 с использованием 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 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, 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*.

Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным посредством ММ, ММ "маскирует" или уменьшает, или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным посредством ММ, такое связывание или модификация может вызывать структурное изменение, уменьшающее или ингибирующее способность АВ специфически связывать его мишень.

АВ, связанный с ММ или модифицированный посредством ММ, можно представлять посредством следующих формул (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 маскирующую группу, АВ представляет собой антитело или его фрагмент антитела, и L представляет собой линкер. Во многих вариантах осуществления, может являться желательным вводить один или несколько линкеров, например, гибких линкеров, в состав для обеспечения гибкости.

В конкретных вариантах осуществления, ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не обладает или в основном не обладает гомологией ни с каким природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 55, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% сходной с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 20% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела содержат АВ, модифицированный посредством ММ, а также содержат одну или несколько расщепляемых групп (СМ). Такие активируемые антитела обладают активируемым/переключаемым связыванием с мишенью АВ. Активируемые антитела, как правило, содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные посредством маскирующей группы (ММ) или связанные с ней, и поддающуюся модификации или расщепляемую группу (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, служащую субстратом по меньшей мере для одной протеазы.

Элементы активируемых антител аранжированы так, что ММ и СМ расположены таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени, АВ связывает мишень, в то же время, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано. Специфическое связывание АВ с его мишенью можно уменьшать благодаря ингибированию или маскировке посредством ММ способности АВ специфически связывать его мишень.

K_d АВ, модифицированного с использованием ММ и СМ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или более или в промежутке между 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 превышает K_d АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с использованием ММ и СМ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10,000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 10000 0-1000000 или 10000 0-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени.

Когда АВ является модифицированным с использованием ММ и СМ, и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего средства (например, по меньшей мере одной протеазы), специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано, по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или со связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, с его мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации с использованием ММ и СМ можно уменьшать по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, 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*.

Как применяют в настоящем документе, термин расщепленное состояние относится к состоянию активируемых антител после модификации СМ посредством по меньшей мере одной протеазы. Термин нерасщепленное состояние, как применяют в настоящем документе, относится к состоянию активируемых антител в отсутствие расщепления СМ посредством протеазы. Как обсуждают выше, термин "активируемые антитела" применяют в настоящем документе для обозначения активируемого антитела в его нерасщепленном (природном) состоянии, так же как в его расщепленном состоянии. Специалисту в данной области очевидно, что в некоторых вариантах осуществления в расщепленном активируемом антителе может отсутствовать ММ из-за расщепления СМ протеазой, приводящего к высвобождению по меньшей мере одной ММ (например, где ММ не является присоединенной к активируемым антителам посредством ковалентной связи (например, дисульфидной связи между остатками цистеина).

Под активируемым или переключаемым понимают, что активируемое антитело обладает первым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (т.е. первой конформации), и вторым уровнем связывания с мишенью в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е. второй конформации), где второй уровень связывания мишени превышает первый уровень связывания. Как правило, доступ к мишени АВ активируемого антитела больше в присутствии расщепляющего средства, способного расщеплять СМ, т.е. протеазы, чем в отсутствие такого расщепляющего средства. Таким образом, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание АВ с мишенью ингибировано и АВ можно замаскировать от связывания с мишенью (т.е. первая конформация является такой, что АВ не может связывать мишень) и в расщепленном состоянии АВ не является ингибированным или является немаскированным для связывания мишени.

СМ и АВ активируемых антител выбирают таким образом, что АВ представляет собой связывающую группу для данной мишени, и СМ представляет собой субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза локализована совместно с мишенью в участке лечения или в участке диагностики у субъекта. Как применяют в настоящем документе, совместная локализация относится к нахождению в одном и том же участке или относительно близко по соседству. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ, образуя активированное антитело, связывающее мишень, локализованную поблизости от участка расщепления. Активируемые антитела, описанные в настоящем документе, находят конкретное применение, когда, например, протеаза, способная расщеплять участок в СМ, т.е. протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях в содержащей мишень ткани в участке лечения или участке диагностики, чем в ткани в участках, не подлежащих лечению (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ по этому описанию расщепляется также посредством одной или нескольких других протеаз. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой одну или несколько других протеаз, локализованных совместно с мишенью и ответственных за расщепление СМ *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают уменьшенные токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в ином случае могут возникнуть в результате связывания АВ в участках, не подлежащих лечению, если АВ не является замаскированным или его связывание с мишенью иным образом не ингибировано.

Как правило, активируемое антитело можно разрабатывать посредством отбора представляющего интерес АВ и конструирования остального активируемого антитела таким образом, что при конформа-

ционном ограничении ММ обеспечивает маскировку АВ или уменьшение связывания АВ с его мишенью. Структурные критерии дизайна можно принимать во внимание для обеспечения этого функционального признака.

Представлены активируемые антитела, обладающие переключаемым фенотипом желательного динамического диапазона связывания мишени в ингибированной в отличие от неингибированной конформации. Динамический диапазон в основном относится к соотношению (а) максимального детектированного уровня параметра при первом наборе условий к (b) минимальному детектированному значению этого параметра при втором наборе условий. Например, в контексте активируемого антитела, динамический диапазон относится к соотношению (а) максимального детектированного уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ активируемых антител, к (b) минимальному детектированному уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела можно рассчитывать как отношение константы диссоциации при обработке активируемого антитела расщепляющим средством (например, ферментом) к константе диссоциации при обработке активируемых антител расщепляющим средством. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. Активируемые антитела, обладающие относительно более высокими значениями динамического диапазона, (например, более 1), обладают более желательными переключаемыми фенотипами, так что связывание белка-мишени активируемыми антителами происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего средства (например, фермента), способного расщеплять СМ активируемых антител, чем в отсутствие расщепляющего средства.

Активируемые антитела можно предоставлять во множестве структурных конфигураций. Иллюстративные формулы активируемых антител представлены ниже. Конкретно предусмотрено, что порядок от N- до C-конца АВ, ММ и СМ можно сохранять внутри активируемого антитела. Конкретно предусмотрено также, что СМ и ММ могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, так что СМ содержится внутри ММ.

Например, активируемые антитела можно представить следующей формулой (в порядке от amino(N)-концевой области до карбокси(C)-концевой области):

(ММ)-(СМ)-(АВ),
(АВ)-(СМ)-(ММ),

где ММ представляет собой маскирующую группу, СМ представляет собой расщепляемую группу, и АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Следует отметить, что несмотря на то, что ММ и СМ указаны как отдельные компоненты в формуле выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в настоящем документе, предусматривают, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, таким образом, что СМ полностью или частично содержится внутри ММ. Кроме того, в формулах выше представлены дополнительные аминокислотные последовательности, которые можно располагать на N-конце или C-конце от элементов активируемых антител.

В конкретных вариантах осуществления, ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не обладает или в основном не обладает гомологией с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 55, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% сходной с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 55, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 20% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ.

Во многих вариантах осуществления может являться желательным вставлять один или несколько линкеров, например гибких линкеров, в конструкцию активируемого антитела таким образом, чтобы обеспечивать гибкость в одном или нескольких из места стыковки ММ-СМ, места стыковки СМ-АВ или обоих. Например, АВ, ММ, и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желательной гибкости. Поэтому, переключаемый фенотип таких конструкций активируемых антител может получать преимущество от введения одной или нескольких аминокислот для обеспечения гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, когда активируемое антитело предоставляют в форме конформационно ограниченной конструкции, гибкий линкер можно вставлять функционально для облегчения образования и сохранения циклической структуры нерасщепленного активируемого антитела.

Например, в конкретных вариантах осуществления активируемое антитело содержит одну из следующих формул (где формула ниже представляет собой аминокислотную последовательность либо в

направлении от N- к C-концу, либо в направлении от C- к N-концу):

(MM)-L1-(CM)-(AB),
 (MM)-(CM)-L2-(AB),
 (MM)-L1-(CM)-L2-(AB),

где MM, CM, и AB являются такими, как определено выше, где каждый из L1 и L2, независимо и необязательно присутствующий или отсутствующий, представляют собой одинаковые или различные гибкие линкеры, содержащие по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, в вышеуказанных формулах представлены дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены с N-конца или C-конца от элементов активируемых антител. Примеры включают в себя, но без ограничения, нацеливающие группы (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и увеличивающие время полужизни в сыворотке группы (например, полипептиды, связывающие сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточные альбумин (HAS))).

CM специфически расщепляет по меньшей мере одна протеаза со скоростью приблизительно $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или по меньшей мере $0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250$ или $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления CM специфически расщепляется со скоростью приблизительно $100000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления CM специфически расщепляется со скоростью от приблизительно 1×10^2 до приблизительно $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (т.е. от приблизительно 1×10^2 до приблизительно $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Для специфического расщепления ферментом, фермент и CM приводят в контакт. Когда активируемое антитело, содержащее AB, присоединено к MM и CM, находится в присутствии мишени и достаточной активности фермента, CM можно расщеплять. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с CM и осуществлять расщепление. Можно легко предположить, что фермент может находиться поблизости от CM, но являться неспособным к расщеплению из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

Линкеры, пригодные для применения в композициях, описанных в настоящем документе, как правило, представляют собой линкеры, обеспечивающие гибкость модифицированного AB или активируемых антител для облегчения ингибирования связывания AB с мишенью. Такие линкеры, как правило, обозначают как гибкие линкеры. Пригодные линкеры можно легко выбирать, и они могут иметь любую из подходящей различной длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 до 15 аминокислот, от 3 до 12 аминокислот, включая от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот и могут иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 339) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 340), где n представляет собой целое число по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры, и другие гибкие линкеры, известные в данной области. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными, и таким образом, могут являться способными служить нейтральной связкой между компонентами. Глицин охватывает значительно большее пространство фи-пси даже по сравнению с аланином и является намного менее ограниченным, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem., 11173-142 (1992)). Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя, но без ограничения, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 341), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 342), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 343), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 344), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 345), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 346) и т.п. Специалисту в данной области понятно, что дизайн активируемых антител может включать линкеры, являющиеся полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, так же как одну или несколько частей, обеспечивающих менее гибкую структуру, для обеспечения желательной структуры активируемых антител.

Описание относится также к композициям и способам, включающим в себя активируемое антитело против CD166, содержащее антитело или фрагмент антитела (AB), специфически связывающие CD166, где AB связано с маскирующей группой (MM), уменьшающей способность AB связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD166 дополнительно содержит расщепляемую группу (CM), являющуюся субстратом для протеазы. Композиции и способы, представленные в настоящем документе, позволяют присоединение одного или нескольких средств к одному или нескольким остаткам цистеина в AB без нарушения активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела против CD166. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, представленные в настоящем документе, позволяют присоединение одного или нескольких средств к одному или нескольким остаткам цистеина в AB без восстановления или нарушения иным образом одной или нескольких дисульфидных связей внутри MM. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают активируемое антитело против CD166, которое является конъюгированным с одним или несколькими средствами, например, с

любым из множества терапевтических, диагностических и/или профилактических средств, например, В некоторых вариантах осуществления где ни одно из средства(средств) не является конъюгированным с ММ активируемого антитела против CD166. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают конъюгированные активируемые антитела против CD166, в которых ММ сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают конъюгированные активируемые антитела против CD166, в которых активируемое антитело все еще является активированным, т.е. расщепленным, в присутствии протеазы, которая может расщеплять СМ.

Активируемые антитела против CD166 обладают по меньшей мере одной точкой для конъюгации со средством, но в способах и композициях, представленных в настоящем документе, менее, чем все возможные точки конъюгации, являются доступными для конъюгации со средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в межцепевые дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в межцепевые сульфидные связи, но не атомы серы, вовлеченные в внутрицепочечные дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы из цистеина или других аминокислотных остатков, содержащих атом серы. Такие остатки могут встречаться в природе в структуре антитела, или их можно вводить в антитело посредством сайт-направленного мутагенеза, химического превращения или несовпадающего включения неприродных аминокислот.

Представлены также способы получения конъюгата активируемого антитела против CD166, обладающего одной или несколькими межцепевыми дисульфидными связями в АВ и одной или несколькими внутрицепочечными дисульфидными связями в ММ, и представлено лекарственное средство, реакционноспособное по отношению к свободным тиолам. Способ в общем включает в себя частичное восстановление межцепевых дисульфидных связей в активируемом антителе с помощью восстанавливающего средства, например, такого как ТСЕР; и конъюгирование лекарственного средства, реакционноспособного по отношению к свободным тиолам, с частично восстановленным активируемым антителом. Как применяют в настоящем документе, термин частичное восстановление относится к ситуациям, когда активируемое антитело против CD166 приводят в контакт с восстанавливающим средством, и менее, чем все дисульфидные связи, например, менее, чем все возможные участки конъюгации, восстанавливают. В некоторых вариантах осуществления и менее, чем 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или менее чем 5% из всех возможных участков конъюгации являются восстановленными.

В других вариантах осуществления, представлен способ восстановления и конъюгирования средства, например лекарственного средства, с активируемым антителом против CD166, обеспечивающий избирательность расположения средства. Способ в основном включает в себя частичное восстановление активируемого антитела против CD166 с использованием восстанавливающего средства, таким образом, что любые участки конъюгации в маскирующей группе или другой не относящейся к АВ части активируемого антитела не являются восстановленными, и конъюгацию средства с межцепевыми тиолами в АВ. Участок(и) конъюгации выбирают таким образом, чтобы позволять желательное расположение средства, чтобы позволять конъюгации происходить в желательном участке. Восстанавливающее средство представляет собой, например, ТСЕР. Условия реакции восстановления, например, такие как отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу, длительность инкубации, температура во время инкубации, рН восстанавливающего реакционного раствора и т.д., определяют посредством идентификации условий, в которых получают конъюгированное активируемое антитело, в котором ММ сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу против CD166 можно менять в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу против CD166 может лежать в диапазоне от приблизительно 20:1 до 1:1, от приблизительно 10:1 до 1:1, от приблизительно 9:1 до 1:1, от приблизительно 8:1 до 1:1, от приблизительно 7:1 до 1:1, от приблизительно 6:1 до 1:1, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 4:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:1, от приблизительно 20:1 до 1:1,5, от приблизительно 10:1 до 1:1,5, от приблизительно 9:1 до 1:1,5, от приблизительно 8:1 до 1:1,5, от приблизительно 7:1 до 1:1,5, от приблизительно 6:1 до 1:1,5, от приблизительно 5:1 до 1:1,5, от приблизительно 4:1 до 1:1,5, от приблизительно 3:1 до 1:1,5, от приблизительно 2:1 до 1:1,5, от приблизительно 1,5:1 до 1:1,5, или от приблизительно 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществ-

вления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 2,5:1 до 1:1.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ восстановления межцепевых дисульфидных связей в АВ активируемого антитела против CD166 и конъюгации средства, например содержащего тиол средства, такого как лекарственное средство, с полученными межцепевыми тиолами, для избирательного расположения средства(средств) на АВ. Способ в общем включает в себя частичное восстановление АВ с использованием восстанавливающего средства для образования по меньшей мере двух межцепевых тиолов без образования всех возможных межцепевых тиолов в активируемом антителе; и конъюгацию средства с межцепевыми тиолами частично восстановленного АВ. Например, АВ активируемого антитела частично восстанавливают в течение приблизительно 1 часа при приблизительно 37°C при желательном соотношении восстанавливающее средство: активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу может лежать в диапазоне от приблизительно 20:1 до 1:1, от приблизительно 10:1 до 1:1, от приблизительно 9:1 до 1:1, от приблизительно 8:1 до 1:1, от приблизительно 7:1 до 1:1, от приблизительно 6:1 до 1:1, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 4:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:1, от приблизительно 20:1 до 1:1,5, от приблизительно 10:1 до 1:1,5, от приблизительно 9:1 до 1:1,5, от приблизительно 8:1 до 1:1,5, от приблизительно 7:1 до 1:1,5, от приблизительно 6:1 до 1:1,5, от приблизительно 5:1 до 1:1,5, от приблизительно 4:1 до 1:1,5, от приблизительно 3:1 до 1:1,5, от приблизительно 2:1 до 1:1,5, от приблизительно 1,5:1 до 1:1,5, или от приблизительно 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 2,5:1 до 1:1.

Содержащий тиол реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающее средство может представлять собой, например, ТСЕР. В некоторых вариантах осуществления восстановленное активируемое антитело можно очищать перед конъюгацией, с использованием например, хроматографии на колонке, диализа или диафильтрации. Альтернативно восстановленное антитело не очищают после частичного восстановления и перед конъюгацией.

Изобретение относится также к частично восстановленным активируемым антителам против CD166, в которых по меньшей мере одна межцепевая дисульфидная связь в активируемом антителе восстановлена с использованием восстанавливающего средства без затрагивания каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD166, маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью CD166, и расщепляемую группу (СМ) присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединена к АВ посредством СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) активируемого антитела не затронуты восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) ММ внутри активируемого антитела не затронуты восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство представляет собой ТСЕР.

Описание относится также к частично восстановленным активируемым антителам, в которых по меньшей мере одна межцепевая дисульфидная связь в активируемом антителе восстановлена с использованием восстанавливающего средства без затрагивания любых внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, например CD166, маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемую группу (СМ) присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединена к АВ посредством СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(и) активируемого антитела не затронута восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(и) ММ внутри активируемого антитела не затронута восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство представляет собой ТСЕР.

В других вариантах осуществления с использованием способа восстановления и конъюгации средства, например лекарственного средства, с активируемым антителом против CD166 получают избира-

тельность расположения средства посредством предоставления активируемого антитела против CD166 с определенным количеством и расположением остатков лизина и/или цистеина. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина выше или ниже количества соответствующих остатков в аминокислотной последовательности исходного антитела или активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может приводить к определенному количеству эквивалентов средства, которое можно конъюгировать с антителом против CD166 или активируемым антителом против CD166. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может приводить к определенному количеству эквивалентов средства, которое можно конъюгировать с антителом против CD166 или активируемым антителом против CD166 сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное активируемое антитело модифицируют с использованием одной или нескольких неприродных аминокислот сайт-специфическим образом, таким образом, В некоторых вариантах осуществления ограничивая конъюгацию средств только участками неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD166 или активируемое антитело против CD166 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина можно частично восстанавливать с использованием восстанавливающего средства, как обсуждают в настоящем документе, так что любые участки конъюгации в маскирующей группе или другой не относящейся к АВ части активируемого антитела не восстанавливают, и конъюгации средства с межцепевыми тиолами в АВ.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описанные в настоящем документе, содержат также средство, конъюгированное с активируемым антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное средство представляет собой лекарственное средство, такое как противовоспалительное и/или антинеопластическое средство. В таких вариантах осуществления, средство является конъюгированным с углеводной группой активируемого антитела, например, В некоторых вариантах осуществления где углеводная группа локализована вне антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой цитотоксическое средство, такое как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

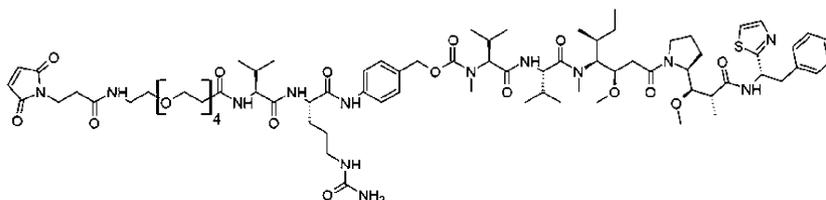
В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой поддающуюся детекции группу например, такую как метка или другой маркер. Например, средство представляет собой или содержит радиоактивно меченную аминокислоту, одну или несколько биотинилированных групп, которые можно детектировать посредством меченого авидина (например, стрептавидина, обладающего флуоресцентным маркером или ферментативной активностью, которую можно детектировать посредством оптических или калориметрических способов), одного или нескольких радиоактивных изотопов или радиоактивных ядер, одной или нескольких флуоресцентных меток, одной или нескольких флуоресцентных меток и/или одного или нескольких хемиллюминесцентных средств. В некоторых вариантах осуществления поддающиеся детекции средства присоединены посредством спейсерных молекул.

Описание относится также к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). Пригодные цитотоксические средства включают в себя, например, доластатины и их производные (например, ауристатин Е, АFР, ММАF, ММАЕ, ММАD, DMAF, DMAE). Например, средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ) или монометилауристатин D (ММАD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из групп, перечисленных в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (ММАD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

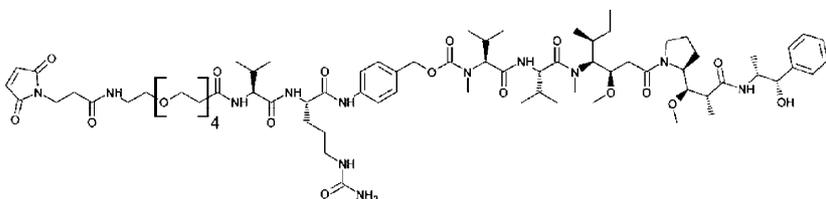
В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин или линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин В некоторых вариантах осуществления

средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "vc-MMAD". В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "vc-MMAE". В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-бис-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонила, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "PEG2-vc-MMAD". Структуры vc-MMAD, vc-MMAE, и PEG2-vc-MMAD показаны ниже.

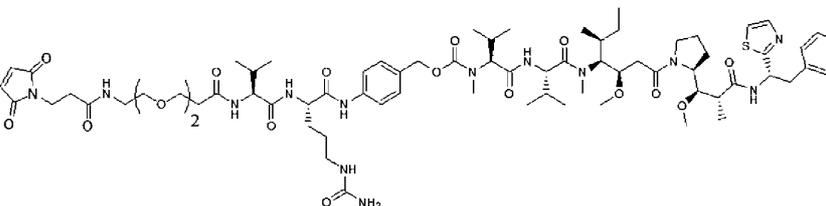
vc-MMAD:



vc-MMAE:



PEG2-vc-MMAD:



Нагрузка для С-26

Описание относится также к конъюгированным активируемым антителам, содержащим активируемое антитело, связанное с нагрузкой монометилауристатина D (MMAD), где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, и СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы ММР.

В некоторых вариантах осуществления осуществления конъюгированное с MMAD активируемое антитело можно конъюгировать с использованием любого из нескольких способов присоединения средств к АВ:

- присоединение к углеводным группам АВ, или
- присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или
- присоединение к аминогруппам АВ, или
- присоединение к карбоксилатным группам АВ.

В некоторых вариантах осуществления нагрузка MMAD является конъюгированной с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка MMAD является конъюгированной с цистеином в АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка MMAD является конъюгированной с лизином в АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка MMAD является конъюгированной с другим остатком АВ посредством линкера, таким как остатки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой содержащий тиол 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, показанных в табл. 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка MMAD связаны посредством линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления

активируемое антитело и нагрузка MMAD связаны посредством линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка MMAD связаны посредством линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка MMAD связаны посредством линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления нагрузка MMAD является конъюгированной с АВ с использованием технологии частичного восстановления и конъюгации, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления компонент полиэтиленгликоля (PEG) линкера по настоящему описанию сформирован из 2 мономеров этиленгликоля, 3 мономеров этиленгликоля, 4 мономеров этиленгликоля, 5 мономеров этиленгликоля, 6 мономеров этиленгликоля, 7 мономеров этиленгликоля, 8 мономеров этиленгликоля, 9 мономеров этиленгликоля или по меньшей мере 10 мономеров этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления по настоящему описанию, компонент PEG представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления по настоящему описанию компонент PEG представляет собой неразветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный компонент PEG является функционализированным с использованием аминогруппы или ее производного, карбоксильной группы или ее производного или как аминогруппы или ее производного, так и карбоксильной группы или ее производного.

В некоторых вариантах осуществления компонент PEG линкера по настоящему описанию представляет собой amino-тетраэтиленгликоль-карбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент PEG линкера по настоящему описанию представляет собой amino-триэтиленгликоль-карбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент PEG линкера по настоящему описанию представляет собой amino-диэтиленгликоль-карбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления amino-производное представляет собой формирование амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой, с которой оно конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой формирование амидной связи между карбоксильной группой и аминогруппой, с которой оно конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления а карбоксил производное представляет собой формирование сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой оно конъюгировано.

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают в себя цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *mordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *saraparia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Множество радиоактивных изотопов доступны для получения радиокоњугированных антител. Примеры включают в себя ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства получают с использованием множества бифункциональных средств для сшивания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдидитиол) пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие, как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радиоактивного изотопа с антителом. (См. WO94/11026).

В табл. 5 перечислены некоторые из иллюстративных лекарственных средств, которые можно применять в описании, описанном в настоящем документе, но это никаким образом не рассматривают как исчерпывающий список.

Таблица 5

Иллюстративные лекарственные средства для конъюгации	
<u>ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА</u>	
Ауристатины	Турбостатин
Ауристин Е	Фенстатины
Монометилауристин D (MMAD)	Гидроксибенфенстатин
Монометилауристин Е (MMAE)	Спонгистатин 5
Десметилауристин Е (DMAE)	Спонгистатин 7
Ауристин F	Галистатин 1
Монометилауристин F (MMAF)	Галистатин 2
Десметилауристин F (DMAF)	Галистатин 3
Производные ауристинина, например, его амиды	Модифицированные бриостатины
Ауристинтирамин	Галокомпстатины
Ауристинхинолин	Пирролобензимидазолы (PBI)
Доластатины	Цибростатин 6
Производные доластатина	Доксалиформ
Доластатин 16 DmJ	Аналоги антрациклинов
Доластатин 16 Dpv	
Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4	
Производные майтанзиноида	Аналог сематодина (SemCH ₂ -SH)
	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (PE38)
Дуокармицин	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38)
Производные дуокармицина	ZJ-101
Альфа-аманитин	OSW-1
Антрациклины	4-нитробензилоксикарбонил
Доксорубин	Производные Об-бензилгуанина
	Ингибиторы топоизомеразы
Даунорубин	Гемиастерлин
Бриостатины	Цефалотаксин
Камптотецин	Гомогаррингтонин
Производные камптотецина	Димеры пирролобензодиазепина (PBD)
7-замещенный камптотецин	Пирролобензодиазепины
10, 11-	
Диформетилендиоксикамптотецин	Функционализированные пирролобензодиазепины
Комбретастатины	Функционализированные димеры пирролобензодиазепинов
Дебромаплисиатоксин	Калихеамицины
Кагалалид-Ф	Подофиллотоксины
Дискодермолит	Таксаны
Эктеинасцидины	Алкалоиды барвинка
<u>ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА</u>	
Ацикловир	
Vira A	
Симметрел	
<u>ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ СРЕДСТВА</u>	
Нистатин	
<u>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ</u>	
<u>АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА</u>	
Адриамицин	¹¹¹ In
Церубидин	¹²³ I
Блеомицин	¹³¹ I
Алкеран	^{99m} Tc
Велбан	²⁰¹ Tl
Онковин	¹³³ Xe
Фторурацил	¹¹ C
Метотрексат	⁶² Cu
Тиотепа	¹⁸ F
Бисантрон	⁶⁸ Ga
Новантрон	¹³ N
Тиогуанин	¹⁵ O
Прокарбизин	³⁸ K
<u>ПОДДАЮЩИЕСЯ КОНЪЮГАЦИИ РЕАГЕНТЫ</u>	
<u>ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ</u>	
	Флуоресцеин и его производные
	Изотиоцианат флуоресцеина (FITC)
<u>РАДИОАКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ</u>	
<u>СРЕДСТВА</u>	

Цитарабин

 ^{82}Rb ^{99}mTc (Технеций)АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

Аминогликозиды

Стрептомицин

Неомицин

Канамицин

Амикацин

Гентамицин

Тобрамицин

Стрептомицин В

Спектиномицин

Ампициллин

Сульфаниламид

Полимиксин

Хлорамфеникол

ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Барий

Золото

Платина

СРЕДСТВА ПРОТИВ МИКОПЛАЗМЫ

Тилозин

Спектиномицин

Специалисту в данной области известно, что большое множество возможных групп можно присоединять к антителам, полученным по этому описанию (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Stuse and R.E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки).

Присоединение можно осуществлять посредством любой химической реакции, связывающей две молекулы, при условии, что антитело и другая группа сохраняют их соответствующую активность. Это связывание может включать в себя множество химических механизмов, например ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. В некоторых вариантах осуществления связывание, однако, представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание можно осуществлять либо посредством прямой конденсации существующих боковых цепей, либо посредством включения внешних молекул-мостиков. Множество двухвалентных или поливалентных связывающих средств можно использовать для соединения белковых молекул, таких как антитела по настоящему описанию, с другими молекулами. Например, репрезентативные связывающие средства могут включать в себя органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Это перечисление не предназначено, чтобы являться исчерпывающим для различных классов связывающих средств, известных в данной области, но вместо этого является иллюстративным для наиболее распространенных связывающих средств (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)).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к композициям и способам, представленным в настоящем документе, конъюгированное активируемое антитело можно также модифицировать для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность активируемого антитела. Эти модифицированные аминокислотные последовательности разработаны, чтобы обеспечивать контролируемое расположение и/или дозирование конъюгированного средства внутри конъюгированного активируемого антитела. Например, активируемое антитело можно конструировать для включения замен на цистеин в положениях легкой и тяжелой цепей, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и ни оказывают отрицательного влияния на сворачивание и сборку белка, ни изменяют связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конструировать для включения или введения иным образом одного или нескольких не природных аминокислотных остатков в активируемое антитело для обеспечения пригодных участков для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конструировать для включения или введения иным образом ферментативно активируемых пептидных последовательностей в последовательность активируемого антитела.

Пригодные линкеры описаны в литературе (см., например, Ramakrishnan S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), где описано применение MBS (М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного сложного эфира). См. также, патент США № 5030719, где описано применение галогенированного производного ацетилгидразида, присоединенного к антителу посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления пригодные линкеры включают в себя

- (i) EDC (гидрохлорид (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид);
- (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)пропионамид]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. #2165-G); и
- (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., Кат. #24510), конъюгированный

с EDC.

Дополнительные линкеры включают в себя, но без ограничения, SMCC ((сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат), или сульфо-SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат).

Описанные выше линкеры содержат компоненты, имеющие различные характеристики, что приводит к получению конъюгатов с различными физико-химическими свойствами. Например, сложные эфиры сульфо-NHS с алкилкарбоксилатами являются более стабильными, чем сложные эфиры сульфо-NHS с ароматическими карбоксилатами. Линкеры, содержащие сложные эфиры NHS, являются менее растворимыми, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с увеличенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, являются менее стабильными, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, уменьшая количество доступного конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может увеличивать стабильность карбодимидных связывающих средств. Карбодимидные связывающие средства (такие как EDC) при использовании в сочетании с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, более устойчивые к гидролизу, чем соединения, полученные посредством только реакции карбодимидного сочетания.

В некоторых вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления линкеры являются нерасщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления присутствуют два или более линкера. Два или более линкера все являются одинаковыми, т.е. расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкера являются различными, т.е. по меньшей мере один расщепляемый и по меньшей мере один нерасщепляемый.

По настоящему описанию используют несколько способов присоединения средств в АВ:

- (a) присоединение к углеводным группам АВ, или
- (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или
- (c) присоединение к аминок группам АВ, или
- (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ.

В соответствии с описанием АВ можно ковалентно присоединять к средству посредством промежуточного линкера, обладающего по меньшей мере двумя реакционноспособными группами, одной для реакции с АВ и одной для реакции со средством. Линкер, который может включать в себя любое совместимое органическое соединение, можно выбирать таким образом, что реакция с АВ (или средством) не оказывает неблагоприятного воздействия на реакционную способность и избирательность АВ. Кроме того, присоединение линкера к средству может не нарушать активность средства. Пригодные линкеры для реакции с окисленными антителами или окисленными фрагментами антител включают в себя 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 их можно вводить посредством подходящей химической модификации линкеров, не содержащих таких групп.

В соответствии с настоящим описанием, пригодные линкеры для присоединения восстановленных АВ, включают в себя линкеры, содержащие реакционноспособные группы, способные к реакции с сульфгидрильной группой восстановленного антитела или фрагмента. Такие реакционноспособные группы включают в себя, но без ограничения, реакционноспособные галоалкильные группы (включая, например, галоацетильные группы), *p*-ртутьбензоатные группы и группы, способные к реакциям присоединения Михаэля (включая, например, малеинимиды и группы типа, описанного в Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc., 101:3097-3110).

В соответствии с настоящим описанием, пригодные линкеры для присоединения к ни окисленным, ни восстановленным АВ, включают в себя линкеры, обладающие определенными функциональными группами, способными к реакции с первичными аминок группами, присутствующими на немодифицированных остатках лизина в АВ. Такие реакционноспособные группы включают в себя, но без ограничения, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры NHS, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры сульфо-NHS, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры 4-нитрофенила, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры пентафторфенила, ацилимидазола, изоцианаты и изотиоцианаты.

В соответствии с настоящим описанием, пригодные линкеры для присоединения к ни окисленным, ни восстановленным АВ, включают в себя линкеры, обладающие конкретными функциональными группами, способными к реакции с группами карбоновой кислоты, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в АВ, активированных с использованием пригодных реагентов. Пригодные активирующие реагенты включают в себя EDC, с добавлением или без добавления NHS или сульфо-NHS, и другие дегидратирующие средства, используемые для формирования карбоксиамида. В этих случаях, функциональные группы, присутствующие в пригодных линкерах, могут включать в себя первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксилamina и гидразида.

Средство можно присоединять к линкеру до или после того, как линкер присоединяют к АВ. При

конкретных применениях может являться желательным сначала получить промежуточное соединение АВ-линкер, в котором линкер является свободным от ассоциированного средства. В зависимости от конкретного применения конкретное средство можно ковалентно присоединять к линкеру. В некоторых вариантах осуществления АВ сначала присоединяют к ММ, СМ и ассоциированным линкерам и затем присоединяют к линкеру для целей конъюгации.

Разветвленные линкеры.

В конкретных вариантах осуществления, используют разветвленные линкеры, обладающие множеством участков для присоединения средств. Для линкеров со множеством участков, одно ковалентное присоединение к АВ может приводить к промежуточному соединению АВ-линкер, способному связывать средство в нескольких участках. Участки могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы, или любой химический участок, к которому можно присоединять средства.

В некоторых вариантах осуществления более высокой специфической активности (или более высокого соотношения средств к АВ) можно достигать посредством присоединения линкера с одним участком во множестве участков на АВ. Это множество участков можно вводить в АВ любым из двух способов. Во-первых, можно получать множество альдегидных групп и/или сульфгидрильных групп в одном и том же АВ. Во-вторых, можно присоединять к альдегиду или сульфгидрилу АВ "разветвленный линкер", обладающий множеством функциональных участков для последующего присоединения к линкерам. Функциональные участки разветвленного линкера или линкера с множеством участков могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы, или могут представлять собой любые химические участки, к которым можно присоединять линкеры. Еще более высокую специфическую активность можно получать посредством комбинации этих двух способов, т.е. присоединения линкеров со множеством участков в нескольких участках на АВ.

Расщепляемые линкеры.

Пептидные линкеры, являющиеся чувствительными к расщеплению ферментами системы комплемента, такими как, но без ограничения, у-активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, трипсин, плазмин или другой фермент, обладающий протеолитической активностью, можно использовать в одном варианте осуществления по настоящему описанию. В соответствии с одним способом по настоящему описанию, средство присоединяют посредством линкера, чувствительного к расщеплению посредством комплемента. Антитело выбирают из класса, который может активировать комплемент. Конъюгат антитело-средство, таким образом, активирует каскад реакций комплемента и высвобождает средство в участке-мишени. В соответствии с другим способом по настоящему описанию, средство присоединяют посредством линкера, чувствительного к расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как у-активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, плазмин или трипсин. Эти расщепляемые линкеры можно использовать в конъюгированных активируемых антителах, содержащих внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, показанных в табл. 5.

Неограничивающие примеры расщепляемых последовательностей линкеров представлены в табл. 6.

Таблица 6

Иллюстративные последовательности линкеров для конъюгации
 Типы расщепляемых последовательностей Amino Acid Sequence

Расщепляемые плазмином
 последовательности

Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 90)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 91)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 92)
Стафилокиназа	SSSFDKGYKKGDDA (SEQ ID NO: 93)
	SSSFDKGYKRGDDA (SEQ ID NO: 94)

Расщепляемые фактором Ха
 последовательности

IEGR (SEQ ID NO: 95)
IDGR (SEQ ID NO: 96)
GGSIDGR (SEQ ID NO: 97)

Расщепляемые MMP последовательности

Желатиназа А	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
--------------	------------------------

Расщепляемые коллагеназой
 последовательности

Коллаген кожи телят (цепь α1(I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 99)
Коллаген кожи телят (цепь α2(I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 100)
Коллаген бычьего хряща (цепь α1(II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 101)
Коллаген печени человека (цепь α1(III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 102)
α ₂ M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 103)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 104)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 105)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 106)
α ₁ M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 107)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 108)
α ₂ M крысы	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 109)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 110)
α ₁ I ₃ (2J) крысы	ESLPVAV (SEQ ID NO: 111)
α ₁ I ₃ (27J) крысы	SAPAVESE (SEQ ID NO: 112)
Коллагеназа фибробластов человека (аутолитическое расщепление)	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 113)
	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 114)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 115)
	PVQFIGPQ (SEQ ID NO: 116)

Кроме того, средства можно присоединять посредством дисульфидных связей (например, дисульфидных связей на молекуле цистеина) с АВ. Поскольку многие опухоли естественным образом высвобождают высокие уровни глутатиона (восстанавливающего средства), это может восстанавливать дисульфидные связи с последующим высвобождением средства в участке доставки. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство, которое может модифицировать СМ, может модифицировать также линкер конъюгированного активируемого антитела.

Спейсерные и расщепляемые элементы.

В некоторых вариантах осуществления может являться необходимым конструировать линкер таким образом, чтобы оптимизировать расстояние между средством и АВ активируемого антитела. Это можно осуществлять посредством использования линкера общей структуры



где W представляет собой либо -NH--CH₂-, либо -CH₂-,

Q представляет собой аминокислоту, пептид, и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать спейсерный элемент и расщепляемый элемент. Спейсерный элемент служит для расположения расщепляемого элемента вдали от сердцевины АВ, так что расщепляемый элемент является более доступным для фермента, ответственного за расщепление. Конкретные разветвленные линкеры, описанные выше, могут служить в качестве спейсерных элементов.

На протяжении этого описания, следует понимать, что присоединение линкера к средству (или спейсерного элемента к расщепляемому элементу, или расщепляемого элемента к средству) не обязательно должно представлять собой конкретный способ присоединения или реакцию. Любая реакция,

обеспечивающая продукт подходящей стабильности и биологической совместимости, является приемлемой.

Комплемент сыворотки и выбор линкеров.

В соответствии с одним способом по настоящему описанию, когда высвобождение средства является желательным, используют АВ, представляющее собой антитело класса, который может активировать комплемент. Полученный конъюгат сохраняет способность как связывать антиген, так и активировать каскад реакций комплемента. Таким образом, в соответствии с этим вариантом осуществления по настоящему описанию, средство присоединяют к одному концу расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, и другой конец линкерной группы присоединяют к специфическому участку на АВ. Например, если средство обладает гидроксигруппой или аминогруппой, его можно присоединять к карбокси-концу пептида, аминокислоты или другого подходящим образом выбранного линкера посредством сложноэфирной или амидной связи, соответственно. Например, такие средства можно присоединять к линкерному пептиду посредством карбодимидной реакции. Если средство содержит функциональные группы, которые могут мешать присоединению к линкеру, эти мешающие функциональные группы можно блокировать перед присоединением и разблокировать после получения конъюгата продукта или промежуточного соединения. Противоположный, или amino-конец, линкера затем используют либо напрямую, либо после дополнительной модификации, для связывания с АВ, способным активировать комплемент.

Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут иметь любую желательную длину, один их конец можно ковалентно присоединять к специфическим участкам на АВ активируемого антитела. Другой конец линкера или спейсерного элемента можно присоединять к аминокислоте или пептидному линкеру.

Таким образом, когда эти конъюгаты связывают антиген в присутствии комплемента, амидная или сложноэфирная связь, присоединяющая средство к линкеру, расщепляется, приводя к высвобождению средства в его активной форме. Эти конъюгаты при введении субъекту могут осуществлять доставку и высвобождение средства в участке-мишени и являются особенно эффективными для доставки *in vivo* лекарственных средств, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных средств и т.п., как представлено, но без ограничения, в табл. 5.

Линкеры для высвобождения без активации комплемента: В другом применении направленной доставки, является желательным высвобождение средства без активации комплемента, поскольку активация каскада реакций комплемента в конечном счете может лизировать клетку-мишень. Таким образом, этот способ можно использовать, когда доставку и высвобождение средства необходимо выполнить без уничтожения клетки-мишени. Такова цель, если является желательной доставка клеточных медиаторов, таких как гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейротрансмиттеры, гены или ферменты, в клетки-мишени. Эти конъюгаты можно получать посредством присоединения средства к АВ, не способному активировать комплемент, посредством линкера, слабо чувствительного к расщеплению сывороточными протеазами. Когда этот конъюгат вводят индивидууму, комплексы антиген-антитело образуются быстро, в то время как расщепление средства происходит медленно, что таким образом приводит к высвобождению в участке-мишени.

Биохимические перекрестно сшивающие средства.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конъюгировать с одним или несколькими лекарственными средствами с использованием конкретных биохимических перекрестно сшивающих средств. Перекрестно сшивающие реагенты формируют молекулярные мостики, связывающие функциональные группы двух различных молекул. Для связывания двух различных белков ступенчатым способом, можно использовать гетеро-бифункциональные перекрестно сшивающие линкеры, включающие образование нежелательного гомополимера.

Можно использовать также пептидные линкеры, расщепляемые лизосомальными протеазами, например Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, можно использовать неустойчивые к кислотам линкеры, расщепляемые в окружении низкого pH лизосомы, например бис-сиалиловый эфир. Другие пригодные линкеры включают в себя неустойчивые к катепсину субстраты, в частности, обладающие оптимальными функциями при кислотном pH.

Иллюстративные гетеро-бифункциональные перекрестно сшивающие средства приведены в табл. 7.

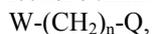
Иллюстративные гетеро-бифункциональные перекрестно сшивающие средства

Линкер	Реакционная способность	Преимущества и применения	Длина спейсерного плеча после перекрестного сшивания (Ангстрем)
SMPT	Первичные амины Сульфгидрилы	Большая стабильность	11,2 Å
SPDP	Первичные амины Сульфгидрилы	Тиолирование Расщепляемое перекрестное сшивание	6,8 Å
LC-SPDP	Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	15,6 Å
Сульфо-LC-SPDP	Сульфгидрилы Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	15,6 Å
SMCC	Сульфгидрилы Первичные амины	Водорастворимый Стабильная реакционноспособная группа малеинимида	11,6 Å
Сульфо-SMCC	Сульфгидрилы Первичные амины	Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-белок-носитель Стабильная реакционноспособная группа малеинимида	11,6 Å
MBS	Первичные амины Сульфгидрилы	Водорастворимый Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-белок-носитель	9,9 Å
Сульфо-MBS	Первичные амины Сульфгидрилы	Водорастворимый	9,9 Å
SIAB	Первичные амины	Конъюгация фермент-антитело	10,6 Å
Сульфо-SIAB	Сульфгидрилы Первичные амины	Водорастворимый	10,6 Å
SMPB	Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо Конъюгация фермент-антитело	14,5 Å
Сульфо-SMPB	Сульфгидрилы Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	14,5 Å
EDE/Сульфо-NHS	Сульфгидрилы Первичные амины	Водорастворимый Конъюгация гаптен-носитель	0
ABN	Карбоксильные группы Углеводы Неизбирательная	Реакция с сахарными группами	11,9 Å

Нерасщепляемые линкеры или прямое присоединение.

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию, можно конъюгировать конъюгат, так чтобы доставлять средство к мишени, но не высвободить. Это можно осуществлять посредством присоединения средства к АВ либо напрямую, либо посредством нерасщепляемого линкера.

Эти нерасщепляемые линкеры могут включать в себя аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые можно модифицировать с включением функциональных групп, которые затем можно использовать для присоединения к АВ способами, описанными в настоящем документе. Общая формула для такого органического линкера может представлять собой



где W представляет собой либо -NH-CH₂-, либо -CH₂-,

Q представляет собой аминокислоту, пептид, и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

Нерасщепляемые конъюгаты.

В некоторых вариантах осуществления соединение можно присоединять к АВ, которые не активируют комплемент. При использовании АВ, неспособных к активации комплемента, это присоединение можно осуществлять с использованием линкеров, чувствительных к расщеплению посредством активированного комплемента, или с использованием линкеров, не чувствительных к расщеплению посредством активированного комплемента.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно также составлять в форме иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, 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 патентов США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

Особенно пригодные липосомы можно получать способом обращенно-фазового испарения из липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatized фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор для получения липосом желательного диаметра. Фрагменты Fab' антитела по настоящему описанию можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена.

Определения.

Если не определено иначе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим описанием, должны иметь значения, являющиеся общепринятыми для специалиста в данной области. Термин объект относится к одному или нескольким таким объектам, например соединение относится к одному или нескольким соединениям, поэтому, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать взаимозаменяемо. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе должны включать множественное число и термины во множественном числе должны включать единственное число. В общем номенклатура, используемая в связи с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией и химией и гибридизацией белков и олиго-или полинуклеотидов, и в их способах, описанная в настоящем документе, является хорошо известной и общепринятой в данной области. Стандартные способы используют для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, и культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как является общепринятым в данной области или как описано в настоящем документе. Вышеупомянутые способы и процедуры обычно проводят в соответствии с общепринятыми способами, как хорошо известно в данной области, и как описано в различных и более специализированных ссылках, упомянутых и обсуждаемых на протяжении настоящего описания. 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 аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, и в их лабораторных процедурах и способах, описанная в настоящем документе, является хорошо известной и общепринятой в данной области. Стандартные способы используют для химического синтеза, химических анализов, фармацевтических препаратов, составов и доставки и лечения пациентов.

Как применяют в соответствии с настоящим описанием, следующие термины, если не указано иначе, следует понимать как имеющие следующие значения.

Как применяют в настоящем документе, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов (Ig), т.е. молекулам, содержащим антигенсвязывающий участок, специфически связывающий антиген (иммунореактивный по отношению к антигену). Под "специфически связывает" или "иммунореактивный по отношению к" или "иммуноспецифически связывает" означает, что антитело вступает в реакцию с одной или несколькими антигенными детерминантами желательного антигена и не вступает в реакцию с другими полипептидами или связывается с ними с намного более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают в себя, но без ограничения, поликлональные, моноклональные, химерные, доменное антитело, отдельную цепь, Fab и фрагменты F(ab')₂, scFvs и экспрессирующую библиотеку Fab.

Известно, что базовая структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи содержит варибельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за узнавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Как правило, молекулы антител, полученных от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга по характеру тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Конкретные классы имеют также подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Более того, у человека, легкая цепь может представлять собой цепь каппа или цепь ламбда.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела", как применяют в настоящем документе, относится к популяции молекул антитела, содержащей только одну молекулярную разновидность молекул антитела, состоящую из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела являются идентичными у всех молекул популяции. MAb содержат антигенсвязывающий участок, способный к иммунной реакции с конкретным эпитопом антигена, характеризующейся уникальной аффинностью связывания с ним.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "связывающая часть" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий участок сформирован аминокислотными остатками N-концевых переменных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три высоко разнообразных фрагмента внутри V областей тяжелой и легкой цепей, обозначенные как "гипервариабельные области", расположены между более консервативными фланкирующими фрагментами, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые обнаружены в природе между гипервариабельными областями иммуноглобулинов и рядом с ними. В молекуле антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи расположены по отношению друг к другу в трехмерном пространстве таким образом, чтобы формировать антигенсвязывающую поверхность.

Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепей обозначены как "определяющие комплементарность области" или "CDR". Отнесение аминокислот к каждому из доменов осуществляется в соответствии с определениями по Rabat 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).

Как применяют в настоящем документе, термин "эпитоп" включает в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином, scFv или T-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включают в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или T-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Например, антитела могут образовываться против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Говорят, что антитело специфически связывает антиген, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления ≤ 10 нМ.

Как применяют в настоящем документе, термины "специфическое связывание", "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям того типа, который возникает между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин является специфическим. Силу, или аффинность взаимодействий иммунологического связывания можно выражать в отношении константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньшая K_d представляет большую аффинность. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов можно оценивать количественно с использованием способов, хорошо известных в данной области. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий участок/антиген, где эти скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, в равной степени влияющих на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константу скорости связывания" (K_{on}), так и "константу скорости диссоциации" (K_{off}) можно определять посредством расчета концентраций и фактических скоростей связывания и диссоциации (см. Nature, 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет устранить все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_d (см. в общем Davies et al. (1990), Annual. Rev. Biochem., 59:439-473). Говорят, что антитело по настоящему описанию 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 приблизительно 1 пМ, как измерено посредством таких анализов, как анализы связывания радиоактивных лигандов или подобные анализы, известные специалистам в данной области.

Термин "выделенный полинуклеотид", как применяют в настоящем документе, должен обозначать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторые их комбинации, где в силу своего происхождения "выделенный полинуклеотид" (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" обнаружен в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в качестве части большей последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с описанием включают в себя молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе.

Термин "выделенный белок", упомянутый в настоящем документе, обозначает белок с кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или некоторые их комбинации, где в силу своего происхождения или источника получения, "выделенный белок" (1) не ассоциирован с белками, обнаруженными в природе, (2) является свободным от других белков из этого же источника, например, свободным от мышечных белков, (3) экспрессируется клетками из другого вида или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" применяют в настоящем документе в качестве общего термина для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Таким образом, фрагменты и аналоги нативного белка являются видами из рода полипептидов. Полипептиды в соответствии с описанием содержат тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, и легкую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, так же как молекулы антител, образованные комбинациями, содержащими тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов с легкой цепью молекул иммуноглобулинов, таких как легкая цепь каппа молекул иммуноглобулинов, и наоборот, так же как их фрагменты и аналоги.

Термин "природный", как применяют в настоящем документе по отношению к объекту, относится к тому факту, что объект можно обнаружить в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была целенаправленно модифицирована человеком в лаборатории или иначе, является встречающейся в природе.

Термин "функционально связанный", как применяют в настоящем документе, относится к расположению описываемых таким образом компонентов в такой взаимосвязи, которая позволяет им функционировать предназначенным для них образом. Контрольную последовательность, "функционально связанную" с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности происходит в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "контрольная последовательность", как применяют в настоящем документе, относится к полинуклеотидным последовательностям, необходимым для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина: у прокариот такие контрольные последовательности, как правило, включают в себя промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают в себя промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" предназначен для обозначения, как минимум, всех компонентов, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых обеспечивает преимущество, например лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию. Термин "полинуклеотид", как упомянуто в настоящем документе, обозначает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает в себя одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Термин олигонуклеотид, как упомянуто в настоящем документе, включает в себя природные и модифицированные нуклеотиды, соединенные друг с другом природными и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, как правило, имеющих длину 200 оснований или менее. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину 10-60 оснований, и в некоторых вариантах осуществления длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут являться двухцепочечными, например, для применения в конструировании генного мутанта. Олигонуклеотиды по этому описанию являются смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами.

Термин "природные нуклеотиды", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфороанилиотиоатные, фосфоранилататные, фосфороимидатные и т.п. 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., Anticancer Drug Design, 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, p. 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). Олигонуклеотид может включать метку для детекции, если желательно.

Как применяют в настоящем документе, двадцать общераспространенных аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют общепринятому применению. См. Immunology - A Synthesis (2nd edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцать общераспространенных аминокислот, неприродные аминокислоты,

такие как α - α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламино кислоты, молочная кислота, и другие необычные аминокислоты, также могут являться пригодными компонентами полипептидов по настоящему описанию. Примеры необычных аминокислот включают в себя 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В аннотации полипептидов, применяемой в настоящем документе, направление влево является направлением к амино-концу и направление вправо является направлением к карбокси-концу, в соответствии со стандартным применением и условными обозначениями.

Подобным образом, если не указано иначе, левый конец одноцепочечной полинуклеотидной последовательности является 5'-концом, направление влево двухцепочечной полинуклеотидной последовательности обозначено 5'-направлением. Направление присоединения от 5' к 3' растущих транскриптов РНК обозначено как направление транскрипции. Области последовательности цепи ДНК, обладающие такой же последовательностью, что и РНК, и расположенные к 5' от 5'-конца транскрипта РНК, обозначены как "вышележащие последовательности", области последовательности цепи ДНК, обладающие такой же последовательностью, что и РНК, и расположенные к 3' от 3'-конца транскрипта РНК, обозначены как "нижележащие последовательности".

Применительно к полипептидам термин "значительная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, посредством программы GAP или BESTFIT с использованием штрафов за пропуски по умолчанию разделяют по меньшей мере 80-процентную идентичность последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95-процентную идентичность последовательностей и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99-процентную идентичность последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления остатки в положениях, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Как обсуждают в настоящем документе, незначительные изменения аминокислотных последовательностей молекул антител или иммуноглобулинов предусмотрены как охватываемые настоящим описанием при условии, что варианты аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80, 90, 95% и в некоторых вариантах осуществления 99%. В частности, предусмотрены консервативные аминокислотные замены.

Консервативными заменами являются те, которые происходят в пределах семейства аминокислот, родственных по их боковым цепям. Генетически кодированные аминокислоты в общем делят на следующие 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 в себя аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают в себя аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают в себя

- (i) серин и треонин, которые образуют алифатически-гидрофильное семейство;
- (ii) аспарагин и глутамин, которые образуют содержащее амид семейство;
- (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые образуют алифатическое семейство; и
- (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые образуют ароматическое семейство.

Например, разумно ожидать, что изолированная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или подобная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не будет оказывать значительного эффекта на связывание или свойства полученной молекулы, особенно, если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном участке. Получен ли в результате замены аминокислоты функциональный пептид, можно легко определять посредством анализа специфической активности полипептидного производного. Анализы подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты или аналоги молекул антител или иммуноглобулинов может легко получать специалист в данной области. Пригодные амино- и карбокси-концы фрагментов или аналогов расположены рядом с границами функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать посредством сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или находящимися в частной собственности базами данных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления компьютеризованные способы сравнения используют для идентификации мотивов последовательностей или предсказания конформационных доменов белка, присутствующих в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации белковых

последовательностей, которые укладываются в известную трехмерную структуру. Bowie et al., Science, 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что специалист в данной области может распознавать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые можно использовать для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с описанием.

Пригодными аминокислотными заменами являются те, которые

- (1) уменьшают чувствительность к протеолизу,
- (2) уменьшают чувствительность к окислению,
- (3) изменяют аффинность связывания при образовании белковых комплексов,
- (4) изменяют аффинность связывания, и
- (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов.

Аналоги могут включать в себя различные мутации последовательности, отличные от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, единичные или множественные аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены) можно выполнять в природной последовательности (например, в части полипептида за пределами домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты).

Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна проявлять тенденцию к разрушению спирали, существующей в исходной последовательности, или разрушать другие типы вторичной структуры, характеризующих исходную последовательность). Примеры известных в данной области 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 и J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature*, 354:105 (1991).

Термин "фрагмент полипептида", как применяют в настоящем документе, относится к полипептиду, который обладает амино-концевой и/или карбокси-концевой делецией и/или одной или несколькими внутренней(ими) делецией(ями), но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность является идентичной соответствующим положениям в природной последовательности, выведенной, например, из полномерной 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, обычно длину по меньшей мере 50 аминокислот, и в некоторых вариантах осуществления длину по меньшей мере 70 аминокислот. Термин "аналог", как применяют в настоящем документе, относится к полипептидам, состоящим из фрагмента из по меньшей мере 25 аминокислот, обладающим значительной идентичностью с частью выведенной аминокислотной последовательности и обладающим специфическим связыванием с мишенью, в подходящих для связывания условиях. Как правило, полипептидные аналоги содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления длину по меньшей мере 50 аминокислот или более, и часто могут достигать в длину размера полномерного встречающегося в природе полипептида.

Термин "средство" применяют в настоящем документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

Как применяют в настоящем документе, термины "метка" или "меченый" относятся к включению поддающегося детекции маркера, например, посредством включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинилированных групп, которые можно детектировать посредством меченого авидина (например, стрептавидина, обладающего флуоресцентным маркером или ферментативной активностью, которую можно детектировать посредством оптических или калориметрических способов). В конкретных ситуациях метка или маркер могут также являться терапевтическими. Разные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают в себя, но без ограничения, следующие: радиоактивные изотопы 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, лантаниды фосфора), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинилированные группы, predeterminedенные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары лейциновой молнии, участки связывания вторичных антител, связывающие металл домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединяют с помощью спейсерных плечей различной длины для уменьшения потенциальных стерических затруднений. Термин "фармацевтический агент или лекарственное средство", как применяют в настоящем документе, относится к химическому соединению или композиции, способным индуцировать желательный терапевтический эффект при надлежащем введении пациенту.

Другие химические термины в настоящем документе используют в соответствии с общепринятым в

данной области применением, как проиллюстрировано в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Как применяют в настоящем документе, "в основном чистый" означает, целевые объекты являются преобладающими присутствующими объектами (т.е. в молярном отношении, они являются более многочисленными, чем любые другие индивидуальные объекты в композиции), и В некоторых вариантах осуществления в основном очищенная фракция представляет собой композицию, где целевые объекты составляют по меньшей мере приблизительно 50% (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных объектов.

Как правило, в основном чистая композиция содержит более чем приблизительно 80% от всех макромолекулярных объектов, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления более чем приблизительно 85, 90, 95 и 99%. В некоторых вариантах осуществления целевые объекты очищены до по существу гомогенного состояния (загрязняющие объекты невозможно детектировать в композиции общепринятыми способами детекции), где композиция состоит в основном из одного вида макромолекулярных объектов.

Термин "пациент" включает в себя человека и ветеринарных субъектов.

Антитела и/или активируемые антитела по этому описанию специфически связывают данную мишень, например, человеческий белок-мишень, такой как CD166 человека. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, связывающие тот же эпитоп, что и антитела и/или активируемые антитела, описанные в настоящем документе. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, конкурирующие с антителом против CD166 и/или активируемым антителом против CD166, описанным в настоящем документе, за связывание с CD166, например CD166 человека. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, проявляющие перекрестную конкуренцию с антителом против CD166 и/или активируемым антителом против CD166, описанным в настоящем документе, за связывание с CD166, например CD166 человека.

Специалисту в данной области понятно, что возможно определить, без излишнего экспериментирования, обладает ли моноклональное антитело (например, мышинное моноклональное или гуманизированное антитело) такой же специфичностью, что и моноклональное антитело, используемое в способах, описанных в настоящем документе, посредством проверки, предотвращает ли первое связывание последнего с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по этому описанию, как показано по уменьшению связывания моноклонального антитела по этому описанию, тогда два моноклональных антитела связывают один и тот же или близко родственный эпитоп. Альтернативным способом определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по этому описанию, является предварительная инкубация моноклонального антитела по этому описанию с мишенью и затем добавление тестируемого моноклонального антитела для определения того, ингибирована ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать мишень. Если тестируемое моноклональное антитело ингибировано, тогда по всей вероятности оно обладает такой же или функционально эквивалентной эпитопной специфичностью, что и моноклональные антитела по этому описанию.

Мультиспецифические активируемые антитела.

Описание относится также к мультиспецифическим активируемым антителам против CD166. Мультиспецифические активируемые антитела, представленные в настоящем документе, представляют собой мультиспецифическое антитела, которые узнают CD166 и по меньшей мере один или более других антигенов или эпитопов и которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (ММ), связанную по меньшей мере с одним антигенсвязывающим или эпитопсвязывающим доменом мультиспецифического антитела, так что присоединение ММ уменьшает способность антигенсвязывающего или эпитопсвязывающего домена связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют к антигенсвязывающему или эпитопсвязывающему домену мультиспецифического антитела посредством расщепляемой группы (СМ), функционирующей в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. Активируемые мультиспецифические антитела, представленные в настоящем документе, являются стабильными в кровотоке, активируются в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани, и при активации демонстрируют связывание с мишенью, по меньшей мере сравнимое со связыванием соответствующего, немодифицированного мультиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения иммуноэффекторных клеток, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие иммуноэффекторные клетки мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения лейкоцитов, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие лейкоциты мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения Т-клеток, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие Т-клетки мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела привлекают поверхностный антиген на

лейкоците, например на Т-клетке, на клетке естественном киллере (NK), на миелоидной мононуклеарной клетке, на макрофаге и/или на другой иммуноэффекторной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой клетку NK. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой мононуклеарную клетку, например миелоидную мононуклеарную клетку. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для связывания или взаимодействия иным образом с более чем одной мишенью и/или с более чем одним эпитопом, они также обозначены в настоящем документе как нацеленные на множество антигенов активируемые антитела. Как применяют в настоящем документе, термины "мишень" и "антиген" используют взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления привлекающие иммуноэффекторные клетки мультиспецифические активируемые антитела по этому описанию содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD166, и привлекающие иммуноэффекторные клетки антитело или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или привлекающего иммуноэффекторные клетки антитела или его антигенсвязывающей части замаскирован. В некоторых вариантах осуществления привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую иммуноэффекторные клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую иммуноэффекторные клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления не привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело представляет собой нацеленное на злокачественную опухоль антитело. В некоторых вариантах осуществления не являющееся эффектором иммуноцитов антитело представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на CD166 антитело (например, не являющееся эффектором иммуноцитов антитело) представляет собой IgG и привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой клетку NK. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой миелоидную мононуклеарную клетку.

В некоторых вариантах осуществления привлекающие Т-клетки мультиспецифические активируемые антитела по этому описанию содержат нацеленное на CD166 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеленного на CD166 антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или привлекающего Т-клетку антитела или его антигенсвязывающей части замаскирован. В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую Т-клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую привлекающую Т-клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) та-

ким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166.

В некоторых вариантах осуществления привлекающего иммуноэффекторные клетки мультиспецифического активируемого антитела, один антиген представляет собой CD166, и другой антиген представляет собой, как правило, стимулирующий или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, клетки естественного киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммуноэффекторной клетки, такой как, но без ограничения, 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 клетки NK; примеры таких стимулирующих рецепторов включают в себя, но без ограничения, CD3, CD27, CD28, CD137 (обозначенный также 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 в себя, но без ограничения, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 и экспрессируемые NK KIR. Домен антитела, придающий специфичность к поверхностному антигену Т-клетки можно также заменить на лиганд или домен лиганда, связывающий Т-клеточный рецептор, рецептор клетки NK, рецептор макрофага и/или рецептор другой иммуноэффекторной клетки, такой как, но без ограничения, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2 или TNFSF9.

В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки мультиспецифическое активируемое антитело содержит scFv против CD3 эpsilon (CD3ε, также обозначаемый в настоящем документе как CD3ε и CD3) и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv против CD3ε и/или нацеливающего антитела или его антигенсвязывающей части замаскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD166, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD166.

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, связывающие первую мишень и/или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие 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 различных мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела связывают два или более различных эпитопа 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 из двух или более различных мишеней и двух или более различных эпитопов на одной и той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее IgG, обладает замаскированными вариabельными доменами IgG. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее scFv, обладает замаскированными доменами scFv. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из вариabельных доменов IgG присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из доменов scFv присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из вариabельных доменов IgG присоединен к маскирующей группе и по меньшей мере один из доменов scFv присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где каждый из вариabельных доменов IgG и доменов scFv присоединен к своей собственной маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени

и другой домен антитела обладает специфичностью для поверхностного антигена Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени и другой домен антитела обладает специфичностью для другого антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для эпитопа антигена-мишени, и другой домен антитела обладает специфичностью для другого эпитопа антигена-мишени.

В мультиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с карбокси-концом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с карбокси-концом легкой цепи активируемого антитела IgG, или с карбокси-концами как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В мультиспецифическом активируемом антителе, scFv можно сливать с амино-концом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с амино-концом легкой цепи активируемого антитела IgG, или с амино-концами как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В мультиспецифическом активируемом антителе, scFv можно сливать с любой комбинацией одного или несколько карбокси-концов и одного или нескольких амино-концов активируемого антитела IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его, и маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его.

Это описание относится к примерам структур мультиспецифического активируемого антитела, которые включают в себя, но без ограничения, следующие:

(VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂;
 (VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂;
 (VL-CL)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂;
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; или
 (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂,

где VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепи для первой специфичности, содержащиеся в IgG;

VL* и VH* представляют собой переменные домены второй специфичности, содержащиеся в scFv;

L1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующую группу (MM) и расщепляемую группу (CM);

L2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий расщепляемую группу (CM) и антитело;

L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные домены scFv;

L4 представляет собой линкерный пептид, соединяющий антитело первой специфичности с антителом второй специфичности;

CL представляет собой константный домен легкой цепи; и

CH1, CH2, CH3 представляют собой константные домены тяжелой цепи.

Первая и вторая специфичности могут быть нацелены на любой антиген или эпитоп.

В некоторых вариантах осуществления привлекающего Т-клетки мультиспецифического активируемого антитела, один антиген представляет собой CD166 и другой антиген, как правило, представляет

собой стимулирующий (также обозначаемый в настоящем документе как активирующий) или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, клетки естественного киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммуноэффекторной клетки, такой как, но без ограничения, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (также обозначаемый как TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. Домен антитела, придающий специфичность к поверхностному антигену Т-клетки, можно также заменять на лиганд или домен лиганда, связывающие Т-клеточный рецептор, рецептор клетки NK, рецептор макрофага и/или рецептор другой иммуноэффекторной клетки.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой антитело против CD166, описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело может находиться в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv (несколько scFv) могут находиться в форме про-scFv (см., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания CD3ε и содержит антитело или его фрагмент или происходит из антитела или его фрагмента, связывающих CD3ε, например CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1 или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания CTLA-4 (также обозначаемого в настоящем документе как CTLA и CTLA4).

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность

```
GGGGGGGGSGGGSGGGSGGGGIEVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFG
GGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQVQGGGVVQGRSLRLSCAASGSTFSSYAM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT
NSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 117)
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3s содержит аминокислотную последовательность

```
GGGGGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHW
VKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY
DDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSIQVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVS
YMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPANFRGSGSGTYSLSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNP
FTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3s содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания одной или нескольких Т-клеток, одной или нескольких клеток NK и/или одного или нескольких макрофагов. В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания мишени, выбранной из группы, состоящей из B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит также средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с мультиспецифическим активируемым антителом посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство, такое как алкилирующее ДНК средство или интеркалирующее в ДНК средство, или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, перечисленной в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин D (ММАД). В некоторых

вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит также поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело естественным образом содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело можно конструировать для включения одной или нескольких дисульфидных связей.

Описание относится также к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей мультиспецифическое активируемое антитело, описанное в настоящем документе, так же как векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Описание относится к способам получения мультиспецифического активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

Описание относится также к способу изготовления мультиспецифических активируемых антител по этому описанию посредством

(a) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическое активируемое антитело в условиях, обеспечивающих экспрессию мультиспецифического активируемого антитела; и

(b) выделения мультиспецифического активируемого антитела.

Пригодные АВ, ММ, и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Описание относится также к мультиспецифическим активируемым антителам и/или к композициям мультиспецифического активируемого антитела, содержащим по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), специфически связывающие первую мишень или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), связывающие вторую мишень или второй эпитоп, где по меньшей мере АВ1 связано или иным образом соединено с маскирующей группой (ММ1), таким образом, что присоединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ1 присоединена к АВ1 через последовательность расщепляемой группы (СМ1), содержащую субстрат для протеазы, например, протеазы, локализованной совместно с мишенью АВ1 в участке лечения или участке диагностики у субъекта. Мультиспецифические активируемые антитела, представленные в настоящем документе, являются стабильными в кровотоке, активируемыми в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, т.е. здоровой, ткани и при активации обладают связыванием с мишенью АВ1, по меньшей мере сравнимым с соответствующим, немодифицированным мультиспецифическим антителом. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любые из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Описание относится также к композициям и способам, включающим в себя мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), специфически связывающие мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где по меньшей мере первый АВ в мультиспецифическом активируемом антителе присоединен к маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления каждый АВ присоединен к ММ, уменьшающей способность соответствующего ей АВ связывать каждую мишень. Например, в вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 присоединен к первой маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень, и АВ2 присоединен к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в таких вариантах осуществления, АВ1 присоединен к первой маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень, АВ2 присоединен к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень, АВ3 присоединен к третьей маскирующей группе (ММ3), уменьшающей способность АВ3 связывать его мишень, и так далее для каждого АВ в мультиспецифическом активируемом антителе. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ, и/или СМ, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело дополнительно содержит по меньшей мере одну расщепляемую группу (СМ), являющуюся субстратом для протеазы, где СМ связывает ММ с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), специфически связывающие мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где по меньшей

мере первый АВ в мультиспецифическом активируемом антителе присоединен посредством первой расщепляемой группы (СМ1) к маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 присоединен посредством СМ1 к ММ1 и АВ2 присоединен посредством второй расщепляемой группы (СМ2) к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления АВ1 присоединен посредством СМ1 к ММ1, АВ2 присоединен посредством СМ2 к ММ2 и АВ3 присоединен посредством третьей расщепляемой группы (СМ3) к третьей маскирующей группе (ММ3), уменьшающей способность АВ3 связывать его мишень, и так далее для каждого АВ в мультиспецифическом активируемом антителе. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Активируемые антитела, обладающие не связывающими стерическими группами, или партнеры по связыванию для несвязывающих стерических групп.

Описание относится также к активируемым антителам, содержащим несвязывающие стерические группы (NB) или партнеров по связыванию (BP) для несвязывающих стерических групп, где BP рекрутирует или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. Активируемые антитела, представленные в настоящем документе, включают в себя, например,

активируемое антитело, содержащее несвязывающую стерическую группу (NB), расщепляемый линкер (CL) и антитело или фрагмент антитела (AB), связывающие мишень;

активируемое антитело, содержащее партнера по связыванию для несвязывающей стерической группы (BP), CL и AB; и

активируемое антитело, содержащее BP, к которому рекрутируется NB, CL и AB, связывающие мишень.

Активируемые антитела, в которых NB ковалентно присоединена к CL и AB активируемого антитела или ассоциирована посредством взаимодействия с BP, ковалентно присоединенному к CL и AB активируемого антитела, представляют собой, как упомянуто в настоящем документе, "содержащие NB активируемые антитела". Под активируемым или переключаемым понимают, что активируемое антитело обладает первым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (т.е. первой конформации), и вторым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е. второй конформации, т.е. активированное антитело), где второй уровень связывания мишени превышает первый уровень связывания мишени. Композиции активируемого антитела могут обладать увеличенной биодоступностью и более благоприятным биораспределением по сравнению с общепринятыми лекарственными средствами на основе антитела.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают уменьшенные токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в ином случае могут возникнуть в результате связывания в участках, не подлежащих лечению и/или не подлежащих диагностике, если АВ не является замаскированным или его связывание с таким участком иным образом не ингибировано.

Активируемые антитела против CD166, содержащие несвязывающую стерическую группу (NB), можно получать с использованием способов, указанных в публикации РСТ № WO 2013/192546, полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Применение антител, конъюгированных антител, активируемых антител и конъюгированных активируемых антител.

Понятно, что при введении терапевтических молекул в соответствии с описанием их вводят с пригодными носителями, наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество пригодных составов можно обнаружить в справочнике, известном всем специалистам в области фармацевтической химии: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности раздел 87 от Blaug, Seymour, в этом документе. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как Липофектин™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле эмульсии, эмульсионный карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любые из вышеупомянутых смесей могут являться пригодными для обработки и терапии в соответствии с настоящим описанием при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется при получении состава и состав является физиологически совместимым и переносимым при этом способе 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 W.N., "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 процитированные в них ссылки для дополнительной информации относительно составов, наполнителей и носителей, хорошо известных специалистам в области

фармацевтической химии.

Терапевтические составы по этому описанию, содержащие антитело против CD166 и/или активируемое антитело против CD166, такие как в качестве неограничивающего примера антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для предотвращения, лечения или облегчения иным образом заболевания или нарушения, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические составы по этому описанию, содержащие антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для лечения или облегчения иным образом злокачественной опухоли или другого неопластического состояния, воспаления, воспалительного нарушения и/или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на паренхиме (например, в злокачественной опухоли, в части органа или ткани, которая часто выполняет функцию(и) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на клетке, ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на строме (т.е. соединительного поддерживающего каркаса клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на эндотелии (в сосудистой сети). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на стволовой клетки злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления средство, с которым конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство, с которым конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство.

Эффективность предотвращения, облегчения или лечения определяют в соответствии с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией и/или активностью мишени, например такой как измененная экспрессия и/или активность мишени. Продление выживаемости субъекта или задержка иным образом прогрессирования заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией и/или активностью мишени, например измененной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта указывает на то, что антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело обеспечивает клиническое преимущество.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и соображения, вовлеченные в получение таких композиций, так же как руководство по выбору компонентов, представлены, 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.

В некоторых вариантах осуществления, где используют фрагменты антител, выбирают наименьший фрагмент, специфически связывающийся со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основании последовательностей вариабельной области антитела, можно разрабатывать пептидные молекулы, сохраняющие способность связывать белковую последовательность-мишень. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать посредством технологии рекомбинантной ДНК (см., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:7889-7893 (1993)). Состав может также содержать более одного активного соединения, как необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, например в некоторых вариантах осуществления соединения с взаимодополняющей активностью, не оказывающие неблагоприятного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления или дополнительно композиция может содержать средство, улучшающее ее функцию, например такое как цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели.

Активные ингредиенты можно также заключать в микрокапсулы, полученные, например, посредством способов коацервации или посредством межповерхностной полимеризации, например микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях.

Составы для применения для введения *in vivo* введения должны являться стерильными. Этого легко достигают фильтрацией через стерильные мембраны для фильтрации.

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных по-

лимеров, содержащих антитело, где матрицы находятся в форме сформованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают в себя полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), или поли(виниловый спирт)), полилактиды патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты - гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (пригодные для инъекции микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты - гликолевой кислоты и ацетата леупролида), и поли-D-(-)-3- гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождение молекул в течение более 100 суток, конкретные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. Используют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv, или F(ab)₂). Термин "меченый" по отношению к зонду или антителу предназначен для включения прямого мечения зонда или антитела посредством присоединения (т.е. физического связывания) поддающегося детекции вещества к зонду или антителу, так же как непрямого мечения зонда или антитела посредством реакционной способности по отношению к другому реагенту, который является меченым напрямую. Примеры непрямого мечения включают в себя детекцию первичного антитела с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда с использованием биотина, так что его можно детектировать с использованием флуоресцентно меченного стрептавидина. Термин "биологический образец" предназначен для включения тканей, клеток и биологических жидкостей, выделенных из субъекта, так же как тканей, клеток и жидкостей, присутствующих внутри субъекта. Таким образом, в применение термина "биологический образец" включены кровь и фракция или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Т.е. способ детекции по этому описанию можно использовать для детекции аналита мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, так же как *in vivo*. Например, способы *in vitro* для детекции аналита мРНК включают в себя способы Нозерн-гибридизации и гибридизации *in situ*. Способы *in vitro* для детекции белкового аналита включает в себя твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), Вестерн-блоттинг, иммунопреципитации, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Способы *in vitro* для детекции аналита геномной ДНК включают в себя способы Саузерн-гибридизации. Способы 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. Более того, способы *in vivo* для детекции белкового аналита включают в себя введение субъекту меченого антитела против белкового аналита. Например, антитело можно метить с использованием радиоактивного маркера, присутствие и локализацию которого можно детектировать стандартными способами визуализации.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию можно также использовать во множестве диагностических и профилактических составов. В одном варианте осуществления, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят пациентам, подверженному риску развития одного или нескольких вышеупомянутых нарушений. Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят индивидуумам-людям с диагностированным клиническим показателем, ассоциированным с одним или несколькими из вышеупомянутых нарушений. После диагностики антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для смягчения или обращения эффектов клинического показателя.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по этому описанию можно также использовать для детекции мишени в образцах от пациентов и, соответственно, можно использовать в качестве диагностических средств. Например, антитела и/или активируемые антитела, и их конъюгированные варианты по этому описанию используют в анализах *in vitro*, например ELISA, для детекции уровней мишени в образце от пациента.

В одном варианте осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по этому описанию иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(ах) микропланшета для титрования). Иммобилизованное антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело служит в качестве связывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела, и/или активируемого антитела, и/или их конъю-

югированных вариантов, в контакт с образцом от пациента, твердую подложку промывают и обрабатывают с использованием блокирующего средства, такого как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, как подозревают, содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, как подозревают, обладающего уровнями циркулирующего антигена, рассматриваемыми как диагностические для патологии. После отмывки тестируемого образца или стандарта, твердую подложку обрабатывают вторичным антителом, меченным поддающейся детекции меткой. Меченное вторичное антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень поддающейся детекции метки и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют посредством сравнения со стандартной кривой, полученной для стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, полученных с использованием антител и активируемых антител по этому описанию, и их конъюгированных вариантов в диагностическом анализе *in vitro* можно определять стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови отбирают у субъектов, диагностированных как находящихся на различных стадиях прогрессирования заболевания, и/или в различных точках терапевтического лечения заболевания. С использованием популяции образцов, обеспечивающей статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, разрабатывают диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно также использовать в способах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, обладающие ферментативно расщепляемыми СМ, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать в себя детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) активности фермента (или в некоторых вариантах осуществления окружающей среды с увеличенным восстановительным потенциалом, такого как тот, что может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измерения 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 обладает ферментативной активностью (или увеличенным восстановительным потенциалом, в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, можно выбирать СМ, чтобы она являлась субстратом для по меньшей мере одной протеазы, обнаруженной в участке опухоли, в участке вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном участке (например, при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может представлять собой АВ, связывающую антиген-мишень. С использованием способов, описанных в настоящем документе, или когда это целесообразно, способов, известных специалисту в данной области, поддающуюся детекции метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку или радиоактивный индикатор) можно конъюгировать с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Пригодные поддающиеся детекции метки обсуждают в контексте вышеуказанных способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. С использованием АВ, специфического для белка или пептида в состоянии заболевания, вместе с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в пораженной заболеванием представляющей интерес ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной заболеванием тканью по сравнению с тканями, где специфический для СМ фермент не присутствует на поддающемся детекции уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной заболеванием ткани, или является неактивным (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови посредством системы фильтрации почек, и поскольку фермент, специфический для СМ, не присутствует на поддающемся детекции уровне (или присутствует на более низких уровнях в не пораженных заболеванием тканях, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной заболеванием ткани увеличено по сравнению с не пораженными заболеванием тканями.

В другом примере активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению восстанавливающим средством, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах, активируемые антитела

можно метить поддающейся детекции меткой, и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как стекло или бусина). Поддающуюся детекции метку можно располагать на части активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, поддающаяся детекции метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не поддается детекции, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, посредством приведения иммобилизованных, меченных поддающейся детекции меткой активируемых антител в контакт с образцом, как подозревают, содержащим фермент и/или восстанавливающее средство, в течение времени, достаточного, чтобы произошло расщепление, затем промывки для удаления избытка образца и загрязняющих примесей. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстанавливающего средства) в образце затем оценивают посредством изменения поддающегося детекции сигнала активируемых антител до контакта с образцом, например присутствия и/или увеличения поддающегося детекции сигнала из-за расщепления активируемого антитела посредством расщепляющего средства в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать, чтобы обеспечивать также детекцию присутствия или отсутствия мишени, способной связывать АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы можно адаптировать для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего средства и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства можно детектировать по присутствию и/или увеличению количества поддающейся детекции метки из активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать посредством детекции комплекса мишень-АВ, например посредством использования меченого поддающейся детекции меткой антитела против мишени.

Активируемые антитела также можно использовать для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, посредством расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, позволяющий локализацию протеолитической активности и мишени биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. С использованием этого способа, можно подтверждать как связывание с данной мишенью, так и протеолитическую активность, на основании присутствия поддающейся детекции метки (например, флуоресцентной метки).

Эти способы можно использовать для любых замороженных клеток или ткани, полученных из участка заболевания (например, ткани опухоли), или здоровых тканей. Эти способы можно также использовать для свежих образцов клеток или ткани.

В этих способах активируемое антитело метят поддающейся детекции меткой. Поддающаяся детекции метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель в ближней инфракрасной (NIR) области спектра (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и усиливающее средство, такое как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

Детекция метки в образце, который инкубировали с меченым, активируемым антителом, показывает, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая является специфической для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы можно подтверждать с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием средства, специфического для протеазы, например антитела, такого как А11, которое является специфическим для протеазы матриптазы и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; см., например, Международную публикацию номер WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 г. Такой же способ с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием более избирательного ингибирующего средства, можно использовать для идентификации протеазы, специфической для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени можно подтверждать с использованием средства, специфического для мишени, например другого антитела, или поддающаяся детекции метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченное активируемое антитело с детекцией посредством меченого вторичного антитела или более сложной системы детекции.

Сходные способы можно также использовать для визуализации *in vivo*, где детекция флуоресцентного сигнала у субъекта, например млекопитающего, включая человека, указывает на то, что участок заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфическую для СМ активируемого антитела.

Эти способы можно также использовать в наборах и/или в качестве реагентов для детекции, идентификации или характеристики протеазной активности во множестве клеток, тканей и организмов на основании специфической для протеазы СМ в активируемом антителе.

Описание относится к способам применения антител и/или активируемых антител при множестве диагностических и/или профилактических показаний. Например, описание относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и представляющей интерес мишени у субъек-

та или в образце посредством

(i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую расщепляющим средством, например, протеазой, антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(a) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и

(b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ мешает специфическому связыванию АВ с мишенью и в расщепленном, активированном состоянии ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью; и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где подающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень отсутствуют и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом в присутствии представляющей интерес мишени, например мишени, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(a) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и

(b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ мешает специфическому связыванию АВ с мишенью и в расщепленном, активированном состоянии ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью; и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где подающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело, содержащее маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной

аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM;

(a) где MM представляет собой пептид, ингибирующий связывание AB с мишенью, и где MM не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и

(b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии MM мешает специфическому связыванию AB с мишенью и в расщепленном, активированном состоянии MM не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию AB с мишенью; и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (MM), расщепляемую группу (CM), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например, протеазы, антигенсвязывающий домен (AB), специфически связывающий мишень, и поддающуюся детекции метку, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM;

(a) где MM представляет собой пептид, ингибирующий связывание AB с мишенью, и где MM не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB;

(b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии MM мешает специфическому связыванию AB с мишенью и в расщепленном, активированном состоянии MM не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию AB с мишенью; и

(c) где поддающаяся детекции метка расположена на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления CM; и

(ii) измерения уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело (например, активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством), описанное в настоящем документе, для применения в контакте с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень отсутствуют и/или не присутствуют в достаточ-

ном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом в присутствии мишени; и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце.

Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и

(b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к расщепляемой группе к N-концу от участка расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления одиночный антигенсвязывающий участок АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления где антитело по этому описанию обладает по меньшей мере двумя антигенсвязывающими участками, где по меньшей мере один антигенсвязывающий участок замаскирован и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие участки замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает в себя применение вторичного реагента, содержащего поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения для приведения в контакт субъекта или биологического образца с активируемым антителом в присутствии мишени, и измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например, протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и

(b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществ-

ления поддающаяся детекции метка присоединена к расщепляемой группе на N-конце от участка расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления одиночный антигенсвязывающий участок АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по этому описанию обладает по меньшей мере двумя антигенсвязывающими участками, по меньшей мере один антигенсвязывающий участок замаскирован и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие участки замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает в себя применение вторичного реагента, содержащего поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне.

Описание относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ, и

(ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень, отсутствуют и/или не присутствуют в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце.

Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ;

(а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и

(b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей

мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения для приведения в контакт с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень, отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством

(i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления CM; и

(ii) измерения уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце.

Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (MM), расщепляемую группу (CM), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM;

(a) где MM представляет собой пептид, ингибирующий связывание AB с мишенью, и где MM не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию AB; и

(b) где MM активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию AB с мишенью и где MM активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию AB с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием а вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия представляющего интерес расщепляющего средства у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные в настоящем документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления CM, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки

у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень, или как расщепляющее средство, так и мишень отсутствуют и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов поддающаяся детекции метка включает в себя средство для визуализации, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов средство для визуализации содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастирующее средство содержит иод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент содержит 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), димер-2 красного флуоресцентного белка (RFP димер2), HCREd или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридиния. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка содержит метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alex Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптенев.

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 не относящегося к человеку млекопитающего, такого как нечеловекообразный примат, животное-компаньона (например, кошку, собаку, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

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*.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* и/или визуализацию *in vivo* можно использовать в способах идентификации пациентов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ*, активируемые антитела используют для скрининга образцов от пациентов для идентификации пациентов, обладающих подходящей протеазой(ами) и мишенью(ями) в подходящей локализации, например в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени (например, этой мишени) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, протестированных с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу, можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, для которого пациент протестирован как положительный.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу, можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, для которого пациент тестируется как положительный.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ или набор используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела, тестируемого в этих способах идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом как на мишени (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в СМ в активируемом антителе, протестированном с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациентов с отрицательным тестом на любую мишень (например, эту мишень) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. В некоторых вариантах осуществления пациентов с отрицательным тестом на любую мишень (например, эту мишень) идентифицируют как не являющихся подходящими кандидатами для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

В некоторых вариантах осуществления способ или набор используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела (например, активируемого антитела, конъюгированного с лекарственным средством) против мишени по этому описанию, с последующим лечением посредством введения этого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела нуждающемуся в этом субъекту. Например, пациентов с положительным тестом как на мишени (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, протестированного в этих способах, идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого антитела и/или такого конъюгированного активируемого антитела, содержащего такую СМ, и затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество протестированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом для любой или обеих из мишени (например, этой мишени) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием другого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, пока не идентифицируют подходящее антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят тера-

пептически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, для которого пациент тестирован как положительный.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов ММ представляет собой пептид, имеющий длину приблизительно от 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (L1) и второй линкерный пептид (L2), где первый линкерный пептид расположен между ММ и СМ, и второй линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов каждый из L1 и L2 представляет собой пептид длиной приблизительно 1-20 аминокислот, и где каждый из L1 и L2 не обязательно представляют собой один и тот же линкер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов один или оба из L1 и L2 содержит глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую формулой (GGS)_n, где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 3), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 5), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 7) и Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из последовательностей антител с перекрестной реакционной способностью, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ содержит фрагмент Fab, а scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов расщепляющее средство представляет собой протеазу, локализованную совместно с мишенью у субъекта или в образце, и СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы, где протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергают воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к N-концу АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к C-концу АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к N-концу цепи VL АВ.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию используют в диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления, активируемое антитело вводят пациентам, подверженным риску развития одного или нескольких из вышеупомянутых воспаления, воспалительных нарушений, злокачественной опухоли или других нарушений.

Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят индивидуумам-людям с диагностированным клиническим показателем, ассоциированным с одним или несколькими из вышеупомянутых нарушений. После диагностики, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для смягчения или обращения эффектов клинического показателя.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию можно также использовать для детекции мишени в образцах от пациентов и, соответственно, можно использовать в качестве диагностических средств. Например, антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию используют в анализах *in vitro*, например ELISA, для детекции уровней мишени в образце от пациента.

В одном варианте осуществления, антитело и/или активируемое антитело по этому описанию иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(ах) микропланшета для титрования). Иммобилизованное антитело и/или активируемое антитело служит в качестве связывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела и/или активируемого антитела в контакт с образцом от пациента, твердую подложку промывают и обрабатывают с использованием блокирующего средства, такого как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, как подозревают, содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, как подозревают, обладающего уровнями циркулирующего антигена, рассматриваемыми как диагностические для патологии. После отмывки тестируемого образца или стандарта, твердую подложку обрабатывают вторичным антителом, меченным поддающейся детекции меткой. Меченное вторичное антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень поддающейся детекции метки, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют посредством сравнения со стандартной кривой, полученной для стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, полученных с использованием антител и/или активируемых антител по этому описанию в диагностическом анализе *in vitro*, можно определять стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания, образцы крови отбирают у субъектов, диагностированных как находящихся на различных стадиях прогрессирования заболевания и/или в различных точках терапевтического лечения заболевания. С использованием популяции образцов, обеспечивающей статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, разрабатывают диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела можно также использовать в способах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела обладающие ферментативно расщепляемыми СМ, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать в себя детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) активности фермента (или в некоторых вариантах осуществления окружающей среды с увеличенным восстановительным потенциалом, такого как тот, что может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измерения 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 обладает ферментативной активностью (или увеличенным восстановительным потенциалом, в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, можно выбирать СМ, чтобы она являлась субстратом протеазы для протеазы, обнаруженной в участке опухоли, в участке вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном участке (например, при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может представлять собой АВ, связывающий антиген-мишень. С использованием способов, известных специалисту в данной области, поддающуюся детекции метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку или радиоактивный индикатор) можно конъюгировать с АВ или другой областью активируемого антитела. Пригодные поддающиеся детекции метки обсуждают в контексте вышеуказанных способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. С использованием АВ, специфического для белка или пептида в состоянии заболевания, вместе с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в представляющей интерес пораженной заболеванием ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной заболеванием тканью по сравнению с тканями, где специфический для СМ фермент не присутствует на поддающемся детекции уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной заболеванием ткани, или является неактивным (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови посредством системы фильтрации почек, и поскольку фермент, специфический для СМ, не присутствует на поддающемся детекции уровне (или присутствует на более низких уровнях в не пораженных заболеванием тканях, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной заболеванием ткани увеличено по сравнению с не пораженными заболеванием тканями.

В другом примере, активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению восстанавливающим средством, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах, активируемые антитела можно метить поддающейся детекции меткой, и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как стекло или бусина). Поддающуюся детекции метку можно располагать на части активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, поддающаяся детекции метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не под-

дается детекции, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, посредством приведения иммобилизованных, меченных подпадающей детекции меткой активируемых антител в контакт с образцом, как подозревают, содержащим фермент и/или восстанавливающее средство, в течение времени, достаточного, чтобы произошло расщепление, затем промывки для удаления избытка образца и загрязняющих примесей. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстанавливающего средства) в образце затем оценивают посредством изменения подпадающей детекции сигнала активируемых антител до контакта с образцом, например, присутствия и/или увеличения подпадающей детекции сигнала из-за расщепления активируемого антитела посредством расщепляющего средства в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать, чтобы обеспечивать также детекцию присутствия или отсутствия мишени, способной связывать АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы можно адаптировать для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего средства и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства можно детектировать по присутствию и/или увеличению количества подпадающей детекции метки из активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать посредством детекции комплекса мишень-АВ, например, посредством использования меченного подпадающей детекции меткой антитела против мишени.

Активируемые антитела также можно использовать для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, посредством расщепления протеазой и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, позволяющий локализацию протеолитической активности и мишени биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. С использованием этого способа можно подтверждать как связывание с данной мишенью, так и протеолитическую активность, на основании присутствия подпадающей детекции метки (например, флуоресцентной метки).

Эти способы можно использовать для любых замороженных клеток или ткани, полученных из участка заболевания (например, ткани опухоли), или здоровых тканей. Эти способы можно также использовать для свежих образцов клеток или ткани.

В этих способах активируемое антитело метят подпадающей детекции меткой. Подпадающая детекции метка может представлять собой флуоресцентный краситель, (например, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), краситель в ближней инфракрасной (NIR) области спектра (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и усиливающее средство, такое как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

Детекция метки в образце, который инкубировали с меченым, активируемым антителом, показывает, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая является специфической для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы можно подтверждать с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием средства, специфического для протеазы, например антитела, такого как А11, которое является специфическим для протеазы матриптазы и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; См., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубл. 11 ноября 2010 г. Такой же способ с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием более избирательного ингибирующего средства, можно использовать для идентификации протеазы или класса протеаз, специфических для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени можно подтверждать с использованием средства, специфического для мишени, например, другое антитело, или подпадающая детекции метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченное активируемое антитело с детекцией посредством меченного вторичного антитела или более сложной системы детекции.

Сходные способы можно также использовать для визуализации *in vivo*, где детекция флуоресцентного сигнала у субъекта, например млекопитающего, включая человека, указывает на то, что участок заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфическую для СМ активируемого антитела.

Эти способы можно также использовать в наборах и/или в качестве реагентов для детекции, идентификации или характеристики протеазной активности во множестве клеток, тканей и организмов на основании специфической для протеазы СМ в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* и/или визуализацию *in vivo* можно использовать в способах идентификации пациентов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ*, активируемые антитела используют для скрининга образцов от пациентов для идентификации пациентов, обладающих подходящей протеазой(ами) и мишенью(ями) в подходящей локализации, например в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень, так и

на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активированного антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активированного антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активированном антителе, протестированных с использованием этих способов, идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е. как не подходящих для лечения с использованием тестируемого активированного антитела). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активированному антителу, можно тестировать с использованием других активированных антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активированное антитело для лечения (например, активированное антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания).

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активированного антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень, так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активированного антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активированного антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е. как не подходящих для лечения с использованием тестируемого активированного антитела). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активированному антителу можно тестировать с использованием других активированных антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активированное антитело для лечения (например, активированное антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания).

Фармацевтические композиции.

Антитела, конъюгированные антитела, активированные антитела и/или конъюгированные активированные антитела по этому описанию (также обозначаемые в настоящем документе как "активные соединения") и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи можно включать в фармацевтические композиции, пригодные для введения. Такие композиции, как правило, содержат антитело, конъюгированное антитело, активированное антитело и/или конъюгированное активированное антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Как применяют в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения всех без исключения растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и замедляющих абсорбцию средств и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Пригодные носители описаны в наиболее недавнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного справочника в данной области, содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Пригодные примеры таких носителей или разбавителей включают в себя, но без ограничения, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Липосомы и неводные носители, такие как жирные масла, также можно использовать. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любые общепринятые среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предусматривают их использование в композициях. Дополнительные активные соединения также можно включать в композиции.

Фармацевтическую композицию по этому описанию составляют, чтобы она была совместимой с намеченным для нее способом введения. Примеры способов введения включают в себя парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляция), чрескожное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты:

- стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители;
- антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены;
- антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия;
- хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA);
- буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и
- средства для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

pH можно регулировать с использованием кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральные препараты можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множественных доз, изготовленных из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для применения для инъекций, включают в себя стерильные водные растворы (когда являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления непосредственно перед введением стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, пригодные носители включают в себя физиологический

солевой раствор, бактериостатическую воду, Кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до такой степени, чтобы существовала возможность легкого введения через шприц. Она должна являться стабильной в условиях изготовления и хранения и должна являться защищенной от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В некоторых вариантах осуществления может являться желательным включение изотонических средств, например сахаров, полиспиртов, таких как манит, сорбит, хлорид натрия в композицию. Продленную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные пригодные для инъекций растворы можно получать посредством введения активного соединения в необходимом количестве подходящего растворителя с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше по необходимости с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и необходимые ингредиенты, отличные от перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов, способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию для получения порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из его предварительно простерилизованного фильтрацией раствора.

Пероральные композиции, как правило, включают в себя инертный разбавитель или съедобный носитель. Их можно также заключать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения, активное соединение можно включать с наполнителями и использовать в форме таблеток, лепешек или капсул. Пероральные композиции можно также получать с использованием жидкого носителя для применения в форме ополаскивателя для полости рта, где соединение в жидком носителе применяют перорально и прополаскивают и выплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связующие вещества и/или вспомогательные материалы можно включать в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки и т.п. могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений сходной природы:

связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал;

смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес;

вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или

придающее вкус средство, такое как перечная мята, метилсалицилат или средство с апельсиновым вкусом.

Для введения посредством ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, содержащего пригодный пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или распылителя.

Системное введение можно осуществлять также трансмукозальными или чрескожными способами. Для трансмукозального или чрескожного введения, средства для облегчения проникновения, подходящие для барьера, подлежащего проникновению, используют в составе. Такие средства для облегчения проникновения в общем известны в данной области и включают в себя, например, средства для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно осуществлять с использованием назальных спреев или суппозитория. Для чрескожного введения активные соединения составляют в мази, бальзамы, гели или кремы, как общеизвестно в данной области.

Соединения можно получать также в форме суппозитория (например, с использованием общепринятых основ для суппозитория, таких как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активные соединения получают с носителями, которые могут защищать соединение против быстрого выведения из организма, например составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны специалисту в данной области. Эти материалы можно также получать на коммерческой

основе из Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Суспензии липосом (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с использованием моноклональных антител против вирусных антигенов) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Является особенно преимущественным составление пероральных или парентеральных композиций в единичной дозированной форме для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная дозированная форма, как применяют в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению, где каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта в ассоциации с необходимым фармацевтическим носителем. Определение единичных дозированных форм по этому описанию продиктовано и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, подлежащего достижению, и ограничений, присущих области получения соединений, таких как активное соединение для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции можно заключать в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

Изобретение далее описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Характеризация антител против CD166.

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки связывания антител против CD166 по этому описанию.

Связывание различных антител против CD166 по этому описанию подтверждали посредством ELISA (фиг. 1). Тестировали антитела против CD166 человека, содержащие следующие последовательности VH и VL.

Наименование антитела	VH SEQ	VL SEQ
CD166-M9_vK1/HcB	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 123
CD166-M9_vK2/HcB	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 124
CD166-M9_vK3a/HcB	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 125
CD166-M9_vK3b/HcB	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 126
CD166-M9_vK1/HcC	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123
CD166-M9_vK2/HcC	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 124
CD166-M9_vK3a/HcC	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 125
CD166-M9_vK3b/HcC	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 126

mAb M9 получали с использованием технологии гибридомы мыши и остальные последовательности получали посредством гуманизации последовательности mAb M9. Специалисту в данной области известно, что возможность вызывать образование антител против CD166 была затруднена в течение длительного времени, поскольку исследователи не могли получать гибридомы и/или антитела у мышей, которым вводили CD166 человека. В отличие от этого антитела против CD166, представленные в настоящем документе, получены у мышей против CD166 человека.

Антитело против CD166 антитело M9, содержащее VH из SEQ ID NO: 119 и VL из SEQ ID NO: 120, использовали в качестве положительного контроля, и контрольное для изотипа антитело использовали в качестве отрицательного контроля.

Как показано на фиг. 1, для всех из гуманизированных антител против CD166 показано связывание с CD166, сравнимое с M9. С использованием стандартного протокола ELISA белок CD166 человека абсорбировали на планшетах для ELISA и затем инкубировали с указанной концентрацией антитела. Связанное антитело детектировали с использованием вторичного антитела против FAV человека с пероксидазой.

Пример 2. Исследование маскировки.

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для идентификации и характеристики маскирующих групп для применения в активируемых антителах против CD166 по этому описанию.

Антитело мыши Mab M9 против CD166 (VH из SEQ ID NO: 119 и VL из SEQ ID NO: 120) использовали для скрининга библиотеки пептидов X₁₅ с ограничением количества цистеина с общим разнообразием 3×10¹¹, где X представляет собой любую аминокислоту с использованием способа, сходного со способом, описанным в международной публикации PCT № WO 2010/081173, опублик. 15 июля 2010 г. Скрининг состоял из двух циклов сортировки MACS и четырех циклов сортировки FACS. Способ сортировки изображен на фиг. 2.

Индивидуальные клоны из популяций M2F1.1, M2F2.1, M2F3.1 и M2F4.1 секвенировали, и результаты показаны в табл. 9.

Таблица 9

Последовательности маскирующих пептидов
M2F1.1

JF16490 YLCQRHPLALKYCTN (SEQ ID NO: 135)
 JF16492 PLCVPTQLLRSCYNY (SEQ ID NO: 136)
 JF16493 AVCHPLANVETQCLD (SEQ ID NO: 137)
 JF16494 PHCHPLFNNTYCYRH (SEQ ID NO: 138)
 JF16495 PLCRPIELLASCMPK (SEQ ID NO: 139)
 JF16496 GAACVSAWGGFFCECC (SEQ ID NO: 140)
 JF16498 DCAKDILHLMPHCSM (SEQ ID NO: 141)
 JF16501 NTCMHPLLLQGCKTY (SEQ ID NO: 142)
 JF16503 YLGCLLYAGPGCEGG (SEQ ID NO: 143)
 JF16506 ARCPHPLLLSICENN (SEQ ID NO: 144)
 JF16507 ELCPHPLPFGFCNNY (SEQ ID NO: 145)
 JF16508 ALYCHPPYIRCEEMT (SEQ ID NO: 146)

M2F2.1

JF16534 TSLCHPVMIMYCKTG (SEQ ID NO: 147)
 JF16535 PLCHPLEQASWCNMD (SEQ ID NO: 148)
 JF16536 PHPCPRTGSRMCHFS (SEQ ID NO: 149)
 JF16537 SGRHPLPLKACGTN (SEQ ID NO: 150)
 JF16538 GLCHPIRLHNTQCTI (SEQ ID NO: 151)
 JF16539 KCMHPLNLHNINCNH (SEQ ID NO: 152)
 JF16540 PICHPLREFMNTCFK (SEQ ID NO: 153)
 JF16541 NCHPLDVVGWLGCMK (SEQ ID NO: 154)
 JF16542 YNNVCHPLFCSQHTY (SEQ ID NO: 155)
 JF16543 TFCHPLFSLNYCGHK (SEQ ID NO: 156)
 JF16544 FCHPLTSLNNKQCNR (SEQ ID NO: 157)
 JF16545 LSHCAVLLLRVCSGS (SEQ ID NO: 158)
 JF16546 KIHCHPLRLGTCLVG (SEQ ID NO: 159)
 JF16547 ETCAHPLDMRMCRHN (SEQ ID NO: 160)
 JF16548 PLCYPLILMSSCWLG (SEQ ID NO: 161)
 JF16549 YGICH PAPDLPCMQI (SEQ ID NO: 162)
 JF16550 TACHPLYNVEHLCEI (SEQ ID NO: 163)
 JF16551 TACNKSVCVAGCCLL (SEQ ID NO: 164)
 JF16552 LHPLCSYMKSCMKNN (SEQ ID NO: 165)
 JF16553 THCHCMVYFCPCRWS (SEQ ID NO: 166)

M2F3.1

JF16554 PKCPHPLHLANCYAS (SEQ ID NO: 167)
 JF16555 KTCYHPTVIAXNSY (SEQ ID NO: 168)

JF16556 AKCLPPLIQYCRCIK (SEQ ID NO: 169)
 JF16557 HACQHPLQLHTCKHN (SEQ ID NO: 170)
 JF16558 LCHPLVLSAWESCSN (SEQ ID NO: 171)
 JF16559 WPLCSFGKSFCAQNA (SEQ ID NO: 172)
 JF16560 ECQSFEHFLTNCHS (SEQ ID NO: 173)
 JF16561 SCKHPLVMPNLKCTR (SEQ ID NO: 174)
 JF16562 YPCHPLQLSIPHCTK (SEQ ID NO: 175)
 JF16563 ICHPLTHTMEYCMN (SEQ ID NO: 176)
 JF16564 TLCHPLTFVPTCTN (SEQ ID NO: 177)
 JF16565 PLCQPNRLQACGNT (SEQ ID NO: 178)
 JF16566 TLCRHPLALDGCQNN (SEQ ID NO: 179)
 JF16567 QPMCYQPAHPLCNTI (SEQ ID NO: 180)
 JF16568 SNCHPLLFQHYHCML (SEQ ID NO: 181)
 JF16569 EKYHPLTLAHCQNH (SEQ ID NO: 182)
 JF16571 NKCFVHPLAMPNCNS (SEQ ID NO: 183)
 JF16572 VNNCLLMTRAHCTSY (SEQ ID NO: 184)
 JF16573 LPCWAFVNPLHCGD (SEQ ID NO: 185)
 M2F4.1
 JS7503 VNNCLLMTRAHCTSY (SEQ ID NO: 186)
 JS7504 SSCPHPLGLTGCNDK (SEQ ID NO: 187)
 JS7505 NKCFVHPLAMPNCNS (SEQ ID NO: 188)
 JS7506 FVGCHSVYVSGCLRA (SEQ ID NO: 189)
 JS7507 NMCHPPHNIYSICNM (SEQ ID NO: 190)
 JS7509 LTCHLLPGLTLH-TK (SEQ ID NO: 191)
 JS7510 RTCHPLPGLTLHCTK (SEQ ID NO: 192)
 JS7511 HPLCFESMKNCFPNY (SEQ ID NO: 193)
 JS7513 TTCHPLSFTHNYCIT (SEQ ID NO: 194)
 JS7515 RDCGFDAVRADCLFG (SEQ ID NO: 195)
 JS7516 RTCSTHPLTMPQCNY (SEQ ID NO: 196)
 JS7517 MKCHPLQLTGNTCSM (SEQ ID NO: 197)
 JS7518 SGCPHPLQLITCSTA (SEQ ID NO: 198)
 JS7519 KCFPAFHDGPLACAS (SEQ ID NO: 199)
 JS7520 LKQHPPLPMSHCQPQ (SEQ ID NO: 200)
 JS7521 AFCGFSVIHPLCSGA (SEQ ID NO: 201)
 JS7522 SVHCAVLKLDGCLGW (SEQ ID NO: 202)
 JS7523 TLPCHPIMVLGCTPM (SEQ ID NO: 203)
 JS7525 HYPCMKYNPLNCSMS (SEQ ID NO: 204)
 JS7526 LKCPHPLSLNGCTLK (SEQ ID NO: 205)
 JS7527 VYSCMANNPLDCFTQ (SEQ ID NO: 206)
 JS7528 PICHPLVTLMSYCNK (SEQ ID NO: 207)
 JS7529 DWCSFWAGQSVWCTS (SEQ ID NO: 208)
 JS7530 STCHPLTPFHDKCRY (SEQ ID NO: 209)
 JS7531 PVCPPPLVTLMSYCNK (SEQ ID NO: 210)
 JS7532 STCHPLPTLMPYCNS (SEQ ID NO: 211)
 JS7533 FPLCGIGPAFCDDTV (SEQ ID NO: 212)
 JS7534 PTCHPLVLSVPCPKI (SEQ ID NO: 213)
 JS7537 GPLCDYFVYSCRG (SEQ ID NO: 214)
 JS7538 HTCYPHPLKLGQCEMF (SEQ ID NO: 215)
 JS7539 RTCIHPLPLHQCHKP (SEQ ID NO: 216)
 JS7540 ACHPINFNSIVYCNN (SEQ ID NO: 217)
 JS7542 SHPCSVVNLPGCEPD (SEQ ID NO: 218)

Маски подвергали укорачиванию и аланиновому сканированию для получения семейств активированных антител с различной эффективностью маскировки. Последовательности показаны ниже в табл.

10, где "а" обозначает положение аланина, включенного в качестве части сканирования. Он является эквивалентным "А".

Таблица 10
Укорачивание и аланиновое сканирование
маскирующих пептидов

<u>7614</u>	<u>LCHPLVLSAWESCSS</u>	(SEQ ID NO: 219)
7614.4	LCaPLVLSAWESCSS	(SEQ ID NO: 220)
7614.5	LCHaLVLSAWESCSS	(SEQ ID NO: 221)
7614.6	LCHPaVLSAWESCSS	(SEQ ID NO: 222)
7614.7	LCHPLaLSAWESCSS	(SEQ ID NO: 223)
7614.8	LCHPLVaSAWESCSS	(SEQ ID NO: 224)
7614.9	LCHPLVLSAaESCSS	(SEQ ID NO: 225)
7614.10	LCHPLVLSAWaSCSS	(SEQ ID NO: 226)
7614.11	CHPLVLSAWESC	(SEQ ID NO: 227)
7614.12	HPLVL	(SEQ ID NO: 228)
7614.13	HPL	(SEQ ID NO: 229)
<u>16522</u>	<u>LEGWCLHPLCLWGAG</u>	(SEQ ID NO: 230)
16522.14	LEGaCLHPLCLWGAG	(SEQ ID NO: 231)
16522.15	LEGWCaHPLCLWGAG	(SEQ ID NO: 232)
16522.16	LEGWCLaPLCLWGAG	(SEQ ID NO: 233)
16522.17	LEGWCLHaLCLWGAG	(SEQ ID NO: 234)
16522.18	LEGWCLHPaCLWGAG	(SEQ ID NO: 235)
16522.19	LEGWCLHPLCaWGAG	(SEQ ID NO: 236)
16522.20	LEGWCLHPLCLaGAG	(SEQ ID NO: 237)
16522.21	CLHPLC	(SEQ ID NO: 238)

Эти маскирующие пептиды использовали для получения активируемых антител против CD166 по этому описанию. Последовательности для конкретных из этих активируемых антител против CD166 показаны ниже в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления эти активируемые антитела против CD166 содержат расщепляемую группу 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SEQ ID NO: 70), расщепляемую группу 3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH; SEQ ID NO: 76), расщепляемую группу 2007 (ISSGLLSGRSDIH; SEQ ID NO: 342), расщепляемую группу 2008 (ISSGLLSGRSDQH; SEQ ID NO: 343), расщепляемую группу 2011 (ISSGLLSGRSDNP; SEQ ID NO: 346), расщепляемую группу 2012 (ISSGLLSGRSANP; SEQ ID NO: 347), расщепляемую группу 2013 (ISSGLLSGRSANI; SEQ ID NO: 348), расщепляемую группу 3007 (AVGLLAPPGGLSGRSDIH; SEQ ID NO: 350), расщепляемую группу 3008 (AVGLLAPPGGLSGRSDQH; SEQ ID NO: 351), расщепляемую группу 3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP; SEQ ID NO: 354), расщепляемую группу 3012 (AVGLLAPPGGLSGRSANP; SEQ ID NO: 355), или расщепляемую группу 3013 (AVGLLAPPGGLSGRSANI; SEQ ID NO: 356), как указано.

В то время как конкретные последовательности, показанные ниже, содержат спейсерную последовательность из SEQ ID NO: 305, специалисту в данной области понятно, что активируемые антитела против CD166 по этому описанию могут содержать любую пригодную спейсерную последовательность, например, такую как спейсерная последовательность, выбранная из группы, состоящей из QGQSGQG (SEQ ID NO: 305), QGQSGQ (SEQ ID NO: 88), QGQSG (SEQ ID NO: 306), QGQS (SEQ ID NO: 307), QGQ (SEQ ID NO: 308), QG (SEQ ID NO: 309), GQSGQG (SEQ ID NO: 359), QSGQG (SEQ ID NO: 360), SGQG (SEQ ID NO: 361), GQG (SEQ ID NO: 362), G или Q. В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела против CD166 по этому описанию могут не обладать спейсерной последовательностью, присоединенной к их N-концу.

Таблица 11

Последовательности активируемых антител против CD166
Тяжелая цепь активируемого антитела против CD166 (HuCD166_{Hc}):

Аминокислотная последовательность

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMVGVWIRQPPGKALEWLANIWWSEDK
HYSPLSKSRLTITKDTSKNQVVLITINVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQGLVTVSSAS
TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 239)

Нуклеотидная последовательность

CAGATCACCCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTCAAACCCACCCAGACCCTGACCCT
GACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAG
CCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCC
CCAGCCTGAAAGTCCCGGCTGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGTGACAAT
CACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGTGCAGATCGACTACGGCAACGAC
TACGCCTTACCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCC
CCTCCGTGTTCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTACCCTGTCTGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC
GGAGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAA
CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGC
CCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCACCCCAAGCCTAAGGACACCC
TGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCTGA
AGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGA
ACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCAT
CTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCG
TGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTC
CGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAC
GTGTTCTCTGACGCTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCC
TGAGCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 241)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2001 (SEQ ID NO: 310)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIVMTQSPL
SLPVTPEPASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSGSGS
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLKLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 242)

[спейсер (SEQ ID NO: 480)] [HuCD166Lc1_7614.6_2001 (SEQ ID NO: 311)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGACAGGGC] [СТГТГТCACCCCTGCCGTGCTGTCTGCCTGGGAGTC
 CTGTTCCCTCCGGCGGTGGCTCCTCTGGCGGCTCCATCTCCTCTGGCCTGCTGTCCGGCAGATCC
 GACAACCACGGCGGAGGCAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACAC
 CTGGCGAGCCTGCCTCCATCAGCTGCCGGTCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCAC
 CTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCC
 AACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA
 AGATCTCCCGGGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAACCTGGAAGTCCC
 CTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC
 ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTCTGTGCCTGCTGAACA
 ACTTCTACCCTCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC
 CCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACC
 CTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGA
 GCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGCGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 243)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_2001 (SEQ ID NO: 312)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 244)

[спейсер (SEQ ID NO: 480)] [huCD166Lc1_7614,8_2001 (SEQ ID NO: 313)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGACAGGGC] [СТГТГТCACCCCTCTGGTGGCCTCTGCCTGGGAGTC
 CTGTTCCCTCCGGCGGTGGCTCCTCTGGCGGCTCCATCTCCTCTGGCCTGCTGTCCGGCAGATCC
 GACAACCACGGCGGAGGCAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACAC
 CTGGCGAGCCTGCCTCCATCAGCTGCCGGTCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCAC
 CTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCC
 AACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA
 AGATCTCCCGCGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAACCTGGAAGTCCC
 CTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC
 ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTCTGTGCCTGCTGAACA
 ACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC
 CCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACC
 CTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGA
 GCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGCGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 245)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 314)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGS AVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 246)

[спейсер (SEQ ID NO: 481)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 315)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC] [CTGTGTACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTC
 CTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCTGCTGGCTCCACCTGGCGGC
 CTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCC
 TGCCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTCCAAGTCCCTGCTGCACTC
 CAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGTGTGATC
 TACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCG
 АСТTACCCTGAAGATCTCCCGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAA
 CCTGGAАCTGCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAАТCAAGCGGACCGTGGCCGCT
 CCCTCCGTGTTСATCTTCCACCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCT
 GCCTGCTGAАСAАТTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCA
 GTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTACCCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC
 TCCACCCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCC
 ACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC] (SEQ ID NO:
 247)

[спейсер (SEQ ID NO: 309)] [huCD166Lc1_7614.8_3001 (SEQ ID NO: 316)]

Аминокислотная последовательность

[QG] [LCHPLVASAWESCSGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLPVT
 PGEPAISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGS
 GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 248)

[спейсер (SEQ ID NO: 483)] [huCD166Lc1_7614.8_3001 (SEQ ID NO: 317)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCC] [TGTGTACCCTCTGGTGGCCTCTGCCTGGGAGTCTGTTCTCCGGCGGAGGC
 TCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACA
 ACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCGTACTCCTGGCGA
 GCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTG
 TACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGG
 CCTCCGGCGTGCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTC
 CCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAАCTGCCCTACACC
 TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAАТCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTСATCTTCC
 CACCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTСGTGCTGCTGAАСAАТTCTA
 CCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAA
 TCCGTGACCAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCA
 AGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC
 CGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 478)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3001 (SEQ ID NO: 316)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSQGQ] [LCHPLVASAWESCSGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMT
 QSPLSLPVTPEPAISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSG
 SSGS
 GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 303)

[спейсер (SEQ ID NO: 482)] [huCD166Lc1_7614.8_CM2 (SEQ ID NO: 479)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGCCAGGGC] [СТГТГТCACCCCTCTGGTGGCCTCTGCCTGGGAGTC
 CTGTTCCCTCCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGC
 CTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCC
 TGCCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTCCAAAGTCCCTGCTGCACTC
 CAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCTCAGCTGCTGATC
 TACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCG
 АСТТCACCCCTGAAGATCTCCCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAA
 CCTGGAACTGCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCT
 CCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTCTGTG
 GCCTGCTGAACAАСТТТАСС
 GTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC
 TCCACCCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCC
 ACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:
 304)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2001 домен VL
 (SEQ ID NO: 364)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 363)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_2001 домен VL
 (SEQ ID NO: 366)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 365)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 домен VL
 (SEQ ID NO: 368)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 367)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3001 домен VL
 (SEQ ID NO: 370)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMT
 QSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAGVPDRFSG
 SSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 369)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2007 (SEQ ID NO: 372)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDIHGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 371)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2007 домен VL
 (SEQ ID NO: 374)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 373)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3007 (SEQ ID NO: 376)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDIHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 375)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 378)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDIHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 377)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2008 (SEQ ID NO: 380)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 379)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 382)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 381)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3008 (SEQ ID NO: 384)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDQHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 383)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3008 домен VL
(SEQ ID NO: 386)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDQHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 385)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2011 (SEQ ID NO: 388)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 387)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2011 домен VL
(SEQ ID NO: 390)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIVMTQSPL
SLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
TDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 389)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3011 (SEQ ID NO: 392)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIVM
TQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 391)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3011 домен VL
(SEQ ID NO: 394)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIVM
TQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 393)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2012 (SEQ ID NO: 396)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIVMTQSPL
SLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
TDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 395)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2012 домен VL
(SEQ ID NO: 398)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIVMTQSPL
SLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
TDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 397)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3012 (SEQ ID NO: 400)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIVM
TQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 399)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3012 домен VL
(SEQ ID NO: 402)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIVM
TQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 401)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2013 (SEQ ID NO: 404)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGSDIVMTQSPL
SLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
TDFTLKISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 403)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.6_2013 домен VL
(SEQ ID NO: 406)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 405)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3013 (SEQ ID NO: 408)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSANIGGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 407)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.6_3013 домен VL
(SEQ ID NO: 410)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSANIGGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 409)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2007 (SEQ ID NO: 412)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 411)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2007 домен VL
(SEQ ID NO: 414)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 413)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3007 (SEQ ID NO: 416)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 415)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 418)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 417)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2008 (SEQ ID NO: 420)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 419)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 422)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 421)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3008 (SEQ ID NO: 424)]
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 423)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3008 домен VL
 (SEQ ID NO: 426)]**
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 425)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2011 (SEQ ID NO: 428)]
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 427)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2011 домен VL
 (SEQ ID NO: 430)]**
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 429)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3011 (SEQ ID NO: 432)]
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 431)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3011 домен VL
 (SEQ ID NO: 434)]**
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 433)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2012 (SEQ ID NO: 436)]
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 435)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2012 домен VL
 (SEQ ID NO: 438)]**
Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 437)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3012 (SEQ ID NO: 440)]
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKLS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 439)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3012 домен VL
 (SEQ ID NO: 442)]**
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 441)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2013 (SEQ ID NO: 444)]
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 443)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614.8_2013 домен VL
 (SEQ ID NO: 446)]**
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 445)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614,8_3013 (SEQ ID NO: 448)]
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANIGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKLS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 447)
**[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614.8_3013 домен VL
 (SEQ ID NO: 450)]**
Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVASAWESCSSGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANIGGSDIVM
 TQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 449)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2001 (SEQ ID NO: 452)]
Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNHGGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 451)
[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2001 домен VL (SEQ ID NO: 454)]
Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNHGGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 453)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3001 (SEQ ID NO: 456)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 455)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3001 домен VL
(SEQ ID NO: 458)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 457)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2011 (SEQ ID NO: 460)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 459)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2011 домен VL
(SEQ ID NO: 462)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 461)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3011 (SEQ ID NO: 464)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 463)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3011 домен VL
(SEQ ID NO: 466)]

Аминокислотная последовательность

[[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGGSDIVM
TQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 465)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2012 (SEQ ID NO: 468)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGGSDIVMTQSPL
SLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 467)

[спейсер (SEQ ID NO: 305)] [HuCD166Lc1_7614_2012 домен VL
(SEQ ID NO: 470)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIVMTQSPL
 SLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 469)
 [спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3012 (SEQ ID NO: 472)]
 Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGS AVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKS
 GTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 471)
 [спейсер (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lc1_7614_3012 домен VL
 (SEQ ID NO: 474)]
 Аминокислотная последовательность
 [[QGQSGQG] [LCHPLVLSAWESCSSGGGSSGGS AVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIVM
 TQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 473)

Пример 3. Получение активируемых антител против CD166.

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для получения активируемых антител против CD166 по этому описанию.

Получали активируемые антитела против CD166 с различной эффективностью маскировки (т.е. показателем способности MM активируемого антитела блокировать связывание АВ активируемого антитела с его мишенью). Пептиды 16522 и 7614 подвергали мутагенезу посредством укорачивания и аланинового сканирования, как описано в примере 2, и эти варианты маскирующих пептидов использовали для получения семейств активируемых антител против CD166 с диапазоном кратности маскировки. Способность антитела против CD166 CD166 M9 vK1/HCВ (VH из SEQ ID NO: 121 и VL из SEQ ID NO: 123) и различных активируемых антител против CD166 связывать CD166 человека оценивали с использованием ELISA связывания CD166 (фиг. 3А, 3В). Тестируемые активируемые антитела против CD166 содержали последовательность варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 121, последовательность варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 123, расщепляемую группу (СМ), содержащую аминокислотную последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70), обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2001, и одну из маскирующих групп, показанных в табл. 10. Полноразмерные последовательности показаны выше в табл. 11.

С использованием стандартного протокола ELISA, белок CD166 человека абсорбировали на планшетах для ELISA и затем инкубировали с указанной концентрацией антитела или активируемого антитела. Связанное антитело или активируемое антитело детектировали с использованием вторичного антитела против FAB человека с пероксидазой. Обобщение иллюстративных кажущихся констант диссоциации (Kd) *in vitro* активируемых антител по настоящему изобретению от полипептида CD166, как определено посредством ELISA, показано ниже в табл. 17, так же как соответствующее увеличение Kd относительно исходного антитела против CD166 M9 (vk-1/HCВ). За исключением исходного антитела против CD166 M9, маска для каждого активируемого антитела является такой, как указано, как описано в настоящем документе, и субстратная последовательность представляла собой 2001 (ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70)).

Таблица 17

Кажущиеся константы диссоциации в ELISA активируемых антител против CD166

Конструкция антитела	Кажущаяся Kd (нМ)	Кратность увеличения Kd
CD166 M9 vk1/HCб	4,4	1
CD166-16522-2001	423,7	95
CD166-7614-2001	998,6	225
CD166-7614.5-2001	495,0	112
CD166-7614.6-2001	265,6	60
CD166-7614.7-2001	618,6	139
CD166-7614.8-2001	82,2	19
CD166-7614.9-2001	534,0	120
CD166-7614.10-2001	685,2	154
CD166-7614.11-2001	544,0	123
CD166-7614.12-2001	331,9	75
CD166-7614.13-2001	77,7	18
CD166-16522.14-2001	422,1	95
CD166-16522.15-2001	447,7	101
CD166-16522.16-2001	47,4	11
CD166-16522.17-2001	61,6	14
CD166-16522.18-2001	57,7	13
CD166-16522.19-2001	49,2	11
CD166-16522.20-2001	700,3	158
CD166-16522.21-2001	144,7	33

Пример 4. Активация активируемых антител против CD166.

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки активации активируемых антител против CD166.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий способность различных активируемых антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека при протеолитической активации. Как показано на фиг. 4, активируемые антитела против CD166 восстанавливают связывание антитела при протеолитической активации. Связывание антитела против CD166 (huM9 HCб/vk-1; VH из SEQ ID NO: 122 и VL из SEQ ID NO: 123), различных активируемых антител против CD166 по этому описанию и активированных посредством uPA активируемых антител против CD166 оценивали с использованием ELISA связывания CD166. Тестируемые активируемые антитела против CD166 содержат последовательность варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 122, последовательность варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 123, либо расщепляемую группу (CM1, субстрат 2001), содержащую аминокислотную последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70) или расщепляемую группу (CM2, субстрат 3001), содержащую аминокислотную последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76), и одну из маскирующих групп, показанных в табл. 10. Полноразмерные последовательности показаны выше в табл. 11.

С использованием стандартного протокола ELISA, белок CD166 человека абсорбировали на планшетах для ELISA и затем инкубировали с указанной концентрацией антитела или активируемого антитела. Связанное антитело или активируемое антитело детектировали с использованием вторичного антитела против FAB человека с пероксидазой. Связанное антитело или активируемое антитело детектировали с использованием вторичного антитела против FAB человека с пероксидазой.

В иллюстративном исследовании, определяли аффинность связывания антитела против CD166 (антитело против CD166 HCб/vk-1 по настоящему описанию и активируемые антитела против CD166 (антитело против CD166-7614.6-3001) по настоящему описанию с клетками человека (клетки HCC1806 рака молочной железы человека) и с CD166 человека. В этих условиях, кажущиеся иллюстративные аффинности связывания (K_d) по ELISA составляли 96,2 и 1,3 нМ для активируемого антитела против CD166 и антитела против CD166 по настоящему описанию, соответственно. В иллюстративном анализе связывания клеток HCC1806, как измерено посредством проточной цитометрии, кажущиеся аффинности связывания (K_d) составляли 372 и 3,2 нМ для активируемого антитела против CD166 и антитела против CD166 по настоящему описанию соответственно. Эти иллюстративные результаты показывают, что для активируемого антитела против CD166 в нерасщепленном состоянии показана более низкая аффинность связывания.

вания с выделенным полипептидом CD166 и CD166 на клетках по сравнению с антителом против CD166 по настоящему описанию.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий способность различных конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию вызывать уничтожение клеток HCC1806 после протеолитической активации с использованием uPA. Эти конъюгированные активируемые антитела против CD166 обозначены также в настоящем документе как "CD166 AADC" или конъюгаты активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (Activatable Antibody Drug Conjugates). Тестируемые конъюгированные активируемые антитела против CD166 содержали последовательность вариабельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 122, последовательность вариабельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 123, расщепляемую группу (CM1, субстрат 2001), содержащую аминокислотную последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70), одну из маскирующих групп, показанных в табл. 10, и майтанзиноид DM4, конъюгированный с активируемым антителом посредством линкера SPDB. Полноразмерные последовательности активируемых антител показаны выше в табл. 11. Все конъюгированные активируемые антитела, описанные в настоящем документе, получены из TCRS (The Chemistry Research Solution).

Как показано на фиг. 5, различные конъюгированные активируемые антитела против CD166 по этому описанию действуют подобно изотипу-DM4 при маскировке, но после протеолитической активации с использованием uPA для этих конъюгированных активируемых антител против CD166 показано уничтожение клеток, сходное с уничтожением посредством huCD166 ADC. Способность конъюгатов с лекарственным средством уничтожать клетки HCC1806 оценивали посредством добавления указанной концентрации ADC или AADC и инкубации клеток в течение 3 суток. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа CellTiter Glo. Сходные результаты наблюдали, когда активируемое антитело, конъюгированное с повреждающим нуклеиновую кислоту средством, тестировали в таких анализах уничтожения клеток.

Следующие анализы разработаны для оценки активации и связывания активируемых антител против CD166 в образцах опухолей после воздействия одной или нескольких протеаз.

Образцы ксенотрансплантатов опухолей и образцы здоровых тканей анализировали с использованием анализа иммуногистохимии (ИНС) и анализа визуализации *in situ*, описанных в публикации PCT № WO 2014/107599, полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Кратко, в этом анализе *in situ* используют активируемое антитело против CD166 по этому описанию, соответствующее исходное антитело и модифицированный вариант активируемого антитела против CD166, в котором CM заменена на нерасщепляемый линкер, обозначенный в настоящем документе в общем как модифицированное антитело против CD166 NSUB. Исходное антитело используют в качестве положительного контроля, в то время как нерасщепляемый вариант активируемого антитела против CD166 используют в качестве отрицательного контроля. Затем замороженные срезы тканей ксенотрансплантата помещают на предметные стекла, промывают два раза с использованием PBS-T, затем PBS, с последующей предварительной обработкой ткани в течение 30 мин с использованием коктейля ингибиторов широкого спектра протеаз или только буфера. Затем поддающуюся детекции метку, такую как Alexa Fluor-680®, конъюгируют с каждым из активируемого антитела против CD166 и модифицированного антитела против CD166 NSUB. Затем меченное поддающейся детекции меткой активируемое антитело против CD166 и модифицированное антитело против CD166 NSUB наносят на ткань и инкубируют в течение 1 ч в темноте (для предотвращения обесцвечивания флуоресценции). После инкубации с 1 мкг/мл инкубированные срезы опухолей промывают с использованием PBS-T, затем PBS, и подвергают контрастному окрашиванию с использованием маркера ядер DAPI в течение 1 мин. Затем использовали анализ флуоресцентной микроскопии для детекции положительного окрашивания. Положительное окрашивание активируемого антитела против CD166, прекращаемое посредством предварительной обработки срезов тканей с использованием ингибиторов протеаз, показывает, что связывание активируемого антитела против CD166 с образцом ткани является результатом протеолитического события. Положительное окрашивание активируемого антитела против CD166 должно также прекращаться, когда ткань предварительно обрабатывают избытком немеченного ("холодного") исходного антитела. Более того, инкубация с тканью опухоли должна выявлять положительное окрашивание для исходного антитела, на которое не влияет предварительная обработка ткани ингибиторами протеаз, но которое прекращается, когда ткань предварительно обрабатывают немеченным исходным антителом. Не должно происходить детекции сигнала модифицированного антитела против CD166 NSUB при детекции в предварительно обработанной ткани, в ткани, предварительно не обработанной ингибиторами протеаз, или в ткани, предварительно обработанной немеченным исходным антителом.

Фиг. 6A-6D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 является активированным (т.е. расщепленным) в образцах ткани злокачественных опухолей ободочной кишки и активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 6A и 6C изображены результаты ИНС анализа образцов опухолей и здоровых тканей, и на фиг. 6B и 6D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов опухолей и здоровых тканей.

Фиг. 7A-7D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 является активированным (т.е. расщепленным) в образцах ткани злокачественных опухолей легких, и активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 7A и 7C изображены результаты ИHC анализа образцов опухолей и здоровых тканей, и на фиг. 7B и 7D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов опухолей и здоровых тканей.

Фиг. 8A-8D представляют собой серии изображений, показывающих, что активируемое антитело против CD166 не является активированным в образцах здоровых тканей. На фиг. 8A и 8C изображены результаты ИHC анализа образцов здоровых тканей, и на фиг. 8B и 8D изображены результаты анализа визуализации *in situ* образцов здоровых тканей.

Пример 5. Активность конъюгированных антител против CD166.

Этот пример показывает, что для конъюгированного антитела против CD166 по этому описанию ("CD166 ADC") показана активность уничтожения *in vitro* по сравнению с конъюгатом контрольного антитела ("контрольным ADC").

Фиг. 9 представляет собой серию графиков, показывающих активность конъюгированного антитела против CD166 по этому описанию против линии клеток рака молочной железы, линии клеток рака предстательной железы, линии клеток рака поджелудочной железы, линии клеток плоскоклеточного рака головы и шеи и линии клеток CD166 в качестве отрицательного контроля.

Пример 6. Эффективность конъюгированных активированных антител против CD166 в моделях опухолей.

В этом примере показана эффективность конъюгированного активируемого антитела против CD166 по этому описанию ("CD166 AADC" или конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (Activatable Antibody Drug Conjugates)) в моделях различных опухолей.

Фиг. 10 представляет собой график, показывающий эффективность AADC, содержащего активируемое антитело против CD166 по этому описанию, конъюгированное с майтанзиноидом DM4, по сравнению с конъюгированным с DM4 контролем для изотипа, и ADC, содержащего конъюгированный с DM4 вариант исходного антитела, для активируемого антитела против CD166. Эффективность измеряют как средний объем опухоли, измеренный в различных временных точках после введения (5 мг/кг IV на сутки 1 и 8) в модели рака молочной железы.

Как показано на фиг. 10, эффективность AADC является эквивалентной эффективности, наблюдаемой для ADC.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий эффективность активируемых антител против CD166 по этому описанию по сравнению с конъюгированным с DM4 контролем для изотипа, и CD166 ADC, конъюгированным с DM4 исходным антителом против CD166. Эффективность измеряют как средний объем опухоли, измеренный в различных временных точках после введения (5 мг/кг IV на сутки 1 и 8) в модели H292 мелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

Ксенотрансплантаты опухолей H292 обрабатывали контролем для изотипа-DM4, huCD166-DM4 ADC, huCD166_7614.6_CM2-DM4 AADC или huCD166_7614.6_CM1-DM4 ADCC, где CM1 и CM2 представляют собой субстраты 2001 и 3001, описанные в настоящем документе, соответственно. Опухоли выращивали до среднего объема 150 мм³, затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь и на сутки 1 и 8 вводили дозы указанных тестируемых веществ. Средний объем опухолей ± SEM наносили на график.

Как показано на фиг. 11, эффективность обоих тестируемых AADC является эквивалентной эффективности, наблюдаемой для ADC.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий эффективность CD166 AADC, конъюгированного с DM4 активируемого антитела против CD166, также обозначаемого в настоящем документе как huCD166_7614.6_CM2-DM4 AADC (где CM2 представляет собой субстрат 3001), по сравнению с конъюгированным с DM4 контролем для изотипа, и CD166 ADC, конъюгированным с DM4 исходным антителом против CD166. Эффективность измеряют как средний объем опухоли, измеренный в различных временных точках после введения (5 мг/кг IV на сутки 1 и 8) в модели H1975 мелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

Как показано на фиг. 12, эффективность AADC является эквивалентной эффективности, наблюдаемой для ADC.

Пример 7. Анализ переносимости активируемых антител против CD166.

Антитела против CD166 по этому описанию характеризовали по их видовой специфичности по отношению к связыванию с CD166 человека и другими близко родственными белками.

Как показано на фиг. 13, антитела против CD166 по этому описанию связывают CD166 человека и яванского макака с равной аффинностью. Ни одно из тестируемых антител против CD166 по этому описанию не связывалось с CD166 крысы или мыши. K_d для связывания антитела против CD166 с CD166 человека и CD166 яванского макака в этих иллюстративных исследованиях связывания составляет 1,3 нМ для обоих.

Затем уровни экспрессии CD166 анализировали в различных типах нормальных тканей человека и яванского макака. Как показано в табл. 3 ниже, уровни экспрессии CD166 являлись почти идентичными в

анализированных образцах тканей человека и яванского макака:

Таблица 3

Уровни экспрессии CD166 в образцах нормальных тканей человека и яванского макака

Тип ткани	Яванский макак	Человек
Молочная железа	++	++
Мозг	-	-
Ободочная кишка	++	++
Пищевод	-	-
Сердце	-	-
Почка	+	+
Печень	++	++
Легкое	++	+
Нерв	-	-
Яичник	++	+
Поджелудочная железа	++	++
Предстательная железа	+++	+++
Кожа	N/A	-/+
Тонкий кишечник	++	++
Слюнная железа	++	++
Селезенка	-	-
Желудок	+++	+++
Поперечнополосатая/скелетная мышца	-	-
Яичко	-	-
Матка	++	++

Значительную экспрессию CD166 детектировали в образцах ткани печени как человека, так и яванского макака.

В первоначальных фармакокинетических исследованиях, обнаружено, что конъюгированное активированное антитело против CD166 по этому описанию исключают зависимое от антигена выведение (т.е. быстрое выведение антител из-за широкой распространенности естественным образом экспрессированного антигена CD166 в организме).

На фиг. 14 показаны результаты исследования переносимости у яванских макаков с использованием введения 5 мг/кг конъюгированного активированного антитела против CD166 по этому описанию. Эти исследования проводили с использованием huCD166 7614.6 CM2-DM4 AADC (где CM2 представляет собой субстрат 3001). 5 мг/кг выбрано, поскольку это представляет собой терапевтическую дозу, используемую для других конъюгатов антител с DM4, содержащих связь SPDB.

Фармакокинетику конъюгата с лекарственным средством huCD166-7614.6-CM1 DM4 (где CM1 представляет собой субстрат 2001) и неконъюгированного антитела против huCD166 оценивали у яванских макаков после однократной дозы 5 или 3 мг/кг соответственно. Общие уровни в сыворотке IgG человека измеряли с использованием сэндвич-ELISA против IgG человека. В соответствии с исключением выведения из-за мишени для AADC против CD166 показано значительно более сильное воздействие, чем для антитела. У обезьян, обработанных конъюгатом с лекарственным средством huCD166-7614.6-CM1 DM4, не наблюдали токсичности. Через 21 сутки не присутствовало клинических наблюдений, признаков токсичности из-за мишени и признаков токсичности для печени. Как показано на фиг. 14, выведение конъюгата с DM4 антитела против CD166 сравнивали с исходным антителом. Связывание антигена было ниже уровня количественного определения.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий, что конъюгированное активированное антитело против CD166 является хорошо переносимым в планируемой терапевтической дозе. Эти исследования проводили с использованием huCD166 7614.6 CM2-DM4 AADC (где CM2 представляет собой субстрат 3001).

Таким образом, в отличие от традиционной терапии ADC не присутствовало доказательств повреждения печени у яванских макаков после введения конъюгированного активированного антитела против CD166 по этому описанию.

Пример 8. Зависимая от протеазы активация активированных антител против CD166.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки зависимой от протеазы активации активированных антител и конъюгированных активированных антител

против CD166 по этому описанию.

Фиг. 16А, 16В и 16С представляют собой графики, показывающие способность различных конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию связывать CD166 человека на клетках HCC1806 в присутствии или в отсутствие зависимой от протеазы активации. Эти конъюгированные активируемые антитела против CD166 также обозначены в настоящем документе как "CD166 AADC" или "конъюгаты активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (Activatable Antibody Drug Conjugates)". Как показано на фиг. 16А, связывание конъюгированных активируемых антител против CD166 с CD166 на клетках HCC1806 блокировано. В отличие от этого, как показано на фиг. 16В и 16С, конъюгированные активируемые антитела против CD166 восстанавливают активность связывания антитела, сходную с активностью связывания немаскированного конъюгированного антитела против CD166 и немаскированного антитела против CD166, когда AADC протеолитически активированы с использованием матриптазы (MT-SP1) или матриксной металлопротеиназы 14 (MMP-14).

Связывание антитела против CD166 (VH из SEQ ID NO: 122 и VL из SEQ ID NO: 123), различных конъюгированных и неконъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию и активированных протеазой конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию оценивали с использованием анализа связывания на основе проточной цитометрии. Тестируемые конъюгированные и неконъюгированные активируемые антитела против CD166 содержали последовательность вариабельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 122, последовательность вариабельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 123, расщепляемую группу (CM1, субстрат 2001), содержащую аминокислотную последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 70) или расщепляемую группу (CM2, субстрат 3001), содержащую аминокислотную последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76), и одну из маскирующих групп, показанных в табл. 10. Полноразмерные последовательности показаны выше в табл. 11. Конъюгированные антитела против CD166 и конъюгированные активируемые антитела против CD166 содержали майтанзиноид DM4, конъюгированный с активируемым антителом посредством линкера SPDB. В типичном анализе клетки HCC1806 инкубировали с указанными концентрациями антитела, активируемого антитела, конъюгированного антитела или активируемого антитела против CD166, в PBS+2%FBS в течение 1 ч на льду. После промывки 2X с использованием PBS+2% FBS, клетки инкубировали с вторичным антителом козы против IgG человека, конъюгированным с AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch), в течение 30-45 мин на льду. Затем клетки промывали 2X с использованием PBS+2% FBS и фиксировали с использованием 1% формальдегида. Связанное антитело детектировали с использованием цитометра Guava EasyCyte, и измеряли медианную интенсивность флуоресценции (MFI) популяции клеток.

Как показано на фиг. 16А, связывание конъюгированных активируемых антител против CD166 с CD166 на клетках HCC1806 блокировано. Как показано на фиг. 16В и 16С, различные конъюгированное и неконъюгированные активируемые антитела против CD166 по этому описанию действуют подобно друг другу, когда замаскированы, но когда конъюгированные активируемые антитела против CD166 протеолитически активированы с использованием протеазы, для них показано связывание, сходное со связыванием немаскированного исходного антитела huCD166 и немаскированного huCD166 ADC.

Пример 9. Связывание активируемых антител против CD166 и конъюгатов антител с лекарственным средством с тканями человека.

Иллюстративные исследования в этом примере показывают свойства связывания конъюгатов антитела против CD166 с лекарственным средством (ADC) и конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию с тканями человека.

В этом исследовании замороженные срезы тканей, полученные из нормальных предстательной железы, яичников, молочной железы, поджелудочной железы и правого предсердия человека (кат. № T1234201, T1234086, T1234183, T1234188 и T1234127 соответственно; BioChain, Newark, CA), подготавливали и блокировали с использованием стандартных протоколов, и затем инкубировали с 0,4 мкг/мл ADC против CD166 по настоящему описанию (анти-CD166-spdb-DM4), AADC против CD166 по настоящему описанию (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4), активированных AADC против CD166 по настоящему описанию (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, инкубированного с очищенным uPA в течение 16 ч при 37°C) или контрольного для изотипа ADC (chKTI- spdb-DM4, а химерного человеческого антитела IgG1 против ингибитора трипсина сои, конъюгированного с spdb-DM4). После инкубации с тестируемыми веществами срезы обрабатывали 2,5 мкг/мл мышинового моноклонального антитела против DM4 (Immunogen). Детекцию нагрузки DM4 осуществляли посредством инкубации с антителом против антител мыши, конъюгированного с полимером с HRP (EnvisionTM+ System-HRP Labeled polymer anti-mouse, Dako, K4006) с последующим добавлением субстрата 3,3'-диаминобензида (DAB Plus, Dako, K3467). Ткани подвергали контрастному окрашиванию с использованием гематоксилина, и изображения получали на сканере виртуальных срезов Olympus VS120.

Иллюстративные результаты этого исследования показывают, что для AADC против CD166 по настоящему описанию (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4) показано отсутствие иммуноокрашивания на каждом из пяти срезов тканей в соответствии с их замаскированным состоянием и подобно наблюдаемым для контрольного для изотипа ADC. Активация AADC против CD166 по настоящему описанию по-

средством uPA восстанавливала связывание активированного AADC против CD166 в двух тканях с наивысшей экспрессией, предстательной железе и молочной железе. Интенсивность и распределение окрашивания активированного посредством uPA AADC против CD166 по настоящему описанию являлись сходными с конъюгатом исходного антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4).

Пример 10. Связывание антител против CD166 с злокачественными опухолями человека.

В этом примере показано, что CD166 экспрессируется во множестве полученных от пациентов опухолей посредством иммуногистохимического (ИНС) окрашивания с использованием антитела против CD166.

В этом исследовании, фиксированные формалином погруженные в парафин образцы опухолей (FFPE) в микромассах тканей (US Biomax) подготавливали и блокировали с использованием стандартных протоколов, а затем инкубировали с 5 мкг/мл моноклонального антитела кролика против CD166 EPR2759[2] (Abcam, ab109215). Детекцию антитела против CD166 проводили посредством инкубации с 5 мкг/мл конъюгированного с биотином антитела ослы против IgG кролика (Jackson Immunoresearch, 711-065-152) с последующим добавлением ABC-HRP Elite Standard (Vector Laboratories, PK-6100) для формирования комплекса авидин-биотин-HRP с последующим добавлением субстрата 3,3'-диаминобензидина (DAB Plus, Dako, K3467). Ткани подвергали контрастному окрашиванию с использованием гематоксилина, и изображения получали на сканере виртуальных срезов Olympus VS120.

Каждую ткань ядра оценивали по показателю ИНС как "отрицательную" (отсутствие окрашивания), "слабую" (интенсивность 1+ в $\leq 70\%$ клеток опухолей или 2+ в $\leq 30\%$ клеток опухолей), "умеренную" (интенсивность 1+ в $> 70\%$ клеток опухолей или 2+ в $> 30\%$ - $\leq 70\%$ клеток опухолей или 3+ в $\leq 30\%$ клеток опухолей) или "сильную" (интенсивность 2+ в $> 70\%$ клеток опухолей или 3+ в $> 30\%$ клеток опухолей), и процент тестированных образцов, для которых показано "умеренное" или "сильное" ИНС окрашивание для антитела против CD166, показан в табл. 4.1 ниже.

Таблица 4.1

ИНС анализ экспрессии CD166 в полученных от пациентов злокачественных опухолях

Ткань (общее количество образцов)	Тип злокачественной опухоли	% образцов с умеренным или сильным показателем ИНС
Предстательная железа (119)	Аденокарцинома	98,3
Молочная железа (392)	Карцинома протоков	87,5
Легкое (213)	Немелкоклеточный рак легкого	83,1
Голова и шея (122)	Плоскоклеточная карцинома	81,1
Эндометрий (147)	Аденокарцинома	75,5
Яичники (129)	Аденокарцинома	70,5
Билиарная (177)	Холангиокарцинома	56,5

Пример 11. Связывание антител против CD166 с клетками человека и яванского макака.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки активируемых антител против CD166 по этому описанию по связыванию с клетками человека и яванского макака в анализе проточной цитометрии.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий способность антител против CD166 (анти-huCD166) по этому описанию связывать клетки H292 человека или эпителиальные клетки первичной почки яванского макака, как измерено посредством проточной цитометрии. Как показано на фиг. 17, для антител против CD166 по настоящему описанию показана сравнимая аффинность для CD166 на клеточной поверхности клеток как человека, так и яванского макака.

Связывание антитела против CD166 (huM9 vk-1/HcC; VH из SEQ ID NO: 122 и VL из SEQ ID NO: 123) по настоящему описанию с клетками H292 человека или эпителиальными клетками первичной почки яванского макака оценивали с использованием анализа связывания на основе проточной цитометрии. В типичном анализе клетки H292 или эпителиальные клетки первичной почки яванского макака инкубировали с указанными концентрациями антитела против CD166 в PBS+2%FBS в течение 1 ч на льду. После промывки 2X с использованием PBS+2% FBS клетки инкубировали с вторичным антителом козы против IgG человека, конъюгированным с AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch), в течение 30-45 мин на льду. Затем клетки промывали 2X с использованием PBS +2% FBS и фиксировали с использованием 1%

формальдегида. Связанное антитело детектировали с использованием цитометра Guava EasyCyte и измеряли медианную интенсивность флуоресценции (MFI) популяции клеток.

Как показано на фиг. 17, антитело против CD166 по настоящему описанию связывалось с клетками человека и яванского макака со сравнимой аффинностью (EC_{50} 3,1 нМ для клеток человека и EC_{50} 1/7 нМ для клеток яванского макака).

Пример 12. Ингибирование связывания клеток с CD6 посредством антител против CD166.

В этом иллюстративном исследовании для антител против CD166 по настоящему описанию показана способность блокировать адгезию клеток лимфомы человека к иммобилизованному CD6, рецептору, лигандом для которого является CD166.

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий способность антител против CD166 (анти-huCD166; vk-1/HcC) по настоящему описанию блокировать адгезию клеток лимфомы человека HuT-78 к иммобилизованному CD166 человека. В этом анализе экспрессирующие CD166 клетки HuT-78 метили флуоресцентной меткой и инкубировали с рекомбинантным белком CD6, иммобилизованным на пластиковых планшетах. После нескольких промывок связанные клетки HuT-78 детектировали посредством измерения флуоресценции и регистрировали как процент от общей флуоресценции (до отмывки). MAB656 представляет собой мышинное моноклональное антитело против CD166, как зарегистрировано, ингибирующее адгезию клеток в этом анализе (R&D Systems) предположительно посредством нарушения взаимодействия CD166 с его рецептором, CD6. В этом иллюстративном анализе для антитела против CD166 по настоящему описанию и MAB656 показаны сходные уровни ингибирования адгезии клеток к CD6. Для обоих антител показана близкая EC_{50} приблизительно 3,7 нМ. Для контрольного для изотипа антитела не показано ингибирования адгезии клеток.

Пример 13. Зависимая от протеазы активация активируемых антител против CD166.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки зависимой от протеазы активации активируемых антител и конъюгированных активируемых антител против CD166 по этому описанию.

Фиг. 19А представляет собой график, показывающий связывание *in vitro* с CD166 в анализе ELISA антитела против CD166 (анти-huCD166 HcC/vk-1, "CD166 Ab"), конъюгата антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4, "CD166-ADC"), активируемого антитела против CD166 (анти-CD166-7614.6-3001, "CD166 Pb"), конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"). Как указано, анализы проводили также с активируемым посредством протеазы конъюгатом активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством с использованием урокиназы (uPA), матриптазы (MT-SP1) или матриксной металлопротеиназы 14 (MMP14), как указано. С использованием стандартного протокола ELISA белок CD166 человека абсорбировали на планшетах для ELISA и затем инкубировали с указанной концентрацией антитела. Связанное антитело детектировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена вторичного антитела против IgG человека.

Фиг. 19В и 19С представляют собой графики, показывающие связывание с клетками HCC1806 или H292 человека в анализе проточной цитометрии антитела против CD166 (анти-huCD166 HcC/vk-1, "CD166 Ab"), конъюгата антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4, "CD166-ADC"), активируемого антитела против CD166 (анти-CD166-7614.6-3001, "CD166 Pb"), конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"). Как указано, анализы проводили также с активируемым посредством протеазы конъюгатом активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством, с использованием урокиназы (uPA), матриптазы (MT-SP1) или матриксной металлопротеиназы 14 (MMP14), как указано. В качестве контроля тестировали также контрольное для изотипа IgG1 антитело, конъюгированное с spdb-DM4 ("IgG1 изотип-ADC"). В типичном анализе клетки H292 или клетки HCC1806 инкубировали с указанными концентрациями антитела против CD166 в PBS+2%FBS в течение 1 ч на льду. После промывки 2X с использованием PBS+2% FBS клетки инкубировали с вторичным антителом козы против IgG человека, конъюгированным с AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch), в течение 30-45 мин на льду. Затем клетки промывали 2X with PBS +2% FBS и фиксировали с использованием 1% формальдегида. Связанное антитело детектировали с использованием цитометра Guava EasyCyte и измеряли медианную интенсивность флуоресценции (MFI) популяции клеток.

Таблица 14

Связывание конструкций антитела против CD166 с CD166 и клетками человека

Конструкция антитела	ELISA CD166, Kd (нМ)	Проточная цитометрия HCC1806, Kd (нМ)	Проточная цитометрия H292, Kd (нМ)
CD166-AADC	2,9	>300	>200
CD166-AADC, расщепленное uPA	0,18	9,9	5,5
CD166-AADC, расщепленное матриптазой	0,17	9,9	5,3
CD166-AADC, расщепленное MMP-14	0,16	12	6,9
CD166-ADC	0,15	6,1	3,3
CD166-Pb	3,05	>300	>200

Как показано по иллюстративным результатам в табл. 14, для нерасщепленного CD166-AADC показана увеличенная кажущаяся Kd по сравнению с немаскированным CD166-ADC в анализах ELISA и проточной цитометрии. Активация CD166-AADC посредством всех трех протеаз, по-видимому, восстанавливала аффинность связывания конъюгата активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством до уровня, сравнимого с уровнем для немаскированного CD166-ADC.

Фиг. 20А и 20В представляют собой графики, показывающие цитотоксичность *in vitro* для клеток HCC1806 или H292 человека антитела против CD166 (анти-huCD166 HcC/vk-1, "CD166 Ab"), конъюгата антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4, "CD166-ADC"), активируемого антитела против CD166 (анти-CD166-7614.6-3001, "CD166 Pb"), конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"). Как указано, анализы проводили также с активируемым посредством протеазы конъюгатом активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством с использованием урокиназы (uPA), матриптазы (MT-SP1) или матриксной металлопротеиназы 14 (MMP14), как указано. В качестве контроля тестировали также контрольное для изотипа IgG1 антитело, конъюгированное с spdb-DM4 ("IgG1 изотип-ADC"). В типичном анализе, клетки H292 или клетки HCC1806 инкубировали с указанными концентрациями антитела, активируемого антитела, конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством или конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством, обработанного протеазой, и инкубировали клетки в течение 3-5 суток. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа CellTiter Glo. Результаты этих анализов цитотоксичности обобщены ниже в табл. 15.

Таблица 15

Цитотоксичность *In vitro* конструкций антитела против CD166 для клеток человека

Конструкция антитела	H292 EC50 (нМ)	HCC1806 EC50 (нМ)
CD166-AADC	2,2	0,9
CD166-AADC, расщепленное uPA	0,5	0,3
CD166-AADC, расщепленное матриптазой	0,5	0,2
CD166-AADC, расщепленное MMP-14	0,5	0,2
CD166-ADC	0,3	0,1

Эти иллюстративные результаты из табл. 15 и фиг. 20А и 20В показывают, что для конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (CD166-AADC) по настоящему описанию, протеолитически активированных с использованием протеазы, узнающей субстратную последовательность (СМ), показано увеличение в несколько раз цитотоксичности по отношению к клеткам человека по сравнению с соответствующими нерасщепленными AADC против CD166. Кроме того, для активированных AADC против CD166 показана цитотоксичность, сравнимая с немаскированным ADC против

CD166.

Пример 14. Анализ иммунологического риска активированных антител против CD166.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки способности конъюгатов активированного антитела против CD166 с лекарственным средством (CD166-AADC) по настоящему описанию запускать иммунологический ответ в анализе *in vitro*.

В этих иллюстративных исследованиях мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека тестировали в анализах *in vitro* по высвобождению цитокинов и пролиферации в ответ на обработку конъюгатом активированного антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"), конъюгатом антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166 (vk-1/HcC)-spdb-DM4, "CD166-ADC"), положительным контрольным антителом против CD3 (антитело ОКТ3) и конъюгатом контрольного для изотипа антитела с лекарственным средством ("изотип") в следующих концентрациях.

№.	Антитело (нМ)	№.	Антитело (нМ)
1	Без обработки	10	Изотип (0, 67 нМ)
2	Анти-CD3 (0, 67 нМ)	11	Изотип (6, 7 нМ)
3	Анти-CD3 (6, 7 нМ)	12	Изотип (67 нМ)
4	Анти-CD3 (67 нМ)	13	Изотип (670 нМ)
5	Анти-CD3 (670 нМ)	14	CD166-ADC (0, 67 нМ)
6	CD166-AADC (0, 67 нМ)	15	CD166-ADC (6, 7 нМ)
7	CD166-AADC (6, 7 нМ)	16	CD166-ADC (67 нМ)
8	CD166-AADC (67 нМ)	17	CD166-ADC (670 нМ)
9	CD166-AADC (670 нМ)		

В этом иллюстративном исследовании образцы от пяти нормальных, здоровых доноров оценивали в двух отдельных форматах, увлажненного покрытия и растворимого тестируемого вещества. Уровень стандартной панели цитокинов Th1 и Th2, включая IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , и IFN γ , измеряли через 24 ч после обработки. Как показано на фиг. 21A-21D, для титрования дозы либо CD166-AADC, либо соответствующего CD166-ADC не показано значительного высвобождения цитокинов из PBMC человека по сравнению с положительным контрольным (анти-CD3, ОКТ3) и отрицательным контрольным (изотип-ADC) антителами. Кроме того, в отличие от положительного контрольного антитела ОКТ3 ни CD166-AADC, ни CD166-ADC не индуцировали пролиферацию PBMC, как оценено на сутки 8 после обработки.

Пример 16. Зависимая от антитела клеточная цитотоксичность конъюгированных активированных антител против CD166.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки *in vitro* зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) для клеток человека конъюгатов активированного антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию.

Фиг. 22 представляет собой график, показывающий анализ ADCC *in vitro* на клетках аденокарциномы яичника человека (SKOV3) с использованием конъюгата активированного антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию (анти-huCD166 (HcC/vk-1)-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"), конъюгата антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4, "CD166-ADC"), положительного контрольного антитела против EGFR и контрольного для изотипа IgG1-spdb-DM4 ("IgG1 изотип-ADC")

Активность ADCC в этом иллюстративном анализе оценивали с использованием биологического репортерного анализа ADCC (Promega). В этом анализе Т-клетки Jurkat, стабильно трансфицированные Fc γ IIIa и индуцируемым NF-AT люциферазным репортером, инкубировали с экспрессирующими CD166 клетками SKOV3 в присутствии CD166-AADC или контрольных антител. Активность люциферазы стимулирована как функция от связывания антитела с клетками-мишенями, привлечения рецептора Fc γ IIIa и нижестоящей передачи сигналов в эффекторных клетках. Для клеток SKOV3, экспрессирующих высокие уровни CD166 и EGFR, при инкубации с CD166-AADC или CD166-ADC показана активность, сходная с контрольным для изотипа IgG1 ADC, и более низкая, чем наблюдаемая положительным контрольным антителом против EGFR. Титровали дозу CD166-AADC или CD166-ADC в этом анализе. Эти данные позволяют предполагать, что CD166-AADC, так же как CD166-ADC, обладают ограниченным потенциалом для ADCC.

Пример 17. Эффективность конъюгированных активированных антител против CD166 против моделей ксенотрансплантатов опухолей, полученных из клеток и от пациентов.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки эффективности *in vivo* конъюгатов активированного антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против ксенотрансплантатов, полученных из клеток и от пациентов, в моделях опухолей на мышах.

В этих иллюстративных исследованиях, тестировали множество моделей полученных из линий клеток и полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX), представляющих различные типы злокаче-

ственных опухолей. Две модели получены из ксенотрансплантатов линий клеток (клетки H292 немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) и клетки HCC1806 трижды отрицательной карциномы молочной железы), и две модели ксенотрансплантатов получены от пациентов (PDX) для карциномы яичников (CTG-0791) и холангиокарциномы (CTG-0941). Для каждой модели, несущих опухоли мышей случайным образом распределяли на группы, и начинали обработку конъюгатом активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию (анти-huCD166 (HcC/vk-1)-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-AADC"), контрольным для изотипа конъюгатом SPDB-DM4 или контрольным носителем, как указано. Тестируемые вещества вводили внутривенно на сутки исследования 0 и 7 при 3 или 5 мг/кг, как указано.

Как показано на фиг. 23, обработка CD166-AADC, в ожидаемой терапевтической дозе для человека или ниже, приводила к регрессии опухолей и длительным ответам у большинства мышей. Другие сходные иллюстративные исследования обобщены в табл. 16 ниже.

Таблица 16

Эффективность конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством

Модель опухоли	Тип злокачественной опухоли	Противоопухолевый ответ на CD166-AADC
H292	NSCLC	Да
H1975	NSCLC	Да
CTG-0166	NSCLC (плоскоклеточная)	Да
HCC1806	Трижды отрицательный рак молочной железы	Да
CTG-0791	Яичники	Да
CTG-0941	Холангиокарцинома	Да

Пример 18. Цитотоксичность *In vitro* конъюгированных активируемых антител против CD166 против линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей эндометрия.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки эффективности *in vitro* конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей эндометрия.

Как показано на фиг. 24A-24C, эти иллюстративные исследования показали цитотоксичность *in vitro* для линии клеток, происходящих из злокачественных опухолей эндометрия матки человека (линии клеток HEC-1-A, AN3-CA и KLE), конъюгата антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166-spdb-DM4, "CD166-ADC") и конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством (анти-CD166-7614.6-3001-spdb-DM4, "CD166-7614.6-AADC"; и анти-CD166-7614.8-3001-spdb-DM4, "CD166-7614.8-AADC"). Контрольный для изотипа ADC (chKTI-spdb-DM4) использовали в качестве контроля. В типичном анализе клетки инкубировали с указанными концентрациями конъюгата антитела с лекарственным средством или конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством и инкубировали клетки в течение 3-5 суток. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа CellTiter Glo. Эти иллюстративные результаты показали, что для анти-CD166-AADC и анти-CD166-ADC по настоящему описанию показана цитотоксичность против всех линий клеток по сравнению с отрицательным контролем. Эти иллюстративные результаты показали также, что для нерасщепленных анти-CD166-AADC показана более низкая цитотоксичность, чем для анти-CD166-ADC, по настоящему описанию из-за их более низкой аффинности к мишени из-за маскирующего субстрата. Относительная чувствительность линий клеток к веществам против CD166 по настоящему описанию, по-видимому, коррелировала с уровнем экспрессии CD166 в каждой клетке. Как показано на фиг. 24D, для определения относительного количества CD166, экспрессированного на поверхности каждой эндометриальной линии клеток, проводили анализ проточной цитометрии с использованием антител против CD166 по настоящему описанию.

Пример 18. Цитотоксичность *in vitro* конъюгатов активируемых антител против CD166 с лекарственным средством против линий клеток, происходящих из различных злокачественных опухолей.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки эффективности *in vitro* конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию против линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей эндометрия.

В этих иллюстративных исследованиях, цитотоксичность *in vitro* конъюгатов антитела против CD166 с лекарственным средством (анти-CD166 (vk-1/HcC)-spdb-DM4, "CD166-ADC") тестировали против линий клеток, происходящих из множества злокачественных опухолей. В типичном анализе, клетки инкубировали в течение 3-5 суток с CD166-ADC в различных концентрациях (от 0,1 до 50 нМ). Жизне-

способность клеток измеряли с использованием анализа CellTiter Glo. Цитотоксичность CD166-ADC сравнивали с отрицательным контролем для изотипа (chKTI-spdb-DM4). В случае линии клеток PC3 рака предстательной железы и линии клеток SAS плоскоклеточной карциномы головы и шеи тестируемое вещество представляло собой анти-CD166-vc-MMAD и отрицательный контроль представлял собой контрольный для изотипа паливизумаб-vc-MMAD. Результаты этих анализов цитотоксичности обобщены ниже в табл. 8.

Таблица 8
Цитотоксичность *in vitro* конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством против клеток злокачественных опухолей человека

Тип клеток	Тип злокачественной опухоли	Цитотоксичность CD166-ADC?
ZR75-1	Карцинома протоков молочной железы человека (положительная по рецептору эстрогенов)	Да
ZR75-30	Карцинома протоков молочной железы человека (положительная по рецептору эстрогенов)	Да
MDA-MB-361	Карцинома протоков молочной железы человека (положительная по рецептору эстрогенов)	Да
HCC1954	Карцинома протоков молочной железы человека (трижды отрицательная)	Да
HCC1143	Рак молочной железы человека (трижды отрицательный)	Да
PC3	Аденокарцинома предстательной железы человека	Да
SAS	Плоскоклеточная карцинома головы и шеи человека	Да

Пример 19. Визуализация *in vivo* активируемых антител против CD166 в модели на мышах ксенотрансплантата рака легкого.

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD166 по настоящему описанию показана активация *in vivo*, зависящая от опухолеассоциированной протеазы, и связывание с CD166, экспрессированным в модели на мышах ксенотрансплантата рака легкого (NSCLC), посредством флуоресцентной визуализации *in vivo*.

На фиг. 25А показана визуализация *in vivo* живых мышей с ксенотрансплантатами опухолей легкого (клеток H292) с использованием конъюгированных с флуоресцентной меткой антител против CD166 и активируемых антител против CD166 по настоящему описанию. В этом исследовании самкам мышей *nu/nu* в возрасте 7-8 недель ($n=3$) имплантировали подкожно в правый задний пах 5×10^6 клеток H292, линии клеток, происходящей из немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого человека. После того, как опухоли выросли до 300-380 мм³, антитело против CD166 (vk-1/HcC) по настоящему описанию ("CD166-Ab"), активируемые антитела против CD166 с отличающимися маскирующими последовательностями и субстратными последовательностями по настоящему описанию (анти-CD166-7614.6-3001, анти-CD166-7614.8-2001), или замаскированное антитело против CD166 по настоящему описанию, лишенное домена CM ("CD166 7614.6-NSUB"), вводили в форме предварительно блокированного реагента каждой из мышей в дозе 5 мг/кг. В качестве контроля контрольное для изотипа антитело (паливизумаб) вводили сходным образом. Через 48 ч мышам инъецировали антитело против CD166, меченное AlexaFluor 750 (анти-CD166-AF750). Мышей подвергали флуоресцентной визуализации *in vivo* через 24, 72 и 96 ч после введения анти-CD166-AF750 с использованием сигнала возбуждения при 745 нм и детекции сигнала излучения при 800 нм. Изображены репрезентативные мыши, визуализированные через 96 ч. Шкала показывает относительную амплитуду детектированного флуоресцентного сигнала. Среднее отношение опухоли к фону (TBR) для каждого тестируемого вещества, как измерено для мышей, показано на фиг. 25В.

Результаты этого иллюстративного исследования показывают, что по флуоресцентным сигналам от немаскированного антитела против CD166 по настоящему описанию и активируемых антител против CD166 по настоящему описанию, они являлись способными связывать CD166 в ксенотрансплантате, таким образом, блокируя последующее связывание флуоресцентно меченного антитела против CD166. В отличие от этого, соответствующее замаскированное антитело против CD166, но с отсутствием участка

расщепления протеазой (СМ), не блокировало последующее связывание CD166-AF750 до степени, сравнимой с контролем для изотипа. Без связи с какой-либо конкретной теорией, это иллюстративное исследование показало, что активируемые антитела против CD166 по настоящему описанию можно активировать *in vivo* посредством расщепления опухолеассоциированной протеазой, таким образом, позволяя активированному активируемому антителу против CD166 связываться CD166 в ксенотрансплантате опухоли до степени, сравнимой с немаскированным антителом против CD166 по настоящему описанию. Замаскированное антитело против CD166, лишенное домена расщепления протеазой (СМ) по настоящему описанию, не поддавалось активации таким же способом, и таким образом, не связывалось существенно с ксенотрансплантатом опухоли.

Пример 20. Эффективность конъюгированных активируемых антител против CD166 против моделей ксенотрансплантатов опухолей, полученных из клеток.

Иллюстративные исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки эффективности *in vivo* конъюгатов активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию против ксенотрансплантатов, полученных из клеток, в моделях опухолей на мышах.

В этих иллюстративных исследованиях, конъюгаты активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию тестировали по эффективности против моделей ксенотрансплантатов опухолей на мышах для рака легкого (клетки H292 немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC)). В этом исследовании несущих опухоли мышшей обрабатывали конъюгатами антитела против CD166 с лекарственным средством и конъюгатом активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию, включая анти-CD166-7614-2001-spdb-DM4 ("CD166-7614-2001-DM4"), анти-CD166-7614.6-2001-spdb-DM4 ("CD166-7614.6-2001-DM4"), анти-CD166-7614.8-3001-spdb-DM4 ("CD166-7614.8-3001-DM4"), анти-huCD166-spdb-DM4 ("CD166-DM4") и контроль для изотипа (паливизумаб-spdb-DM4; "Isotype-DM4"). 5 мг/кг тестируемых веществ вводили внутривенно на сутки исследования 1 и 8 каждой мыши и средний объем опухоли (MTV) ксенотрансплантата H292 измеряли на указанные сутки.

Как показано на фиг. 26, обработка конъюгатами активируемого антитела против CD166 с лекарственным средством по настоящему описанию приводила к уменьшению MTV с течением времени до степени, сравнимой с наблюдаемой для немаскированного конъюгата с лекарственным средством анти-CD166-DM4. Анти-CD166-DM4 AADC, обладающий маскировкой со значительно более высоким эффектом на уменьшение аффинности связывания исходного антитела с CD166 (см., например, табл. 17), по видимому, обладал значительно более низкой эффективностью, чем AADC против CD166, обладающие более низкой маскировкой.

Другие варианты осуществления.

В то время как изобретение описано в отношении его подробного описания, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не ограничения объема изобретения, определенного объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации включены в объем следующего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где AB специфически связывается с CD166 человека и CD166 яванского макака, где AB содержит

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 (CDR1) вариативной области тяжелой цепи (VH) GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127);

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 2 (CDR2) VH NIWWSKDKN (SEQ ID NO: 128);

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 3 (CDR3) VH IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129);

аминокислотную последовательность CDR1 вариативной области легкой цепи (VL) RSSKSLHNSGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQLLHNSGITYLY (SEQ ID NO: 131);

аминокислотную последовательность CDR2 VL QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133); и

аминокислотную последовательность CDR3 VL AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134).

2. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD166 млекопитающего, содержащее

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где AB специфически связывается с CD166 человека и CD166 яванского макака, которое содержит аминокислотную последовательность CDR1 VH GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127), аминокислотную последовательность CDR2 VH NIWWSKDKN (SEQ ID NO: 128), аминокислотную последовательность CDR3 VH IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129), аминокислотную последовательность

CDR1 VL RSSKSLHNSNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLHNSNGITYLY (SEQ ID NO: 131), аминокислотную последовательность CDR2 VL QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133) и аминокислотную последовательность CDR3 VL AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134);

маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если активированное антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы.

3. Активируемое антитело по п.2, где ММ обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая выше константы диссоциации АВ с CD166 млекопитающего.

4. Активируемое антитело по п.2 или 3, где ММ не влияет и не конкурирует с АВ за связывание с CD166 млекопитающего, если активированное антитело находится в расщепленном состоянии.

5. Активируемое антитело по любому из пп.2-4, где ММ представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

6. Активируемое антитело по любому из пп.2-5, где полипептидная последовательность ММ отличается от последовательности CD166 человека.

7. Активируемое антитело по любому из пп.2-6, где полипептидная последовательность ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру связывания АВ.

8. Активируемое антитело по любому из пп.2-7, где СМ является субстратом для протеазы, которая активна в пораженной заболеванием ткани.

9. Активируемое антитело по любому из пп.2-8, где АВ присоединено к СМ.

10. Активируемое антитело по любому из пп.2-9, где АВ напрямую присоединено к СМ.

11. Активируемое антитело по любому из пп.2-10, где АВ присоединено к СМ через связывающий пептид.

12. Активируемое антитело по любому из пп.2-11, где ММ присоединена к СМ таким образом, что активированное антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ.

13. Активируемое антитело по любому из пп.2-12, где активированное антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ.

14. Активируемое антитело по любому из пп.2-13, где активированное антитело содержит связывающий пептид между СМ и АВ.

15. Активируемое антитело по любому из пп.2-14,

где активированное антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2); и

где активированное антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ;

где два связывающих пептида не должны быть идентичны друг другу; и/или

где каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно 1-20 аминокислот.

16. Активируемое антитело по любому из пп.2-15, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 121, 122 или 239; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 242, 244, 246, 248, 303, 310, 312, 314, 316 и 363-474.

17. Активируемое антитело по любому из пп.2-16, где

ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135-238; и

СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-87 и 318-358.

18. Активируемое антитело по п.17, где

ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219-238; и

СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-87 и 336-358.

19. Конъюгированное активированное антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD166 млекопитающего, содержащее

активируемое антитело по любому из пп.2-18; и

средство, конъюгированное с АВ, где средство представляет собой токсин, или его фрагмент, или подающуюся детекции группу.

20. Конъюгированное антитело, или конъюгированное активированное антитело, содержащее антитело по п.1, конъюгированное со средством, или активированное антитело по п.19, где

(i) когда средство представляет собой токсин или его фрагмент, средство выбирают из группы, состоящей из ингибитора микротрубочек, повреждающего нуклеиновую кислоту средства, доластатина или его производного, ауристин или его производного, мейтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного, пирролобензодиазепина или его

производного, ауристатина E или его производного, монометилауристатина E (ММАЕ), монометилауристатина F (ММАF), монометилауристатина D (ММАD), майтанзиноида, выбранного из группы, состоящей из DM1 и DM4, майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, дуокармицина, пирролбензодиазепина и димера пирролобензодиазепина; или

(ii) когда средство представляет собой поддающуюся детекции группу, поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19 или 20, где его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv и scAb.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19 или 20, где АВ содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121 или 122, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19 или 20, где АВ специфически связывается с CD166 человека.

24. Активируемое антитело по любому из пп.2-18 или 21-23 или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121 и 122, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 363-370, 373, 374, 377, 378, 381, 382, 385, 386, 389, 390, 393, 394, 397, 398, 401, 402, 405, 406, 409, 410, 413, 414, 417, 418, 421, 422, 425, 426, 429, 430, 433, 434, 437, 438, 441, 442, 445, 446, 449, 450, 453, 454, 457, 458, 461, 462, 465, 466, 469, 470, 473 и 474.

25. Активируемое антитело по любому из пп.2-18, 23 или 24 или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-23, где

(i) активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где комбинация аминокислотных последовательностей выбрана из

(a) тяжелой цепи АВ, которая содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VH, содержащих SEQ ID NO: 127, 128 и 129,

(b) легкой цепи АВ, которая содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VL, содержащих SEQ ID NO: 130, 132 и 134,

(c) MM, которая содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (MM), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219, 222, 224 и 230, и

(d) CM, которая содержит аминокислотную последовательность из субстратных последовательностей (CM), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 32, 39, 44, 52, 61, 70, 71, 76, 87, 318 и 338-358; и/или

(ii) активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где для данной комбинации аминокислотных последовательностей

(a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VH с SEQ ID NO: 121 или 122 или последовательностей CDR VH, содержащих SEQ ID NO: 127, 128 и 129,

(b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VL с SEQ ID NO: 123, 124, 125 или 126, или последовательностей CDR VL, содержащих либо SEQ ID NO: 130, 132 и 134, либо SEQ ID NO: 131, 133 или 134,

(c) MM содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (MM), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219-225 и 227-238, и

(d) CM содержит аминокислотную последовательность из субстратных последовательностей (CM), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 20, 21, 24, 32, 39-41, 44, 51, 52, 54, 59-71, 76 и 318-358; и/или

(iii) активируемое антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 121, 122 или 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 242, 244, 246, 248, 303, 310, 312, 314, 316 и 363-474.

26. Конъюгированное антитело, содержащее

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где AB содержит

(i) аминокислотную последовательность CDR1 VH GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127), аминокислотную последовательность CDR2 VH NIWWSSEDKH (SEQ ID NO: 128), аминокислотную последовательность CDR3 VH IDYGNFYAFTY (SEQ ID NO: 129), аминокислотную последовательность CDR1 VL RSSKSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 131), аминокислот-

ную последовательность CDR2 VL QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133) и аминокислотную последовательность CDR3 VL AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134), или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121 и 122, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 363-370, 373, 374, 377, 378, 381, 382, 385, 386, 389, 390, 393, 394, 397, 398, 401, 402, 405, 406, 409, 410, 413, 414, 417, 418, 421, 422, 425, 426, 429, 430, 433, 434, 437, 438, 441, 442, 445, 446, 449, 450, 453, 454, 457, 458, 461, 462, 465, 466, 469, 470, 473 и 474, или

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 122 и 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 242, 244, 246, 248, 303, 310, 312, 314, 316 и 363-474; и

(b) средство, конъюгированное с АВ, где средство выбрано из группы, состоящей из ауристинина Е, монометилауристинина F (ММАF), монометилауристинина Е (ММАЕ), монометилауристинина D (ММАD), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина и дуокармицина.

27. Конъюгированное активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD166 млекопитающего, содержащее

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD166 млекопитающего, где АВ специфически связывается с CD166 человека и CD166 яванского макака;

маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ с CD166 млекопитающего, если активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии;

расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы; и

средство, конъюгированное с АВ, где АВ содержит

(i) аминокислотную последовательность CDR1 VH GFSLSTYGMGVG (SEQ ID NO: 127), аминокислотную последовательность CDR2 VH NIWVSEDKH (SEQ ID NO: 128), аминокислотную последовательность CDR3 VH IDYGNDYAFTY (SEQ ID NO: 129), аминокислотную последовательность CDR1 VL RSSKSLHNSGITYLY (SEQ ID NO: 130) или RSSQSLHNSGITYLY (SEQ ID NO: 131), аминокислотную последовательность CDR2 VL QMSNLAS (SEQ ID NO: 132) или QMSNRAS (SEQ ID NO: 133) и аминокислотную последовательность CDR3 VL AQNLELPYT (SEQ ID NO: 134); или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121 и 122, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 363-370, 373, 374, 377, 378, 381, 382, 385, 386, 389, 390, 393, 394, 397, 398, 401, 402, 405, 406, 409, 410, 413, 414, 417, 418, 421, 422, 425, 426, 429, 430, 433, 434, 437, 438, 441, 442, 445, 446, 449, 450, 453, 454, 457, 458, 461, 462, 465, 466, 469, 470, 473 и 474; или

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 122 и 239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-126, 242, 244, 246, 248, 303, 310, 312, 314, 316 и 363-474; и

где средство выбрано из группы, состоящей из ауристинина Е, монометилауристинина F (ММАF), монометилауристинина Е (ММАЕ), монометилауристинина D (ММАD), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина и дуокармицина.

28. Активируемое антитело по любому из пп.2-18 или 21-23 или активируемое антитело по любому из пп.19-25, где ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135-238, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219-238, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-87 и 318-358, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-87 и 336-358.

29. Конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-28, где средство конъюгировано с АВ посредством линкера,

где линкер, с помощью которого средство конъюгировано с АВ, содержит группу SPDB, группу vc или группу PEG2-VC; и/или

где линкер и токсин, конъюгированный с АВ, содержит группу SPDB-DM4, группу vc-ММАD, группу vc-ММАЕ, группу vc-дуокармицин или группу PEG2-VC-ММАD; или

где линкер представляет собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер.

30. Конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое в активированном состоянии связывается с CD166 млекопитающего; и

токсин, конъюгированный с АВ посредством линкера,

где конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело содержит аминокислотные последовательности, линкер и токсин, выбранные из

(a) АВ, который содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи или последовательность варибельного домена тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 122 или 239;

(b) АВ, который содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи или последовательность варибельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 240, 242, 244, 246, 252, 303, 310, 312, 314, 316, 363-370, 387-402, 427-442 и 451-474; и

(c) линкера и токсина, которые содержат линкер и токсин, выбранные из группы, состоящей из vc-MMAD, PEG2-vc-MMAD, vc-MMAE, vc-дуокармицин и spdb-DM4.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1 или 21, активируемое антитело по любому из пп.2-18, 21-25, 27 или 28 или конъюгированное антитело либо конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-30 и носитель.

32. Фармацевтическая композиция по п.31, содержащая дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

33. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 и 23-25.

34. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая активируемое антитело по любому из пп.2-18, 21-25, 27 и 28.

35. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.33 или 34.

36. Способ получения антитела или активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или активируемого антитела, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.33 или 34 или вектор по п.35.

37. Способ изготовления активируемого антитела, которое в активированном состоянии связывается с CD166 млекопитающего, где способ включает

(a) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где активируемое антитело содержит активируемое антитело по любому из пп.2-18, 21-25 или 28; и

(b) выделение активируемого антитела.

38. Способ по п.37, который дополнительно включает конъюгирование средства с выделенным активируемым антителом, где средство представляет собой токсин, или его фрагмент, или поддающуюся детекции группу; и/или где

(i) средство представляет собой ингибитор микротрубочек; или

(ii) средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство; или

(iii) средство выбрано из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристатина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамина или его производного и пирролобензодиазепина или его производного; или

(iv) средство представляет собой ауристатин E или его производное, монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), монометилауристатин D (MMAD), майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4, майтанзиноид DM4, майтанзиноид DM1, дуокармицин, пирролобензодиазепин или димер пирролобензодиазепина; и/или

(v) средство представляет собой поддающуюся детекции группу; и/или

(vi) поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

39. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD166 млекопитающего, включающий введение больному терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1 или 21, активируемого антитела по любому из пп.2-18, 21-25 и 28, конъюгированного антитела либо конъюгированного активируемого антитела по любому из пп.19-30 или фармацевтической композиции по п.31 или 32 больному.

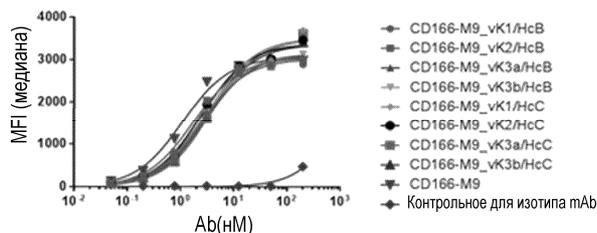
40. Способ по п.39, где нарушение или заболевание представляет собой нарушение или заболевание, при котором пораженные заболеванием клетки экспрессируют CD166 млекопитающего.

41. Способ по п.39 или 40, где

(i) нарушение или заболевание представляет собой злокачественную опухоль, где злокачественная опухоль представляет собой аденокарциному, злокачественную опухоль желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, рак эндометрия, карциноидную злокачественную опухоль, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак ободочной кишки, глиому, рак головы и шеи, лейкоз, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфому, меланому, рак ротоглотки, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, метастазирующую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, плоскоклеточный рак, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеполовой системы или уротелиальный рак.

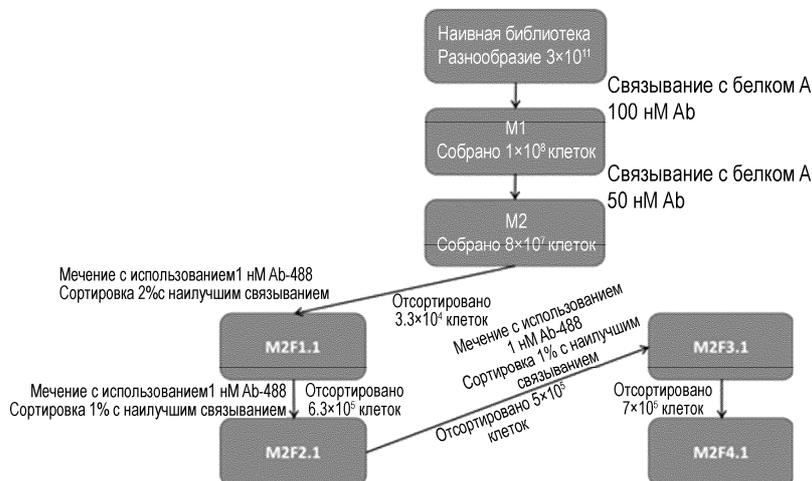
42. Способ по п.41, где рак молочной железы представляет собой отрицательный по Her2 рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы или положительный по рецептору эстрогенов рак молочной железы.

43. Способ по п.41, где рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.
 44. Способ по п.41, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
 45. Способ по любому из пп.39-44, где указанный способ предназначен для ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD166 млекопитающего.
 46. Способ по любому из пп.39-44, где способ предназначен для ингибирования, блокирования или предотвращения связывания природного лиганда или рецептора с CD166 млекопитающего, где природный лиганд или рецептор представляет собой CD6 млекопитающего.
 47. Способ по любому из пп.39-44, где экспрессия и/или активность CD166 млекопитающего нарушена.
 48. Способ по любому из пп.39-44, где способ включает введение дополнительного средства, где дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.



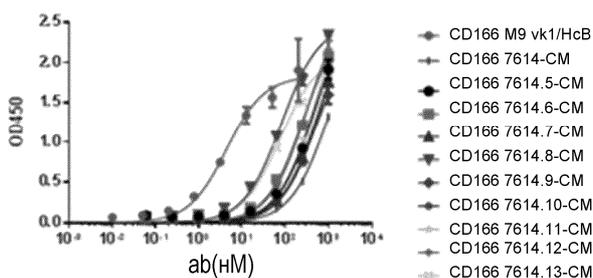
Ab	Кажущаяся Kd(nM); FACS
CD166-M9_vK1/HcB	2.39
CD166-M9_vK2/HcB	1.79
CD166-M9_vK3a/HcB	2.88
CD166-M9_vK3b/HcB	2.61
CD166-M9_vK1/HcC	3.26
CD166-M9_vK2/HcC	2.50
CD166-M9_vK3a/HcC	3.76
CD166-M9_vK3b/HcC	3.19
CD166-M9 chimera	1.12

Фиг. 1



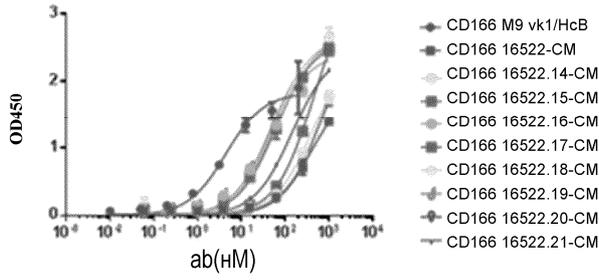
Фиг. 2

ELISA связывания CD166



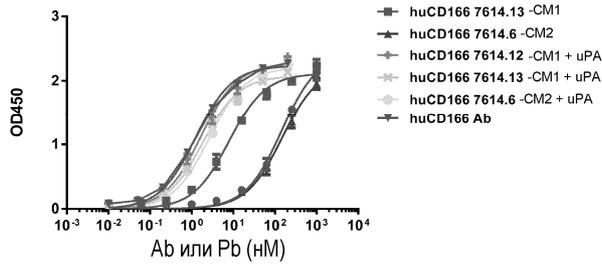
Фиг. 3А

ELISA связывания CD166



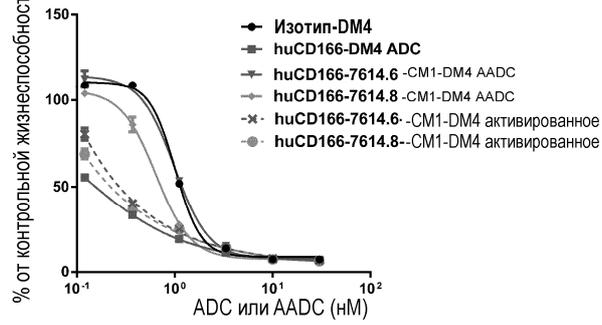
Фиг. 3В

ELISA связывания CD166

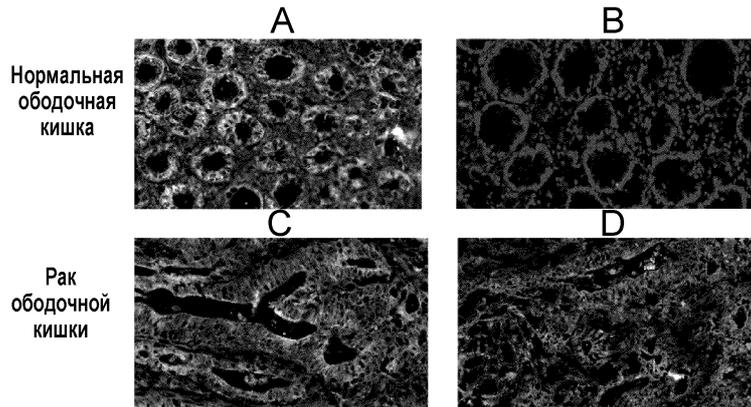


Фиг. 4

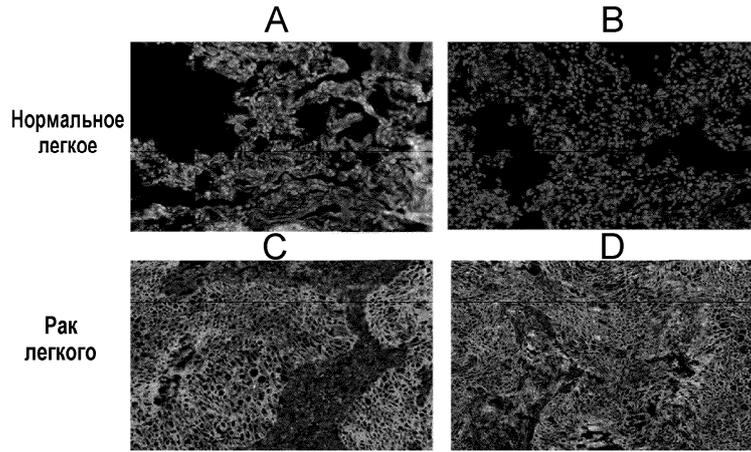
Цитотоксичность (клетки HCC1806)



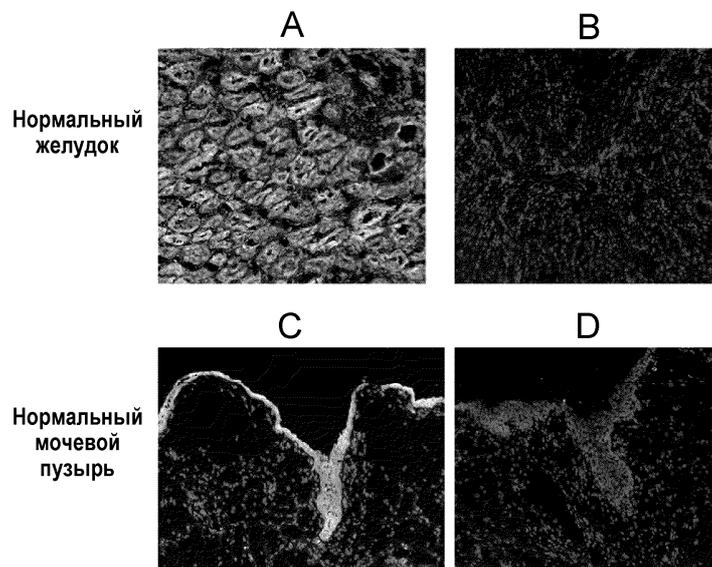
Фиг. 5



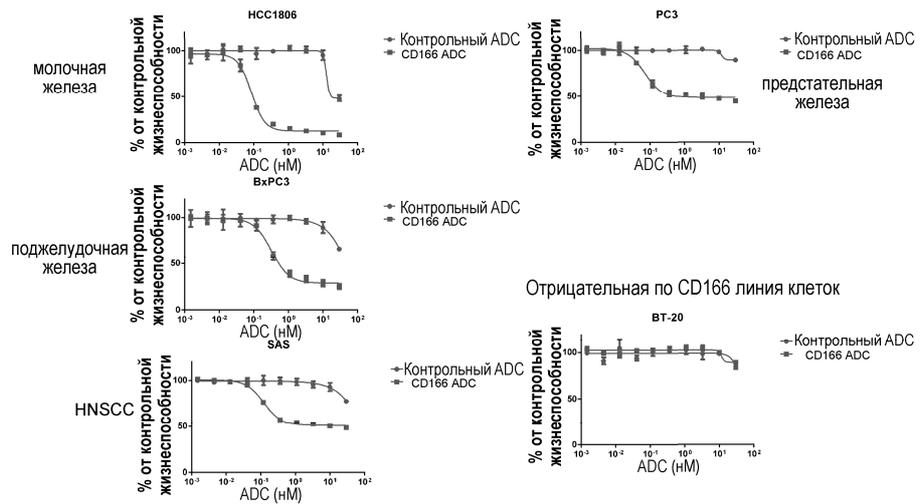
Фиг. 6



Фиг. 7

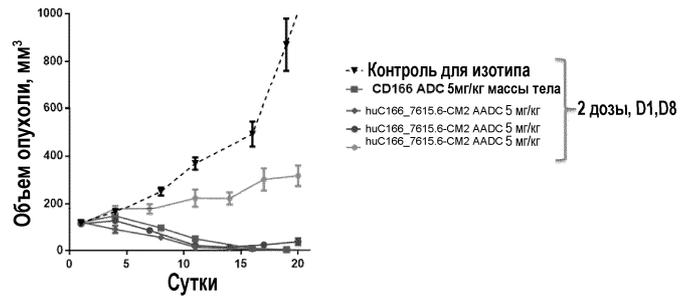


Фиг. 8



Фиг. 9

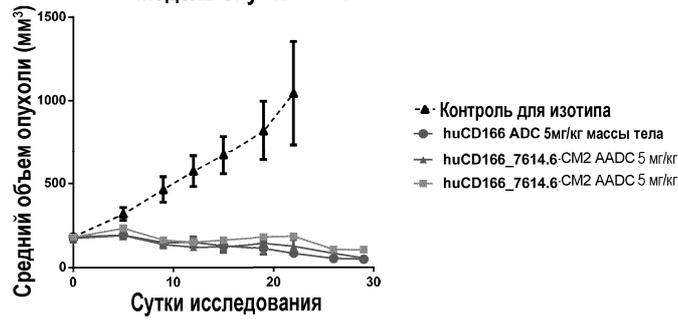
Модель опухоли НСС1806



AADC превосходит по эффективности эталонный стандарт

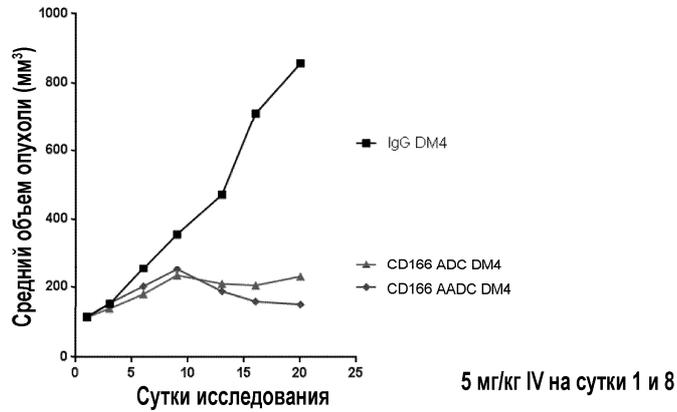
Фиг. 10

Модель опухоли H292



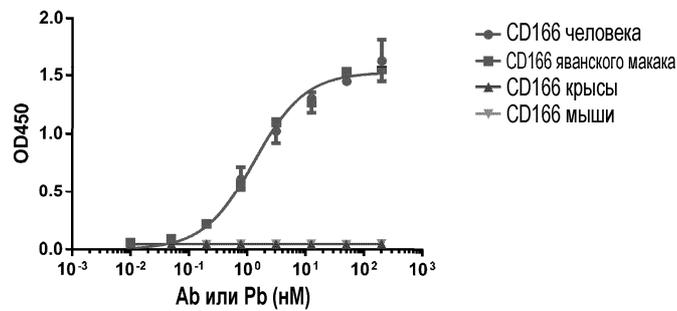
Фиг. 11

H1975 - CD166

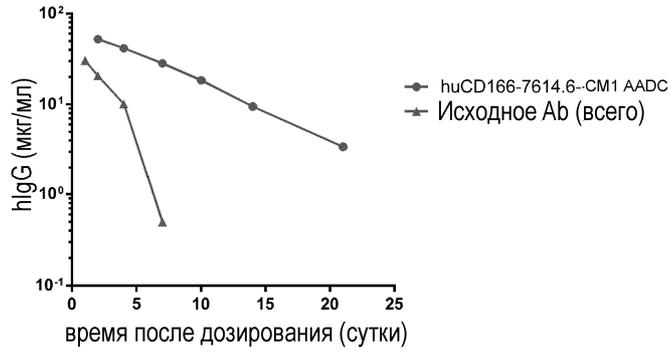


Фиг. 12

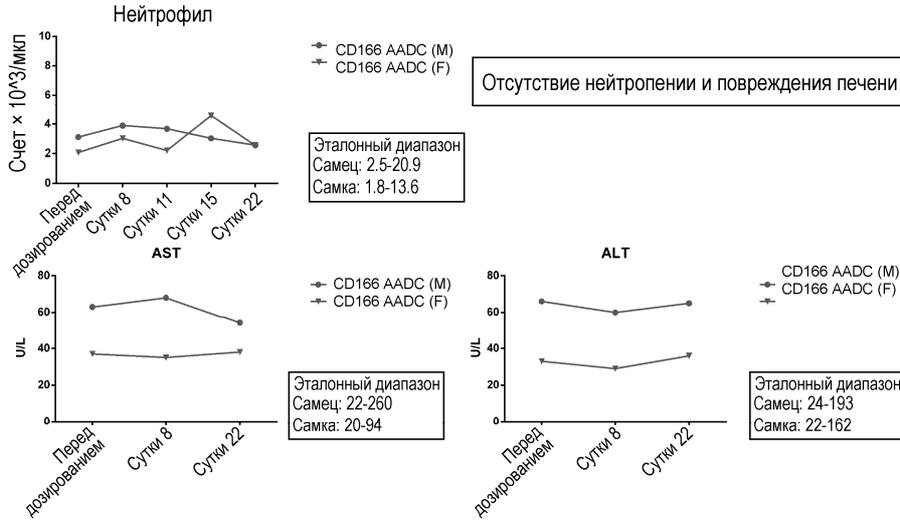
ELISA - связывание для человека и яванского макака идентично



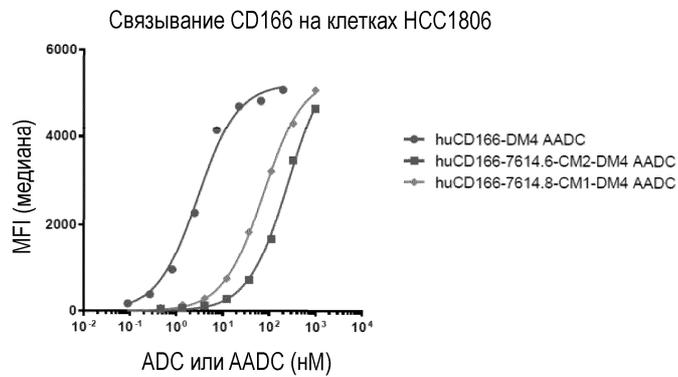
Фиг. 13



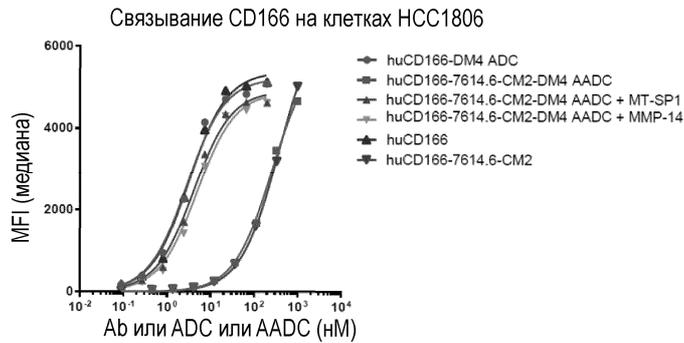
Фиг. 14



Фиг. 15

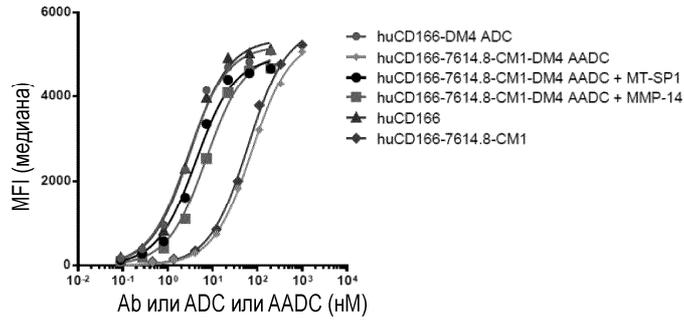


Фиг. 16А

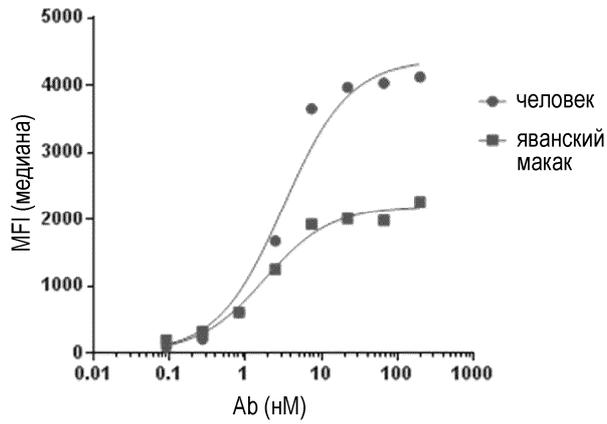


Фиг. 16В

Связывание CD166 на клетках HCC1806

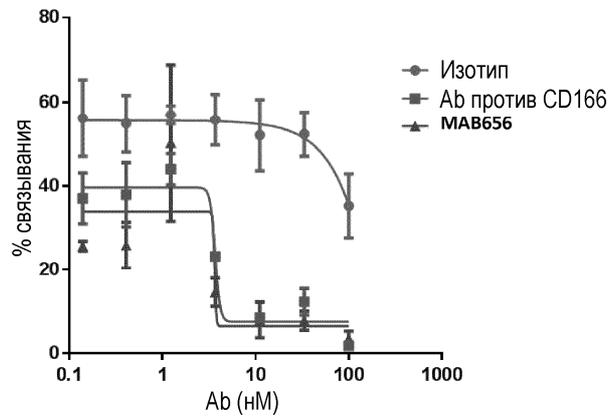


Фиг. 16С



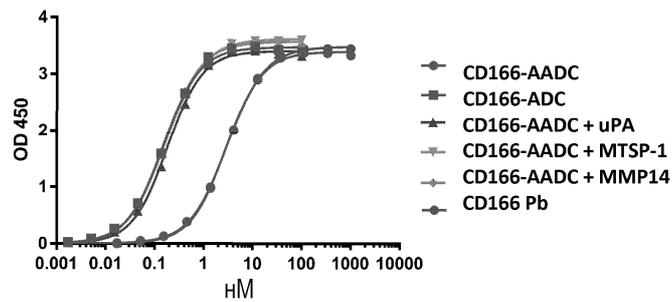
Фиг. 17

Анализ адгезии клеток HuT-78



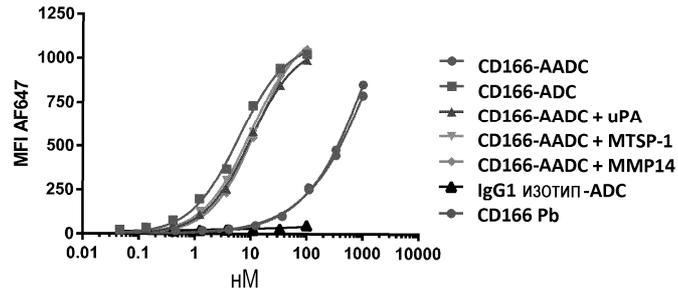
Фиг. 18

Связывание в ELISA



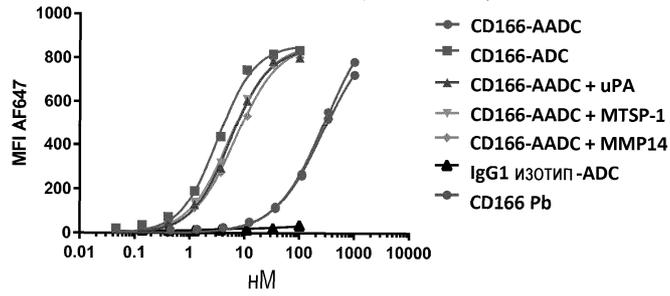
Фиг. 19А

Связывание клеток человека (клетки HCC1806)

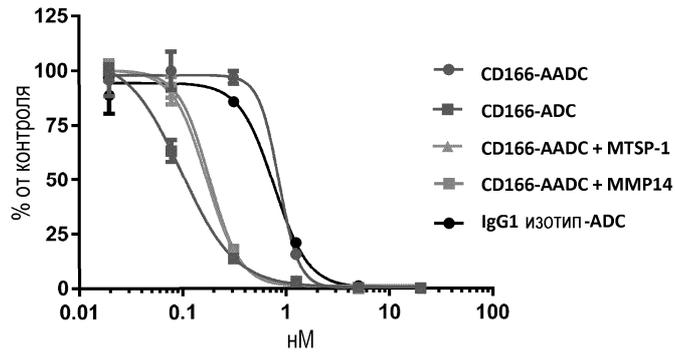


Фиг. 19В

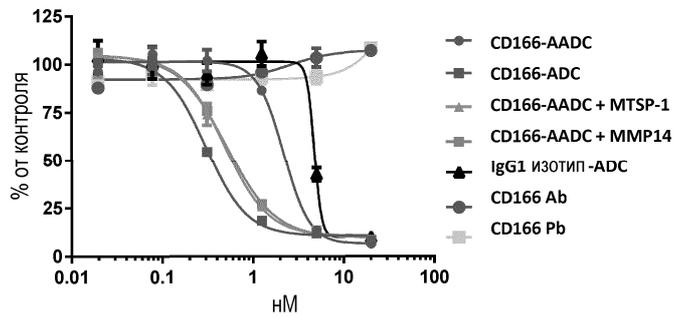
Связывание клеток человека (клетки H292)



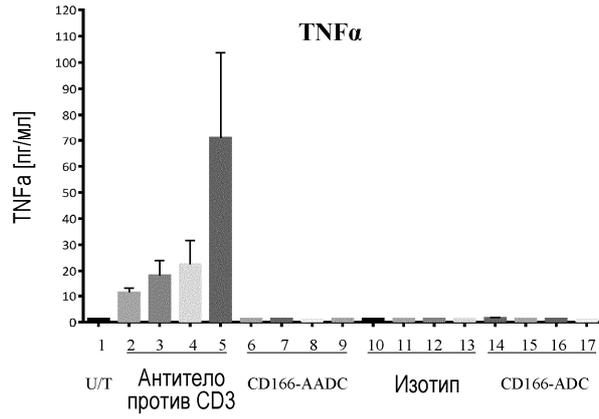
Фиг. 19С



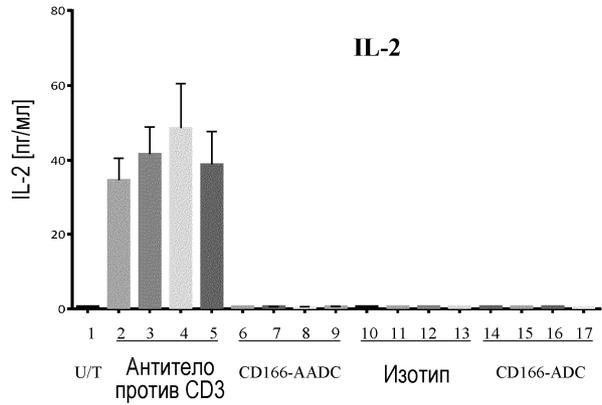
Фиг. 20А



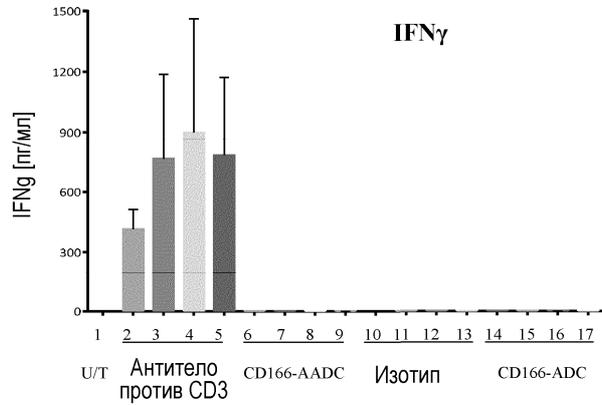
Фиг. 20В



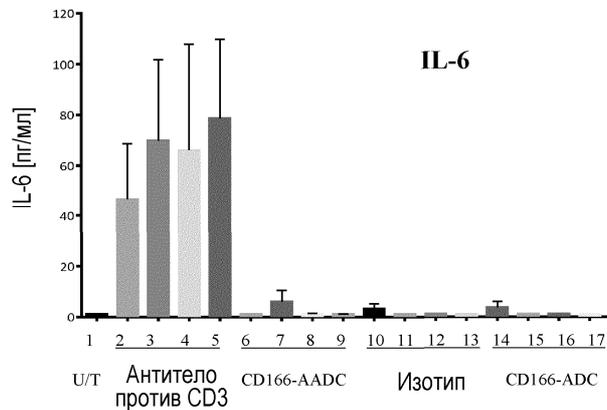
Фиг. 21А



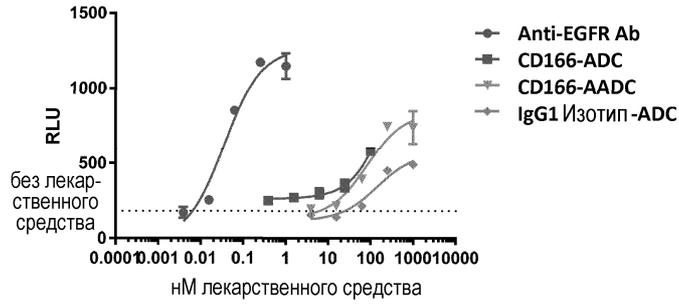
Фиг. 21В



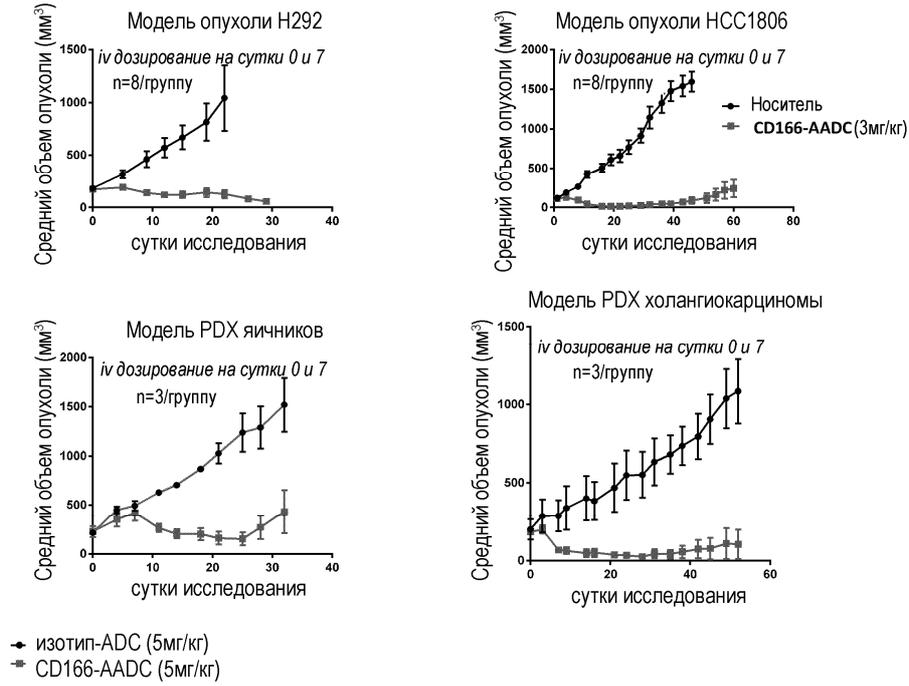
Фиг. 21С



Фиг. 21D

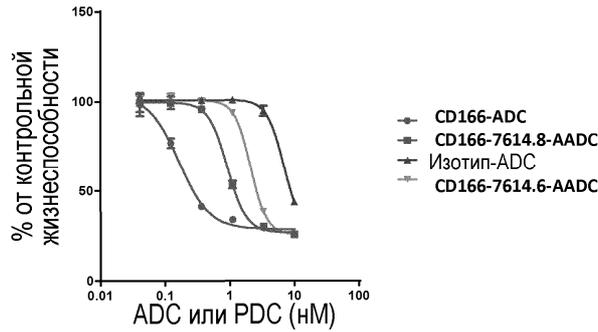


Фиг. 22

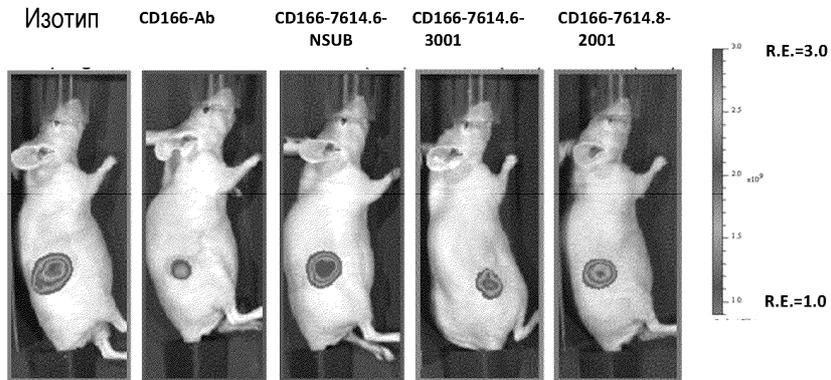
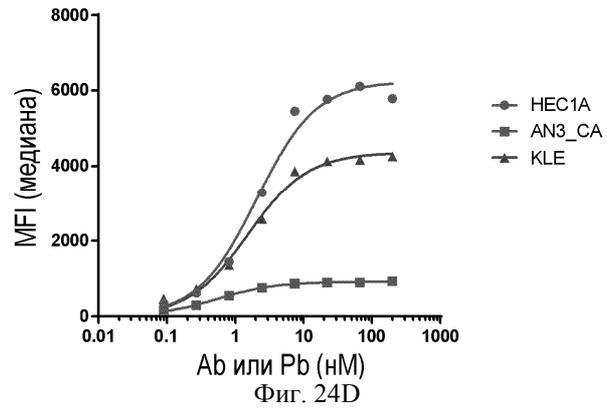
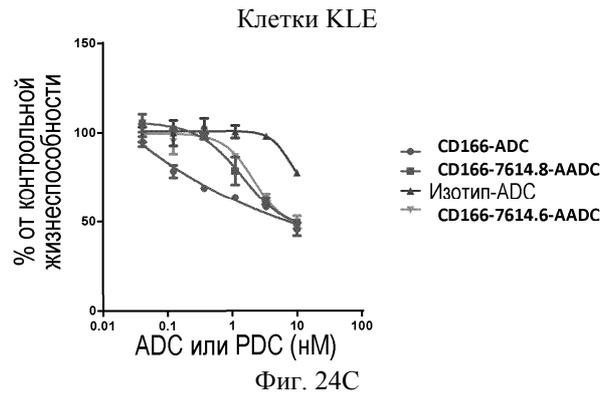
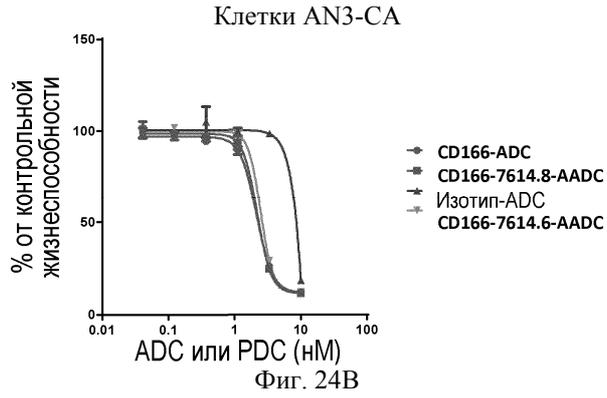


Фиг. 23

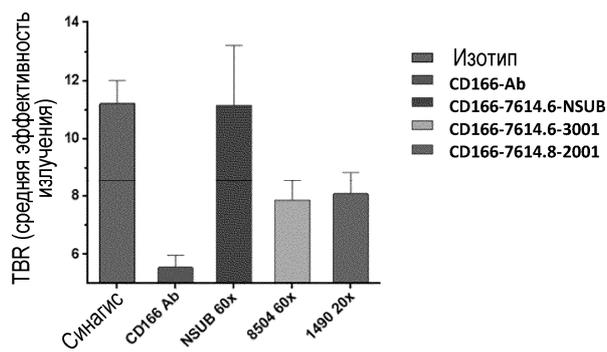
Клетки HEC-1-A



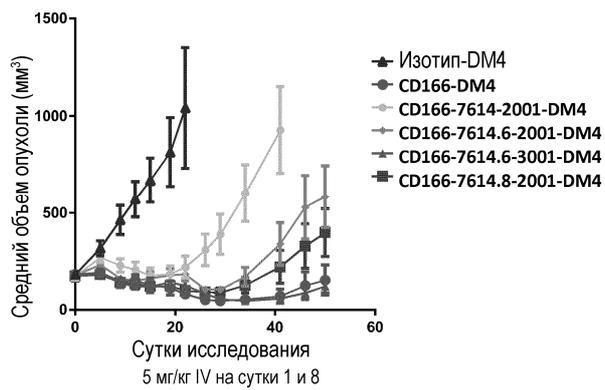
Фиг. 24А



Фиг. 25А



Фиг. 25В



Фиг. 26

