

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042544**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.27**

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

(21) Номер заявки  
**201791647**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.01.20**

### (54) РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ МАТРИКСНЫМИ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗАМИ И РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СЕРИНОВЫМИ ПРОТЕИНАЗАМИ ВЕЩЕСТВА И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) **62/105,490; 62/258,015; 62/278,713**

(32) **2015.01.20; 2015.11.20; 2016.01.14**

(33) **US**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/US2016/014132**

(87) **WO 2016/118629 2016.07.28**

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

(72) Изобретатель:  
**Мур Стефен Джеймс, Нгуен Маргарет**  
**Тхи Луу, Хостеттер Дэниел Р.,**  
**Васильева Ольга, Сэйджерт Джейсон**  
**Гэри, Терретт Джонатан Александр,**  
**Уэст Джеймс Уилльям (US)**

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

(56) JEANNETTE GERSPACH ET AL.: "Target-selective activation of a TNF prodrug by urokinase-type plasminogen activator (uPA) mediated proteolytic processing at the cell surface", **CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY**, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 55, no. 12, 25 April 2006 (2006-04-25), pages 1590-1600, XP019422516, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-006-0162-6, p.1591 col.1 par.2 - col.2 par.2, p.1593 col.2 par.3, p.1593 col.1 par.4 - col.2 par.1, p.1594 fig.1(a), p.1591 col.2 par.2, p.1598 col.2 par.2 - p.1599 col.1 par.1 & GERSPACH J. ET AL.: "Restoration of membrane TNF-like activity by cell surface targeting and matrix metalloproteinase-mediated processing of a TNF prodrug", **CELL DEATH AND DIFFERENTIATION**, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 13, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 273-284, XP002413275, ISSN: 1350-9047, DOI: 10.1038/SJ.CDD.4401735, p.281, col.2

**WO-A2-2014052462**

**WO-A2-2014107599**

LIU SHIHUI ET AL.: "Intermolecular complementation achieves high-specificity tumor targeting by anthrax toxin", **NATURE BIOTECHNOLOGY**, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 23, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 725-730, XP002349856, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1091, p.726, col.1, par.2

**WO-A1-2014176284**

(57) Изобретение относится в основном к полипептидам, которые содержат по меньшей мере первую расщепляемую группу (CM1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (CM2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP), к активируемым антителам и другим большим молекулам, которые содержат эти полипептиды, которые содержат, по меньшей мере, CM1, которая является субстратом по меньшей мере для одной MMP протеаза, и, по меньшей мере, CM2, которая является субстратом по меньшей мере для одной SP протеаза, и к способам получения и использования таких полипептидов, которые содержат, по меньшей мере, CM1, которая является субстратом по меньшей мере для одной MMP протеазы, и, по меньшей мере, CM2, которая является субстратом по меньшей мере для одной SP протеазы, при ряде терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

**B1****042544****042544****B1**

### **Родственные заявки**

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/105490, зарегистрированной 20 января 2015 года, предварительной заявки США № 62/258015, зарегистрированной 20 ноября 2015 года, и предварительной заявки США № 62/278713, зарегистрированной 14 января 2016 года, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

### **Включение списка последовательностей**

Содержание текстового файла, названного "CYTM037001WO\_ST25", который был создан 15 января 2016 года и размер которого составляет 456 кБ, таким образом, полностью включен посредством ссылки.

### **Область изобретения**

Изобретение в основном относится к полипептидам, которые содержат по меньшей мере первую расщепляемую группу (СМ1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (ММР), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (СМ2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP), к активируемым антителам и другим более крупным молекулам, которые содержат такие полипептиды, которые содержат по меньшей мере СМ1, которая является субстратом по меньшей мере для одной ММР протеазы, и СМ2, которая является субстратом по меньшей мере для одной SP протеазы, и к способам получения и использования таких полипептидов, которые содержат по меньшей мере СМ1, которая является субстратом по меньшей мере для одной ММР протеазы, и СМ2, которая является субстратом по меньшей мере для одной SP протеазы, при ряде терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

### **Уровень техники, предшествующий изобретению**

Протеазы представляют собой ферменты, которые разрушают белки путем расщепления пептидных связей между аминокислотными остатками. В природе протеазы встречаются во всех организмах и участвуют в различных физиологических реакциях от простого разрушения до высокорегулируемых путей. Известно, что некоторые протеазы разрушают конкретные пептидные связи в зависимости от наличия конкретной аминокислотной последовательности в белке.

Таким образом, существует необходимость в идентификации новых субстратов протеаз и использовании этих субстратов при ряде терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к аминокислотным последовательностям, которые содержат по меньшей мере первую расщепляемую группу (СМ1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (ММР), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (СМ2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). Эти аминокислотные последовательности совокупно обозначают в настоящем описании как "субстраты СМ1-СМ2". Этот термин не предназначен накладывать какое-либо требование касательно ориентации или другой структурной организации первой расщепляемой группы (СМ1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (ММР), и по меньшей мере второй расщепляемой группы (СМ2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). Таким образом, термин "субстраты СМ1-СМ2" включает субстраты СМ1-СМ2, обладающие структурной организацией от N-конца к C-концу, как указано ниже: СМ1-СМ2 или СМ2-СМ1. Термин "субстраты СМ1-СМ2" также включает субстраты, где по меньшей мере участок последовательности СМ1 перекрывается по меньшей мере с участком последовательности СМ2.

Субстраты СМ1-СМ2, описываемые в настоящем описании, являются пригодными при ряде терапевтических, диагностических и профилактических показаний. Например, такие субстраты СМ1-СМ2 являются пригодными в активируемых антителах, которые включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (АВ), которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (ММ), связанную по меньшей мере с одним антигенсвязывающим или эпитопсвязывающим доменом АВ, таким образом, что связывание ММ снижает способность АВ связываться со своей мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит по меньшей мере первую СМ (СМ1) и вторую СМ (СМ2). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере а участок последовательности субстрата СМ1 перекрывается по меньшей мере с участком последовательности СМ2. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата СМ1 и последовательность субстрата СМ2 имеют по меньшей мере один общий аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата СМ1 и последовательность субстрата СМ2 имеют по меньшей мере два общих аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата СМ1 и последовательность субстрата СМ2 имеют по меньшей мере три общих аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата СМ1 и последовательность субстрата СМ2 имеют три или более общих аминокислотных остатка.

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 представляют собой отдельные полипептиды, которые являются функционально связанными друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 представляют собой отдельные полипептиды, которые непосредственно связаны друг с другом, т.е. N-конец одного субстрата непосредственно связан с C-концом другого являющегося субстратом полипептида. В некоторых вариантах осуществления N-

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

В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 представляют собой отдельные полипептиды, которые являются функционально связанными друг с другом, по меньшей мере, посредством одной сшивающей группы.

В некоторых вариантах осуществления первая расщепляемая группа CM1 и вторая расщепляемая группа CM2 в активируемом антителе в нерасщепленном состоянии имеют структурная организация от N-конца к С-концу, как указано ниже: MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB или AB-CM1-CM2-MM.

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

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

В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GSGGS (SEQ ID NO: 350).

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

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

В некоторых вариантах осуществления CM1 представляет собой субстрат для MMP и содержит по меньшей мере последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 20); QNQALRMA (SEQ ID NO: 21); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 351); STFPFGMF (SEQ ID NO: 352); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 353); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 354); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 355); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 356); WATPRPMR (SEQ ID NO: 357); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 358); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 359); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 360); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 361); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 362); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 363); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 364); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 365); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 366); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 367); PAGLWLDP (SEQ ID NO: 368); ISSGLSS (SEQ ID NO: 369); ISSGL (SEQ ID NO: 480); ISSGLLS (SEQ ID NO: 481); ISSGLL (SEQ ID NO: 482) и/или VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 411).

В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность QNQALRMA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность AQNLLGMV (SEQ ID NO: 351). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность STFPFGMF (SEQ ID NO: 352). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность PVGYTSSL (SEQ ID NO: 353). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность DWLYWPGI (SEQ ID NO: 354). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность MIAPVAYR (SEQ ID NO: 355). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность RPSPMWAY (SEQ ID NO: 356). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность WATPRPMR (SEQ ID NO: 357). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность FRLLDWQW (SEQ ID NO: 358). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность LKAAPRWA (SEQ ID NO: 359). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность GPSHLVLT (SEQ ID NO: 360). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность LPGGLSPW (SEQ ID NO: 361). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность MGLFSEAG (SEQ ID NO: 362). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность SPLPLRVP (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность RMHLRSLG (SEQ ID NO: 364). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность LAAPLGLL (SEQ ID NO: 365). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность AVGLLAPP (SEQ ID NO: 366). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность LLAPSHRA (SEQ ID NO: 367). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность PAGLWLDP (SEQ ID NO: 368). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 369). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 411). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность ISSGL (SEQ ID NO: 480). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность ISSGLLS (SEQ ID NO: 481). В некоторых вариантах осуществления CM1 содержит аминокислотную последовательность ISSGLL (SEQ ID NO: 482).

В некоторых вариантах осуществления CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления SP выбрана из активатора плазминогена u-типа (uPA, также обозначаемого как урокиназа), матриптазы (также обозначаемой в настоящем описании как MT-SP1 или MTSP1) и их сочетаний. Примеры других SP, которые расщепляют CM2, описываемую в настоящем описании, включают в качестве неограничивающего примера, активированный белок C; катепсин A; катепсин G; химазу; протеазу фактора свертывания, такого как, например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa; эластазу; гранзим B; гуанидинобензоатазу; HtrA1; эластазу нейтрофилов человека; лактоферрин; марапсин; NS3/4A; PACE4; плазмин; PSA; tPA; тромбин; триптазу; трансмембранную сериновую протеазу II типа (TTSP), такую как, например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптазу 2, TMPRSS2, TMPRSS3 и/или TMPRSS4.

Например, подходящая CM2 расщепляется по меньшей мере одной сериновой протеазой и содержит последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 370); SARGPSRW (SEQ ID NO: 371); TARGPSFK (SEQ ID NO: 372); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 18); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 373); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 374); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 375); AARGPAIH (SEQ ID NO: 376); RGAFFNPM (SEQ ID NO: 377); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 378); RGPATPIM (SEQ ID NO: 379); RGPA (SEQ ID NO: 380); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 412); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 413); TSGRSANP (SEQ ID NO: 414); SGRSANPRG (SEQ ID NO: 468); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 415); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 547); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 548); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 549); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 550); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 551); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 552); LSGRSANP (SEQ ID NO: 553); LSGRSANI (SEQ ID NO: 554) и/или LSGRSDNI (SEQ ID NO: 71).

В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 370). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность SARGPSRW (SEQ ID NO: 371). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность TARGPSFK (SEQ ID NO: 372). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNH (SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность GGWHTGRN (SEQ ID NO: 373). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность HTGRSGAL (SEQ ID NO: 374). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность PLTGRSGG (SEQ ID NO: 375). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность AARGPAIH (SEQ ID NO: 376). В некоторых вариантах осуществления CM2 содержит аминокислотную последовательность RGAFFNPM (SEQ ID NO: 377). В



страт CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSGNHGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность QNQAL-RMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 17). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 469). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 470). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 471). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 483). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 484). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 485). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 486). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 487). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 488). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 489). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 490). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 515). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 516). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 517). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 518). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 519). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 520). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 521). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 522). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 555). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 557).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB или AB-CM1-CM2-MM.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый сшивающий пептид (LP1) и второй сшивающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB, AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM, MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB или AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два сшивающих пептида необязательно являются идентичными друг другу.

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

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP'') между AB и CM1. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP''') между CM2 и маскирующей группой (MM). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP'') между AB и CM1 и сшивающий пептид (LP''') между CM2 и MM. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид между AB и CM1 (LP'') и сшивающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP') между

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

В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GSGGS (SEQ ID NO: 350).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 382), 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: 383), GSGGG (SEQ ID NO: 384), GSGSG (SEQ ID NO: 385), GSGGG (SEQ ID NO: 386), GGGSG (SEQ ID NO: 387) и GSSSG (SEQ ID NO: 388).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 389), GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 390), GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 391), GSSGGSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 392), GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 393) или GSSGGSGSGSGG (SEQ ID NO: 394).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 395), GSSGT (SEQ ID NO: 396) или GSSG (SEQ ID NO: 397).

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации AB составляет приблизительно 100 нМ или менее для связывания с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления AB представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления AB представляет собой иммунологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления AB представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления AB представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одиночную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scab, dAb, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления такой AB представляет собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью принадлежащее человеку моноклональное антитело.

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

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

В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности, например, какой-либо полипептидной последовательности, принадлежащей животному, которая естественным образом расщепляется той же MMP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности млекопитающего, которая естественным образом расщепляется той же MMP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности человека, которая естественным образом расщепляется той же MMP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной какой-либо полипептидной последовательности, например, любой полипептидной последовательности животного, которая естественным образом расщепляется той же MMP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной любой полипептидной последовательности млекопитающего, которая естественным образом

расщепляется той же MMP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM1 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной MMP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной любой полипептидной последовательности человека, которая естественным образом расщепляется той же MMP протеазой.

В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности, например, какой-либо полипептидной последовательности животного, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности млекопитающего, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая по существу не является идентичной какой-либо полипептидной последовательности человека, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной любой полипептидной последовательности, например, любой полипептидной последовательности животного, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной любой полипептидной последовательности млекопитающего, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность субстрата CM2 субстрата CM1-CM2 представляет собой субстрат по меньшей мере для одной SP и содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 90% или более идентичной любой полипептидной последовательности человека, которая естественным образом расщепляется той же SP протеазой.

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, а также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который связывает мишень и маскирующую группу (MM), которая уменьшает способность антиген- или эпитоп-связывающего домена AB связываться со своей мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело к Jagged, содержащее аминокислотную последовательность антитела к Jagged, описываемого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162 или SEQ ID NO: 164, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления CM1-CM2 содержится в активируемом антителе, содержащем аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 439, 477, 479, 507-514, 539-546, 561 и 562, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления CM1-CM2 содержится в активируемом антителе, содержащем аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 439, 477, 479, 507-514, 539-546, 561 и 562, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело к EGFR, содержащее аминокислотную последовательность антитела к EGFR, описываемого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109 или SEQ ID NO: 110.



В некоторых вариантах осуществления CM1-CM2 содержится в активируемом антителе, содержащем аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 472, 474, 499-506, 531-538, 559 и 560, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления CM1-CM2 содержится в активируемом антителе, содержащем аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 472, 474, 499-506, 531-538, 559 и 560, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления CM1-CM2 содержится в активируемом антителе, содержащем аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 472, 474, 499-506, 531-538, 559 и 560, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 также представляет собой субстрат по меньшей мере для одной дополнительной протеазы.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой MMP протеазу, отличную от MMP протеазы, которая расщепляет CM1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой MMP протеазу, выбранную из группы, состоящей из MMP1; MMP2; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; MMP14; MMP15; MMP16; MMP17; MMP19; MMP20; MMP23; MMP2 4; MMP2 6 и MMP2 7.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза представляет собой SP протеазу, отличную от SP протеазы, которая расщепляет CM2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная SP протеаза выбрана из группы, состоящей из uPA; матриптазы; активированного белка C; катепсина А; катепсина G; химазы; фактора свертывания протеаза, такого как, например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa; эластазы; гранзима В; гуанидинобензоатазы; HtrA1; эластазы нейтрофилов человека; лактоферрина; марапсина; NS3/4A; PACE4; плазмина; PSA; tPA; тромбина; триптазы; трансмембранной сериновой протеазы II типа (TTSP), такой как, например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы 2, TMPRSS2, TMPRSS3 и TMPRSS4.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл. 6.

Таблица 6. Иллюстративные протеазы и/или ферменты

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

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое содержит маскирующую группу (ММ), первый сшивающий пептид (LP1) и второй сшивающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: средство-ММ1-LP1-СМ1-СМ2-LP2-АВ, АВ-LP2-СМ2-СМ1-LP1-ММ-средство, средство-ММ1-LP1-СМ2-СМ1-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ1-СМ2-LP1-ММ-средство. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два сшивающих пептида необязательно должны быть идентичными друг другу.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой конъюгированное активируемое антитело, которое содержит маскирующую группу (ММ), первый сшивающий пептид (LP1) и второй сшивающий пептид (LP2), и антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: средство-ММ1-LP1-СМ1-СМ2-LP2-АВ-средство, средство-АВ-LP2-СМ2-СМ1-LP1-ММ-средство, средство-ММ1-LP1-СМ2-СМ1-LP2-АВ-средство или средство-АВ-LP2-СМ1-СМ2-LP1-ММ-средство. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления два сшивающих пептида необязательно должны быть идентичными друг другу.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP'') между маскирующей группой (MM) и CM1. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP''') между CM2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP'') между MM и CM1 и сшивающий пептид (LP''') между CM2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид между MM и CM1 (LP'') и сшивающий пептид между CM1 и CM2 (LP'). В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2 и сшивающий пептид (LP''') между CM2 и АВ. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP'') между MM и CM1, сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и сшивающий пептид (LP''') между CM2 и АВ.

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

В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GSGGS (SEQ ID NO: 350).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 382), 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 GSGS (SEQ ID NO: 383), GSGSG (SEQ ID NO: 384), GSGSG (SEQ ID NO: 385), GSGGG (SEQ ID NO: 386), GGGSG (SEQ ID NO: 387) и GSSSG (SEQ ID NO: 388).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 389), GSSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 390), GSSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 391), GSSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 392), GSSGSGSGSG (SEQ ID NO: 393) или GSSGSGSGS (SEQ ID NO: 394).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 395), GSSGT (SEQ ID NO: 396) или GSSG (SEQ ID NO: 397).

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 является связанным или иным образом прикрепленным к антителу. Например, CM1-CM2 используют для связывания одного или нескольких средств с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (AB), который связывается с данной мишенью, таким образом, что CM1-CM2 отщепляется при воздействии MMP и/или SP, и средство высвобождается из AB. Иллюстративные мишени включают, но не ограничиваются ими, мишени, представленные в табл. 1. Иллюстративные AB включают, но не ограничиваются ими, антитела, представленные в табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации AB составляет приблизительно 100 нМ или менее для связывания с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент, который связывается с мишенью, представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одиночную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scab, dAb, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его иммунологически активный фрагмент, который связывается с мишенью, представляет собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью принадлежащее человеку моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления MM имеет константу диссоциации связывания с AB, которая является не больше константы диссоциации AB с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления MM не препятствует или не конкурирует с AB за связывание с мишенью в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления MM представляет собой полипептид длиной приблизительно от 2 до 40 аминокислот. Например, MM представляет собой полипептид длиной до приблизительно 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM отличается от последовательности любого природного партнера по связыванию AB. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию AB. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM является не более чем на 40, 30, 25, 20, 15 или 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию AB.

В некоторых вариантах осуществления средство, конъюгированное с AB, или AB активируемого антитела представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. Как используют в настоящем описании, фрагмент токсина представляет собой фрагмент, который сохраняет токсическую активность. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с AB через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с AB через линкер, который содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с AB через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновые кислоты средство, такое как алкилирующее ДНК средство или интеркалятор ДНК, или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, приведенной в табл. 3. 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 E или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления средство представляет

собой монометилауристатин D (MMAD). 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 калихимицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазефина.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой противовоспалительное средство.

В некоторых вариантах осуществления антитело и/или активируемое антитело также содержит детектируемую группу. В некоторых вариантах осуществления детектируемая группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка включает визуализирующее средство, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металлов или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления визуализирующее средство содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления контрастирующее средство содержит йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), циановый флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. В некоторых вариантах осуществления люминесцентная метка содержит производное N-метилакридиния. В некоторых вариантах осуществления метка включает метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или более гап-тенов.

В некоторых вариантах осуществления антитело и/или АВ активируемого антитела естественным образом содержит одну или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления АВ можно конструировать так, чтобы он содержал одну или более дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело является полиспецифическим, обозначаемым в настоящем описании как полиспецифические антитела и/или конъюгированные полиспецифические антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое антитело является биспецифическим или триспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело формулируют в виде части пробиспецифической молекулы, активирующей Т-клетки (pro-BITE). В некоторых вариантах осуществления антитело и/или конъюгированное антитело формулируют в виде части модифицированной Т-клетки с прохимерным антигенным рецептором (pro-CAR) или другого конструируемого рецептора или другой эффекторной клетки иммунной системы, такой как модифицированная CAR NK-клетка. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело формулируют в виде части модифицированной Т-клетки с прохимерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело формулируют в виде части модифицированной NK-клетки с прохимерным антигенным рецептором (CAR).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело является полиспецифическим, обозначаемым в настоящем описании как полиспецифические активируемые антитела и/или конъюгированные полиспецифические активируемые антитела. Как используют в настоящем описании, термины, такие как "активируемое антитело" и все их грамматические варианты, если не указано иное, предназначены включать, но не ограничиваются ими, варианты осуществления, где активируемое антитело представляет собой полиспецифическое активируемое антитело по изобретению. Как используют в настоящем описании, термины, такие как "конъюгированное активируемое антитело" и все их грамматические варианты, если не указано иное, предназначены включать, но не ограничиваются ими, варианты осуществления, где конъюгированное активируемое антитело представляет собой конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело является биспецифическим или трифункциональным. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело формулируют в виде части пробиспецифической моле-

кулы, активирующей Т-клетки (pro-BITE). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело формулируют в виде части модифицированной Т-клетки с прохимерным антигенным рецептором (pro-CAR) или другого конструируемого рецептора.

В некоторых вариантах осуществления антитела, конъюгаты антител, активируемые антитела, конъюгированные активируемые антитела, полиспецифические активируемые антитела и/или конъюгированные полиспецифические активируемые антитела, описываемые в настоящем описании, используют в сочетании с одним или более дополнительными средствами или комбинацией дополнительных средств. Подходящие дополнительные средства включают существующие в настоящее время виды фармацевтической и/или хирургической терапии для предполагаемого применения, такого как, например, злокачественная опухоль. Например, активируемые антитела, конъюгированные активируемые антитела, полиспецифические активируемые антитела и/или конъюгированные полиспецифические активируемые антитела можно использовать в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или антинеопластическим средством.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой полиспецифическое активируемое антитело. Полиспецифические активируемые антитела, предоставленные в настоящем описании, представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают два или более различных антигена или эпитопа и которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (ММ), связанную по меньшей мере с одним антиген- или эпитопсвязывающим доменом полиспецифического антитела, таким образом, что связывание ММ снижает способность антиген- или эпитопсвязывающего домена связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ является связанным с антиген- или эпитопсвязывающим доменом полиспецифического антитела через субстрат CM1-CM2, которые функционирует как субстрат по меньшей мере для одной MMP протеазы и по меньшей мере для одной SP протеазы. Активируемые полиспецифические антитела, предоставленные в настоящем описании, являются стабильными в кровообращении, активируемыми в предполагаемых участках терапии и/или диагностики, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани и при активации характеризуются связыванием с мишенью, которое является, по меньшей мере, сравнимым с соответствующим немодифицированным полиспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, включает по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается с мишенью Jagged, например, Jagged 1 и/или Jagged 2, и который содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH выбрана из CDR1 VH, последовательность которой содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO: 398); последовательности CDR2 VH, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SIDPEGRQTY-YADSVKG (SEQ ID NO: 399); последовательности CDR3 VH, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность DIGGRSAFDY (SEQ ID NO: 400), и их сочетаний.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, включает по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается с мишенью Jagged, например, Jagged 1 и/или Jagged 2, и который содержит комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL выбрана из последовательности CDR1 VL, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность RASQSISSY (SEQ ID NO: 401); последовательности CDR2 VL, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO: 402); последовательности CDR3 VL, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QQTVVAPPL (SEQ ID NO: 403), и их сочетаний.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, включает по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается с мишенью Jagged, например, Jagged 1 и/или Jagged 2, и который содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где по меньшей мере одна из последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH выбрана из последовательности CDR1 VH, которая содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SYAMS (SEQ ID NO: 398); последовательности CDR2 VH, которая содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95,





В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, включает по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается EGFR и который содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где последовательность CDR1 VH содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности NYGVH (SEQ ID NO: 404); последовательность CDR2 VH содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности VIWSGGNTDYNTPTFS (SEQ ID NO: 405); последовательность CDR3 VH содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 406); последовательность CDR1 VL содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 407); последовательность CDR2 VL содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности KYASESIS (SEQ ID NO: 408), и последовательность CDR3 VL содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 409).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело к Jagged, содержащее аминокислотную последовательность антитела к Jagged, описываемого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162 или SEQ ID NO: 164, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 439, 477, 479, 507-514, 539-546, 561 и 562.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело к EGFR, содержащее аминокислотную последовательность антитела к EGFR, описываемого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит субстрат CM1-CM2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-17, 22, 469-471, 483-490, 515-522, 555 и 557, и антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109 или SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 472, 474, 499-506, 531-538, 559 и 560.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируе-



мое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 439, 477, 479, 507-514, 539-546, 561 и 562.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, предоставленное в настоящем описании, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифическое активируемое антитело и/или конъюгированное полиспецифическое активируемое антитело по изобретению, содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 472, 474, 499-506, 531-538, 559 и 560.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также содержит средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое 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 конъюгировано с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый 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 интеркалятор ДНК, или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с АВ через линкер, который содержит по меньшей мере одну последовательность субстрата CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, приведенной в табл. 3. 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 калихимицин 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 представляет собой противовоспалительное средство.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также содержит детектируемую группу. В некоторых вариантах осуществления детектируемая группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка включает визуализирующее средство, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металлов или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления визуализирующее средство содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления контрастирующее средство содержит йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), циановый флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. В некоторых вариантах осуществления люминесцентная метка содержит производное N-метиلاكридия. В некоторых вариантах осуществления метка содержит метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенов.

[illegible]

- 17 -

ло, которое включает антитело или фрагмент антитела (АВ), который специфически связывается с данной мишенью, где АВ связан с маскирующей группой (ММ), которая снижает способность АВ связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело дополнительно содержит субстрат CM1-CM2, который является субстратом по меньшей мере для одной ММР и по меньшей мере одной SP. Композиции и способы, предоставленные в настоящем описании, обеспечивают присоединение одного или более средств к одному или более остаткам цистеина в АВ без нарушения активности (например, маскировки, активации или активности связывания) активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, предоставленные в настоящем описании, обеспечивают присоединение одного или более средств к одному или более остаткам цистеина в АВ без снижения или иным образом нарушения одной или более дисульфидных связей в ММ. Композиции и способы, предоставленные в настоящем описании, обеспечивают получение активируемого антитела, которое конъюгировано с одним или более средств, например, любым из ряда терапевтических, диагностических и/или профилактических средств, например, в некоторых вариантах осуществления без того, чтобы любое средств (любое из средств) являлось конъюгированным с ММ активируемого антитела. Композиции и способы, предоставленные в настоящем описании, обеспечивают получение конъюгированных активируемых антител, в которых ММ сохраняет способность фактически и эффективно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы, предоставленные в настоящем описании, обеспечивают получение конъюгированных активируемых антител, в которых активируемое антитело все еще является активируемым, т.е., расщепляется в присутствии ММР, которая может расщеплять субстрат CM1-CM2.

Активируемое антитело содержит по меньшей мере одну точку конъюгации для средства, но в способах и композициях, предоставленных в настоящем описании, доступными являются меньше чем все возможные точки конъюгации со средством. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, входящие в состав дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в межцепевых дисульфидных связях. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в межацепевых дисульфидных связях, но не атомы серы, участвующие в внутрисульфидных дисульфидных связях. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации представляют собой атомы серы цистеина или других аминокислотных остатков, содержащих атом серы. Такие остатки могут встречаться естественным образом в структуре антитела или могут быть введены в антитело сайт-специфическим мутагенезом, химическим преобразованием или ошибочным включением неприродных аминокислот.

Также раскрыты способы получения конъюгата активируемого антитела, содержащего одну или более межацепевых дисульфидных связей в АВ и одну или более внутрисульфидных дисульфидных связей в ММ, и раскрыто лекарственное средство, взаимодействующее со свободными тиолами. Способ, как правило, включает частичное восстановление межацепевых дисульфидных связей в активируемом антителе восстановителем, таким как, например, TCEP, и конъюгацию лекарственного средства, взаимодействующего со свободными тиолами, с частично восстановленным активируемым антителом. Как используют в настоящем описании, термин частичное восстановление относится к случаям, когда активируемое антитело приводят в контакт с восстановителем, и не все дисульфидные связи, например, не все возможные участки конъюгации восстанавливают. В некоторых вариантах осуществления восстанавливают менее 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или менее 5% всех возможных участков конъюгации.

Некоторые варианты осуществления относятся к способу восстановления и конъюгации средства, например лекарственного средства, с активируемым антителом, который приводит к избирательности расположения средства. Способ, как правило, включает частичное восстановление активируемого антитела восстановителем, таким образом, что любые участки конъюгации в маскирующей группе или другой не являющееся АВ части активируемого антитела не восстанавливаются, и конъюгацию средства с межацепевыми тиолами в АВ. Участок(и) конъюгации выбран таким образом, чтобы обеспечивать желаемое расположение средства для того, чтобы обеспечивать прохождение конъюгации на желаемом участке. Восстановитель, например, представляет собой TCEP. Условия реакции восстановления, такие как, например, отношение восстановителя к активируемому антителу, продолжительность инкубации, температура во время инкубации, pH восстанавливающего реакционного раствора и т.д., определяют путем установления условий, при которых получают конъюгированное активируемое антитело, в котором ММ сохраняет способность фактически и эффективно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу изменяется в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления отношение восстановителя к активируемому антителу находится в диапазоне приблизительно от 20:1 до 1:1, приблизительно от 10:1 до 1:1, приблизительно от 9:1 до 1:1, приблизительно от 8:1 до 1:1, приблизительно от 7:1 до 1:1, приблизительно от 6:1 до 1:1, приблизительно от 5:1 до 1:1, приблизительно от 4:1 до 1:1, приблизительно от 3:1 до 1:1, приблизительно от 2:1 до 1:1, приблизительно от 20:1 до 1:1,5, приблизительно от 10:1 до 1:1,5, приблизительно от 9:1 до 1:1,5, приблизительно от 8:1 до 1:1,5, приблизительно от 7:1 до

1:1,5, приблизительно от 6:1 до 1:1,5, приблизительно от 5:1 до 1:1,5, приблизительно от 4:1 до 1:1,5, приблизительно от 3:1 до 1:1,5, приблизительно от 2:1 до 1:1,5, приблизительно от 1,5:1 до 1:1,5 или приблизительно от 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 2,5:1 до 1:1.

Некоторые варианты осуществления относятся к способу восстановления межцепевых дисульфидных связей в АВ активируемого антитела и конъюгации средства, например, тиолсодержащего средства, такого как лекарственное средство, с получением межцепевых тиолов для избирательного расположения средство(в) на АВ. Способ, как правило, включает частичное восстановление АВ восстановителем с образованием по меньшей мере двух межцепевых тиолов без образования всех возможных межцепевых тиолов в активируемом антителе и конъюгации средства с межцепевыми тиолами частично восстановленного АВ. Например, АВ активируемого антитела частично восстанавливают в течение приблизительно 1 ч приблизительно при 37°C при желаемом отношении восстановитель:активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления отношение восстановителя к активируемому антителу находится в диапазоне приблизительно от 20:1 до 1:1, приблизительно от 10:1 до 1:1, приблизительно от 9:1 до 1:1, приблизительно от 8:1 до 1:1, приблизительно от 7:1 до 1:1, приблизительно от 6:1 до 1:1, приблизительно от 5:1 до 1:1, приблизительно от 4:1 до 1:1, приблизительно от 3:1 до 1:1, приблизительно от 2:1 до 1:1, приблизительно от 20:1 до 1:1,5, приблизительно от 10:1 до 1:1,5, приблизительно от 9:1 до 1:1,5, приблизительно от 8:1 до 1:1,5, приблизительно от 7:1 до 1:1,5, приблизительно от 6:1 до 1:1,5, приблизительно от 5:1 до 1:1,5, приблизительно от 4:1 до 1:1,5, приблизительно от 3:1 до 1:1,5, приблизительно от 2:1 до 1:1,5, приблизительно от 1,5:1 до 1:1,5 или приблизительно от 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне приблизительно от 2,5:1 до 1:1.

Тиолсодержащий реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстановитель может представлять собой, например, ТСЕР. В некоторых вариантах осуществления восстановленное активируемое антитело можно очищать перед конъюгацией с использованием, например, колоночной хроматографии, диализа или диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления восстановленное антитело не очищают после частичного восстановления и перед конъюгацией.

Изобретение также относится к частично восстановленным активируемым антителам, в которых по меньшей мере одну межцепевую дисульфидную связь в активируемом антителе восстанавливали восстановителем без нарушения каких-либо внутрицепевых дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат СМ1-СМ2, связанный с АВ, где субстрат СМ1-СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат по меньшей мере для одной ММР и одной SP. В некоторых вариантах осуществления ММ связана с АВ через субстрат СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепевых дисульфидных связей активируемого антитела не нарушаются восстановителем. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепевых дисульфидных связей ММ в активируемом антителе не нарушаются восстановителем. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстановитель представляет собой ТСЕР.

Изобретение также относится к частично восстановленным активируемым антителам, включая, но, не ограничиваясь ими, полиспецифические активируемые антитела по изобретению, в которых по меньшей мере одну межцепевую дисульфидную связь в активируемом антителе восстанавливали восстановителем без нарушения или иным образом снижения активности и/или эффективности активируемого антитела, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат СМ1-СМ2, связанный с АВ, и субстрат СМ1-СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы. Активность и/или эффективность активируемого антитела, в качестве неограничивающего примера, представляет собой маскирующую активность, активацию активируемого антитела и/или активность связывания активированного активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществ-

ствления одна или более внутрицепевых дисульфидных связей активируемого антитела не нарушается восстановителем. В некоторых вариантах осуществления одна или более внутрицепевых дисульфидных связей ММ в активируемом антителе не нарушается восстановителем. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстановитель представляет собой ТСЕР.

Изобретение также относится к конъюгированным активируемым антителам, которые включают активируемое антитело, связанное с нагрузкой монометилауристатин D (ММАД), где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и субстрат СМ1-СМ2, связанный с АВ, и субстрат СМ1-СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат по меньшей мере для одной MMP протеазы и по меньшей мере одной SP протеазы.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное с ММАД активируемое антитело можно конъюгировать любым из ряда способов присоединения средств к АВ: (а) присоединение к углеводным группам АВ, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или (c) присоединение к аминогруппам АВ, или (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ.

В некоторых вариантах осуществления нагрузку ММАД конъюгируют с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления нагрузку ММАД конъюгируют с цистеином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления нагрузку ММАД конъюгируют с лизином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления нагрузку ММАД конъюгируют с другим остатком АВ через линкер, такими как остатки, описываемые в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой тиолсодержащий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из линкеров, представленных в табл. 5 и 6. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны через малеинимидкапроил-валин-цитруллиновый линкер. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны через малеинимид-PEG-валин-цитруллиновый линкер. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны через малеинимидкапроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильный линкер. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны через малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильный линкер. В некоторых вариантах осуществления нагрузку ММАД конъюгируют с АВ с использованием технологии частичного восстановления и конъюгации, описываемой в настоящем описании.

Изобретение также относится к полипептидам и другими более крупным молекулам, которые содержат одну или более последовательностей субстрата СМ1-СМ2, представленных в настоящем описании. В качестве неограничивающего примера, последовательности субстрата СМ1-СМ2, представленные в настоящем описании, являются пригодными в композициях пролекарств и способах их использования. Такие последовательности субстрата СМ1-СМ2, представленные в настоящем описании, также являются пригодными в зондах и других средствах детекции и способах их использования. Например, последовательности субстрата СМ1-СМ2, представленные в настоящем описании, можно использовать в сочетании с флуоресцирующими средствами и другими гасителями для получения средств детекции, таких как визуализирующие средства, и/или других диагностических средств. Специалистам в данной области понятно, что последовательности субстрата СМ1-СМ2, представленные в настоящем описании, являются пригодными в любой композиции и/или способе в данной области, в котором используют субстрат, который расщепляется по меньшей мере одной MMP и по меньшей мере одной SP.

Изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело и/или активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, а также к векторам, которые содержат такие выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Изобретение относится к способам получения антитела и/или активируемого антитела культивированием клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела, где клетка содержит такой вектор.

Изобретение относится к способу получения конъюгированного антитела по изобретению, которое связывается с данной мишенью, (а) культивированием клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии антитела, (i), где антитело содержит субстрат СМ1-СМ2, и (ii) где субстрат СМ1-СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для матриксной металлопротеазы и сериновой протеазы; (b) выделение антитела и (c) конъюгацию выделенного антитела с одной или более дополнительных средств.

Изобретение также относится к способу производства активируемых антител по изобретению, которые связываются в активированном состоянии с данной мишенью (а) культивированием клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат СМ1-СМ2 и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который

специфически связывается с мишенью, (i), где субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для MMP и SP; и (ii), где субстрат CM1-CM2 располагается в активированном антителе, таким образом, что в нерасщепленном состоянии MM препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном состоянии MM не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и (b) выделением активируемого антитела.

Изобретение также относится к способу производства конъюгированных активируемых антител по изобретению, которые связываются в активированном состоянии с данной мишенью (a) культивированием клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (MM), субстрат CM1-CM2, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с мишенью, (i) где субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для MMP и SP, и (ii) где субстрат CM1-CM2 располагается в активированном антителе, таким образом, что в нерасщепленном состоянии MM препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном состоянии MM не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; (b) выделением активируемого антитела и (c) конъюгацией выделенного антитела с одним или более дополнительных средств.

Изобретение относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иным образом улучшения состояния связанного с мишенью заболевания у индивидуума путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описываемого в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

Изобретение относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иным образом улучшения состояния воспаления и/или воспалительного нарушения у индивидуума путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описываемого в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму. Изобретение также относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иным образом улучшения состояния злокачественной опухоли у индивидуума путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описываемого в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму. Изобретение также относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иным образом улучшения состояния аутоиммунного заболевания у индивидуума путем введения терапевтически эффективного количества конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, описываемого в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используемое в любом из вариантов осуществления этих способов, и применения можно проводить на любой стадии заболевания. Например, такое конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить пациенту, страдающему злокачественной опухолью на любой стадии от ранней до метастатической. Термины индивидуум и пациент в настоящем описании используют взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как человек, не являющимся человеком примат, животное-компаньон (например, кошку, собаку, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное в зоопарке. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является грызуном. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является животным-компаньоном. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является животным, за которым ухаживает ветеринар.

Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и его терапевтические составы вводят индивидууму, страдающему или у которого подозревают заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Индивидуум, страдающего или у которого подозревают заболевание или нарушение, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, идентифицируют с использованием любого из ряда известных в данной области способов. Например, индивидуумов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из ряда клинических и/или лабораторных тестов, таких как, медицинский осмотр и анализы крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, индивидуумов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из ряда клинических и/или лабораторных тестов, таких как медицинский осмотр и/или анализ жидкостей организма, например анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья.

Введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, связанным с aberrантной экс-

прессией и/или активностью мишени, считают эффективным, если достигают любой из ряда лабораторных или клинических задач. Например, введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, связанным с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, считают эффективным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, ослабляется, уменьшается, ингибируется или не прогрессирует в дальнейшем, т.е. к худшему состоянию. Введение конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, связанным с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, считают эффективным, если заболевание или нарушение переходит в ремиссию или не прогрессирует в дальнейшем, т.е. к худшему состоянию.

В некоторых вариантах осуществления антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела, описываемые в настоящем описании, используют в сочетании с один или более дополнительных средств или комбинация дополнительных средств. Подходящие дополнительные средства включают существующие в настоящее время фармацевтические и/или хирургические виды терапии для предназначенного применения, такого как, например, злокачественная опухоль. Например, антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела 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 средство(а) представляет собой ингибитор контрольных точек, ингибитор киназы, средство, направленное на ингибиторы в микроокружении опухоли и/или агонист Т-клетки или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) представляет собой лучевую терапию отдельно или в комбинации с другим дополнительным средством(ами), такими как химиотерапевтическое или антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) представляет собой вакцину, онковирус и/или DC-активатор, такой как, в качестве неограничивающего примера, агонист Toll-подобного рецептора (TLR) и/или  $\alpha$ -CD40. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) представляет собой направленное на опухоль антитело, сконструированное так, что бы уничтожать опухоль посредством ADCC или посредством прямой конъюгации с токсином (например, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD-1, PD-1, TIGIT, TIM-3, B7H4, BTLA и Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RaFi, MEKi и Btk, таких как ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор микроокружения опухоли выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора  $\alpha$ -CSF1R, ингибитор  $\alpha$ -CCR4, TGF- $\beta$ , супрессорную клетку миелоидного происхождения или регуляторную Т-клетку. 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 PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B7H4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B-RaFi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор MEKi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Btk. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор IDO. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор  $\alpha$ -CSF1R. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор  $\alpha$ -CCR4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой TGF- $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой регуляторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой OX40. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист пред-

ставляет 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 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительных средств, таких как, например, химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессирующее средство. В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство формулируют в одной терапевтической композиции и антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят одновременно. Альтернативно, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство отделяют друг от друга, например, каждое формулируют в отдельной терапевтической композиции, и антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят одновременно или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят в различные моменты времени во время курса лечения. Например, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят до введения дополнительного средства, антитела, конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированное активируемое антитело вводят вслед за введением дополнительного средства, или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят поочередно. Как описано в настоящем описании, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят в однократных дозах или в многократных дозах.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) вводят одновременно. Например, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) можно формулировать в одной композиции или вводить в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) вводят последовательно или антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство вводят в различные моменты времени во время курса лечения.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят во время и/или после лечения в комбинации с один или более дополнительных средств, такими как, в качестве неограничивающего примера, противовоспалительное средство, иммуносупрессирующее средство, химиотерапевтическое средство, такое как алкилирующее средство, антиметаболит, средство, оказывающий воздействие на микротрубочки, 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, Abraxane®). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антиметаболит, такой как гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой алкилирующее средство, такое как химиотерапевтическое на основе платины, такое как карбоплатин или цисплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство направленной доставки, такое как ингибитор киназы, например, сорафениб или эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство направленной доставки, такое как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор протеасом, такой как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуномодулирующее средство, такое как ленолидоминд или IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, которое специалисты в данной области считают стандартом лечения. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой хорошо известное специалистам в данной области химиотерапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело против той же мишени что и первое конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления



дополнительное средство представляет собой антитело, другое конъюгированное антитело, другое активируемое антитело и/или другое конъюгированное активируемое антитело против мишени, отличной от мишени первого конъюгированного антитела, активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) вводят одновременно. Например, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) можно формулировать в одной композиции или вводят в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и дополнительное средство(а) вводят последовательно или антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительное средство вводят в различные моменты времени во время курса лечения. Например, антитело и/или конъюгированные антитела вводят до введения дополнительного средства, антитело и/или конъюгированные антитела вводят после введения дополнительного средства, или антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительное средство вводят поочередно. Как описано в настоящем описании, антитело и/или конъюгированные антитела и дополнительное средство находятся в однократных дозах или в многократных дозах.

Изобретение также относится к способам и наборам для использования конъюгированных антител, активируемых антител и/или конъюгированных активируемых антител при ряде диагностических и/или профилактических показаний.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению и носитель. Такие фармацевтические композиции можно включать в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1А и 1В представляют собой серию графиков, иллюстрирующих результаты анализов ELISA связывания Jagged 1 человека, которые демонстрируют, что связывание антитела к Jagged и маскированных и активированных активируемых антител. Оба (А) 2001 и (В) 1001/LP/0001 содержащие активируемые антитела активировали uPA (сериновой протеазой), MMP14 (MMP) и uPA в комбинации с MMP14. Для активированных активируемых антител демонстрировали связывание, эквивалентное антителу к Jagged.

Фиг. 2 представляет собой график, иллюстрирующий концентрации IgG человека в сыворотке для антитела к Jagged и активируемых антител 1001/LP/0001 и 2001 после однократной 5 мг/кг внутривенной дозы. Антитело к Jagged быстро выводилось вследствие опосредованного мишень клиренса. В противоположность этому активируемые антитела к Jagged остаются маскированными в кровотоке.

Фиг. 3 представляет собой график, иллюстрирующий объем опухоли HCC1806 (среднее групповое значение  $\pm$  SEM n=8) в зависимости от момента времени после начальной дозы. Группы дозировали на сутки 1 и сутки 8 исследования. В группах антитела к Jagged-SPDB-DM4 и активируемое антитело-SPDB-DM4 к Jagged 2001 демонстрировали регрессию опухоли, при этом для группы изотип-SPDB-DM4 не демонстрировали ингибирование роста опухоли.

Фиг. 4 представляет собой график, иллюстрирующий процент исходной массы тела (среднее групповое значение n=8) в зависимости от момента времени после начальной дозы. Группы дозировали на сутки 1 и сутки 8 исследования. Для животных в группе, обрабатываемой антителом к Jagged-SPDB-DM4 ADC, демонстрировали значительную потерю массы тела, тогда как для животных, обрабатываемых PBS, изотип-SPDB-DM4 ADC и активируемым антителом-SPDB-DM4 к Jagged 2001 не демонстрировали значительной потери массы тела.

Фиг. 5 представляет собой график, иллюстрирующий активацию *in vivo* активируемых антител к EGFR, измеряемую в плазме на 8 сутки после введения дозы 12,5 мг/кг таких активируемых антител к EGFR у мышей, несущих ксенотрансплантат опухоли H292.

Фиг. 6 представляет собой график, иллюстрирующий эффективность *in vivo* активируемых EGFR антител у мышей, несущих ксенотрансплантат опухоли H292.

Фиг. 7 представляет собой график, иллюстрирующий оценку *in situ* активации активируемого EGFR антитела в H292 микроокружение ксенотрансплантата опухоли H292.

Фиг. 8А, 8В, 8С, 8D, 8Е и 8F представляют собой серии графиков, иллюстрирующих объем опухоли ксенотрансплантатов опухоли H292 у мышей nu/nu в различные моменты времени после введения контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIg, фиг. 8А), антитела к EGFR цетуксимаба (фиг. 8В), активируемого антитела к EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2001 к EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 449 (фиг. 8С); активируемого антитела к EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2003 к EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 472 (фиг. 8D); или активируемого антитела к EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2005 к EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID

NO: 474 (фиг. 8E). Для данных, представленных на фигуры 8C и 8D, в каждой группе теряли одно животное, каждое вследствие потери массы тела. Фиг. 8F представляет собой график, на котором приводят и сравнивают данные, представленные на фиг. 8A-8E на одном графике.

Фиг. 9 представляет собой график, иллюстрирующий токсичность, как измеряют по потери массы тела (BW) после введения изотипического контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIG), дозы 20 мг/кг антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как 4D11, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 162, дозы 10 мг/кг антитела 4D11, дозы 5 мг/кг антитела 4D11, активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2001 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 420, активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 1004/LP/0001 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 432, активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2003 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 477, и активируемое антитело к Jagged, обозначаемое в настоящем описании как активируемое антитело 2005 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 479. Результаты приведены как процент (%) изменения относительной массы тела (BW) в различные моменты времени во время исследования.

Фиг. 10 представляет собой график, иллюстрирующий токсичность, как измеряют по потери массы тела (BW) после введения изотипического контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIG), дозы 20 мг/кг антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как 4D11, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 162, дозы 10 мг/кг антитела 4D11, дозы 5 мг/кг антитела 4D11, активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2001 к Jagged ("2001"), которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 420, активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 1004/LP/0001 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 432, и активируемого антитела к Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 1004/LP/0003 к Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 424. Результаты приведены в виде процента (%) изменения относительной массы тела (BW) в различные моменты времени во время исследования.

Фиг. 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G и 11H и фиг. 12 представляют собой серию графиков, иллюстрирующих эффективность различных субстратов по изобретению при введении в активируемые антитела к EGFR по изобретению. Эффективность субстратов оценивали путем измерения объема опухоли (TV мм<sup>3</sup>) в различные моменты времени после введения.

Фиг. 13 представляет собой график, иллюстрирующий токсичность, как измеряют в зависимости от потери массы тела (BW) у мышей DBA/1 после введения контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIG), антитела к Jagged по изобретению и активируемых антител к Jagged по изобретению, которые содержат различные субстраты по изобретению.

Фиг. 14 представляет собой график, иллюстрирующий реконструкцию 3D данных визуализации FLIT-μCT цетуксимаба и двух активируемых антител к EGFR, содержащих tandemные субстраты на модели совместно трансплантируемых ксенотрансплантатов опухолей H292 (полая стрелка) и FaDu (сплошная стрелка).

### Подробное описание изобретения

Изобретение относится к аминокислотным последовательностям, которые содержат по меньшей мере первую расщепляемую группу (CM1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (CM2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). Такие субстраты CM1-CM2 являются пригодными при ряде терапевтических, диагностических и профилактических показаний. Например, такие субстраты CM1-CM2 являются пригодными в активируемых антителах, которые включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (MM), связанную по меньшей мере с одним антиген- или эпитопсвязывающим доменом AB, таким образом, что связывание MM снижает способность AB связываться со своей мишенью.

Демонстрационные примеры, предоставленные в настоящем описании, демонстрируют, что эти субстраты CM1-CM2 обладают рядом желаемых характеристик расщепления при воздействии по меньшей мере одной MMP протеазы и/или по меньшей мере одной SP протеазы в контурных условиях.

Изобретение также относится к антителам, которые содержат один или более таких субстратов CM1-CM2. Например, такие субстраты CM1-CM2 являются пригодными при конъюгации антитела с один или более дополнительными средствами для получения конъюгированных антител. Такие субстраты CM1-CM2 также являются пригодными в активируемых антителах и/или конъюгатах активируемых антител.

Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью. Иллюстративные классы мишеней АВ включают, но не обязательно ограничиваются, рецепторами клеточной поверхности и секретируемыми связывающими белками (например, факторами роста), растворимыми ферментами, структурными белками (например, коллагеном, фибронектином) и т.п. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные антитела и/или активируемые антитела содержат АВ, который связывается с внеклеточной мишенью, как правило, внеклеточным белком-мишенью. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные антитела и/или активируемые антитела конструируют для клеточного захвата, и они являются переключаемыми внутри клетки.

В качестве неограничивающего примера АВ представляет собой партнер по связыванию для любой мишени, приведенной 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   | МЕТКА-72 |
| Интегрин         | CD70 | DPP-4 | IFN альфа     | LRP4    | TAPA1    |

|                                            |                     |                                    |                           |                                        |                         |
|--------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| альфа4бета<br>1                            |                     |                                    |                           |                                        |                         |
| Интегрин<br>альфа4бета<br>7                | CD71                | DSG1                               | IFN бета                  | LRRC26                                 | TGFbeta                 |
| AGR2                                       | CD74                | EGFR                               | IFN гамма                 | MCSP                                   | TIGIT                   |
| Антитело<br>против<br>антигена Y<br>Льюиса |                     | EGFRviii                           | IgE                       | Мезотелин                              | TIM-3                   |
| Рецептор<br>апелина J                      | CD80                | Рецептор<br>эндотелина<br>B (ETBR) | Рецептор IgE<br>(FcεRI)   | MRP4                                   | TLR2                    |
| APRIL                                      | CD81                | ENFP3                              | IGF                       | MUC1                                   | TLR4                    |
| B7-H4                                      | CD86                | EpCAM                              | IGF1R                     | Муцин <sup>16</sup><br>(MUC16, CA-125) | TLR6                    |
| BAFF                                       | CD95                | EPHA2                              | IL1B                      | Na/K АТФаза                            | TLR7                    |
| BTLA                                       | CD117               | EPHB2                              | IL1R                      | Нейтрофильная<br>эластаза              | TLR8                    |
| Комплемент<br>C5                           | CD125               | ERBB3                              | IL2                       | NGF                                    | TLR9                    |
| C-242                                      | CD132<br>(IL-2RG)   | F-белок<br>RSV                     | IL11                      | Никастрин                              | TMEM31                  |
| CA9                                        | CD133               | FAP                                | IL12                      | Рецепторы Notch                        | TNF альфа               |
| CA19-9<br>(антиген<br>Льюиса a)            | CD137               | FGF-2                              | IL12p40                   | Notch 1                                | TNFR                    |
| Карбоангид<br>раза 9                       | CD138               | FGF8                               | IL-12R, IL-<br>12R бета 1 | 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<br>трансферрин |
| CD11a                                      | CEACAM5<br>(CEA)    | Рецептор<br>фолата                 | IL18                      | OX-40                                  | TRK-A                   |
| CD19                                       | CEACAM6<br>(NCA-90) | GAL3ST1                            | IL21                      | PAR2                                   | TRK-B                   |
| CD20                                       | Клаудин<br>3        | G-CSF                              | IL23                      | PDGF-AA                                | uPAR                    |
| CD22                                       | Клаудин4            | G-CSFR                             | IL23R                     | PDGF-BB                                | VAP1                    |

|        |          |                             |                      |                        |        |
|--------|----------|-----------------------------|----------------------|------------------------|--------|
| CD24   | cMet     | GD2                         | IL27/IL27R<br>(wsx1) | PDGFR альфа            | VCAM-1 |
| CD25   | Коллаген | GITR                        | IL29                 | PDGFR бета             | VEGF   |
| CD27   | Крипто   | 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                  | Фосфатидилсерин        | VEGF-D |
| CD38   | CTGF     | Рецепторы<br>GP<br>IIb/IIIa | IL4R                 | P1GF                   | VEGFR1 |
| CD40   | CXCL10   | Gp130                       | IL6, IL6R            | PSCA                   | VEGFR2 |
| CD40L  | CXCL13   | GPIIB/IIIA                  | Рецептор<br>инсулина | PSMA                   | VEGFR3 |
| CD41   | CXCR1    | GPNMB                       | Лиганды<br>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-<br>фосфат | WISP-3 |
| CD51   | CYR61    | hGH                         |                      |                        |        |

В качестве неограничивающего примера АВ представляет собой, или его выделяют из антитела, приведенного в табл. 2.

Таблица 2. Иллюстративные источники Ab

| Торговое наименование антитела<br>(название антитела) | Мишень        |
|-------------------------------------------------------|---------------|
| Avastin™ (бевацизумаб)                                | VEGF          |
| Lucentis™ (ранибизумаб)                               | VEGF          |
| Erbix™ (цетуксимаб)                                   | EGFR          |
| Vectibix™ (панитумумаб)                               | EGFR          |
| Remicade™ (инфликсимаб)                               | TNFα          |
| Humira™ (адалимумаб)                                  | TNFα          |
| Tysabri™ (натализумаб)                                | Интегрин α4   |
| Simlect™ (базиликсимаб)                               | IL2R          |
| Soliris™ (eculizumab)                                 | Комплемент C5 |
| Raptiva™ (эфализумаб)                                 | CD11a         |
| Bexxar™ (тозитумумаб)                                 | CD20          |
| Zevalin™ (ибритумумаб тиуксетан)                      | CD20          |
| Rituxan™ (ритуксимаб)                                 | CD20          |

|                                   |                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Окрелизумаб                       | CD20                            |
| Arzerra™ (офатумумаб)             | CD20                            |
| Gazyva™ (обинутузумаб)            | CD20                            |
| Zenapax™ (даклизумаб)             | CD25                            |
| Adcetris™ (брентуксимаб ведотин)  | CD30                            |
| Myelotarg™ (гемтузумаб)           | CD33                            |
| Mylotarg™ (гемтузумаб озогамидин) | CD33                            |
| Campath™ (алемтузумаб)            | CD52                            |
| ReoPro™ (абициксимаб)             | Рецептор гликопротеина IIb/IIIa |
| Xolair™ (омализумаб)              | IgE                             |
| Herceptin™ (трастузумаб)          | Her2                            |
| Kadcyla™ (трастузумаб эмтанзин)   | Her2                            |
| Synagis™ (паливизумаб)            | F-белок RSV                     |
| (ипилимумаб)                      | CTLA-4                          |
| (тремелимумаб)                    | CTLA-4                          |
| Hu5c8                             | CD40L                           |
| (пертузумаб)                      | Her2-neu                        |
| (эртумаксрмб)                     | CD3/Her2-neu                    |
| Orencia™ (абатацепт)              | CTLA-4                          |
| (танезумаб)                       | NGF                             |
| (бавитуксимаб)                    | 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                            |
| Enbrel™ (этанерцепт)              | TNF-R                           |
| Amevive™ (алефацепт)              | 1-92-LFA-3                      |
| Antril™, Kineret™ (анкинра)       | IL-1Ra                          |
| GC1008                            | TGF бета                        |
|                                   | Notch, например, Notch 1        |
|                                   | Jagged 1 или Jagged 2           |
| (адекватумумаб)                   | EpCAM                           |
| (фигитумумаб)                     | IGF1R                           |
| (тоцилизумаб)                     | Рецептор IL-6                   |
| Stelara™ (устекинумаб)            | IL-12/IL-23                     |
| Prolia™ (денозумаб)               | RANKL                           |

Иллюстративные конъюгированные антитела, активируемые антителом и/или конъюгированные активированные антителом по изобретению включают, например, антитела, которые связываются с рецептором интерлейкина 6 (IL-6R) и которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, которые представляют собой или которые получают из антитела, обозначаемого в настоящем описании как антитело "Av1", которое связывается с рецептором интерлейкина 6 (IL-6R). Аминокислотные последовательности для тяжелой цепи Av1 и легкой цепи Av1 приведены ниже в SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101 соответственно.

**Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела Av1**

QVQLQESGPGLVPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITT  
 YNPSLKSRVTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGSGLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 100)

**Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Av1**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 101)

Иллюстративные активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению включают, например, антитела, которые связываются с рецептором интерлейкина 6 (IL-6R) и которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, которые представляют собой или которые получают из антитела Av1 и маскирующей группы. Иллюстративные активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению содержат аминокислотную последовательность, присоединенную к N-концу легкой цепи AV1. Такие N-концевые аминокислотные последовательности включают, например, YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 102); QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 103); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 104); QGQSGQYGSWSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 105); QGQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 106) или QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 107). Также преимуществом является то, что такие аминокислотные последовательности можно присоединять к N-концу тяжелой цепи AV1 или к C-концу тяжелой или легкой цепи AV1.

Иллюстративные активируемые антитела по изобретению включают, например, антитела, которые связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, которые представляют собой или которые получают из антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела, обозначаемого в настоящем описании как антитело "c225v5" (также обозначаемое в настоящем описании как антитело C225v5), антитела, обозначаемого в настоящем описании как антитело "c225v4" (также обозначаемого в настоящем описании как антитело C225v4), и антитела, обозначаемого в настоящем описании как антитело "c225v6" (также обозначаемого в настоящем описании как антитело C225v6), каждое из которых связывается с EGFR. Антитело c225v5, антитело c225v4 и антитело c225v6 содержат общую последовательность легкой цепи, обозначаемую в настоящем описании как "легкая цепь c225". Аминокислотные последовательности для тяжелой цепи c225v5, антитело c225v4, антитело c225v6 и легкая цепь c225 приведены ниже.

**Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела c225v5**

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIVSGGNTDY  
 NTPFTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 108)

**Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела c225v4**

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIVSGGNTDY  
 NTPFTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSQDNTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 109)

**Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела c225v6**

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDY  
 NTPFTSRLSINKDNSKSVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 110)

**Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела C225**

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIP  
 SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111)

Иллюстративные конъюгированные антитела и/или активируемые антитела по изобретению включают, например, антитела, которые связываются с мишенью Jagged, например, Jagged-1, Jagged-2 и/или как Jagged-1, так и Jagged-2, и которые содержат комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые представляют собой или которые получают из последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, представленной ниже.

**Аминокислотная последовательность Lc4 вариабельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 112)

**Аминокислотная последовательность Hc4 вариабельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 113)

**Аминокислотная последовательность Lc5 вариабельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 114)

**Аминокислотная последовательность Hc5 вариабельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGQFDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 115)

**Аминокислотная последовательность Lc7 вариабельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 116)

**Аминокислотная последовательность Hc7 вариабельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 117)

**Аминокислотная последовательность Lc8 вариабельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 118)

**Аминокислотная последовательность Hc8 вариабельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNPFYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 119)

**Аминокислотная последовательность Lc13 вариабельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 120)

**Аминокислотная последовательность Hc13 вариабельной области тяжелой цепи**



EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTE  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
 ID NO: 121)

**Аминокислотная последовательность Lc16 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 122)

**Аминокислотная последовательность Hc16 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFYQGFQDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 123)

**Аминокислотная последовательность Lc19 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 124)

**Аминокислотная последовательность Hc19 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQGFQDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 125)

**Аминокислотная последовательность Lc21 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 126)

**Аминокислотная последовательность Hc21 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFQDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 127)

**Аминокислотная последовательность Lc24 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 128)

**Аминокислотная последовательность Hc24 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTL  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
 ID NO: 129)

**Аминокислотная последовательность Lc26 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 130)

**Аминокислотная последовательность Hc26 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFQDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 131)

**Аминокислотная последовательность Lc27 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 132)

**Аминокислотная последовательность Hc27 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFYQGFQDYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 133)

**Аминокислотная последовательность Lc28 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 134)

**Аминокислотная последовательность Hc28 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGTLLTVSS  
 (SEQ ID NO: 135)

**Аминокислотная последовательность Lc30 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 136)

**Аминокислотная последовательность Hc30 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTL  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYAKSAAAFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID  
 NO: 137)

**Аминокислотная последовательность Lc31 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 138)

**Аминокислотная последовательность Hc31 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLLTVSS  
 (SEQ ID NO: 139)

**Аминокислотная последовательность Lc32 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 140)

**Аминокислотная последовательность Hc32 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLLTVSS (SEQ  
 ID NO: 141)

**Аминокислотная последовательность Lc37 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 142)

**Аминокислотная последовательность Hc37 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNGQFDYWGQGTLLTVSS  
 (SEQ ID NO: 143)

**Аминокислотная последовательность Lc39 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 144)

**Аминокислотная последовательность Hc39 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTE  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLLTVSS (SEQ  
 ID NO: 145)

**Аминокислотная последовательность Lc40 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 146)

**Аминокислотная последовательность Hc40 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGTLLTVSS  
 (SEQ ID NO: 147)

**Аминокислотная последовательность Lc47 варибельной области легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
 148)

**Аминокислотная последовательность Hc47 варибельной области тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTE  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
ID NO: 149)

**Вариабельная область 4B2 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQTLDPAPPQFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
150)

**Вариабельная область 4B2 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 151)

**Вариабельная область 4D11 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
152)

**Вариабельная область 4D11 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 153)

**Вариабельная область 4E7 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQSLVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
154)

**Вариабельная область 4E7 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTK  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
ID NO: 155)

**Вариабельная область 4E11 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQALDAPLMFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
156)

**Вариабельная область 4E11 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEPMGQLTE  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 157)

**Вариабельная область 6B7 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
158)

**Вариабельная область 6B7 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
ID NO: 159)

**Вариабельная область 6F8 легкой цепи**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
160)

**Вариабельная область 6F8 тяжелой цепи**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ  
ID NO: 161)

Иллюстративные конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активированные антитела по изобретению включают, например, антитела, которые связываются с мишень Jagged, например, Jagged-1, Jagged-2 и/или как Jagged-1, так и Jagged-2, и которые содержат комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, которые представляют собой или которые получают из последовательностей тяжелых цепей и легких цепей, приведенных ниже.

**Последовательность легкой цепи 4D11**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 162)

**Последовательность тяжелой цепи 4D11**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 67)

**Последовательность тяжелой цепи 4D11v2**

EVHLLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 163)

**Последовательность легкой цепи 4D11v2**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLLXKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 164)

Активируемые антитела и композиции активируемых антител, предоставленные в настоящем описании, содержат по меньшей мере антитело или фрагмент антитела (обобщенно обозначаемый как АВ на всем протяжении описания), который специфически связывается с мишенью, например, принадлежащей человеку мишенью, где АВ является модифицированным маскирующей группой (ММ).

В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа выбрана для использования с конкретным антителом или фрагментом антитела. Например, подходящие маскирующие группы для использования с антителами, которые связываются с EGFR, включают ММ, которые содержат последовательность CISPRG (SEQ ID NO: 165).

В качестве неограничивающих примеров, ММ может содержать последовательность, такую как CISPRGC (SEQ ID NO: 166); CISPRGCG (SEQ ID NO: 167); CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 168); CISPRGCPDGPYVM (SEQ ID NO: 169), CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO: 170) и CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO: 171). Другие подходящие маскирующие группы включают любую из специфичные к EGFR маски, раскрытые в публикации PCT № WO 2010/081173, такие как в качестве неограничивающего примера GSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 172); CISPRGCGGSSASQSGQSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 173); CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 174); ADHVFWGSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 175); CHNVYWGHCISPRGCPG (SEQ ID NO: 176); CPHFTTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 177); CNHHYHYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 178); CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 179); CPYYTSLSYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 180); CNHVYFGTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 181); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 182); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 183); YNPCATPMCCISPRGCPG (SEQ ID NO: 184); CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 185); CNHHYHYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 186); CNHVYFGTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 187); CHNVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 188); CPHFTTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 189); CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 190); CHHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 191); CPYYTSLSYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 192); CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 193); ADHVFWGSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 194); YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO: 195); CHNVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 196); C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/л)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (SEQ ID NO: 197); CISPRGCGQPIPSVK (SEQ ID NO: 198); CISPRGCTQPYHVS (SEQ ID NO: 199) и/или CISPRGCNAVSGLS (SEQ ID NO: 200).

Подходящие маскирующие группы для использования с антителами, которые связываются с ми-

шень Jagged, например, Jagged 1 и/или Jagged 2, включают в качестве неограничивающего примера маскирующие группы, которые содержат последовательность, такую как QGQSGQCNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 201); QGQSGGQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 202); PWCMQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO: 203); QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO: 204); CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO: 205); SCSLWTSGSCLPHSP (SEQ ID NO: 206); YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO: 207); CFLYSCTDVSYNNT (SEQ ID NO: 208); PWCMQRQDYLRCPP (SEQ ID NO: 209); CNLWISGGDCRGLAG (SEQ ID NO: 210); CNLWVSGGDCRGVQG (SEQ ID NO: 211); CNLWVSGGDCRGLRG (SEQ ID NO: 212); CNLWISGGDCRGLPG (SEQ ID NO: 213); CNLWVSGGDCRDAPW (SEQ ID NO: 214); CNLWVSGGDCRDLLG (SEQ ID NO: 215); CNLWVSGGDCRGLQG (SEQ ID NO: 216); CNLWLHGGDCRGWQG (SEQ ID NO: 217); CNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 218); CTTWFCGGDCGVMRG (SEQ ID NO: 219); CNIWGSPVDCGALLG (SEQ ID NO: 220); CNIWVNGGDCRSFEG (SEQ ID NO: 221); YCLNLPRYMQDMCWA (SEQ ID NO: 222); YCLALPHYMQADCAR (SEQ ID NO: 223); CFLYSCGDVSYWWSA (SEQ ID NO: 224); CYLYSCTDSAFWNNR (SEQ ID NO: 225); CYLYSCNDVSYWSNT (SEQ ID NO: 226); CFLYSCTDVSYW (SEQ ID NO: 227); CFLYSCTDVAYWNSA (SEQ ID NO: 228); CFLYSCTDVSYWGDT (SEQ ID NO: 229); CFLYSCTDVSYWNS (SEQ ID NO: 230); CFLYSCTDVAYWNNT (SEQ ID NO: 231); CFLYSCGDVSYWGNPLS (SEQ ID NO: 232); CFLYSCTDVAYWSGL (SEQ ID NO: 233); CYLYSCTDGSYNNT (SEQ ID NO: 234); CFLYSCSDVSYWNI (SEQ ID NO: 235); CFLYSCTDVAYW (SEQ ID NO: 236); CFLYSCTDVSYWGST (SEQ ID NO: 237); CFLYSCTDVAYWGDT (SEQ ID NO: 238); GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (SEQ ID NO: 239); GCNIWLVGDCRGWIGDTNG (SEQ ID NO: 240); GCNIWLVGDCRGWIEDSNG (SEQ ID NO: 241); GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (SEQ ID NO: 242); GCNIWLVGDCRGWLGEAVG (SEQ ID NO: 243); GCNIWLVGDCRGWLEEAVG (SEQ ID NO: 244); GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (SEQ ID NO: 245); GAPVFCNIWLNGGDCRGWMG (SEQ ID NO: 246); GQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 247); GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (SEQ ID NO: 248); GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (SEQ ID NO: 249); GASQYCNLWINGGDCRGWRG (SEQ ID NO: 250); GCNIWLVGDCRPWVEGG (SEQ ID NO: 251); GCNIWAVGGDCRPFVDGG (SEQ ID NO: 252); GCNIWLNGGDCRAWVDTG (SEQ ID NO: 253); GCNIWIVGGDCRPFINDG (SEQ ID NO: 254); GCNIWLNGGDCRPVFFGG (SEQ ID NO: 255); GCNIWLSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO: 256); GCNIWVNGGDCRSFVYSG (SEQ ID NO: 257); GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO: 258); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 259); GCNIWLNGGDCRTFVASG (SEQ ID NO: 260); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 261); GFLENCNIWLNGGDCRTG (SEQ ID NO: 262); GIYENCNIWLNGGDCRMG (SEQ ID NO: 263) и/или GIPDNCNIWINGGDCRYG (SEQ ID NO: 264).

Подходящие маскирующие группы для использования с антителами, которые связываются с мишенью интерлейкин 6, например рецептором интерлейкина 6 (IL-6R), включают в качестве неограничивающего примера маскирующие группы, которые содержат последовательность, такую как QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 265); QGQSGQGFDFIPPAHWVPIT (SEQ ID NO: 266); QGQSGQMGPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 267); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 268); PGAFDIPPAHWVPNT (SEQ ID NO: 269); ESSCVWNYVHIYMD (SEQ ID NO: 270); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 271); YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO: 272); YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 273); YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 274); YGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 275); YTSCNWNYSIFMDC (SEQ ID NO: 276); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 277); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 278); WSNCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 279); DRSCWNYVRISYDC (SEQ ID NO: 280); SGCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 281); SRSCIWNYAHIHLDC (SEQ ID NO: 282); SMSCYWQYERIFLDC (SEQ ID NO: 283); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 284); SGCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 285); YKSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 286); YGSCWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 287); FSSCNWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 288); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 289); YGSCQWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 290); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 291); NMSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 292); FGPCTWNYARISWDC (SEQ ID NO: 293); XXsCXWXYvhlFXdC (SEQ ID NO: 294); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 295); RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO: 296); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 297); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 298); DGGPAGCSWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 299); AVGPAGCWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 300); CTWNYVHIFMDCGEGEP (SEQ ID NO: 301); GGVPEGCTWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 302); AEVPAGCWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 303); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 304); SGASGGCKWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 305); TPGCRWNYVHIFMECEAL (SEQ ID NO: 306); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 307); PGAFDIPPAHWVPNT (SEQ ID NO: 308); RGACDIPPAHWIPNT (SEQ ID NO: 309); QGDFDIPPAHWVPIT (SEQ ID NO: 310); XGafDIPPAHWvPnT (SEQ ID NO: 311); RGDGNDSDIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 312); SGVGRDRDIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 313); WAGGNDSDIPPAHWIPNT (SEQ ID NO: 314); WGDGMDVDIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 315); AGSGNDSDIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 316); ESRSGYADIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 317) и/или RECGRCGDIPPAHWVPRT (SEQ ID NO: 318).

Когда АВ является модифицированным ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ со своей мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированным ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью.

$K_d$  АВ, модифицированного ММ, по отношению к мишени является по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или выше, или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз больше, чем  $K_d$  АВ, не модифицированного ММ, или исходного АВ по отношению к мишени. В противоположность этому, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ, по отношению к мишени является по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или выше или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000 или 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного ММ, или исходного АВ по отношению к мишени.

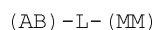
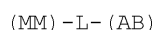
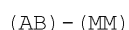
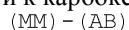
Константа диссоциации ( $K_d$ ) ММ по отношению к АВ, как правило, является больше чем  $K_d$  АВ по отношению к мишени.  $K_d$  ММ по отношению к АВ может являться по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз больше, чем  $K_d$  АВ по отношению к мишени. В противоположность этому, аффинность связывания ММ к АВ, как правило, является ниже, чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени. Аффинность связывания ММ к АВ может являться по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени.

Когда АВ является модифицированным ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ со своей мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированным ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не модифицированным ММ, или связыванием исходного АВ с мишенью способность АВ связываться с мишенью при модификации ММ может снижаться по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более, как измеряют *in vivo* или в анализе *in vitro*.

ММ ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ связывается с антигенсвязывающим доменом АВ и ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ может пространственно ингибировать связывание АВ с мишенью. ММ может аллостерически ингибировать связывание АВ со своей мишенью. В этих вариантах осуществления, когда АВ является модифицированным или связанным с ММ и находится в присутствии мишени, не происходит связывание или по существу не происходит связывание АВ с мишенью, или происходит не более чем 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 модифицированным ММ, исходным АВ или АВ, не связанным с ММ, с мишенью, в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 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 больше, как измеряют *in vivo* или в анализе *in vitro*.

Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным ММ, ММ "маскирует" или снижает, или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным ММ, такое связывание или модификация может приводить к структурному изменению, которое снижает или ингибирует способность АВ специфически связываться со своей мишенью.

АВ, связанный с ММ или модифицированный ММ, можно представить следующими ниже формулами (в порядке от аминоконцевой (N) области к карбоксиконцевой (C) области):



где ММ представляет собой маскирующую группу, АВ представляет собой антитело или фрагмент антитела, и L представляет собой линкер. Во многих вариантах осуществления желательным может являться введение одного или более линкеров, например, гибких линкеров в композицию, таким образом, чтобы обеспечивать гибкость.

В определенных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не обладает гомологией или по существу не обладает гомологией 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% сходным 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, который является модифицированным ММ, а также содержит по меньшей мере одну расщепляемую группу (СМ1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (ММР), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (СМ2), которая подвергается действию по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). Такие активируемые антитела характеризуются активируемым/переключаемым связыванием с мишенью АВ. Активируемые антитела, как правило, содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированный или связанный маскирующей группой (ММ), и субстрат СМ1-СМ2.

Элементы активируемых антител располагают таким образом, чтобы ММ и субстрат СМ1-СМ2 располагались так, чтобы в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени АВ связывался с мишенью, тогда как в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфическое связывание АВ со своей мишенью снижалось или ингибировалось. Специфическое связывание АВ со своей мишенью может снижаться вследствие ингибирования или маскировки способности АВ специфически связываться со своей мишенью посредством ММ.

$K_d$  АВ, модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, по отношению к мишени является по меньшей мере в 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или выше, или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 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 больше чем  $K_d$  АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, или исходного АВ по отношению к мишени. В противоположность этому, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, с мишенью является по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или выше, или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-10000000 или 100000-10000000 раз ниже чем аффинность связывания АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, или исходного АВ с мишенью.

Когда АВ является модифицированным ММ и субстратом СМ1-СМ2 и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего средства (например, ММР и SP), специфическое связывание АВ со своей мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или связыванием АВ, не модифицированного ММ и субстратом СМ1-СМ2, со своей мишенью способность АВ связываться с мишенью при модификации ММ и субстратом СМ1-СМ2 может снижаться 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 больше, как измеряют *in vivo* или в анализе *in vitro*.

Как используют в настоящем описании, термин расщепленное состояние относится к состоянию активируемых антител после модификации, т.е. расщепления, субстрата СМ1-СМ2 по меньшей мере одной матриксной металлопротеазой и/или по меньшей мере одной сериновой протеазой. Термин нерасщепленное состояние или полностью нерасщепленное, как используют в настоящем описании, относится к состоянию активируемых антител при отсутствии расщепления субстрата СМ1-СМ2 ММР и/или SP. Как указано выше, термин "активируемые антитела" применяют в настоящем описании для обозначения активируемого антитела в его нерасщепленном (нативном) состоянии, а также в его расщепленном состоянии. Активируемое антитело в своем расщепленном состоянии также обозначают в настоящем описании как активированное антитело и/или активированное активируемое антитело. Как правило, специалисту в данной области очевидно, что в некоторых вариантах осуществления расщепленное активируемое антитело может не содержать ММ вследствие расщепления субстрата СМ1-СМ2 протеазой, что приводит к высвобождению по меньшей мере ММ.

Под активируемым или переключаемым подразумевают, что активируемое антитело характеризуется первым уровнем связывания с мишенью, когда 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 с мишенью является больше чем первый уровень связывания. Как правило, доступ мишени к АВ активируемого антитела является выше в присутствии расщепляющего средства, спо-

собного расщеплять субстрат CM1-CM2, чем в отсутствии такого расщепляющего средства. Таким образом, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ингибируются связывание АВ с мишенью, и можно экранировать связывание с мишенью АВ (т.е. первая конформация является такой, что АВ не может связываться с мишенью), и в расщепленном состоянии связывание АВ с мишенью не ингибируется и не экранируется.

Субстрат CM1-CM2 и АВ активируемых антител выбраны таким образом, что АВ предоставляет связывающую группу данной мишени, и субстрат CM1-CM2 предоставляет субстрат для MMP и SP, где MMP и/или SP локализованы с мишенью на участке лечения или участке диагностики у индивидуума. Активируемые антитела, описываемые в настоящем описании, находят конкретное применение, где, например, каждая из MMP и SP, которая может расщеплять участок в субстрате CM1-CM2, приставит на относительно более высоких уровнях в содержащей мишень ткани участка лечения или участка диагностики, чем в ткани, не относящейся к участкам лечения (например, в здоровой ткани).

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают пониженную токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы являться результатом связывания АВ в не относящихся к лечению участках, если не экранировали или иным образом не ингибировали связывание АВ с мишенью.

Как правило, активируемое антитело можно конструировать посредством выбора представляющего интерес АВ и конструкции оставшейся части активируемого антитела таким образом, чтобы при конформационном ограничении ММ обеспечивала маскировку АВ или снижение связывания АВ с его мишенью. Для обеспечения такого функционального признака необходимо учитывать критерии структурного проектирования.

Раскрыты активируемые антитела, обладающие переключающим фенотипом желаемого динамического диапазона для связывания мишени в ингибированной в сравнении с неингибированной конформации. Динамический диапазон, как правило, относится к отношению (а) максимального детектируемого уровня параметра при первом наборе условий к (б) минимальному детектируемому значению этого параметра при втором наборе условий. Например, в отношении активируемого антитела динамический диапазон относится к отношению (а) максимального детектируемого уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии MMP и SP, которые способны расщеплять субстрат CM1-CM2 активируемых антител, к (б) минимальному детектируемому уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела можно рассчитывать как отношение константы диссоциации при обработке расщепляющим активируемое антитело средством (например, ферментом) к константе диссоциации при обработке расщепляющим активируемые антитела средством. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. Активируемые антитела с относительно более высокими значениями динамического диапазона (например, более 1) обладают более желаемыми переключающимися фенотипами, таким образом, что такое связывание белка-мишени активируемыми антителами происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего средства (например, фермента), способного расщеплять субстрат CM1-CM2 активируемых антител, чем в отсутствии расщепляющего средства.

Активируемые антитела можно предоставлять в различных структурных конфигурациях. Иллюстративные формулы для активируемых антител приведены ниже. Конкретно предусматривают, что порядок от N-конца к С-концу АВ, ММ и субстрата CM1-CM2 можно приводить в обратном направлении в активируемом антителе. Также конкретно предусматривают, что CM и ММ могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, таким образом, что субстрат CM1-CM2 по меньшей мере частично содержится в ММ.

Например, активируемые антитела можно представить следующей ниже формулой (в порядке от аминоконцевой (N) области к карбоксиконцевой (C) области):

$$(MM) - (субстрат CM1-CM2) - (AB)$$

$$(AB) - (субстрат CM1-CM2) - (MM)$$

где ММ представляет собой маскирующую группу, субстрат CM1-CM2 представляет собой расщепляемую группу, и АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Как указано выше, термин "субстрат CM1-CM2" не предназначен включать какое-либо требование в отношении ориентации или другой структурной организации первой расщепляемой группы (CM1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP), и по меньшей мере второй расщепляемой группы (CM2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). Таким образом, термин "субстраты CM1-CM2" включает субстраты CM1-CM2 со структурной организацией от N-конца к С-концу, как указано ниже: CM1-CM2 или CM2-CM1. Термин "субстраты CM1-CM2" также включает субстраты, где по меньшей мере участок последовательности CM1 перекрывается по меньшей мере с участком последовательности CM2. Также следует отметить, что хотя ММ и субстрат CM1-CM2 указаны как отдельные компоненты в приведенной выше формуле, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описываемых в настоящем описании, предусмотрено, что аминокис-



лотные последовательности ММ и субстрата CM1-CM2 могут перекрываться, например, таким образом что субстрат CM1-CM2 полностью или частично содержится в ММ. Кроме того, указанные выше формулы предоставляют дополнительные аминокислотные последовательности, которые можно располагать в N-конце или C-конце по отношению к элементам активируемых антител.

В определенных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не обладает или по существу не обладает гомологией с каким-либо 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% сходным 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 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 желательным может являться введение одного или более линкеров, например, гибких линкеров в конструкцию активируемого антитела, таким образом, чтобы обеспечивать гибкость в одной или более областей соединения ММ-субстрат CM1-CM2, областей соединения субстрат CM1-CM2-АВ или обеих. Например, АВ, ММ и/или субстрат CM1-CM2 могут не содержать достаточное количество остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желаемой гибкости. В связи с этим переключаемый фенотип таких конструкций активируемого антитела может выигрывать от введения одной или более аминокислот для обеспечения гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, где активируемое антитело предоставляют в виде конструкции с конформационными ограничениями, гибкий линкер можно функционально вводить для облегчения образования и поддержания циклической структуры в нерасщепленном активируемом антителе.

Например, в определенных вариантах осуществления активируемое антитело содержит одну из следующих ниже формул (где формула ниже представляет собой аминокислотную последовательность в направлении от N-конца к C-концу или в направлении от C-конца к N-концу):

$$(MM) - L1 - (субстрат CM1-CM2) - (AB)$$

$$(MM) - (субстрат CM1-CM2) - L2 - (AB)$$

$$(MM) - L1 - (субстрат CM1-CM2) - L2 - (AB)$$

где ММ, субстрат CM1-CM2 и АВ являются такими, как определено выше; где каждый из L1 и L2 независимо и необязательно присутствует или отсутствует, представляет собой один и тот же или отличный гибкий линкер, который содержит по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, указанная выше формула предоставляет дополнительные аминокислотные последовательности, которые можно располагать в N-конце или C-конце по отношению к элементам активируемых антител. Примеры включают, но не ограничиваются ими, обеспечивающие направленную доставку группы (например, лиганд к рецептору клетки, содержащейся в ткани-мишени) и увеличивающие время полувыведения из сыворотки группы (например, полипептиды, которые связывают сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HAS))).

Субстрат CM1-CM2 специфически расщепляется по меньшей мере одной MMP со скоростью приблизительно  $0,001-1500 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$  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  $1500 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$  и специфически расщепляется по меньшей мере одной SP со скоростью приблизительно  $0,001-1500 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$  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  $1500 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ .

Для специфического расщепления ферментом создают контакт между ферментом и субстратом CM1-CM2. Когда активируемое антитело, содержащее АВ, связанный с ММ и субстратом CM1-CM2, находится в присутствии мишени и достаточной ферментативной активности, субстрат CM1-CM2 может расщепляться. Достаточная ферментативная активность может относиться к способности фермента образовывать контакт с субстратом CM1-CM2 и осуществлять расщепление. Можно легко представить, что фермент может находиться вблизи субстрата CM1-CM2, но являться неспособным расщеплять вследствие других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

Линкеры пригодные для использования в композициях, описываемых в настоящем описании, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированного АВ или активируемых антител для облегчения ингибирования связывания АВ с мишенью. Такие линкеры, как правило, обозначают как гибкие линкеры. Подходящие линкеры можно легко отбирать, и они могут являться любой подходящей из различных длин, таких как от 1 аминокислота (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот

кислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот и могут составлять в 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 полимеры глицина (G)<sub>n</sub>, полимеры глицин-серин (включая, например, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 382), где n представляет собой целое число по меньшей мере один), полимеры глицин-аланин, полимеры аланин-серин и другие известные в данной области гибкие линкеры. Полимеры глицина и глицин-серина являются относительно бесструктурными и, таким образом, могут служить в качестве нейтральной связи между компонентами. Глицин получает значительно больше пространства фи-пси даже чем аланин, и является в меньшей степени ограниченным чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Иллюстративные гибкие линкеры включают, но не ограничиваются ими, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 383), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 384), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 385), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 386), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 387), Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 388) и т.п. Как правило, специалисту в данной области понятно, что конструкция активируемых антител может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, таким образом, что линкер может включать гибкий линкер, а также один или более участков, придающих менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры активируемых антител.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описываемые в настоящем описании, также содержат средство, конъюгированное с активируемым антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное средство представляет собой терапевтическое средство, такое как противовоспалительное и/или антинеопластическое средство. В таких вариантах осуществления средство конъюгировано с углеводной группой активируемого антитела, например, в некоторых вариантах осуществления, где углеводная группа располагается вне антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано 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. радиокоъюгат).

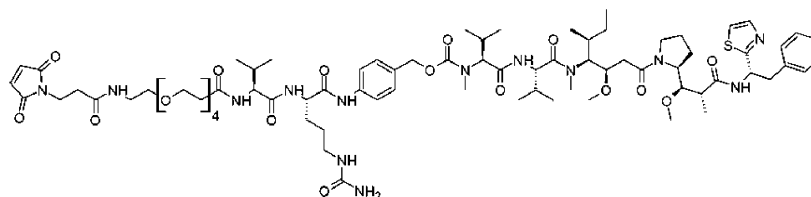
В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой детектируемую группу, такую как, например, метка или другой маркер. Например, средство представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, одну или более биотинильных групп, которые можно детектировать меченым авидином (например, содержащим стрептавидин флуоресцентным маркером или ферментативную активность, которого можно детектировать оптическими или калориметрическими способами), один или более радиоактивных изотопов или радионуклидов, одну или более флуоресцентных меток, одну или более ферментативных меток и/или одно или более хемилюминесцентных средств. В некоторых вариантах осуществления детектируемые группы присоединяют посредством спейсерных молекул.

Изобретение также относится к иммунокоъюгатам, 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. радиокоъюгат). Подходящие цитотоксические средства включают, например, доластатины и их производные (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Например, средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE) или монометилауристатин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, приведенной в табл. 3. 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 E или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD). 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 калихимицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

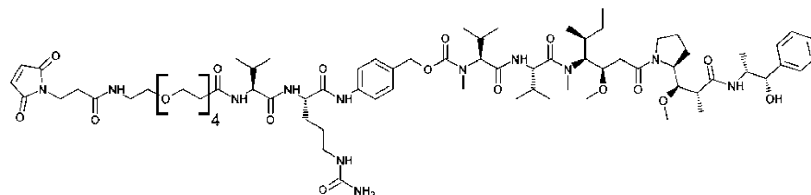
В некоторых вариантах осуществления средство связывают с АВ с использованием малеинимидкапроил-валин-цитруллинового линкера или малеинимид-PEG-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления средство связывают с АВ с использованием малеинимидкапроил-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления средство связывают с АВ с использованием малеинимид-PEG-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с АВ с использованием малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильного линкера, и такую конструкцию нагрузки

линкера обозначают в настоящем описании как "vc-MMAD". В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ), связанный с АВ с использованием малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонильного линкера, и такую конструкцию нагрузки линкером обозначают в настоящем описании как "vc-MMAE". Конструкции vc-MMAD и vc-MMAE продемонстрированы ниже:

vc-MMAD



vc-MMAE



Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, необязательные активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецен. Различные радионуклиды являются доступными для получения радиокоњуогированных антител. Примеры включают  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{186}\text{Re}$ .

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства получают с использованием ряда бифункциональных связывающих белок средств, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональных производных имидофиров (таки как диметиладипимидат HCL), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегидов (таких как глутаральдегид), бис-азидосоединений (таких как бис(п-азидобензил)гександиамин), производных бис-дiazония (таких как бис(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианатов (таких как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активных соединений фтора (таких как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано у Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Меченная углеродом 14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является иллюстративным хелатирующим средством для конъюгации радионуклеотида с антителом. (См. WO 94/11026).

В табл. 3 приведены некоторые из иллюстративных фармацевтических средств, которые можно применять в описанном в настоящем описании изобретении, но это не означает каким-либо образом, что список является исчерпывающим.

Таблица 3. Иллюстративные фармацевтические средства для конъюгации  
ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Ауристатины                  | Турбостатин                  |
| Ауристатин Е                 | Фенстатины                   |
| монометилауристатин D (MMAD) | Гидроксифенстатин            |
| монометилауристатин Е (ММАЕ) | Спонгистатин 5               |
| Desметил ауристатин Е (DMAE) | Спонгистатин 7               |
| Ауристатин F                 | Галистатин 1                 |
| монометилауристатин F (MMAF) | Галистатин 2                 |
| Desметил ауристатин F (DMAF) | Галистатин 3                 |
| Производные ауристатина,     | Модифицированные бриостатины |

например, его амиды

|                                     |                                                            |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Ауристатин тирамин                  | Галокомстатины                                             |
| Ауристатин хинолин                  | Пирролобензимидазолы (PBI)                                 |
| Доластатины                         | Цибростатин 6                                              |
| Производные доластатина             | Доксалиформ                                                |
| Доластатин 16 DmJ                   | Аналоги антрациклина                                       |
| Доластатин 16 Dpv                   |                                                            |
| Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4 |                                                            |
| Производные майтанзиноида           | Аналог цемадотина (CemCH2-SH)                              |
| Дуокармицин                         | Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (PE38)                |
| Производные дуокармицина            | Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38)             |
| Альфа-аманитин                      | ZJ-101                                                     |
| Антрациклины                        | OSW-1                                                      |
| Доксорубицин                        | 4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина |
| Даунорубицин                        | Ингибиторы топоизомеразы                                   |
| Бриостатины                         | Гемиастерлин                                               |
| Камптотецин                         | Цуфалотаксин                                               |
| Производные камптотецина            | Гомогаррингтонин                                           |
| 7-замещенный камптотецин            | Пирролобензодиазепин (PBD)                                 |
| 10,11-диформетилendioксикамптотецин | Димеры пирролобензодиазефина (PBD)                         |
| Комбретастатины                     | Функционализированные пирролобензодиазефины                |
| Дебромалплизиадоксин                | Функционализированные димеры пирролобензодиазефина         |
| Кахалалид-F                         | Калихимицины                                               |
| Дтскодермолид                       | Подофиллотоксины                                           |
| Эктеинасцидины                      | Таксаны                                                    |
|                                     | Алкалоиды барвинка                                         |
| ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ           |                                                            |
| Ацикловир                           | КОНЪЮГИРУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ                        |
| Вира А                              | Флуоресцеин и его производные                              |
| Симметрел                           | Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)                             |
| ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ          | РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА                             |
| Нистатин                            | $^{125}\text{I}$                                           |
|                                     | $^{131}\text{I}$                                           |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ                      | $^{89}\text{Zr}$                                           |

## АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

|              |                   |
|--------------|-------------------|
| Адриамицин   | <sup>111</sup> In |
| Церубидин    | <sup>123</sup> I  |
| Блеомицин    | <sup>131</sup> In |
| Алкеран      | <sup>99m</sup> Tc |
| Велбан       | <sup>201</sup> Tl |
| Онковин      | <sup>133</sup> Xe |
| Фторурацил   | <sup>11</sup> C   |
| Метотрексат  | <sup>62</sup> Cu  |
| Тиотепа      | <sup>18</sup> F   |
| Бизантрен    | <sup>68</sup> Ga  |
| Новантрон    | <sup>13</sup> N   |
| Тиогуанин    | <sup>15</sup> O   |
| Прокарабизин | <sup>38</sup> K   |
| Цитарабин    | <sup>82</sup> Rb  |

<sup>99m</sup>Tc (технеций)

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

|                |                 |
|----------------|-----------------|
| Аминогликозиды | ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ |
| Стрептомицин   | Барий           |
| Неомицин       | Золото          |
| Канамицин      | Платина         |
| Амикацин       |                 |

|                |                                 |
|----------------|---------------------------------|
| Гентамицин     | ПРОТИВОМИКОПЛАЗМЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ |
| Трбрамицин     | Тиолзин                         |
| Стрептомицин В | Спектиномицин                   |

Спектиномицин  
Ампициллин  
Сульфаниламид  
Полимиксин  
Хлорамфеникол

Специалистам в данной области понятно, что большое разнообразие возможных групп можно присоединять к получаемым антителам по изобретению. (См., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки).

Присоединение можно проводить посредством любой химической реакции, которая связывает две молекулы при условии, что антитело и другая группа сохраняют свои соответствующие виды активности. Такое связывание может включать многие химические механизмы, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексирование. Однако в некоторых вариантах осуществления связывание представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание можно получать прямой конденсацией существующих боковых цепей или введением внешних мостиковых молекул. Многие бивалентные или поливалентные связывающие средства являются пригодными для связывания белковых молекул, таких как антитела по настоящему изобретению с другими молекулами. Например, соответствующие связывающие средства могут включать органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот список не предназначен являться исчерпывающим для различных классов связывающих средств, известных в данной области, а наоборот является иллюстративным наиболее распространенных связывающих средств. (См. Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); and Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к композициям и способам, предоставленным в настоящем описании, конъюгированное активируемое антитело также можно модифицировать для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вводимых или иным образом включаемых в последовательность активируемого антитела. Такие модифицированные аминокислотные последовательности конструируют таким образом, чтобы обеспечивать контролируемое расположение и/или дозу конъюгированного средства в конъюгированном активируемом антителе. Например, активируемое антитело можно конструировать так, чтобы оно содержало замены цистеина в положениях на легкой и тяжелой цепях, которые предоставляют реакционноспособные тиоловые группы и не оказывают негативного влияния на сворачивание и сборку белка, и не изме-

няют связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конструировать так, чтобы включать или иным образом вводить один или более не природных аминокислотных остатков в активируемое антитело для обеспечения подходящих участков конъюгации. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конструировать так, чтобы включать или иным образом вводить последовательности ферментативно активируемого пептида в последовательность активируемого антитела.

Подходящие линкеры описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., *Cancer Res.* 44:201-208 (1984) describing use of MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester). Также см., патент США № 5030719, в котором описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидгидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-придилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-придилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., каталожный № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-придилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co. кат. № 2165-G), и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 24510) конъюгированный с EDC. Дополнительные линкеры включают, но не ограничиваются ими, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB или сульфо-SPDB.

Линкеры, описанные выше, содержат компоненты, которые обладают различными характеристиками, что, таким образом, приводит к конъюгатам с различными физико-химическими свойствами. Например, сложные эфиры сульфо-NHS и алкилкарбоксилатов являются более стабильными, чем сложные эфиры сульфо-NHS и ароматических карбоксилатов. Содержащие NHS-сложный эфир линкеры являются более растворимыми, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Кроме того, линкер SMPT содержит пространственно-затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи в основном являются менее стабильными, чем другие связи вследствие того, что дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к менее доступному конъюгату. Сульфо-NHS, в частности, может повышать стабильность карбодимидных связываний. Карбодимидные связывания (такие как EDC) при использовании в сочетании с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые являются более устойчивыми к гидролизу по сравнению с одной реакцией карбодимидного связывания.

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 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.

В настоящем изобретении используют несколько способов присоединения к АВ: (а) присоединения к углеводным группам АВ или (b) присоединения к сульфгидрильным группам АВ, или (с) присоединения к аминокислотным группам АВ, или (d) присоединения к карбоксилатным группам АВ. По изобретению АВ можно ковалентно присоединять к средству посредством промежуточного линкера, содержащего по меньшей мере две реакционноспособные группы, где одна взаимодействует с АВ, а другая взаимодействует со средством. Линкер, который может содержать любое совместимое органическое соединение, можно выбирать таким образом, чтобы реакция АВ (или средства) не оказывала неблагоприятного влияния на реактивность и селективность АВ. Кроме того, присоединение линкера к средству не может нарушать активность средства. Подходящие линкеры для взаимодействия с окисленными антителами или окисленными фрагментами антител включают линкеры, содержащие амин, выбранный из группы, состоящей из групп первичного амина, вторичного амина, гидразина, гидразида, гидроксилamina, фенилгидразина, семикарбазида и тиосемикарбазида. Такие реакционноспособные функциональные группы могут существовать в виде части структуры линкера, или их можно вводить посредством подходящей химической модификации линкеров, не содержащих такие группы.

По настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к восстановленным АВ включают линкеры, содержащие определенные реакционноспособные группы, способные взаимодействовать с сульфгидрильной группой восстановленного антитела или фрагмента. Такие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими: реакционноспособные галоалкильные группы (включая, например, галоацетильные группы), пара-ртутьбензоатные группы и группы, способные к реакции присоединения по Михаэлю (включая, например, маленимиды и группы типа, описываемого Mitra and Lawton, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* 101: 3097-3110).

По настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к окисленным или восстановленным АВ включают линкеры, содержащие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с первичными аминокислотными группами, содержащимися в немодифицированных остатках лизина в АВ. Такие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры NHS и карбоновой кислоты, сложные эфиры сульфо-NHS и карбоновой кислоты, сложные эфиры 4-нитрофенилкарбоновой кислоты, сложные эфиры пентафторфенилкарбоновой кислоты, ацилимидазолы, изотиоцианаты и изотиоцианаты.

По настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к окисленным или восста-

новленным АВ включают линкеры, содержащие определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с группами карбоновой кислоты, содержащимися в остатках аспартата или глутамината в АВ, которые активировали подходящими реагентами. Подходящие реагенты активации включают EDC с добавленными NHS или сульфо-NHS или без них и другие дегидратирующие средства, используемые для образования карбоксиамида. В этих случаях функциональные группы, содержащиеся в подходящих линкерах, включают первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксилламины и гидразиды.

Средство можно присоединять к линкеру до или после того, как линкер присоединяют к АВ. В определенных применениях желательным может являться сначала получать промежуточное соединение АВ-линкер, в котором линкер не связан с ассоциированным средством. В зависимости от конкретного применения конкретное средство можно затем присоединять к линкеру. В некоторых вариантах осуществления АВ сначала присоединяют к ММ, субстрату СМ1-СМ2 и ассоциированным линкерам, а затем присоединяют к линкеру, предназначенному для конъюгации.

**Разветвленные Линкеры.** В конкретных вариантах осуществления используют разветвленные линкеры, которые содержат множественные сайты присоединения средств. Для линкеров с множественными сайтами одиночное ковалентное присоединение к АВ приводит к промежуточному соединению АВ-линкер, способному связывать средство по различным участкам. Участки могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы или любой химический участок, к которому можно присоединять средства.

В некоторых вариантах осуществления более высокую специфическую активность (или более высокое отношение средств к АВ) можно получать присоединением линкера с одним участком по совокупности участков на АВ. Такую совокупность участков можно вводить в АВ любым из двух способов. Первый, можно получать множественные альдегидные группы и/или сульфгидрильные группы в одном и том же АВ. Второй, можно присоединять к альдегиду или сульфгидрилу АВ "разветвленный линкер", содержащий множественные функциональные участки для последующего присоединения к линкерам. Функциональные участки разветвленного линкера или линкера с множественными участками могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы или могут являться любым химическим участком, к которому можно присоединять линкеры. Еще более высокие виду специфической активности можно получать комбинацией этих двух подходов, т.е. присоединением линкера с множественными участками к нескольким участкам на АВ.

**Расщепляемые линкеры.** В одном из вариантов осуществления по настоящему изобретению можно использовать пептидные линкеры, которые могут подвергаться расщеплению ферментами системы комплемента, такими как, но, не ограничиваясь ими, урокиназа, тканевой активатор плазминогена, трипсин, плазмин или другим ферментом, обладающим протеолитической активностью. По одному из способов по настоящему изобретению средство присоединяют через линкер, подвергающийся расщеплению комплементом. Антитело выбирают из класса, который может активировать комплемент. Таким образом, конъюгат антитело-средство активирует каскад комплемента и высвобождает средство в участке мишени. По другому способу по настоящему изобретению средство присоединяют через линкер, подвергающийся расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как урокиназа, тканевой активатор плазминогена, плазмин или трипсин. Такие расщепляемые линкеры являются пригодными в конъюгированных активируемых антителах, которые содержат внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, приведенных в табл. 3.

Неограничивающие примеры последовательностей расщепляемого линкера приведены в табл. 4.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности линкеров для конъюгации

| Типы расщепляемых последовательностей                               | Аминокислотная последовательность                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Расщепляемые плазмином последовательности                           |                                                                                                                  |
| Проурокиназа                                                        | PRFKIIGG (SEQ ID NO: 319)<br>PRFRIIGG (SEQ ID NO: 320)                                                           |
| TGFβ                                                                | SSRHRRALD (SEQ ID NO: 321)                                                                                       |
| Плазминоген                                                         | RKSSIIIRMDVVL (SEQ ID NO: 322)                                                                                   |
| Стафилокиназа                                                       | SSSFDKGKYKGDGA (SEQ ID NO: 323)<br>SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 324)                                              |
| Расщепляемые фактором Ха последовательности                         | IEGR (SEQ ID NO: 325)<br>IDGR (SEQ ID NO: 326)<br>GGSIDGR (SEQ ID NO: 327)                                       |
| Расщепляемые MMP последовательности                                 |                                                                                                                  |
| Желатиназа А                                                        | PLGLWA (SEQ ID NO: 328)                                                                                          |
| Расщепляемые коллагеназой последовательности                        |                                                                                                                  |
| Коллаген телячьей кожи (цепь α1(I))                                 | GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 329)                                                                                        |
| Коллаген телячьей кожи (цепь α2(I))                                 | GPQGGLGA (SEQ ID NO: 330)                                                                                        |
| Коллаген хрящей крупного рогатого скота (цепь α1(II))               | GIAGQ (SEQ ID NO: 331)                                                                                           |
| Коллаген печени человека (цепь α1(III))                             | GPLGIAGI (SEQ ID NO: 332)                                                                                        |
| α <sub>2</sub> M человека                                           | GPEGLRVG (SEQ ID NO: 333)                                                                                        |
| PZP человека                                                        | YGAGLGVV (SEQ ID NO: 334)<br>AGLGVVER (SEQ ID NO: 335)<br>AGLGISST (SEQ ID NO: 336)                              |
| α <sub>1</sub> M крысы                                              | EPQALAMS (SEQ ID NO: 337)<br>QALAMSAI (SEQ ID NO: 338)                                                           |
| α <sub>2</sub> M крысы                                              | AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 339)<br>MDAFLESS (SEQ ID NO: 340)                                                           |
| α <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (2J) крысы                            | ESLPVVAV (SEQ ID NO: 341)                                                                                        |
| α <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (27J) крысы                           | SAPAVESE (SEQ ID NO: 342)                                                                                        |
| Коллагеназа фибробластов человека (аутолитические виды расщепления) | DVAQFVLT (SEQ ID NO: 343)<br>VAQFVLTE (SEQ ID NO: 344)<br>AQFVLTEG (SEQ ID NO: 345)<br>PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 346) |

Кроме того, средства можно присоединять через дисульфидные связи (например, дисульфидные связи на молекуле цистеина) к АВ. Вследствие того, что многие опухоли по своей природе высвобождают высокие уровни глутатиона (восстановителя), это может восстанавливать дисульфидные связи с последующим высвобождением средства на участке доставки. В определенных конкретных вариантах осуществления восстановитель, который модифицирует субстрат CM1-CM2 также модифицирует линкер конъюгированного активируемого антитела.

Спейсеры и расщепляемые элементы. В некоторых вариантах осуществления необходимым может являться конструирование линкера таким образом, чтобы оптимизировать расстояние между средством и АВ активируемого антитела. Это можно проводить путем использования линкера общей структуры:

W-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Q,

где W представляет собой -NH-CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-;

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 в стороне от сердцевины АВ, таким образом, что расщепляемый элемент является в большей степени доступным для фермента, обеспечивающего расщепление. Определение из разветвленных линкеров, описанных выше, могут служить в качестве спейсерных элементов.

На всем протяжении настоящего описания следует понимать, что присоединение линкера к сред-



ву (или спейсерного элемента к расщепляемому элементу, или расщепляемого элемента к средству) обязательно должно являться конкретным способом прикрепления или реакции. Приемлемой является любая реакция, обеспечивающая продукт, подходящий стабильности и биологической совместимости.

Комплемент сыворотки и выбор линкеров. Согласно одному из способов по настоящему изобретению, когда желательным является высвобождение средства, используют АВ, который представляет собой антитело класса, который может активировать комплемент. Получаемый конъюгат сохраняет способность связывать антиген и активировать каскад комплемента. Таким образом, по этому варианту осуществления по настоящему изобретению средство присоединяют к одному концу расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, и другой коней линкерной группы присоединяют к конкретному сайту на АВ. Например, если средство содержит гидроксигруппу или аминогруппу, его можно присоединять к С-концу пептида, аминокислоты или другого подходящим образом выбранного линкера через сложноэфирную или амидную связь, соответственно. Например, такие средства можно присоединять к линкерному пептиду посредством карбодимидной реакции. Если средство содержит функциональные группы, которые препятствуют присоединению к линкеру, такие создающие препятствия функциональные группы можно блокировать до присоединения и снимать блокировку после получения конъюгата продукта или промежуточного соединения. Затем используют противоположный или амино-конец линкера непосредственно или после дополнительной модификации для связывания с АВ, который может активировать комплемент.

Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут являться любой желаемой длины, один конец которых можно ковалентно связывать с конкретными участками на АВ активируемого антитела. Другой конец линкера или спейсерного элемента можно присоединять к аминокислоте или пептидному линкеру.

Таким образом, когда эти конъюгаты связываются с антигеном в присутствии комплемента амидная или сложноэфирная связь, которая связывает средство с линкером, расщепляется, что приводит к высвобождению средства в его активной форме. Эти конъюгаты, при введении индивидууму, осуществляют доставку и высвобождение средства в целевом участке и являются особенно эффективными для доставки *in vivo* фармацевтических средств, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных средств и т.п., таких как приведенные, но, не ограничиваясь ими, в табл. 3.

Линкеры для высвобождения без активации комплемента. В еще одном другом применении направленной доставки желательным является высвобождение средства без активации комплемента, т.к. активация каскада комплемента в конечном итоге приведет к лизису клетки-мишени. Таким образом, такой подход является пригодным, когда доставку и высвобождение средства следует проводить без уничтожения клетки-мишени. Такой является цель, когда желаемой является доставка клеточных медиаторов, таких как гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейромедиаторы, гены или ферменты. Такие конъюгаты можно получать присоединением средства к АВ, которое не способно активировать комплемент посредством линкера, который слабо подвергается расщеплению протеазами сыворотки. Когда такой конъюгат вводят индивидууму, быстро образуется комплекс антиген-антитело, тогда как расщепление средства происходит медленно, что, таким образом, приводит к высвобождению соединения в целевом участке.

Биохимические кросс-линкеры. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конъюгировать с одним или более терапевтических средств с использованием определенных биохимических кросс-линкеров. Перекрестносшивающие реагенты образуют молекулярные мостики, которые связывают друг с другом функциональные группы двух различных молекул. Для связывания двух различных белков поэтапно можно использовать гетеробифункциональные кросс-линкеры, которые устраняют нежелательное образование гомополимеров.

Пептидные линкеры, расщепляемые липосомальными протеазами, также являются пригодными, например, Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, можно использовать кислото-неустойчивые линкеры, расщепляемые в среде с низким pH липосом, например: бис-сиалильный эфир. Другие подходящие линкеры включают неустойчивые к действию катепсина субстраты, в частности субстраты, для которых демонстрируют оптимальную функцию при кислом pH.

Иллюстративные гетеробифункциональные кросс-линкеры указаны в табл. 5.

Таблица 5. Иллюстративные гетеробифункциональные кросс-линкеры  
ГЕТЕРОБИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КРОСС-ЛИНКЕРЫ

| Линкер         | Реакционноспособный в отношении | Преимущества и виды применения       | Длина спейсерной "ножки" после перекрестного сшивания (ангстрем) |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| SMPT           | Первичных аминов                | Более высокая стабильность           | 11,2 Å                                                           |
| SPDP           | Сульфгидрилов                   | Тиолирование                         | 6,8 Å                                                            |
|                | Первичных аминов                | Расщепляемое перекрестное сшивание   |                                                                  |
|                | Сульфгидрилов                   | Удлиненная спейсерная "ножка"        | 15,6 Å                                                           |
| LC-SPDP        | Первичных аминов                | Удлиненная спейсерная "ножка"        | 15,6 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   | Водорастворимый                      |                                                                  |
| Сульфо-LC-SPDP | Первичных аминов                | Стабильная                           |                                                                  |
|                | Сульфгидрилов                   | реакционноспособная                  | 11,6 Å                                                           |
| SMCC           | Первичных аминов                | малеинимидная группа                 |                                                                  |
|                | Сульфгидрилов                   | Конъюгация фермент-антитело          |                                                                  |
|                |                                 | Конъюгация белка-переносчика гаптена |                                                                  |
| Сульфо-SMCC    | Первичных аминов                | Стабильная реакционноспособная       | 11,6 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   | малеинимидная группа                 |                                                                  |
|                |                                 | Водорастворимый                      |                                                                  |
|                |                                 | Конъюгация фермент-антитело          |                                                                  |
| MBS            | Первичных аминов                | Конъюгация фермент-антитело          | 9,9 Å                                                            |
|                | Сульфгидрилов                   | Гаптен-носитель белок conjugation    |                                                                  |
| Сульфо-MBS     | Первичных аминов                | Водорастворимых                      | 9,9 Å                                                            |
|                | Сульфгидрилов                   |                                      |                                                                  |
| SIAB           | Первичных аминов                | Конъюгация фермент-антитело          | 10,6 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   |                                      |                                                                  |
| Sulfo-SIAB     | Первичных аминов                | Водорастворимый                      | 10,6 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   |                                      |                                                                  |
| SMPB           | Первичных аминов                | Удлиненная спейсерная "ножка"        | 14,5 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   | Конъюгация фермент-антитело          |                                                                  |
| Sulfo-SMPB     | Первичных аминов                | Удлиненная спейсерная "ножка"        | 14,5 Å                                                           |
|                | Сульфгидрилов                   | Водорастворимый                      |                                                                  |
| EDE/Sulfo-NHS  | Первичных аминов                | Конъюгация носителя гаптен-носителя  | 0                                                                |
|                | Карбоксильных групп             |                                      |                                                                  |
| ABH            | Углеводов                       | Взаимодействие с группами сахаров    | 11,9 Å                                                           |
|                | Неселективный                   |                                      |                                                                  |

Нерасщепляемые линкеры или прямое присоединение. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат можно конструировать таким образом, что средство доставляется к мишени, но не высвобождается. Это можно получать путем присоединения средства к АВ непосредственно или через нерасщепляемый линкер.

Такие нерасщепляемые линкеры могут включать аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые можно модифицировать для введения функциональных групп, которые затем можно использовать в присоединении к АВ способами, описываемыми в настоящем описании.

Общая формула для такого органического линкера может представлять собой:

$W-(CH_2)_n-Q$ ,

где W представляет собой  $-NH-CH_2-$  или  $-CH_2-$ ;

Q представляет собой аминокислоту, пептид, и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

Нерасщепляемые конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления соединения можно присоединять к АВ, которые не активируют комплемент. При использовании АВ, которые не способны активировать комплемент, такое присоединение можно проводить с использованием линкеров, которые подвергаются расщеплению активированным комплементом, или с использованием линкеров, которые не подвергаются расщеплению активированным комплементом.

Антитела, описываемые в настоящем описании, также можно формулировать в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают известными в данной области способами, таким как описано у Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980), и в патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

Особенно пригодные липосомы можно получать способом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и дериватизированный PEG фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы age продавливают через фильтры с определенным размером пор с получением липосом с желаемым диаметром. Фрагменты Fab' антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано у Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), путем реакции обмена дисульфидами.

Определения.

Если не определено иное, научные и технические термины, используемые по отношению к настоящему изобретению, имеют значения, которые общепринято понимают специалисты в данной области. Термин в единственном числе касательно объекта относится к одному или более таких объектов. Например, соединение относится к одному или более соединений. Таким образом, термины в единственном числе, "один или более" и "по меньшей мере один" можно использовать взаимозаменяемо. Кроме того, если из контекста не следует иное, термины в единственном числе включают формы множественного числа, и термины во множественном числе включают формы единственного числа. Как правило, номенклатура, используемая по отношению к и способы культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии и химии белков и олиго- или полинуклеотидов и гибридизации, описываемые в настоящем описании, представляют собой номенклатуру хорошо известную и общепринятую в данной области. Стандартные способы используют для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза и культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и способы очистки проводят в соответствии с инструкциями производителя или как общепринято проводят в данной области, или как описано в настоящем описании. Указанные выше техники и способы, как правило, проводят в соответствии с общепринятыми способами хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируют и обсуждают на всем 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)). Используемая номенклатура и лабораторные способы и техники аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии, описываемые в настоящем описании, представляет собой номенклатуру, хорошо известную и общепринятую в данной области. Стандартные способы используют для химических синтезов, химических анализов, фармацевтического препарата, состава и доставки, и лечения пациентов.

Как используют в соответствии с настоящим изобретением, следует понимать, что следующие ниже термины, если не указано иное, имеют указанные ниже значения.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным участкам молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекул, которые содержат антигенсвязывающий участок, который специфически связывается (иммунологически взаимодействует) с антигеном. Под "специфически связывается" или "иммунологически взаимодействует" или "иммуноспецифически связывается" подразумевают, что антитело взаимодействует с одной или более антигенных детерминант желаемого антигена и не взаимодействует с другими полипептидами или связывается с значительно меньшей аффинностью ( $K_d > 10^{-6}$ ). Антитела включают но не ограничиваются ими,

поликлональное, моноклональное, химерное, доменное антитело, одиночную цепь, фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub>, scFvs и экспрессионную библиотеку Fab.

Известно, что основная 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). Аминоконцевой участок каждой цепи содержит вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, преимущественно обеспечивающих распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок каждой цепи определяет константную область, преимущественно обеспечивающую эффекторную функцию. Как правило, молекулы антител, получаемые от людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, содержащейся в молекуле. Определенные классы также содержат подклассы, такие как IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и другие. Кроме того, у людей легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела", как используют в настоящем описании, относится к популяции молекул антитела, которые содержат только один молекулярный тип молекулы антитела, состоящей из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела являются идентичными во всех молекулах популяции. MAb содержат антигенсвязывающий участок, способный иммунологически взаимодействовать с конкретным эпитопом антигена, характеризующийся уникальной аффинностью связывания с ним.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "связывающий участок" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками вариабельных ("V") областей N-конца тяжелых ("H") и легких ("L") цепей. Три высокодивергирующие фрагмента в V-областях тяжелых и легких цепей, обозначаемые как "гипервариабельные области", располагаются между более консервативными фланкирующими фрагментами, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые в природе встречаются между гипервариабельными областями и являются смежными с ними в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности встречающейся в антигене, и три гипервариабельные области каждой из тяжелых и легких цепей обозначают как "определяющие комплементарность области" или "CDR". Приписывание аминокислот к каждому домену проводят в соответствии с определениями Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

Как используют в настоящем описании, термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином, scFv или T-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или T-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекулы, таких как аминокислоты боковые цепи или сахаров, и, как правило, обладают конкретными трехмерными структурными характеристиками, а также конкретными характеристиками заряда. Например, антитела можно индуцировать против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет  $\leq 1$  мкМ, в некоторых вариантах осуществления  $\leq 100$  нМ и в некоторых вариантах осуществления  $\leq 10$  нМ.

Как используют в настоящем описании, термины "специфическое связывание", "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям такого типа, который происходит между молекулой иммуноглобулина и антигеном, к которому иммуноглобулин является специфичным. Силу или аффинность взаимодействия иммунологического связывания можно выражать в виде константы диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействия, где меньшая  $K_d$  отражает большую аффинность. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов можно количественно оценивать хорошо известными в данной области способами. Один такой способ включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий участок/антиген, где такие скорости зависят от концентрации партнеров по образованию комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, "константу скорости прямой реакции" ( $K_{on}$ ) и "константу скорости обратной реакции" ( $K_{off}$ ) можно определять путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. Nature, 361:186-87 (1993)). Отношение  $K_{off}/K_{on}$  позволяет исключать все параметры, не относящиеся к аффинности, и является равным константе диссоциации  $K_d$ . (См. в основном Davies et al., (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Говорят, что антитело по настоящему изобретению специфически связывается с мишенью, когда константа связывания ( $K_d$ ) составляет  $\leq 1$  мкМ, в некоторых вариантах осуществ-

ствления  $\leq 100$  нМ, в некоторых вариантах осуществления нМ и в некоторых вариантах осуществления от  $\leq 100$  пМ приблизительно до 1 пМ, как измеряют анализами, такими как анализы связывания радиоактивного лиганда или аналогичными анализами, известными специалистам в данной области.

Термин "выделенный полинуклеотид", как используют в настоящем описании, означает полинуклеотид геномной ДНК, кДНК или синтетического происхождения или некоторого их сочетания, где в силу своей природы "выделенный полинуклеотид" (1) не является связанным с полным полинуклеотидом или его частью, в котором "выделенный полинуклеотид" встречается в природе, (2) является функционально связанным с полинуклеотидом, с которым он не является связанным в природе, или (3) не встречается в природе в виде части более крупной последовательности. Полинуклеотиды по изобретению включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящем описании, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы легкой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящем описании.

Термин "выделенный белок", указанный в настоящем описании, означает белок кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или некоторого их сочетания, где в силу своего происхождения или источника получения "выделенный белок" (1) не является связанным с белками белки, встречающимися в природе, (2) не содержит других белков из того же источника, например, не содержит белков мыши, (3) экспрессируется клеткой от другого вида или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используют в настоящем описании как родовой термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Таким образом, нативные белковые фрагменты и аналоги являются молекулами рода полипептидов. Полипептиды по изобретению содержат молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящем описании, и молекулы легкой цепи иммуноглобулина, представленные в настоящем описании, а также молекулы антител, образованные комбинациями, содержащими молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина с молекулами легкой цепи иммуноглобулинов, таким как молекулы легкой каппа-цепи иммуноглобулина и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Термин "природный", как используют в настоящем описании, когда применяют к объекту, указывает на тот факт, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которую можно выделять из источника в природе, и которую человек специально не модифицировал в лаборатории или иным образом, является природной.

Термин "функционально связанный", как используют в настоящем описании, относится к положениям компонентов, описываемых таким образом, которые находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предписанным им образом. Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, является лигированной таким образом, что экспрессию кодирующей последовательности получают в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "контрольная последовательность", как используют в настоящем описании, относится к полинуклеотидным последовательностям, которые являются необходимыми для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей отличается в зависимости от организма хозяина, у прокариот, такие контрольные последовательности, как правило, содержат промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции, у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности содержат промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" предназначен включать, по меньшей мере, все компоненты, наличие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, а также могут содержать дополнительные компоненты, наличие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию. Термин "полинуклеотид", как указывают в настоящем описании, означает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, а также рибонуклеотиды или дезоксинуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает одноцепочечную и двухцепочечную формы ДНК.

Термин олигонуклеотид, указанный в настоящем описании, включает природные и модифицированные нуклеотиды, связанные друг с другом природными и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, как правило, составляющих в длину 2 00 оснований или менее. В некоторых вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10 до 60 оснований и в некоторых вариантах осуществления 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, для зондов, при этом олигонуклеотиды могут являться двухцепочечными, например, для применения в конструкции мутанта гена. Олигонуклеотиды по изобретению представляют собой смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды.

Термин "природные нуклеотиды", указанный в настоящем описании, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", указанный в настоящем описании, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными группами сахаров и т.п. Термин "олиго-

нуклеотидные связи", указанный в настоящем описании, включает олигонуклеотидные связи, такие как тиофосфат, фосфодитиоат, фосфоселерлоат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоранилат, фосфонидат и т.п. См., например, La Planche 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. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Patent No. 5151510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990). При желании олигонуклеотид может содержать метку для детекции.

Как используют в настоящем описании, двадцать общепринятых аминокислот и их сокращенные обозначения находят общепринятое использование. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати общепринятых аминокислот, искусственных аминокислот, таких как  $\alpha$ -,  $\alpha$ -замещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие неклассические аминокислоты также могут представлять собой подходящие компоненты для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры неклассических аминокислот включают: 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутаминат,  $\epsilon$ -N,N,N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, сек-N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В описании полипептидов, используемой в настоящем описании, левое направление является направлением к аминоконцу, и правое направление является направлением к карбоксиконцу, в соответствии с стандартным использованием и соглашением.

Аналогично, если не указано иное, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец, левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей обозначают как 5'-направление. Добавление в направлении от 5' к 3' образующихся транскриптов РНК обозначают как области последовательности направления транскрипции на цепи ДНК, имеющей такую же последовательность как РНК, и которые являются 5'-5'-конец транскрипта РНК обозначают как "вышележащие последовательности", области последовательности на цепи ДНК, имеющие такую же последовательность как РНК и которые являются 3'-3'-конец транскрипта РНК, обозначают как "нижележащие последовательности".

Как применяют к полипептидам, термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BEST-FIT с использованием по умолчанию штраф за пропуск, обладают по меньшей мере 80 процентами идентичности последовательности, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90 процентами идентичности последовательности, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95 процентами идентичности последовательности и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99 процентами идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Как описано в настоящем описании, предусматривают, что незначительные изменения аминокислотных последовательностей антител или молекул иммуноглобулина входят в настоящее изобретение, при условии, что изменения 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, предусматривают консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, которые являются родственными по их боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты, как правило, разделяют на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутаминат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутаминат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые представляют собой алифатическое-гидрокси семейство; (ii) аспарагин и глутамин, которые представляют собой содержащее амид семейство; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые представляют собой алифатическое семейство, и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые представляют собой ароматическое семейство. Например, вполне можно ожидать, что выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаминатом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно сходной аминокислотой не оказывает значительного влияния на связывание или свойства получаемой молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном участке. Приводит ли аминокислотная замена к функциональному пептиду, можно легко определять оценкой специфической активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в настоящем описании. Специалисты в данной области могут легко получать фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулина. Подходящие амино- и карбоксиконцы фрагментов или

аналогов возникают около границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать сравнением данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с открытыми или патентованными базами данных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления используют компьютеризированные способы сравнения для идентификации мотивов последовательности или теоретически рассчитанные конформационные домены белка, которые возникают в других белках известной структуры и/или функции. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые сворачиваются в известную трехмерную структуру. Bowie et al. Science 253:164 (1991). Таким образом, указанные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области могут распознавать мотивы последовательности и структурные конформации, которые можно использовать для определения структурных и функциональных доменов по изобретению.

Подходящие замены аминокислот представляют собой замены, которые: (1) снижают подверженность протеолизу, (2) снижают подверженность окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания и (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличной от природной пептидной последовательности. Например, одиночные или множественные замены аминокислот (например, консервативные аминокислотные замены) можно получать в природной последовательности (например, в части полипептида вне домена(ов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна по существу изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, аминокислота замены не должна разрушать спираль, которая возникает в исходной последовательности или нарушать другие типы вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры принятых в данной области полипептидных вторичных и третичных структур описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)), и у Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Термин "полипептидный фрагмент", как используют в настоящем описании, относится к полипептиду, который содержит делецию и/или одну или более внутренних делеций в аминоконце и/или карбоксиконце, но где оставшаяся аминокислотная последовательность является идентичной соответствующим положениям в природной последовательности, расшифрованной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Длина фрагментов, как правило, составляет по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 14 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20 аминокислот, как правило, по меньшей мере 50 аминокислот, и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70 аминокислот. Термин "аналог", как используют в настоящем описании, относится к полипептидам, которые состоят из сегмента по меньшей мере 25 аминокислот, который обладает существенной идентичностью с участком расшифрованной аминокислотной последовательности и который характеризуется специфическим связыванием с мишенью в подходящих условиях связывания. Как правило, аналоги полипептидов содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление или делецию) относительно природной последовательности. Длина аналогов, как правило, составляет по меньшей мере 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50 аминокислот или больше, и может являться такой же как и длина полноразмерного природного полипептида.

Термин "средство" используют в настоящем описании для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологических макромолекул или экстракта, получаемого из биологических материалов.

Как используют в настоящем описании, термины "метка" или "меченый" относятся к введению детектируемого маркера, например, путем введения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных групп, которые можно детектировать меченым авидином (например, содержащим стрептавидин флуоресцентным маркером, или ферментативную активность, которую можно детектировать оптическими или калориметрическими способами). В определенных ситуациях метка или маркер также может являться терапевтической. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области, и их можно использовать. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются следующими ниже: радиоактивные изотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, участки связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединены спейсерными "ножками" различных длин для уменьшения возможного стерического препятствия. Термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство", как используют в настоящем описании, относится к химическому соединению или композиции, способной индуцировать желаемый терапевтический эффект при соответствующем введении пациенту.

Другие химические термины в настоящем описании используют в соответствии с общепринятым использованием в данной области, как проиллюстрировано The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Как используют в настоящем описании, "по существу чистый" означает целевое соединение является преобладающим соединением, присутствующим (т.е. на молекулярном уровне оно является более распространенным чем любые другие отдельные соединения в композиции), и в некоторых вариантах осуществления в значительной степени очищенная фракция представляет собой композицию, где целевое соединение составляет по меньшей мере приблизительно 50 процентов (на молекулярном уровне) от всех содержащихся макромолекулярных соединений.

Как правило, по существу чистая композиция содержит более приблизительно 80 процентов от всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления более чем приблизительно 85, 90, 95 и 99%. В некоторых вариантах осуществления целевое соединение очищают до существенной гомогенности (загрязняющие соединения невозможно детектировать в композиции общепринятыми способами детекции), где композиция состоит по существу из одного макромолекулярного соединения.

Термин "пациент" включает человека и являющихся животными индивидуумов.

Активируемые антитела по изобретению специфически связываются с данной мишенью, например, белком-мишенью человека. Также в изобретение входят активируемые антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом что и активируемые антитела, описываемые в настоящем описании.

Специалистам в данной области понятно, что можно определять без излишнего экспериментирования, обладает ли моноклональное антитело (например, моноклональное или гуманизированное антитело мыши) такой же специфичностью, как и моноклональное антитело, используемое в способах, описываемых в настоящем описании, путем оценки, препятствует ли первое связыванию с мишенью последнего. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по изобретению, как показано по уменьшению связывания моноклональным антителом по изобретению, то два моноклональных антитела связываются с тем же или близкородственным эпитопом. Способ определения обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по изобретению, заключается в предварительной инкубации моноклонального антитела по изобретению с мишенью, а затем добавлении тестируемого моноклонального антитела для определения, ингибирует ли тестируемое моноклональное антитело его способность связываться с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируют, то по всей вероятности, оно обладает такой же или функционально эквивалентной эпитопной специфичностью как моноклональное антитело по изобретению.

Полиспецифические активируемые антитела.

Изобретение также относится к полиспецифическим активируемым антителам. Полиспецифические активируемые антитела, предоставленные в настоящем описании, представляют собой полиспецифические антитела, которые распознают два или более различных антигена или эпитопа и которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (ММ), связанную по меньшей мере с одним антиген- или эпитопсвязывающим доменом полиспецифического антитела, таким образом, что присоединение ММ снижает способность антиген- или эпитопсвязывающего домена связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют к антиген- или эпитопсвязывающему домену полиспецифического антитела через субстрат CM1-CM2, который функционирует как субстрат по меньшей мере для одной MMP протеазы и по меньшей мере одной SP. Активируемые полиспецифические антитела, предоставленные в настоящем описании, являются стабильными в циркулирующей крови, активируемыми в предполагаемых участках терапии и/или диагностики, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани, и при активации характеризуются связыванием с мишенью, которое является по меньшей мере сравнимым с соответствующим, немодифицированным полиспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела конструируют так, чтобы активировать эффекторные клетки иммунной системы, также обозначаемые в настоящем описании как активирующие эффекторные клетки иммунной системы полиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела конструируют так, чтобы активировать лейкоциты, также обозначаемые в настоящем описании как активирующие лейкоциты полиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела конструируют так, чтобы активировать Т-клетки, также обозначаемые в настоящем описании как активирующие Т-клетки полиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела активируют поверхностный антиген на лейкоците, таком как на Т-клетке, на естественной киллерной (NK) клетке, на миелоидной мононуклеарной клетке, на макрофаге и/или на другой эффекторной клетке иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой мононуклеарную клетку, такую как миелоидная мононуклеарная клетка. В некото-



рых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела конструируют так, чтобы связываться или иным образом взаимодействовать с более чем одной мишенью и/или более чем одним эпитопом, также обозначаемые в настоящем описании как направленные на множественные антигены активируемые антитела. Как используют в настоящем описании, термины "мишень" и "антиген" используют взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления активирующие эффекторную клетку иммунной системы полиспецифические активируемые антитела по изобретению содержат антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент и активирующее эффекторную клетку иммунной системы антитело или его антигенсвязывающий участок, где по меньшей мере одно из антитела против клетки-мишени или его антигенсвязывающего фрагмента и/или активирующего эффекторную клетку иммунной системы антитела или его антигенсвязывающего участка является маскированным. В некоторых вариантах осуществления активирующее эффекторную клетку иммунной системы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывает первую активирующую эффекторную клетку иммунной системы мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, который содержит второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления активирующее эффекторную клетку иммунной системы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывает первую активирующую эффекторную клетку иммунной системы мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью, и антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второй антитело или его фрагмент, который содержит второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления активирующее неиммунную эффекторную клетку антитело представляет собой антитело против злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления эффекторное антитело неиммунной клетки представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления активирующее эффекторную клетку иммунной системы антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени (например, эффекторное антитело неиммунной клетки) представляет собой IgG, и активирующее эффекторную клетку иммунной системы антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка иммунной системы представляет собой миелоидную мононуклеарную клетку.

В некоторых вариантах осуществления активирующие Т-клетку полиспецифические активируемые антитела по изобретению содержат антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент и активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий участок, где по меньшей мере одно из антитела против клетки-мишени или его антигенсвязывающего фрагмента и/или активирующего Т-клетку антитела или его антигенсвязывающего участка маскируют. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью, и антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активирующие Т-клетку полиспецифические активируемые антитела включают антитело против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент и

активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий участок, где по меньшей мере одно из антитела против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающего фрагмента и/или активирующего Т-клетку антитела или его антигенсвязывающего участка маскируют. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью, и антитело против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активирующие Т-клетку полиспецифические активируемые антитела включает антитело IgG против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент и активирующий Т-клетку scFv, где по меньшей мере одно из антитела IgG против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающего фрагмента и/или активирующего Т-клетку антитела или его антигенсвязывающего участка маскируют. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с первой активирующей Т-клетку мишенью, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с первой мишенью, и антитело IgG против злокачественной опухоли или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй связанной со злокачественной опухолью мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активирующего эффекторную клетку иммунной системы полиспецифического активируемого антитела один антиген представляет собой, как правило, антиген, присутствующий на поверхности опухолевой клетки или другого типа клеток, связанных с заболеванием, такой как, но, не ограничиваясь ими, любая мишень, приведенная в табл. 1, такой как, но, не ограничиваясь ими, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 или CD71 (рецептор трансферрина), и другой антиген представляет собой, как правило, стимулирующий или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, естественной киллерной (NK) клетки, миелоидной мононуклеарной клетки, макрофаге и/или другой эффекторной клетки иммунной системы, такой как, но, не ограничиваясь ими, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой стимулирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки или NK-клетки; примеры таких стимулирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, CD3, CD27, CD28, CD137 (также обозначаемый как 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D и OX40. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки; примеры таких ингибирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 и экспрессируемые NK KIR. Домен антитела, обеспечивающий специфичность к Т-клеточному поверхностному антигену, также можно заменять лигандом или доменом лиганда, который созывается с Т-клеточным рецептором, NK-клеточным рецептором, макрофа-

гальным рецептором и/или рецептором другой эффекторной клетки иммунной системы, таким как, но, не ограничиваясь ими, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 или TNFSF9.

Один из вариантов осуществления изобретения представляет собой полиспецифическое активируемое антитело, которое является активируемым в микроокружении злокачественной опухоли и которое содержит антитело, например IgG или scFv, направленное на опухоль-мишень и антитело-агонист, например, IgG или scFv, направленное на костимулирующий рецептор, экспрессируемый на поверхности активированной Т-клетки или NK-клетки, где по меньшей мере одно из антител против злокачественной опухоли-мишени и/или антитело-агонист маскируют. Примеры костимулирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, CD27, CD137, GITR, HVEM, NKG2D и OX40. В этом варианте осуществления полиспецифическое активируемое антитело после активации опухолеспецифическими протеазами эффективно связывается и активирует экспрессируемые Т-клеткой или NK-клеткой костимулирующие рецепторы в зависимости от опухоли с повышением активности Т-клеток, которые реагируют на любой опухолевый антиген через свои эндогенные Т-клеточные антигенные или активирующие NK рецепторы. Зависящая от активации природа таких Т-клеточных или NK-клеточных костимулирующих рецепторов сконцентрирует активность активированного полиспецифического активируемого антитела на опухолеспецифических Т-клетках без активации всех Т-клеток независимо от их антигенной специфичности. В одном из вариантов осуществления, по меньшей мере, антитело к костимулирующему рецептору полиспецифического активируемого антитела маскируют для предотвращения активации аутореактивных Т-клеток, которые могут присутствовать в тканях, которые также экспрессируют антиген, распознаваемый направленным на опухоль-мишень антителом в полиспецифическом активируемом антителе, но активность которого является ограниченной в виду отсутствия вовлечения корецептора.

Один из вариантов осуществления изобретения представляет собой полиспецифическое активируемое антитело, которое является активируемым при заболевании, характеризуемым сверхстимуляцией Т-клеток, такой как, но, не ограничиваясь ими, микроокружение при аутоиммунном заболевании или воспалительном заболевании. Такое полиспецифическое активируемое антитело включает антитело, например, IgG или scFv, направленное на мишень, содержащую поверхностный антиген, экспрессируемый в ткани, на которую направлена Т-клетка при аутоиммунном или воспалительном заболевании, и антитело, например, IgG или scFv, направленное на ингибирующий рецептор, экспрессируемый на поверхности Т-клетки или NK-клетки, где по меньшей мере одно антитело против ткани-мишени при заболевании и/или антитело к ингибирующему рецептору Т-клетки маскируют. Примеры ингибирующих рецепторов включают, но не ограничиваются ими, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIM3 и экспрессируемые NK KIR. Примеры тканевого антигена, на который направлены Т-клетки при аутоиммунном заболевании, включают, но не ограничиваются ими, поверхностный антиген, экспрессируемый на миелине или нервными клетками при рассеянном склерозе, или поверхностный антиген, экспрессируемый на клетках панкреатических островков при диабете 1 типа. В этом варианте осуществления полиспецифическое активируемое антитело при локализации в ткани в случае аутоиммунной атаки или воспаления активируется и ко-активирует ингибирующий рецептор Т-клетки или NK-клетки для подавления активности аутореактивных Т-клеток, реагирующих на любые антигены в пораженной ткани, через их эндогенные TCR или активирующие рецепторы. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одно или совокупность антител маскируют для предотвращения подавления Т-клеточного ответа в не пораженных тканях, где антиген-мишень также может экспрессироваться.

В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку полиспецифическое активируемое антитело включает scFv против CD3 эпсилон (CD3ε, также обозначаемой в настоящем описании как CD3ε и CD3) и антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере один из scFv против CD3ε и/или антитела против клетки-мишени или его антигенсвязывающего участка маскируют. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CD3ε. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CD3ε, и антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью.

В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетку полиспецифическое активируемое



В некоторых вариантах осуществления активизирующее Т-клетку полиспецифическое активируемое антитело включает scFv против CTLA-4, где по меньшей мере одно из антител против клетки-мишени или его антигенсвязывающего фрагмента и/или scFv против CTLA-4 маскируют. В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с CTLA-4, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с CTLA-4, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CTLA-4, и антитело против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью.

- 60 -

зывается с CTLA-4, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG против клетки-мишени или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который связывается с CTLA-4, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться с CTLA-4, и антитело против клетки-мишени IgG или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2), таким образом, что присоединение MM2 снижает способность AB2 связываться со второй мишенью.

В некоторых вариантах осуществления антитела против множественных антигенов и/или активируемые антитела против множественных антигенов включают по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первой мишенью и/или первым эпитопом, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со второй мишенью и/или вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антитела против множественных антигенов и/или активируемые антитела против множественных антигенов связывают две или более различные мишени. В некоторых вариантах осуществления антитела против множественных антигенов и/или активируемые антитела против множественных антигенов связывают два или более различных эпитопа на одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления антитела против множественных антигенов и/или активируемые антитела против множественных антигенов связывает комбинацию двух или более различных мишеней и двух или более различных эпитопов на одной и той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, содержащее IgG, содержит маскированные вариабельные домены IgG. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, содержащее scFv, содержит маскированные scFv-домены. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит вариабельные домены IgG и scFv-домены, где по меньшей мере один из вариабельных доменов IgG связан с маскирующей группой. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит вариабельные домены IgG и scFv-домены, где по меньшей мере один из scFv-доменов связан с маскирующей группой. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит вариабельные домены IgG и scFv-домены, где по меньшей мере один из вариабельных доменов IgG связан с маскирующей группой, и по меньшей мере один из scFv-доменов связан с маскирующей группой. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит вариабельные домены IgG и scFv-домены, где каждый из вариабельных доменов IgG и scFv-доменов связан со своей маскирующей группой. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью к антигену-мишени, а другой домен антитела обладает специфичностью к Т-клеточному поверхностному антигену. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью к антигену-мишени, а другой домен антитела обладает специфичностью к другому антигену-мишени. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью к эпитопу антигена-мишени, а другой домен антитела обладает специфичностью к другому эпитопу антигена-мишени.

В полиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с карбоксильным концом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с карбоксильным концом легкой цепи активируемого антитела IgG или с карбоксильным концом как тяжелых, так и легких цепей активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с аминоконцом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с аминоконцом легкой цепи активируемого антитела IgG или с аминоконцом как тяжелых, так и легких цепей активируемого антитела IgG. В полиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с любой комбинацией одного или более карбоксильных концов и одного или более аминоконцов активируемого антитела IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с субстратом CM1-CM2, присоединена и маскирует антигенсвязывающий домен IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с субстратом CM1-CM2, присоединена и маскирует антигенсвязывающий домен, по меньшей мере один scFv. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с субстратом CM1-CM2, присоединена и маскирует антигенсвязывающий домен IgG, и маскирующая группа (MM), связанная с субстратом CM1-CM2, присоединена и маскирует антигенсвязывающий домен по меньшей мере одного scFv.

Изобретение раскрывает примеры структур полиспецифического активируемого антитела, которые включают, но не ограничиваются ими, следующие ниже: (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-

субстрат CM1-CM2-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>:(MM-L1-субстрат CM1-CM2-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; или (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-субстрат CM1-CM2-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>, где VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепи первой специфичности, содержащиеся в IgG; VL\* и VH\* представляют собой переменные домены второй специфичности, содержащиеся в scFv; L1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующую группу (MM) и субстрат CM1-CM2; L2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий субстрат CM1-CM2 и антитело; L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные домены scFv; L4 представляет собой линкерный пептид, соединяющий антитело 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 направлены на любой антиген или эпитоп.

В некоторых вариантах осуществления активирующего Т-клетку полиспецифического активируемого антитела один антиген представляет собой, как правило, антиген, присутствующий на поверхности опухолевой клетки или другом типе клеток, связанном с заболеванием, такой как, но, не ограничиваясь ими, любая мишень, приведенная в табл. 1, такой как, но, не ограничиваясь ими, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 или CD71 (рецептор трансферрина), а другой антиген представляет собой, как правило, стимулирующий (также обозначаемый в настоящем описании как активирующий) или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, естественной киллерной (NK) клетки, миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой эффекторной клетки иммунной системы, такой как, но, не ограничиваясь ими, 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, обеспечивающий специфичность к Т-клеточному поверхностному антигену, также можно заменять лигандом или доменом лиганда, который связывается с Т-клеточным рецептором, NK-клеточным рецептором, рецептором макрофага и/или другим рецептором эффекторной клетки иммунной системы, таким как, но, не ограничиваясь ими, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 или TNFSF9. В некоторых вариантах осуществления активируемого антитела против множественных антигенов один антиген выбран из группы мишеней, приведенных в табл. 1, а другой антиген выбран из группы мишеней, приведенных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой антитело против EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой C225v5, которое является специфическим в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой C225, которое является специфическим в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой C225v4, которое является специфическим в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой C225v6, которое является специфическим в отношении связывания с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой антитело против Jagged. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой 4D11, которое является специфическим в отношении связывания с Jagged 1 и Jagged 2 человека и мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени представляет собой 4D11v2, которое является специфическим в отношении связывания с Jagged 1 и Jagged 2 человека и мыши.

В некоторых вариантах осуществления антитело против клетки-мишени может находиться в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv(s) может находиться в форме Pro-scFv (см., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим в отношении связывания с CD3ε и представляет собой, или его получают из антитела или его фрагмента, который связывается с CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1 или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим в отношении связывания с CTLA-4 (также обозначаемом в настоящем описании как CTLA и CTLA4).

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

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFG
GGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQGTGGGVVQGRSLRLSCAASGSTFFSSYAM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT
NSLYWYFDLWGRGTLTVTSSAS (SEQ ID NO: 347).
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 347.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит аминокислотную последовательность

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHW
VKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY
DDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKEKVTMTCSASSSVS
YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPANFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNP
FTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 349).
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 349.

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

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело также содержит средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое 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 конъюгировано с полиспецифическим активируемым антителом через линкер. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с АВ через линкер, который содержит по меньшей мере один последовательность субстрата CM1-CM2. 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 интеркалятор ДНК, 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, приведенной в табл. 4. 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 калихимицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело также содержит детектируемую группу. В некоторых вариантах осуществления детектируемая группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело естественным образом содержит одну или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления поли-



специфическое активируемое антитело можно конструировать так, чтобы оно содержало одну или более дисульфидных связей.

Изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полиспецифическое активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, а также к векторам, которые содержат такие выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Изобретение относится к способам получения полиспецифического активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

Изобретение также относится к способу производства полиспецифических активируемых антител по изобретению (а) культивированием клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей полиспецифическое активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии полиспецифического активируемого антитела, и (b) выделением полиспецифического активируемого антитела.

Изобретение также относится к полиспецифическим активируемым антителам и/или композиции полиспецифических активируемых антител, которая содержит по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается с первой мишенью или первым эпитопом, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который связывается со второй мишенью или вторым эпитопом, где по меньшей мере AB1 является связанным или иным образом присоединенным к маскирующей группе (MM1), таким образом, что присоединение MM1 снижает способность AB1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления MM1 присоединен к AB1 через субстрат CM1-CM2 для MMP и SP, где по меньшей мере одна из MMP и SP локализована с мишенью AB1 в участке лечения или участке диагностики у индивидуума. Полиспецифические активируемые антитела, предоставленные в настоящем описании, являются стабильными в циркулирующей крови, активируемыми в предназначенных участках терапии и/или диагностики, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани, и при активации характеризуются связыванием с мишенью AB1, которое является по меньшей мере сравнимым с соответствующим, немодифицированным полиспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит сшивающий пептид между MM1 и субстратом CM1-CM2.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит сшивающий пептид между субстратом CM1-CM2 и AB1.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый сшивающий пептид (LP1) и второй сшивающий пептид (LP2), и по меньшей мере участок полиспецифического активируемого антитела имеет структурную организацию от N-конца к C-концу, как указано ниже в нерасщепленном состоянии: MM1-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-AB1 или AB1-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-MM1. В некоторых вариантах осуществления два сшивающих пептида необязательно должны быть идентичными друг другу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 382), 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 GGSG (SEQ ID NO: 383), GSGGG (SEQ ID NO: 384), GSGSG (SEQ ID NO: 385), GSGGG (SEQ ID NO: 386), GGGSG (SEQ ID NO: 387) и GSSSG (SEQ ID NO: 388).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый сшивающий пептид (LP1), второй сшивающий пептид (LP2) и сшивающий пептид (LP') между CM1 и CM2, и по меньшей мере участок полиспецифического активируемого антитела имеет структурную организацию от N-конца к C-концу, как указано ниже в нерасщепленном состоянии: MM1-LP1-субстрат CM1-CM2-LP2-AB1 или AB1-LP2-субстрат CM1-CM2-LP1-MM1. В некоторых вариантах осуществления сшивающие пептиды необязательно должны быть идентичными друг другу.

В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления LP' представляет собой GSGGS (SEQ ID NO: 350).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), который специфически связывается с первой мишенью или первым эпитопом, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), который специфически связывается со второй мишенью или вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления каждый из AB в полиспецифическом активируемом антителе независимо выбран из группы, состоящей из моноклонального антитела, доменного антитела, одиночной цепи, фрагмента Fab, фрагмента F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела с тяжелой цепью и однодоменного антитела с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления каждый из AB в полиспецифи-

ческом активируемом антителе представляет собой моноклональное антитело грызуна (например, мыши или крысы), химерное, гуманизированное или полностью принадлежащее человеку моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации каждого из АВ в полиспецифическом активируемом антителе составляет приблизительно 100 нМ или менее для связывания с его соответствующей мишенью или эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 имеет константу диссоциации для связывания с соответствующим ему АВ, которая является больше чем константа диссоциации АВ к его соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 имеет константу диссоциации для связывания с соответствующим ему АВ, которая не является больше чем константа диссоциации АВ к его соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 не препятствует или не конкурирует со своим соответствующим АВ за связывание с соответствующей мишенью или эпитопом, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 представляет собой полипептид длиной приблизительно от 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый из ММ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит полипептидную последовательность, которая отличается от полипептидной последовательности мишени соответствующего АВ.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ1 снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере в 20 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ1 снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 40 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ1 снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере в 100 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ1 снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 1000 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ1 снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 10000 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не связан с ММ1, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления ММ1 представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из ММ, описываемой в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит по меньшей мере вторую маскирующую группу (ММ2), которая ингибирует связывание АВ2 с его мишенью, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, и дополнительную расщепляемую группу (СМ'), присоединенную к АВ2, где СМ' представляет собой субстрат СМ1-СМ2 или полипептид, который функционирует как субстрат для второй протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ' представляет собой полипептид длиной не более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ' представляет собой субстрат СМ1-СМ2, где длина каждого из СМ1 и СМ2 в субстрате СМ1-СМ2 независимо является не более 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления MMP протеаза, SP протеаза и/или вторая протеаза колокализирована со второй мишенью или эпитопом в ткани, и где MMP протеаза, SP протеаза и/или вторая протеаза расщепляет СМ' в полиспецифическом активируемом антителе, когда полиспецифическое активируемое антитело подвергается действию MMP протеазы, SP протеазы и/или второй протеазы. В некоторых вариантах осуществления MMP протеаза, SP протеаза и/или вторая протеаза колокализирована с первой мишенью или эпитопом и второй мишенью или эпитопом в ткани. В некоторых вариантах осуществления MMP протеаза, SP протеаза и/или вторая протеаза представляют собой одну и ту же MMP протеазу и одну и ту же SP протеазу. В некоторых вариантах осуществления MMP протеаза, SP протеаза и/или вторая протеаза не являются одной и той же MMP протеазой и не являются одной и той же SP протеазой. В некоторых вариантах осуществления субстрат СМ1-СМ2 и СМ' представляют собой различные субстраты для одной и той же MMP протеазы и одной и той же SP протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет СМ', выбрана из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл. 6.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе, например, ММ1 и по меньшей мере ММ2, имеет константу диссоциации связывания со своим соответствующим АВ, которая является больше чем константа диссоциации АВ для связывания со своей соответствующей мишенью или эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе имеет константу диссоциации связывания со своим соответствующим АВ, которая не является больше чем константа диссоциации АВ для его соответствующей мишени или эпитопа.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе не препятствует или не конкурирует со своим соответствующим АВ за связывание с соответствующей мишенью или эпитопом, когда полиспецифическое активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид приблизительно длиной от 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе содержит полипептидную последовательность, которая отличается от полипептидной последовательности мишени соответствующего АВ.

В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ. В некоторых вариантах осуществления каждая из ММ в полиспецифическом активируемом антителе содержит полипептидную последовательность, которая является не более чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию соответствующего АВ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение каждой из ММ снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 20 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение каждой из ММ снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 40 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение каждой из ММ снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 100 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение каждой из ММ снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу является по меньшей мере 1000 раз больше чем  $K_d$  АВ, когда он не присоединен к ММ по отношению к своей соответствующей мишени или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления присоединение каждой из ММ снижает способность соответствующего АВ связываться со своей мишенью или эпитопом, таким образом, что константа диссоциации ( $K_d$ ) АВ, когда он присоединен к ММ, по отношению к своей соответствующей мишени или эпи-



своей мишенью.

В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 располагают в полиспецифическом активируемом антителе, таким образом, что в нерасщепленном состоянии, связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ уменьшается с константой диссоциации, которая является по меньшей мере в 100 раз больше чем константа диссоциации связывания немодифицированного АВ со своей мишенью, и при этом в расщепленном состоянии АВ связывается со своей мишенью.

В некоторых вариантах осуществления каждый субстрат CM1-CM2 располагают в полиспецифическом активируемом антителе, таким образом, что в нерасщепленном состоянии, связывание полиспецифического активируемого антитела с мишенью одной из областей АВ уменьшается с константой диссоциации, которая является по меньшей мере в 200 раз больше чем константа диссоциации связывания немодифицированного АВ со своей мишенью, и при этом в расщепленном состоянии АВ связывается со своей мишенью.

Изобретение также относится к композициям и способам, которые включают полиспецифическое активируемое антитело, которое содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (AB1), который специфически связывается с мишенью, и второе антитело или фрагмент антитела (AB2), где по меньшей мере первый АВ в полиспецифическом активируемом антителе присоединен к маскирующей группе (MM1), которая снижает способность АВ1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления каждый АВ присоединен к MM, которая снижает способность соответствующего ей АВ связываться с каждой мишенью. Например, в вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 присоединяют к первой маскирующей группе (MM1), которая снижает способность АВ1 связываться со своей мишенью, и АВ2 присоединяют ко второй маскирующей группе (MM2), которая снижает способность АВ2 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в таких вариантах осуществления АВ1 присоединяют к первой маскирующей группе (MM1), которая снижает способность АВ1 связываться со своей мишенью, АВ2 присоединяют ко второй маскирующей группе (MM2), которая снижает способность АВ2 связываться со своей мишенью, АВ3 присоединяют к третьей маскирующей группе (MM3), которая снижает способность АВ3 связываться со своей мишенью, и т.д. для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело дополнительно содержит по меньшей мере один субстрат CM1-CM2, который является субстратом MMP протеазы и SP протеазы, где субстрат CM1-CM2 связывает MM с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит по меньшей мере первое антитело или фрагмент антитела (AB1), который специфически связывается с мишенью, и второе антитело или фрагмент антитела (AB2), где по меньшей мере первый АВ в полиспецифическом активируемом антителе присоединен через первый субстрат CM1-CM2 к маскирующей группе (MM1), которая снижает способность АВ1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 присоединяют через первый субстрат CM1-CM2 к MM1, и АВ2 присоединяют через второй субстрат CM1-CM2 ко второй маскирующей группе (MM2), которая снижает способность АВ2 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления АВ1 присоединяют через первый субстрат CM1-CM2 к MM1, АВ2 присоединяют через второй субстрат CM1-CM2 к MM2, и АВ3 присоединяют через третий субстрат CM1-CM2 к третьей маскирующей группе (MM3), которая снижает способность АВ3 связываться со своей мишенью, и т.д. для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе.

Активируемые антитела, содержащие несвязывающие стерические группы или партнеров по связыванию для несвязывающих групп

Изобретение также относится к активируемым антителам, которые содержат несвязывающие стерические группы (NB) или партнеры по связыванию (BP) для несвязывающих стерических групп, где BP рекрутирует или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. Активируемые антитела, предоставленные в настоящем описании, включают, например, активируемое антитело, которое содержит несвязывающую стерическую группу (NB), субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), который связывается с мишенью; активируемое антитело, которое содержит партнер по связыванию для несвязывающей стерической группы (BP), субстрат CM1-CM2 и АВ; и активируемое антитело, которое содержит BP, который рекрутирует NB, субстрат CM1-CM2 и АВ, который связывается с мишенью. Активируемые антитела, в которых NB является ковалентно связанной с субстратом CM1-CM2 и АВ активируемого антитела или является связанной в результате взаимодействия с BP, который является ковалентно связанным с субстратом CM1-CM2 и АВ активируемого антитела, обозначают в настоящем описании как "содержащие NB активируемые антитела". Под активируемым или переключаемым подразумевают, что активируемое антитело характеризуется первым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, экранированном или нерасщепленном состоянии (т.е. в первой конформации), и вторым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело нахо-

дится в неингибированном, неэкранированном и/или нерасщепленном состоянии (т.е. во второй конформации, т.е. активированное антитело), где второй уровень связывания с мишенью является больше чем первый уровень связывания с мишенью. Композиции активируемых антител могут характеризоваться повышенной биодоступностью и более благоприятным биораспределением по сравнению с общепринятыми терапевтическими средствами на основе антитела.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают пониженную токсичность и/или пониженные неблагоприятные побочные эффекты, которые могут иным образом возникать в результате связывания в участках, не относящихся к участкам лечения и/или участкам диагностики, если АВ не подвергали маскировке или иным образом не ингибировали связывание с таким участком

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело содержит несвязывающую стерическую группу (NB); субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), который специфически связывается с мишенью, где NB представляет собой полипептид, который специфически не соизывается с АВ; субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью; и NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Как используют в настоящем описании и на всем протяжении, термин полипептид относится к любому полипептиду, который содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, включая большие полипептиды, полноразмерные белки и их фрагменты, и термин полипептид не является ограниченным одноцепочечными полипептидами и может включать состоящие из многих звеньев, например, многоцепочечные, полипептиды. В случае, когда полипептид имеет меньшую длину, например, в целом менее 50 аминокислот, термины пептид и полипептид в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и в случае, когда полипептид имеет большую длину, например, 50 аминокислот или больше, термины полипептид и белок в настоящем описании используют взаимозаменяемо.

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело содержит несвязывающую стерическую группу (NB); субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), которое специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид который не связывается специфически с АВ; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид длиной до 50 аминокислот, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью, и (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Например, каждая из последовательности субстрата CM1 и последовательности субстрата CM2 в субстрате CM1-CM2 независимо имеет длину до 15 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело содержит несвязывающую стерическую группу (NB); субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), который специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид, который не связывается специфически с АВ; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью; (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом, и (v) активируемое антитело имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже в нерасщепленном состоянии: NB-субстрат CM1-CM2-AB или АВ-субстрат CM1-CM2-NB.

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело содержит несвязывающую стерическую группу (NB); субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), который специфически связывается с мишенью, где (i) NB содержит полипептид, который не связывается специфически с АВ; (ii) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (iii) субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью, и где NB в нерасщепленном активируемом антителе снижает способность АВ связываться с мишенью по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 100% по сравнению со способностью расщепленного АВ связываться с мишенью, и (iv) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. Снижение способности АВ связываться с мишенью определяют, например, с использованием анализа, как описано в настоящем описании или анализа вытеснения мишени *in vitro*, такого как, например, анализ, описанный в публикациях PCT № WO 2009/025846 и WO 2010/081173.

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело содержит партнер по связыванию (BP) для несвязывающей стерической группы (NB); субстрат CM1-CM2 и антитело или фрагмент антитела (AB), который специфически связывается с мишенью, где BP представляет собой полипептид, который связывается с NB, когда подвергается ее воздействию; NB не связывается специфически с АВ; субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; субстрат

CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии в присутствии NB NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью, и ВР не препятствует связыванию АВ с мишенью; и NB и ВР не ингибируют расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом. В некоторых примерах этого варианта осуществления ВР активируемого антитела необязательно связывается с NB. В одном из вариантов осуществления NB рекрутируется ВР активируемого антитела *in vivo*.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело формулируют в виде композиции. В некоторых из этих вариантов осуществления композиция также содержит NB, где NB формулируют совместно с активируемым антителом, которое содержит ВР, субстрат CM1-CM2 и АВ. В некоторых примерах этого варианта осуществления ВР выбран из группы, состоящей из связывающего альбумин пептида, связывающего фибриноген пептида, связывающего фибронектин пептида, связывающего гемоглобин пептида, связывающего трансферрин пептида, связывающего домен иммуноглобулина пептида и других связывающих сывороточных белки пептидов.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела NB представляет собой растворимый глобулярный белок. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела NB представляет собой белок, который циркулирует в кровотоке. В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела NB выбрана из группы, состоящей из альбумина, фибриногена, фибронектина, гемоглобина, трансферрина, домена иммуноглобулина и других сывороточных белков.

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

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже, в нерасщепленном состоянии: NB-субстрат CM1-CM2-AB, АВ-субстрат CM1-CM2-NB, ВР-субстрат CM1-CM2-AB или АВ-субстрат CM1-CM2-ВР. В вариантах осуществления где активируемое антитело содержит ВР, и активируемое антитело в присутствии соответствующей NB, активируемое антитело имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже, в нерасщепленном состоянии: NB:ВР-CM1-CM2-AB, NB:ВР-CM2-CM1-AB, АВ-CM1-CM2-ВР:NB или АВ-CM2-CM1-ВР:NB, где ":" представляет собой взаимодействие, например связь между NB и ВР.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с данной мишенью и представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одиночную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scab, dAb, однодоменное антитело с тяжелой цепью или однодоменное антитело с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его иммунологически активный фрагмент, который связывается с мишенью, представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью принадлежащее человеку моноклональное антитело.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело содержит комбинацию вариативной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в настоящем описании, и вариативную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию вариативной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности, представленной в настоящем описании, и вариативную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности, представленной в настоящем описании.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемое антитело также содержит средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство

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

- 71 -



вируемого антитела составляет по меньшей мере 10 ч при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления время полувыведения из сыворотки активируемого антитела составляет по меньшей мере 8 ч при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления время полувыведения из сыворотки активируемого антитела составляет по меньшей мере 6 ч при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления время полувыведения из сыворотки активируемого антитела составляет по меньшей мере 4 ч при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления время полувыведения из сыворотки активируемого антитела составляет по меньшей мере 3 ч при введении в организм.

Изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей любое из этих активируемых антител, а также векторы, которые содержат такие выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Изобретение относится к способам получения активируемого антитела культивированием клеток в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит такую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

Константа диссоциации ( $K_d$ ) содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени является больше чем  $K_d$  АВ по отношению к мишени, когда он не является связанным с NB или NB:BP. Константа диссоциации ( $K_d$ ) содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени является больше чем  $K_d$  исходного АВ по отношению к мишени. Например,  $K_d$  содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени, которая является по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1,000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз больше, чем  $K_d$  АВ, когда он не является связанным с NB или NB:BP, или  $K_d$  исходного АВ по отношению к мишени. В противоположность этому, аффинность связывания содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени является ниже аффинность связывания АВ, когда он не является связанным с NB или NB:BP или ниже, чем аффинность связывания исходного АВ по отношению к мишени. Например, аффинность связывания содержащего NB активируемого антитела по отношению к мишени, которая является по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или в диапазоне 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1,000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или 100000-10000000 раз ниже чем аффинность связывания АВ, когда он не является связанным с NB или NB:BP, или ниже чем аффинность связывания исходного АВ по отношению к мишени.

Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, когда он не является связанным с NB или NB:BP. Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не связанным с NB или NB:BP, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность содержащего NB активируемого антитела связываться с мишенью снижается, например, по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 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 больше при измерении *in vitro* и/или *in vivo*.

Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего средства (например, протеазы или другого фермента), специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, когда он не является связанным с NB или NB:BP. Когда содержащее NB активируемое антитело находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего средства (например, протеазы, другого фермента, восстанавливающего средства или света), специфическое связывание АВ с мишенью снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не связанным с NB или NB:BP, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность содержащего NB активируемого антитела связываться с мишенью снижается, например, по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 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 больше при измерении *in vitro* и/или *in vivo*.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела, активируемое антитело содержит средство, конъюгированное с АВ, с получением конъюгата активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела средство представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой диагностическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой детектируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела средство

представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела средство представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела средство конъюгировано с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления конъюгата активируемого антитела линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с АВ через 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 интеркалятор ДНК, или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, приведенной в табл. 3. 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 калихимин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых примерах любого из этих вариантов осуществления активируемого антитела активируемые антитела представляют собой связывающиеся с двойной мишенью активируемые антитела. Такие связывающиеся с двойной мишенью активируемые антитела содержат два Ab, которые могут связываться с одинаковыми или различными мишенями. В конкретных вариантах осуществления активируемые антитела против двух мишеней содержат биспецифические антитела или фрагменты антител.

Связывающиеся с двойной мишенью активируемые антитела конструируют таким образом, чтобы они содержали субстрат CM1-CM2, расщепляемый расщепляющим средством, которое локализовано в ткани-мишени с одной или обоими мишенями, способными связываться с АВ активируемых антител. Связывающиеся с двойной мишенью активируемые антитела с более чем одним АВ к одинаковым или разным мишеням можно конструировать таким образом, чтобы они содержали более чем один субстрат CM1-CM2, где первый субстрат CM1-CM2 расщепляется расщепляющим средством в первой ткани-мишени, и где второй субстрат CM1-CM2 расщепляется расщепляющим средством во второй ткани-мишени, с одной или более мишеней, связывающихся с АВ активируемых антител. В одном из вариантов осуществления первая и вторая ткани-мишени разделены в пространстве, например, находятся в различных участках в организме. В одном из вариантов осуществления первая и вторая ткани-мишени представляют собой одну и ту же ткань в различные моменты времени, например одну и ту же ткань в две различные временные точки, например первый момент времени приходится на момент, когда ткань представляет собой опухоль на ранней стадии, и второй момент времени приходится на момент, когда ткань представляет собой опухоль на поздней стадии.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим активируемые антитела, описываемые в настоящем описании. Изобретение также относится к векторам, которые содержат эти нуклеиновые кислоты. Активируемые антитела, описываемые в настоящем описании, получают культивированием клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит такие молекулы нуклеиновой кислоты или векторы.

Изобретение также относится к способам производства активируемых антител. В одном из вариантов осуществления способ включает этапы (а) культивирования клетки, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит (i) несвязывающую стерическую группу (NB); (ii) субстрат CM1-CM2 и (iii) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с мишенью, где (1) NB не связывается специфически с АВ; (2) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (3) субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщепленном состоянии NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью, и (4) NB не ингибирует расщепление субстрата CM1-CM2 ферментом, и (б) выделения активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления способ включает этапы (а) культивирования клетки, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей активируемое антитело, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит (i) партнер по связыванию (BP) для несвязывающей стерической группы (NB); (ii) субстрат CM1-CM2 и (iii) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с мишенью, где (1) NB не связывается специфически с АВ; (2) субстрат CM1-CM2 представляет собой полипептид, который содержит субстрат (S) для фермента; (3) субстрат CM1-CM2 располагают таким образом, что в нерасщеп-

ленном состоянии в присутствии NB NB препятствует связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном состоянии NB не препятствует связыванию АВ с мишенью, и ВР не препятствует связыванию АВ с мишенью, и (4) NB и ВР не ингибируют расщепление субстрата СМ1-СМ2 ферментом, и (b) выделения активируемого антитела. В некоторых примерах этого варианта осуществления ВР активируемого антитела связывается с NB.

Использование активируемых антител и конъюгированных активируемых антител.

Следует понимать, что введение терапевтических соединений по изобретению будут проводить с подходящими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые вводят в составы для обеспечения улучшенной транспортировки, доставки, переносимости и т.п. Целый ряд подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности глава 87 авторов Blaug, Seymour в нем. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии "карбовакс" (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из указанных выше смесей может являться подходящей для лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и переносимым с использованием определенного пути введения. Также см. Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals", Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts", J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311 (1998) и цитирования для дополнительной информации, относящейся к составам, эксципиентам и носителям, хорошо известным фармацевтическим химикам.

Терапевтические составы по изобретению, которые содержат конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для профилактики, лечения или иным образом улучшения состояния заболевания или нарушения, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические составы по изобретению, которые содержат конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для лечения или иным образом улучшения состояния воспаления, воспалительного нарушения, аутоиммунного заболевания и/или злокачественной опухоли или другого неопластического состояния. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, при котором экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, при которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, при котором экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на паренхиме (например, в злокачественной опухоли, части органа или ткани, которая часто выполняет функцию(и) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на клетке, ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на строме (т.е. соединительной поддерживающей структуре клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на эндотелии (сосудистой системе). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется на злокачественной стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления средство, с которым активируемое антитело конъюгировано, представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство, с которым активируемое антитело конъюгировано, представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство.

Эффективность профилактики, улучшения состояния или лечения определяют в сочетании с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, такой как, например, aberrантная экспрессия и/или активность мишени. Увеличение продолжительности жизни индивидуума или иным образом замедление прогрессирования заболевания или нарушения, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, например aberrантной экспрессией и/или активностью мишени, у индивидуума свидетельствует о том, что конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело обеспечивает клиническое преимущество.

Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и рассматриваемые факторы, связанные с получением таких композиций, а также руководство в выборе компонентов предоставлены, например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Ad-

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

В некоторых вариантах осуществления, где используют фрагменты антител, выбирают наименьший фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом белка-мишени. Например, в зависимости от последовательностей вариабельной области антитела можно конструировать молекулы пептидов, которые сохраняют способность связывать последовательность белка-мишени. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать технологией рекомбинантных ДНК. (См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Состав также может содержать более одного активного соединения по мере необходимости для конкретного показания, подлежащего лечению, например, в некоторых вариантах осуществления активные соединения с дополняющими видами активности, которые не оказывают неблагоприятного действия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления или дополнительно композиция может содержать средство, которое повышает его функцию, такое как, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемых целей.

Активные ингредиенты также можно заключать в микрокапсулы, получаемые, например, способами коацервации или интерфазной полимеризацией, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы из альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в микроэмульсии.

Составы, используемые для введения *in vivo*, должны являться стерильными. Это легко достигается фильтрованием через стерильные фильтрационные мембраны.

Можно получать препараты с длительным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с длительным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, матрицы которого находятся в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с длительным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутаминат, неразрушаемый этиленвинилацетат, разрушаемые сополимеры молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT™ (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочная кислота-гликолевая кислота и лейпролида ацетата), и поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота. Несмотря на то, что полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота обеспечивают высвобождение молекул в течение 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит детектируемую метку. Используют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab)<sub>2</sub>). Термин "меченый" касательно зонда или антитела предназначен включать прямое мечение зонда или антитела присоединением (т.е. физическим связыванием) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также не прямое мечение зонда или антитела путем взаимодействия с другим реагентом, который является непосредственно меченым. Примеры непрямого мечения включают детекцию первичного антитела с использованием флуоресцентно-меченого вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда биотином, таким образом, что его можно детектировать флуоресцентно-меченым стрептавидином. Термин "биологический образец" предназначен включать ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные от индивидуума, а также ткани, клетки и жидкости, содержащиеся у индивидуума. Таким образом, в рамках использования термина "биологический образец" представляет собой кровь и фракцию или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Таким образом, способ детекции по изобретению можно использовать для детекции анализируемой иРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, техники *in vitro* детекции анализируемой иРНК включают виды нозерн-гибридизации и виды гибридизации *in situ*. Техники *in vitro* детекции анализируемого белка включают виды твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), вестерн-блоттинги, иммунопреципитации, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Техники *in vitro* детекции анализируемой геномной ДНК включают виды саузерн-гибридизации. Способы проведения иммунологических анализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, техники *in vivo* детекции анализируемого белка включают введение индивидууму меченого антитела против анализируемого белка. Например, антитело можно метить радиоактивным маркером, присутствием и локализацию которого у индивидуума можно детектировать стандартными методами визуализации.

Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению также являются пригодными в ряде составов для диагностики и профилактики. В

одном из вариантов осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят пациентам, которые подвергаются риску развития одного или более указанных выше нарушений. Предрасположенность пациента или органа к одному или более указанных выше нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят являющимся людьми индивидуумам, у которых диагностировали клинического показания, связанного с одним или более указанных выше нарушений. При диагностике конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для ослабления или для того, чтобы способствовать регрессии эффектов клинического показания.

Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению также является пригодным для детекции мишени в образцах пациента и, таким образом, является пригодным в качестве диагностического средства. Например, антитела и/или активируемые антитела и их конъюгированные варианты по изобретению используют в анализах *in vitro*, например, ELISA, для детекции уровней мишени в образце пациента.

В одном из вариантов осуществления конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению иммобилизуют на твердой подложке (например, лунке(ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может содержаться в тестируемом образце. Перед приведением в контакт иммобилизованного антитела с образцом пациента твердую подложку ополаскивают и обрабатывают блокирующим средством, таким как молочный белок или альбумин для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, в котором, как подозревают, содержится антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от индивидуума, у которого подозревают уровни циркуляции антигена, которые считают диагностическими для патологии. После ополаскивания тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое является детектируемым меченым. Меченое второе антитело служит в качестве детектируемого антитела. Уровень детектируемой метки измеряют и определяют концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце сравнением со стандартной кривой, построенной на основании стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, получаемых с использованием антител по изобретению и их конъюгированных вариантов в диагностическом анализе *in vitro*, можно устанавливать стадию заболевания у индивидуума на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови получают от индивидуумов, у которых диагностировали различные стадии прогрессирования заболеваний и/или в различные временные точки терапевтического лечения заболевания. С использованием совокупности образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, обозначают диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристическим для каждой стадии.

Конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело также можно 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, содержащие ферментативно расщепляемый субстрат CM1-CM2, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять субстрат CM1-CM2. Такие активируемые антитела можно использовать в видах диагностики, которые могут включать детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) активности фермента (или в некоторых вариантах осуществления среду повышенного восстановительного потенциала, такую как среда которую, можно предоставлять для восстановления дисульфидной связи) путем измерения накопления активированных антител (т.е. антител, образуемых 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 повышенным восстановительным потенциалом в зависимости от природы субстрата CM1-CM2), а также то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, субстрат CM1-CM2 можно выбирать так, чтобы он являлся субстратом для матриксной металлопротеазы (ММР) и сериновой протеазы (SP), встречающихся в месте локализации опухоли, в месте локализации вирусной или бактериальной инфекции на биологически ограниченном участке (например, такой как при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может представлять собой АВ, который связывается с антигеном-мишенью. Способами, как описано в настоящем описании, или при необходимости способами, хорошо известными специалисту в данной области, детектируемую метку (например, флуо-

ресцентную метку или радиоактивную метку или радиофармацевтическое средство) можно конъюгировать с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Подходящие детектируемые метки описаны в отношении указанных выше способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры приведены ниже. С использованием АВ, специфического к белку или пептиду, характерному для состояния болезни, наряду с ММР, активность которой повышается в представляющей интерес пораженной ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной тканью относительно тканей, где специфический к субстрату CM1-CM2 фермент не содержится на детектируемом уровне или содержится на более низком уровне, чем в пораженной ткани или является неактивным (например, находится в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Вследствие того, что небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, и вследствие того, что фермент, специфический к субстрату CM1-CM2, не содержится на детектируемом уровне (или содержится на более низких уровнях в непораженных тканях или содержится в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной ткани является повышенным относительно непораженных тканей.

В другом примере активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат субстрат CM1-CM2, подверженный расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат субстрат CM1-CM2, подверженный расщеплению восстановителем, активируемые антитела можно использовать для детекции (качественно или количественно) присутствия восстановительных условий в образце. Для облегчения анализа в таких способах активируемые антитела можно детектируемо метить и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Детектируемую метку можно располагать на участке активируемого антитела, который не высвобождается после расщепления, например, детектируемую метку может представлять собой флуоресцентную метку с гасителем или другую метку, которая не является детектируемой до тех пор, пока не происходит расщепление. Анализ можно проводить, например, приведением в контакт иммобилизованных, детектируемо меченных активируемых антител с образцом, который, как подозревают, содержит фермент и/или восстановитель в течение периода времени, достаточного для того, чтобы происходило расщепление, затем промыванием для удаления избытка образца и загрязнителей. Затем оценивают присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстановителя) в образце по изменению детектируемого сигнала активируемых антител до приведения в контакт с образцом, например, присутствие и/или повышение детектируемого сигнала вследствие расщепления активируемого антитела расщепляющим средством в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать также для обеспечения детекции присутствия или отсутствия мишени, которая способная связываться с 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 детектируемой метки активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать по детекции комплекса мишень-АВ, например, с использованием детектируемо меченого антитела к мишени.

Активируемые антитела также являются пригодными при визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, в результате расщепления протеазой, и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, который обеспечивает возможность локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как культуры клеток или тканевые срезы. С использованием этого способа можно подтверждать связывание с данной мишенью и протеолитическую активность на основании присутствия детектируемой метки (например, флуоресцентной метки).

Эти техники являются пригодными для любых замороженных клеток или тканей, получаемых из места локализации заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти техники также являются пригодными для свежих образцов клеток или тканей.

В этих техниках активируемое антитело метят детектируемой меткой. Детектируемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель, (например, флуорофор, Флуоресцеинизотиоцианат (FITC), родамин изотиоцианат (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель в ближайшем инфракрасном диапазоне (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и реагент амплификации, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу).

Детекция метки в образце, который инкубировали с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит матриксную металлопротеазу (ММР) и одну сериновую протеазу (SP), которые являются специфическими к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие ММР можно подтверждать с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как ингибиторы протеаз, описываемые в настоящем описании, и/или

с использованием средства, которое является специфическим для протеазы, например, антитела, такого как A11, которое является специфическим к протеазе матриптазе (MT-SP1) и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; см., например, международную публикацию номер WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 года. Тот же подход использования широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как ингибиторы протеаз, описываемые в настоящем описании, и/или с использованием в большей степени селективно ингибирующего средства можно использовать для идентификации MMP и SP, специфических к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени можно подтверждать с использованием средства, которое является специфическим к мишени, например, другого антитела, или детектируемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченое активируемое антитело с детекцией посредством меченого вторичного антитела или более сложной системы детекции.

Аналогичные техники также являются пригодными для визуализации *in vivo*, где детекция флуоресцентного сигнала у индивидуума, например, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что участок заболевания содержит мишень и содержит MMP и SP, которая является специфической к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела.

Эти техники также являются пригодными в наборах и/или в качестве реагентов для детекции, идентификации или характеристики активности протеазы в различных клетках, тканях и организмах на основании специфического для протеазы субстрата CM1-CM2 в активируемом антителе.

Изобретение относится к способам использования антител и/или активируемых антител в ряде диагностических и/или профилактических показаний. Например, изобретение относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и представляющей интерес мишени у индивидуума или в образце (i) приведением индивидуума или образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (MM), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), который специфически связывается с представляющей интерес мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к C-концу, как указано ниже: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) где в нерасщепленном неактивированном состоянии MM препятствует специфическому связыванию AB с мишенью, и в расщепленном активированном состоянии MM не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание AB с мишенью; и (ii) измерением уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у индивидуума или в образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство, мишень или расщепляющее средство и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на AB. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Изобретение также относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у индивидуума или в образце (i) приведением индивидуума или образца в контакт с активируемым антителом в присутствии представляющей интерес мишени, например, мишень, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (MM), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (AB), который специфически связывается с представляющей интерес мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к C-концу, как указано ниже: MM-субстрат CM1-CM2-AB или AB-субстрат CM1-CM2-MM; (a) где MM представляет собой пептид, который ингибирует связывание AB с мишенью, и где MM не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию AB и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию AB; и (b) где в нерасщепленном неактивированном состоянии MM препятствует специфическому связыванию AB с мишенью, и в расщепленном активированном состоянии MM не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание AB с мишенью; и (ii) измерением уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в образце, и где недетектируемый уровень активированного акти-

вируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у индивидуума или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело, которое содержит маскирующую группу (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с представляющей интерес мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) где в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и (ii) измерение уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в образце и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у индивидуума или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Изобретение также относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у индивидуума или в образце (i) приведением индивидуума или образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим средством, антигенсвязывающий домен (АВ), который специфически связывается с мишенью, и детектируемая метка, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ; где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; где в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и где детектируемую метку располагают на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления субстрата СМ1-СМ2; и (ii) измерением уровня детектируемой метки у индивидуума или в образце, где детектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует на недостаточном уровне у индивидуума или в образце, и где недетектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.



Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело (например, активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство), описываемое в настоящем описании, для применения в приведении в контакт с индивидуумом или биологическим образцом и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированное активируемое антитело у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у индивидуума или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство, мишень или расщепляющее средство и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в биологическом образце, таким образом, что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце.

Изобретение также относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у индивидуума или в образце (i) приведением в контакт индивидуума или биологического образца с активируемым антителом в присутствии мишени и (ii) измерением уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует у индивидуума или в биологическом образце на недостаточном детектируемом уровне, таком что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к N-концу расщепляемой группы к участку расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления маскируют один антигенсвязывающий участок АВ. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка, маскируют по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не маскируют. В некоторых вариантах осуществления маскируют все антигенсвязывающие участки. В некоторых вариантах осуществления этап измерения включает использование вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, для применения в приведении индивидуума или биологического образца в контакт с активируемым антителом в присутствии мишени и измерения уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует у индивидуума или в биологическом образце на недостаточном детектируемом уровне, таким образом, что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется расщепляющим средством и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат СМ1-СМ2-АВ или АВ-субстрат СМ1-СМ2-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера

по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к N-концу расщепляемой группы к участку расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления маскируют один антигенсвязывающий участок АВ. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по изобретению содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих участка, по меньшей мере один антигенсвязывающий участок маскируют и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не маскируют. В некоторых вариантах осуществления маскируют все антигенсвязывающие участки. В некоторых вариантах осуществления этап измерения включает использование вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, для применения в приведения в контакт с индивидуумом или биологическим образцом и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированное активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит детектируемую метку, которую располагают на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в биологическом образце, таким образом, что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в биологическом образце на детектируемом уровне.

Изобретение относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у индивидуума или в образце (i) приведением в контакт индивидуума или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит детектируемую метку, которую располагают на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2, и (ii) измерением уровня активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство, мишень или расщепляющее средство и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в биологическом образце, таким образом, что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у индивидуума или в биологическом образце. Пониженный уровень детектируемой метки представляет собой, например, понижение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% и/или приблизительно на 100%. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат CM1-CM2-АВ или АВ-субстрат CM1-CM2-ММ; (a) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления детектируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с исполь-

зованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, для применения в приведении в контакт с индивидуумом или биологическим образцом и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство, мишень или расщепляющее средство и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в биологическом образце, таким образом, что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень активированного активируемого антитела у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у индивидуума или в биологическом образце. Пониженный уровень детектируемой метки представляет собой, например, понижение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% и/или приблизительно на 100%.

Изобретение также относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у индивидуума или в образце (i) приведением в контакт индивидуума или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит детектируемую метку, которую располагают на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2; и (ii) измерением уровня детектируемой метки у индивидуума или в биологическом образце, где детектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство отсутствует и/или присутствует у индивидуума или в биологическом образце на недостаточном детектируемом уровне, таким образом, что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство присутствует у индивидуума или в биологическом образце. Пониженный уровень детектируемой метки представляет собой, например, понижение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% и/или приблизительно на 100%. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), субстрат CM1-CM2, который расщепляется расщепляющим средством, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-субстрат CM1-CM2-АВ или АВ-субстрат CM1-CM2-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Изобретение также относится к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия представляющего интерес расщепляющего средства у индивидуума или в образце, где наборы содержат, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описываемое в настоящем описании, для применения в приведении в контакт с индивидуумом или биологическим образцом и средствами детекции уровня активированного активируемого антитела и/или

конъюгированное активируемое антитело у индивидуума или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит детектируемую метку, которую располагают на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления субстрата CM1-CM2, где детектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство, мишень или расщепляющее средство и мишень отсутствуют и/или присутствуют на недостаточном уровне у индивидуума или в биологическом образце, таким образом, что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у индивидуума или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень детектируемой метки у индивидуума или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у индивидуума или в биологическом образце. Пониженный уровень детектируемой метки представляет собой, например, понижение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% и/или приблизительно на 100%.

В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов детектируемая метка содержит визуализирующее средство, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или более ионов металлов или метка на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов визуализирующее средство содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов контрастирующее средство содержит йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), циановый флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный флуоресцентный белок tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED или производное европия. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления таких способов метка включает метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенев.

В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов индивидуум представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой не принадлежащее человеку млекопитающее, такое как не являющийся человеком примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой грызуна.

В некоторых вариантах осуществления таких способов способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления таких способов способ представляет собой способ *in situ*. В некоторых вариантах осуществления таких способов способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления таких способов способ представляет собой способ *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* являются пригодными в способах идентификации, каких пациентов необходимо лечить. Например, в визуализации *in situ* активируемые антитела используют для скрининга образцов пациента для идентификации таких пациентов с соответствующими протеазой(ами) и мишенью(ями) в соответствующем месте локализации, например, в месте расположения опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациентов, которые имеют положительный результат в отношении мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 тестируемого активируемого антитела, (например, накапливают активированное антитела в месте локализации заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. Аналогично, пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении любой или в отношении и мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 активируемого антитела, тестируемого такими способами, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении первого активируемого антитела, можно тестировать с другими активируемыми антителами, содержащими различные субстраты CM1-CM2, до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например,

активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество конъюгированного активируемого антитела, для которого он имел положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациентов, которые имеют положительный результат в отношении мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 тестируемого активируемого антитела (например, накапливают активированное антитело в месте локализации заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. Аналогично, пациентов, которые имеют отрицательный результат, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении первого активируемого антитела можно тестировать с другими активируемыми антителами, содержащими различные субстраты CM1-CM2, до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество конъюгированного активируемого антитела, для которого имел положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ или набор используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациенты, которые имеют положительный результат в отношении мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 тестируемого активируемого антитела в таких способах, идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. Аналогично, пациенты, которые имеют отрицательный результат в отношении мишеней (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате CM1-CM2 в активируемом антителе, тестируемом такими способами, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с другими активируемыми антителами до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении любой мишени (например, мишени), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении любой мишени (например, мишени), идентифицируют как не являющихся подходящими кандидатами для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с другими активируемыми антителами до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, с которым конъюгировано терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемую метку располагают на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у индивидуума или в образце проводят с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

В некоторых вариантах осуществления способ или набор используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом против мишени и/или конъюгированным активируемым антителом против мишени (например, активируемым антителом, с которым конъюгировано терапевтическое средство) по изобретению, с последующим лечением путем введения такого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела нуждающемуся в этом индивидууму. Например, пациенты, которые имеют положительный результат в отношении обеих мишеней (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат CM1-CM2 активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, тестируемого в таких способах, идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким антителом и/или таким конъюгированным активируемым антителом, содержащим такой субстрат CM1-CM2, и пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, которое тестировали. Аналогично, пациенты, которые имеют отрицательный результат в отношении любой из или на обе мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в суб-

страте CM1-CM2 в активируемом антителе, тестируемом этими способами, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с другим антителом и/или конъюгированным активируемым антителом до тех пор, пока не идентифицируют подходящее антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, содержащее субстрат CM1-CM2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного, для которого пациент имел положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов MM представляет собой пептид с длиной приблизительно от 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид располагается между MM и субстратом CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид располагается между АВ и субстратом CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (L1) и второй линкерный пептид (L2), где первый линкерный пептид располагается между MM и субстратом CM1-CM2, и второй линкерный пептид располагается между АВ и субстратом CM1-CM2. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов каждый из L1 и L2 представляет собой пептид длиной приблизительно от 1 до 20 аминокислот, и где каждый из L1 и L2 необязательно представляет собой один и тот же линкер. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов один или оба из L1 и L2 содержат полимер глицин-серин. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 381) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 382), где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность формулы (GGS)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления таких 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: 383), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 384), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 385), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 386), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 387) и Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 388).

В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов АВ содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из последовательностей дающего перекрестную реакцию антитела, приведенных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов АВ содержит фрагмент Fab, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов расщепляющее средство представляет собой протеазу, которая колокализирована у индивидуума или в образце с мишенью и субстратом CM1-CM2, представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы, где протеаза расщепляет субстрат CM1-CM2 в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается действию протеазы. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов каждая из последовательности субстрата CM1 и последовательности субстрата CM2 в субстрате CM1-CM2 представляет собой независимо полипептид длиной до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов субстрат CM1-CM2 связан с N-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов субстрат CM1-CM2 связан с C-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления таких способов и наборов субстрат CM1-CM2 связан с N-концом VL цепи АВ.

Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению используют в составах для диагностики и профилактики. В одном из вариантов осуществления активируемое антитело вводят пациентам, которые подвергаются риску развития одного или более из указанных выше воспаления, воспалительных нарушений, злокачественной опухоли или других нарушений.

Предрасположенность пациента или органа к одному или более из указанных выше нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и/или конъюгированные активируемые антитела вводят являющимся людьми индивидуумам, у которых диагностировали клиническое показание, ассоциированное с одним или более из указанных выше нарушений. При диагностике активируемое антитело и/или конъюгированные активируемые антитела вводят для ослабления или для того, чтобы способствовать регрессии эффектов клинического показания.

Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению также являются пригодными для детекции мишени в образцах пациента и, таким образом, являются пригодными в качестве диагностических средств. Например, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению используют в анализах *in vitro*, например, ELISA, для детекции уровня мишени в образце пациента.

В одном из вариантов осуществления активируемое антитело по изобретению иммобилизуют на твердой подложке (например, лунке(ах) планшета для микротитрования).

Иммобилизованное активируемое антитело служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела в контакт с образцом пациента твердую подложку ополаскивают и обрабатывают блокирующим средством, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, в котором подозревают содержание антигена, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от индивидуума, у которого подозревают уровни циркулирующего антигена, по которым, как считают, диагностируют патологию. После ополаскивания тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое является детектируемо меченым. Меченое второе антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень детектируемой метки и определяют концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце путем сравнения со стандартной кривой, построенной на основании стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, получаемых с использованием антител по изобретению в диагностическом анализе *in vitro*, возможным является определение стадии заболевания у индивидуума на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови получают от индивидуумов, у которых диагностировали различные стадии прогрессирования заболевания, и/или в различные временные точки в ходе терапевтического лечения заболевания. С использованием совокупности образцов, которые обеспечивают статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, устанавливают диапазон концентраций антигена, который можно считать характеристическим для каждой стадии.

Активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела также можно 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 представляет собой способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, содержащие ферментативно расщепляемый субстрат CM1-CM2, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять субстрат CM1-CM2. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) активности фермента (или в некоторых вариантах осуществления среды повышенного восстановительного потенциала, такой как среда, которая может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) путем измерения накопления активированных антител (т.е. антител, образующихся 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 повышенным восстановительным потенциалом в зависимости от природы субстрата CM1-CM2), а также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, субстрат CM1-CM2 можно выбирать так, чтобы он являлся субстратом протеазы для протеазы, встречающейся в месте локализации опухоли, в месте локализации вирусной или бактериальной инфекции на биологически ограниченном участке (например, такой как при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может представлять собой АВ, который связывается с антигеном-мишенью. Способами, хорошо известными специалисту в данной области, детектируемую метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку или радиофармацевтическое средство) можно конъюгировать с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Подходящие детектируемые метки описаны в отношении указанных выше способов скрининга, и приведены ниже дополнительные конкретные примеры. С использованием АВ, специфического к белку или пептиду, характерному для состояния болезни, наряду с протеазой, активность которой повышается в представляющей интерес пораженной ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной тканью относительно тканей, где специфический к субстрату CM1-CM2 фермент не содержится на детектируемом уровне или содержится на более низком уровне, чем в пораженной ткани или является неактивным (например, находится в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Вследствие того, что небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови системой почечной фильтрации, и вследствие того, что фермент, специфический к субстрату CM1-CM2, не содержится на детектируемом уровне (или содержится на более низких уровнях в непораженных тканях или содержится в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной ткани является повышенным относительно непораженных тканей.

В другом примере, активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат субстрат CM1-CM2, подверженный расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат субстрат CM1-CM2, подверженный расщеплению восстановителем, активируемые антитела можно использовать для детекции (качественно или количественно) присутствия восстановительных условий в образце. Для облегчения анализа в таких способах активируемые антитела

можно детектируемо метить и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или гранула). Детектируемую метку можно располагать на участке активируемого антитела, который не высвобождается после расщепления, например, детектируемую метку может представлять собой флуоресцентную метку с гасителем или другую метку, которая не является детектируемой до тех пор, пока не происходит расщепление. Анализ можно проводить, например, приведением иммобилизованных, детектируемо меченных активируемых антител в контакт с образцом, который, как подозревают, содержит фермент и/или восстановитель в течение периода времени, достаточного для того, чтобы происходило расщепление, затем промыванием для удаления избытка образца и загрязнителей. Затем оценивают присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстановителя) в образце по изменению детектируемого сигнала активируемых антител до приведения в контакт с образцом, например, присутствие и/или повышение детектируемого сигнала вследствие расщепления активируемого антитела расщепляющим средством в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать также для обеспечения детекции присутствия или отсутствия мишени, которая способная связываться с 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 детектируемой метки активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать по детекции комплекса мишень-АВ, например, с использованием детектируемо меченого антитела к мишени.

Активируемые антитела также являются пригодными при визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, в результате расщепления протеазой, и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, который обеспечивает возможность локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как культуры клеток или тканевые срезы. С использованием этого способа можно подтверждать связывание с данной мишенью и протеолитическую активность на основании присутствия детектируемой метки (например, флуоресцентной метки).

Эти техники являются пригодными для любых замороженных клеток или тканей, получаемых из места локализации заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти техники также являются пригодными для свежих образцов клеток или тканей.

В этих техниках активируемое антитело метят детектируемой меткой. Детектируемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель, (например, флуорофор, Флуоресцеинизотиоцианат (FITC), родамин изотиоцианат (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель в ближайшем инфракрасном диапазоне (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и реагент амплификации, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу).

Детекция метки в образце, который инкубировали с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит матриксную металлопротеазу (ММР) и одну сериновую протеазу (SP), которые являются специфическими к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие ММР можно подтверждать с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как ингибиторы протеаз, описываемые в настоящем описании, и/или с использованием средства, которое является специфическим для протеазы, например, антитела, такого как A11, которое является специфическим к протеазе матриптазе (MT-SP1) и ингибирует протеолитическую активность матриптазы; см., например, международную публикацию номер WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 года. Тот же подход использования широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как ингибиторы протеаз, описываемые в настоящем описании, и/или с использованием в большей степени селективно ингибирующего средства можно использовать для идентификации ММР и SP, специфических к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени можно подтверждать с использованием средства, которое является специфическим к мишени, например, другого антитела, или детектируемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченое активируемое антитело с детекцией посредством меченого вторичного антитела или более сложной системы детекции.

Аналогичные техники также являются пригодными для визуализации *in vivo*, где детекция флуоресцентного сигнала у индивидуума, например млекопитающего, включая человека, указывает на то, что участок заболевания содержит мишень и содержит ММР и SP, которая является специфической к субстрату CM1-CM2 активируемого антитела.

Эти техники также являются пригодными в наборах и/или в качестве реагентов для детекции, идентификации или характеристики активности протеазы в различных клетках, тканях и организмах на основании специфического для протеазы субстрата CM1-CM2 в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* являются пригодными в способах идентификации, каких пациентов необходимо лечить. Например, в визуализации *in situ* активируемые антитела используют для скрининга образцов пациента для идентификации таких



пациентов с соответствующими протеазой(ами) и мишенью(ями) в соответствующем месте локализации, например, в месте расположения опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациентов, которые имеют положительный результат в отношении мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 тестируемого активируемого антитела, (например, накапливают активированное антитело в месте локализации заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. Аналогично, пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении любой или в отношении и мишени и протеазы, которая расщепляет субстрат в субстрате СМ1-СМ2 в активируемом антителе, тестируемого такими способами, идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е. не подходящими для лечения тестируемым активируемым антителом). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении первого активируемого антитела, можно тестировать с другими активируемыми антителами, содержащими различные субстраты СМ1-СМ2, до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания).

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом отбора популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым антителом по изобретению. Например, пациентов, которые имеют положительный результат в отношении мишени и протеазы, которая расщепляет субстрат в расщепляемой группе (субстрате СМ1-СМ2 тестируемого активируемого антитела (например, накапливают активированное антитело в месте локализации заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой субстрат СМ1-СМ2. Аналогично, пациентов, которые имеют отрицательный результат, идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е. как не подходящих для лечения тестируемым активируемым антителом). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов, которые имеют отрицательный результат в отношении первого активируемого антитела можно тестировать с другими активируемыми антителами, содержащими различные СМ, до тех пор, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее субстрат СМ1-СМ2, который расщепляется у пациента в месте локализации заболевания).

#### Фармацевтические композиции.

Конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению (также обозначаемые в настоящем описании как "активные соединения") и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи можно вводить в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Как используют в настоящем описании, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен включать любые и все растворители и замедляющие всасывание средства и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартный справочный текст в данной области, включенный в настоящее описание посредством ссылки. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Также можно использовать липосомы и неводные носители, такие как жирные масла. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любая общепринятая среда или средство является несовместимой с активным соединением, предусматривают его использование в композициях. В композиции также можно вводить дополнительные активные соединения.

Фармацевтическую композицию по изобретению формулируют таким образом, чтобы она являлась совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, ингаляцию), трансдермальное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы многократной дозы, выполненные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие использования в качестве инъекций, включают сте-

рильны водные растворы (где вода растворитель) или дисперсии и стерильные порошки для получения непосредственно перед введением стерильных инъектируемых растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Sterophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться жидкой в тех случаях, когда существует простая возможность введения через шприц. Она должна являться стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и подходящие их смеси. Соответствующее текучее состояние можно поддерживать, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно получать различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. В некоторых вариантах осуществления желательным будет являться введение в композицию средств придания изотоничности, например, сахаров, полиспиртов, таких как манитол, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъектируемых композиций можно получать введением в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъектируемые растворы можно получать введением активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают введением активного соединения в стерильном носителе, который содержит основную диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из ингредиентов, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъектируемых растворов способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, которой получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно фильтрованного в стерильных условиях их раствора.

Пероральные композиции, как правило, содержат инертный разбавитель или пищевой носитель. Их можно заключать в желатиновые капсулы или спрессовывать в таблетки. С целью перорального терапевтического введения активное соединение можно вводить с эксципиентами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также можно получать с использованием жидкого носителя для применения в качестве ополаскивателя для полости рта, где соединение в жидком носителе применяют перорально и полоскают, и сплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связывающие средства и/или адъювантные вещества можно вводить в виде части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ниже ингредиентов или соединений сходной природы: связывающее средство, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее средство, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазочное средство, такое как стеарат магния или стеротес (sterotes); способствующее скольжению средство, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин, или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

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

Системное введение также можно проводить трансмукозальным или трансдермальным путем. Для трансмукозального или трансдермального введения в составе используют обеспечивающие проникновение вещества, подходящие для барьера, через который необходимо проникать. Такие обеспечивающие проникновение вещества, как правило, известны в данной области и включают, например, для трансмукозального введения детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно проводить с использованием назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения формулируют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как правило, известных в данной области.

Соединения также можно получать в форме суппозитория (например, с общепринятыми основами для суппозитория, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживающая клизма для ректальной доставки.

В одном из вариантов осуществления активные соединения получают с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав 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 будут очевидны специалистам в данной области. Вещества также можно получать коммерческим путем от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей

также можно использовать липосомальные суспензии (включая липосомы, направленные на инфицированные клетки, моноклональными антителами к вирусным антигенам). Их можно получать способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительно формулировать пероральные или парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для облегчения введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используют в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидуума, подлежащего лечению; каждая единица, содержащая определенное количество активного соединения, рассчитанного для оказания желаемого терапевтического действия в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования к стандартным лекарственным формам по изобретению определяются и непосредственно зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического действия, которое необходимо получить, и ограничений, характерах для данной области получения составов, таких как активное соединение для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции можно помещать в контейнер, упаковку или дозатор совместно с инструкциями по введению.

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

### Примеры

Пример 1. Активируемые антитела против Jagged, расщепляемые матриксной металлопротеазой (MMP) и сериновой протеазой (SP).

Этот пример демонстрирует получение и оценку активируемых антител, которые связываются с мишенью Jagged, например, Jagged 1 и/или Jagged 2, где активируемые антитела активируются в присутствии по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (MMP) и по меньшей мере одной сериновой протеазы.

В исследовании, описываемом в настоящем описании, использовали следующие ниже последовательности субстрата, где LP' представляет собой сшивающий пептид между CM1 и CM2. Для субстрата CM1-CM2 1001/LP'/0001 LP' представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO: 350), и для всех других CM1-CM2 в табл. ниже LP' представляет собой GG:

| Субстрат CM1-CM2 | а.к. последовательность   | SEQ ID NO: |
|------------------|---------------------------|------------|
| 2001             | ISSGLLSGRSDNH             | 1          |
| 1001/LP'/0001    | ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH    | 2          |
| 1004/LP'/0003    | AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG    | 3          |
| 0003/LP'/1004    | TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP    | 4          |
| 1003/LP'/0003    | VHMPGLGFLGPGGTSTSGRSANPRG | 5          |
| 0003/LP'/1003    | TSTSGRSANPRGGGVHMPGLGFLGP | 6          |
| 1004/LP'/0001    | AVGLLAPPGGLSGRSDNH        | 7          |
| 0001/LP'/1004    | LSGRSDNHGGAVGLLAPP        | 8          |
| 1003/LP'/0001    | VHMPGLGFLGPGGLSGRSDNH     | 9          |
| 0001/LP'/1003    | LSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP     | 10         |

Конструирование легких цепей активируемого антитела против Jagged проводили так, как указано ниже.

Субстраты CM1-CM2 вводили в вектор активируемого антитела против Jagged (описанный в публикации PCT № WO 2013/192550) так, как указано ниже. С использованием стандартных техник молекулярной биологии использовали прямые (F) праймеры, кодирующие субстраты CM1-CM2, (см. табл. A) и обратные (R) праймеры CX1198 для амплификации субстрата и домена VL активируемого антитела против Jagged, а затем клонировали в вектор активируемого антитела с использованием участков рестрикции XhoI и BsiWI. Получаемые векторы кодировали следующие ниже легкие цепи активируемого антитела против Jagged.

Таблица А. Праймеры, используемые для конструкции экспрессирующих векторов CM1-CM2

|        |                 |                                                                                                                                                |
|--------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CX1198 | Легкая цепь R   | Gtgcagccaccgtacgttttgatttccaccttggtccc (SEQ ID NO: 37)                                                                                         |
| CX2066 | 2001 F          | CaggggggctcgagcGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAGATCCGACAATCACGGCGGAGGCTCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 38)                              |
| CX2067 | 1001/LP'/0001 F | CaggggggctcgagcGGCGGCTCTATCTCTTGGCCTGCTGTCTAGCGCGGCTCCGGCGGATCTGTGTGGCAGATCTGACAACCACGGCGGAGGCTCCGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 39)        |
| CX2190 | 1004/LP'/0003 F | CaggggggctcgagcGGAGGATCTGCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCC TGGCGGCACATCTACCTCTGGCAGATCCGCCAACCTCGGGGCGGAGGATCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 40)      |
| CX2191 | 0003/LP'/1004 F | CaggggggctcgagcGGCGGCTCCACATCTACCTCTGGCAGATCCGC CAACCCAGAGGTGGCGGAGCTGTGGGACTGCTGGCTCCACAGGCGGATCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 41)       |
| CX2192 | 1003/LP'/0003 F | CaggggggctcgagcGGCGGCTCTGTGCATATGCCCTGGGCTTTCT GGGCCCTGGCGGCACATCTACCTCTGGCAGATCCGCCAACCTCGGGGCGGAGGATCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 42) |
| CX2193 | 0003/LP'/1003 F | CaggggggctcgagcGGCGGCTCCACATCTACCTCTGGCAGATCCGC CAACCCAGAGGCGGCGGAGTGATATGCCTCTGGGCTTTCTGGGACCTGGCGGCTCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 43) |
| CX2242 | 1004/LP'/0001 F | CaggggggctcgagcGGAGGATCTGCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCC TGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGATAACCACGGCGGCTCCGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 44)                 |
| CX2243 | 0001/LP'/1004 F | CaggggggctcgagcGGAGGCTCTGGCCTGTCTGGCAGATCCGATAA CCATGGCGGCGCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGATCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 45)              |
| CX2244 | 1003/LP'/0001 F | CaggggggctcgagcGGCGGCTCTGTGCATATGCCCTGGGCTTTCT GGGACCTGGCGGCTGTCTGGCAGATCCGATAATCACGGCGGCTCCGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 46)             |
| CX2245 | 0001/LP'/1003 F | CaggggggctcgagcGGAGGCTCTGGCCTGTCTGGCAGATCTGATAA CCACGGCGGCTGCACATGCCCTGGGCTTTCTGGGACCTGGCGGATCTGacatccagatgacccagcttc (SEQ ID NO: 47)          |

Лс активируемого антитела 2001 против Jagged со спейсерной последовательностью.

#### Нуклеотидная последовательность

Caaggccagctctggccagtgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcagggggctcgagcggcggtctatctcttccggactgctgtccggcagatccgacaatcacggcggaggctctgacatccagatgacccagctctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcgccatccagtttgcaaagtggggtcccataagggttcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgccctccgttattcgccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccggcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtgataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 48)

#### Аминокислотная последовательность

QGGSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASV  
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ  
PEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC (SEQ ID NO: 49)

**Лс активируемого антитела 2001 против Jagged.**  
**Нуклеотидная последовательность**  
Tgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcgggcg  
ctctatctcttccggactgctgtccggcagatccgacaatcacggcggaggctctgacatccag  
atgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccggg  
caagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagccctaagct  
cctgatctatgcggcattccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatct  
gggacagatttctactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtc  
aacagacggttggtggcgccctcggtatttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaactgacggt  
ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctct  
gttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacg  
ccctccaatcggttaactcccagagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag  
cctcagcagcacctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaa  
gtcaccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ  
ID NO: 419)

**Аминокислотная последовательность**  
CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT  
YYCQQTIVVAPPLFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C (SEQ ID NO: 420)

**Лс активируемого антитела 1001/LP'/0001 против Jagged со спейсерной последовательностью.**  
**Нуклеотидная последовательность**  
Caaggccagctcggccagtgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
ggggggctcgagcgggcggtctatctcttctggcctgctgtctagcgggcggtccggcggtatct  
ctgtctggcagatctgacaaccacggcggtcctccgacatccagatgaccagctctccatcct  
ccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcag  
ctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagccctaagctcctgatctatgcgccatcc  
agtttgcaaagtgggtcccatcaagggttcagtggcagtggtatctgggacagatttctactctca  
ccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgcc  
tccgttatttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaactgacggtggctgcaccatctgtcttc  
atcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaata  
acttctatcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgcctccaatcggttaactc  
ccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacg  
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctga  
gctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 50)

**Аминокислотная последовательность**  
QGGSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGGSGGSLSGRSDNHGGGSDIQMTQ  
SPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 51)

**Лс активируемого антитела 1001/LP'/0001 против Jagged.**  
**Нуклеотидная последовательность**

Tgcaatatatttgctcgtaggtggtgattgcaggggctggcagggggctcgagcggcgg  
ctctatctcttctggcctgctgtctagcggcggctccggcggatctctgtctggcagatctgac  
aaccacggcggaggctccgacatccagatgacccagctctccatcctccctgtctgcatctgtag  
gagacagagtcacatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatca  
gcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggtc  
ccatcaagggttcagtgagtgatctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaac  
ctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacgggttggtggcgcctccgttattcggccaagg  
gaccaaggtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat  
gagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataacttctatcccagagagg  
ccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacaga  
gcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactac  
gagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaaga  
gcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 421)

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLS  
ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 422)

**Лс активируемого антитела 1004/LP'/0003 против Jagged со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

Caaggccagtcctggccagtgcaatatatttgctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
ggggggctcgagcggaggatctgctgtgggactgctggctcctcctggcggcacatctacctct  
ggcagatccgccaaaccctcgggcgaggatctgacatccagatgacccagctctccatcctccc  
tgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagcta  
tttaaattggtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagt  
ttgcaaagtggggtcccatcaagggttcagtgagtgatctgggacagatttactctcacca  
tcagcagtcctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacgggttggtggcgcctcc  
gttattcggccaagggaaggtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatc  
ttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataact  
tctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca  
ggagagtggtcacagagcaggaagacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctg  
agcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct  
cgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 52)

**Аминокислотная последовательность**

QGGSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSAGVLLAPPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQS  
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL  
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 53)

**Лс активируемого антитела 1004/LP'/0003 против Jagged.**

**Нуклеотидная последовательность**

Tgcaatatatttggtcgtaggtggtgattgcaggggctggcagggggctcgagcggagg  
 atctgctgtgggactgctggtcctcctggcgccacatctacctctggcagatccgccaaccct  
 cggggcgaggatctgacatccagatgaccagtcctccatcctcctgtctgcatctgtaggag  
 acagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagca  
 gaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggtccca  
 tcaaggttcagtggtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtcgtgcaacctg  
 aagatatttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcgccaaggac  
 caaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag  
 cagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagagaggcca  
 aagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccaggagagtggtcacagagca  
 ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag  
 aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct  
 tcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 423)

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSA  
 SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS  
 LQPEDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 424)

**Лс активируемого антитела 0003/LP'/1004 против Jagged со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

Caaggccagtcgtggccagtgcaatatatttggtcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
 ggggggctcgagcggcggtccacatctacctctggcagatccgccaacccagaggtggcgga  
 gctgtgggactgctggtccaccaggcggtatctgacatccagatgaccagtcctccatcctccc  
 tgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagcta  
 tttaaattggtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagt  
 ttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggtggtatctgggacagatttcactctcacca  
 tcagcagtcgtgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctcc  
 gttattcgccaagggaaggtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatc  
 tccccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataact  
 tctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca  
 ggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctg  
 agcaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct  
 cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 54)

**Аминокислотная последовательность**

QQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGS TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPPGGSDIQMTQS  
 PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF  
 TLTISSLQPEDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL  
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 55)

**Лс активируемого антитела 0003/LP'/1004 против Jagged.**

**Нуклеотидная последовательность**

Tgcaatatatttggtctgtaggtggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcggcgg  
ctccacatctacctctggcagatccgccaacccagaggtggcggagctgtgggactgctggct  
ccaccaggcggatctgacatccagatgaccagttctccatcctcctgtctgcatctgtaggag  
acagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattgggatcagca  
gaaaccagggaaagccctaagctcctgatctatgcggcattcagtttgcaaagtggggtccca  
tcaaggttcagtggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagttctgcaacctg  
aagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcggccaaaggga  
caaggtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag  
cagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgtgtaataacttctatcccagagaggcca  
aagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagca  
ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgag  
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagct  
tcaacaggggaagatgt (SEQ ID NO: 425)

### Аминокислотная последовательность

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSTSTSGRSANPRGGGAVGLLAPPGGSDIQMTQSPSSL  
SVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTIS  
LQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 426)

Лс активируемого антитела 1003/LP'/0003 против Jagged со спейсерной последовательностью.

### Нуклеотидная последовательность

Caagggcagctctggccagctgcaatatattggctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
ggggggcctcgagcggcgggctctgtgcataatgccctgggctttctgggccctggcggcacatct  
acctctggcagatccgccaacctcggggcggaggatctgacatccagatgacccagctctccat  
cctccctgtctgcatactgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcaagtcagagcattag  
cagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctatgcggca  
tccagtttgcaaagtgggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctgggacagatttcactc  
tcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttgtggc  
gcctccgttattcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtc  
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgtga  
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagtggtataacgcctccaatcgggtaa  
ctcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctg  
acgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcc  
tgagctcggccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 56)

### Аминокислотная последовательность

QGGSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSVHMPGLFLPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMT  
QSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVT  
HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 57)

Лс активируемого антитела 1003/LP'/0003 против Jagged.

## Нуклеотидная последовательность



Tgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcagggggctcgagcggcgg  
 ctctgtgcatatgccctgggctttctgggacctggcggcacatctacctctggcagatccgcc  
 aacctcggggcggaggtctgacatccagatgacctagctccatcctccctgtctgcatctg  
 taggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtg  
 tcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggg  
 gtcccatcaagggtcagtggtgagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgc  
 aacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgcctccgttattcggcca  
 agggaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcacctctgtcttcatcttcccgccatct  
 gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagag  
 aggccaaagtacagtgggaaggtgataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgac  
 agagcagacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagcagac  
 tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa  
 agagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 427)

#### Аминокислотная последовательность

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSVHMLPLGFLPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSL  
 SASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI  
 SSLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF  
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 428)

Лс активируемого антитела 0003/LP'/1003 против Jagged со спейсерной последовательностью.

#### Нуклеотидная последовательность

Caaggccagtctggccagtgcataatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
 ggggggctcgagcggcgggctccacatctacctctggcagatccgccaaacccagagggcgcgga  
 gtgcatatgcctctgggctttctgggacctggcggctctgacatccagatgacctagctccat  
 cctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattag  
 cagclalalalalalggalalcagcagaaaccagggaagcccclaagclccclgalclalgcggca  
 tccagtttgcaaagtgggggtcccatcaagggtcagtggtgagtggtctgggacagatttactc  
 tcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggc  
 gcctccgttattcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcacctctgtc  
 ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctga  
 ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcggttaa  
 ctcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctg  
 acgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcc  
 tgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 58)

#### Аминокислотная последовательность

QGQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSTSTSGRSANPRGGGVHMLPLGFLPGGSDIQMT  
 QSPSSLASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
 HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 59)

Лс активируемого антитела 0003/LP'/1003 против Jagged.

#### Нуклеотидная последовательность

Tgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcagggggctcgagcgggc  
ctccacatctacctctggcagatccgccaaccccagaggcgggagtgcatatgcctctgggc  
tttctgggacctggcggtctgacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctg  
taggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagagcattagcagctatttaattggta  
tcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggg  
gtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagtcctgc  
aacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcgcca  
agggaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct  
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgctgctgaataacttctatcccagag  
aggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccctccaatcggttaactcccaggagagtgac  
agagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac  
tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa  
agagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 429)

#### Аминокислотная последовательность

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSTSTSGRSANPRGGGVHMLPLGFLGPGGSDIQMTQSPSSL  
SASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI  
SSLQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 430)

Лс активируемого антитела 1004/LP'/0001 против Jagged со спейсерной последовательностью.

#### Нуклеотидная последовательность

Caaggccagtcctggccagtgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
ggggggctcgagcgaggatctgctgtgggactgctggctcctcctggtggcctgtctggcaga  
tctgataaccacggcggtccgacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctg  
taggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagagcattagcagctatttaattggta  
tcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggg  
gtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagtcctgc  
aacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcgcca  
agggaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct  
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgctgctgaataacttctatcccagag  
aggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccctccaatcggttaactcccaggagagtgac  
agagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac  
tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa  
agagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 60)

#### Аминокислотная последовательность

QQQSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSAGVLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSL  
SASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI  
SSLQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)

Лс активируемого антитела 1004/LP'/0001 против Jagged.

#### Нуклеотидная последовательность

Tgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcgagg  
atctgctgtgggactgctggctcctcctggtggcctgtctggcagatctgataaccacggcggc  
tccgacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacca  
tcaacttgcgggcaagtcagagcattagcagctatttaattggatcagcagaaaccaggga  
agcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtgggggtcccatcaaggttcag  
ggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagtcctgcaacctgaagattttgcaa  
cttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcgccaagggaccaaggtggaaat

caaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct  
 ggaactgcctctgttgtgtgctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggga  
 aggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagga  
 cagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc  
 tacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
 agtgt (SEQ ID NO: 431)

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNHGGS DIQMTQSPSSLSASVGD  
 RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE  
 DFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK  
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
 NRGEC (SEQ ID NO: 432)

**Лс активируемого антитела 0001/LP'/1004 против Jagged со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

Caaggccagtcctggccagtgcaatatttggctcgtaggtgggtgattgcaggggctggca  
 ggggggctcgagcggaggtcttgccctgtctggcagatccgataaccatggcggcgctgtggga  
 ctgctggctcctcctgttggtgatctgacatccagatgacccagtcctccatcctcctgtctgcat  
 ctgtaggagacagagtcacccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattg  
 gtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaagt  
 ggggtcccatcaaggttcagtggtggtgatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtc  
 tgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcgg  
 ccaagggaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcc  
 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgtgaataacttctatcca  
 gagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgt  
 cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagca  
 gactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgctca  
 caaagagcttcaacaggggagagtg (SEQ ID NO: 62)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSGLSGRSDNHGGAVGLLAPPGGSDIQMTQSPSS  
 LSASVGD RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT  
 ISSLQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN  
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 63)

**Лс активируемого антитела 0001/LP'/1004 против Jagged.**

**Нуклеотидная последовательность**

Tgcaatatttggctcgtaggtgggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcggag  
 ctctggcctgtctggcagatccgataaccatggcggcgctgtgggactgctggctcctcctggt  
 ggatctgacatccagatgacccagtcctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtc  
 ccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagg  
 gaaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaagtggggtcccatcaaggttc  
 agtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacctgaagattttg  
 caacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcggccaagggaccaaggtgga  
 aatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaa  
 tctggaactgcctctgttgtgtgctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagt  
 ggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaa  
 ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaa  
 gtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagg  
 gagagtg (SEQ ID NO: 433)

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGSGLSGRSDNHGGAVGLLAPPGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 434)

**Лс активируемого антитела 1003/LP'/0001 против Jagged со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

Caaggccagtctggccagtgcataatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
 ggggggctcgagcggcgctctgtgcatatgccctgggctttctgggacctggcggcctgtct  
 ggcagatccgataatcacggcggtccgacatccagatgacctagctccatcctccctgtctg  
 catctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctattttaa  
 ttggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaa  
 agtggggtcccatcaaggttcagtggcagtgatctgggacagatttcactctcaccatcagca  
 gtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttatt  
 cggccaagggaagtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccg  
 ccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgctgaataacttctatc  
 ccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccctccaatcgggtaactcccaggagag  
 tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaa  
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccc  
 tcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 64)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGSGSVHMLPLGFLGPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPS  
 SLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL  
 TISSLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
 SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 65)

**Лс активируемого антитела 1003/LP'/0001 против Jagged.**

**Нуклеотидная последовательность**

Tgcaatatttggctcgtaggtggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcggcg  
 ctctgtgcatatgccctgggctttctgggacctggcggcctgtctggcagatccgataatcac  
 ggcggctccgacatccagatgacctagctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagag  
 tcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctattttaaattggtatcagcagaaacc  
 agggaaagccctaaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagg  
 ttcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatt  
 ttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcggccaagggaaggt  
 ggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttg  
 aaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtac  
 agtggaaggtggataacgcccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacag  
 caaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac  
 aaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaaca  
 ggggagagtgt (SEQ ID NO: 435)

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGSGSVHMLPLGFLGPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASV  
 GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ  
 PEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
 SFNRGEC (SEQ ID NO: 436)

**Лс активируемого антитела 0001/LP'/1003 против Jagged со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

Caaggccagctctggccagtgcaatatatttggtcgtaggtggtgattgcaggggctggca  
 ggggggctcgagcggaggtctctggcctgtctggcagatctgataaccacggcggcgtgcacatg  
 cccctgggctttctgggacctggcgatctgacatccagatgaccagctctccatcctccctgt  
 ctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctattt  
 aaattggtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttg  
 caaagtgggttcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatca  
 gcagtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgtt  
 attcggccaagggaaggtggaatcaaactgacggtggctgcaccatctgtcttcatcttc  
 ccgcatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttct  
 atcccagagaggccaaagtacagtggaaagtgataacgccctccaatcgggtaactcccagga  
 gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagc  
 aaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgc  
 ccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 66)

#### Аминокислотная последовательность

QGQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGSLSGRSDNHGGVHMLPLGFLPGGSDIQMTQSP  
 SSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDTFT  
 LTISLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 437)

#### Лс активируемого антитела 0001/LP/1003 против Jagged.

##### Нуклеотидная последовательность

Tgcaatatatttggtcgtaggtggtgattgcaggggctggcaggggggctcgagcggagg  
 ctctggcctgtctggcagatctgataaccacggcggcgtgcacatgccctgggctttctggga  
 cctggcggtatctgacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagaca  
 gagtccaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaa  
 accagggaaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtgggttcccatca  
 aggttcagtggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaag  
 attttgcaacttactactgtcaacagacggttggtggcgctccgttattcggccaagggaacaa  
 ggtggaatcaaactgacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcag  
 ttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag  
 tacagtggaaagtgataacgccctccaatcgggtaactcccagagagtggtcacagagcagga  
 cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaa  
 cacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttca  
 acaggggagagtgt (SEQ ID NO: 438)

#### Аминокислотная последовательность

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGSLSGRSDNHGGVHMLPLGFLPGGSDIQMTQSPSSLSAS  
 VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISL  
 QPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR  
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 439)

#### Нс активируемого антитела против Jagged

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIDPEGRQTY  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 67)

Связывание и активацию *in vitro* CM1-CM2 активируемого антитела против Jagged оценивали так, как указано ниже.

Активируемые антитела против Jagged экспрессировали из транзитивно трансфицированных клет-

ки НЕК-293 и очищали от культурального супернатанта хроматографией на белке А. Для подтверждения того, что активируемые антитела CM1-CM2 против Jagged можно активировать MMP и сериновыми протеазами, очищенные активируемые антитела расщепляли uPA и/или MMP14, а затем оценивали их способность связываться с Jagged 1-Fc человека посредством ELISA. Планшеты ELISA (Greiner Bio-One №655061) покрывали Jag1-Fc человека (R&D №1277-JG-050) в сбалансированном солевом растворе Хенкса pH 7,4 (HBSS) (Teknova №H8057) при 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C; как используют в настоящем описании, микрограмм(ы) также представляют как мкг и  $\mu\text{г}$ . Планшеты блокировали 2% обезжиренным сухим молоком (NFDМ) в HBSS в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Снимали блокирование и антитело против Jagged 4D11, активируемое антитело CM1-CM2 против Jagged или конструируемое активируемое антитело добавляли в указанной концентрации в 2% NFDМ/HBSS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты ELISA промывали 3 раза избытком HBSS, 0,05% TWEEN (HBSS-T) перед добавлением конъюгированного с HRP IgG мыши, специфического F<sub>Ab(2)</sub> против антитела человека (Jackson ImmunoResearch №209-035-097), разбавленного 1:30000 в 2% NFDМ/HBSS. Затем планшет ELISA промывали 3× HBSS-T и проявляли с использованием субстрата 1-Step TMB (Pierce/Thermo Fisher №NC0140927). Планшеты считывали при OD<sub>450</sub> и строили график с использованием программного обеспечения Prism.

На фиг. 1 продемонстрировано, что активируемые антитела CM1-CM2 против Jagged (a) являлись эффективно маскированными до расщепления uPA или MMP14, и (b) продемонстрировано связывание, эквивалентное антителу, при расщеплении uPA или MMP14 или комбинацией uPA и MMP14.

Фармакокинетику активируемого антитела против Jagged, содержащего субстрат CM1-CM2 оценивали у не несущих опухоль бестимусных мышей так, как указано ниже.

В качестве суррогатного параметра стабильности маски и субстрата фармакокинетику активируемых антител против Jagged, содержащих субстраты CM1-CM2 2001 и 1001/LP'/0001, сравнивали с фармакокинетикой антитела против Jagged у не несущих опухоль мышей. Для перекрестно реагирующего антитела против Jagged мыши/человека демонстрируют быстрый клиренс у мышей вследствие связывания Jagged 1/2 в нормальных тканях. Если активируемое антитело CM1-CM2 против Jagged остается маскированным (стабильным) в циркулирующей крови, то активируемое антитело избегает мишень-опосредованного клиренса и обладает увеличенным временем полувыведения из сыворотки.

Фармакокинетика в плазме антитела против Jagged и активируемых антител против Jagged оценивали так, как указано ниже. Как указано в табл. В, каждая группа состояла из 2 когорт по 5 мышей. Мышам вводили однократную внутривенную дозу 5 мг/кг указанного соединения. Собирали гепаринизированную литием плазму у когорты 1 через 24, 96 ч и 10 суток после дозирования, при этом плазму собирали у когорты 2 через 48 ч, 7 и 14 суток ретроорбитальным путем с анестезией изофлураном. Общие уровни IgG человека в плазме детектировали с использованием сэндвич-ELISA с IgG человека. В кратком изложении, планшеты ELISA (Costar 3590 Fisher Scientific кат. № 07-200-35) покрывали F(ab')<sub>2</sub> козы против IgG человека AffiniPure Fragment Specific, (Jackson ImmunoResearch кат. № 109-006-097) в фосфатно-солевом буфере (PBS) при 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали Superblock (ScyTek Laboratories кат. № AAA500) в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Блокирование снимали и добавляли в планшет соответствующие разведения стандарта (тестируемый препарат) и тестируемых образцов (образцы плазмы), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет ELISA промывали 3 раза избытком PBS, 0,05% TWEEN (PBS-T) перед добавлением F(ab')<sub>2</sub> козы против IgG человека AffiniPure Fragment Specific, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch кат. № 109-035-097), разбавленного 1:25000. Затем планшет ELISA промывали 3× PBS-T и разбавляли с использованием субстрата 1-Step TMB (Pierce/Thermo Fisher №NC0140927) согласно протоколу производителей. Уровни IgG человека в сыворотке рассчитывали путем сравнения тестируемых значений образца со стандартной кривой. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием некомпартментного анализа с выборочным взятием образцов (Phoenix WinNonlin v6.3).

Как представлено на фиг. 2, антитело против Jagged быстро выводится и находится ниже предела детекции анализа на сутки 10. В противоположность этому для активируемых антител 1001/LP'/0001 и 2001 CM1-CM2 против Jagged демонстрировали значительно увеличенное время полужизни, что указывает на то, что активируемые антитела остаются стабильными и хорошо маскированными в циркулирующей крови.

Таблица В. Группы и дозы для фармакокинетического анализа активируемых антител 2001 и 1001/LP'/0001 CM1-CM2 против Jagged

| Группа | N   | Лечение                                           | Доза<br>(мг/кг) | Объем дозы<br>(мл/кг) | Режим      | Путь |
|--------|-----|---------------------------------------------------|-----------------|-----------------------|------------|------|
| 1      | 2×5 | антитело против Jagged                            | 5               | 10                    | однократно | и/п  |
| 2      | 2×5 | активируемое антитело 2001 против Jagged          | 5               | 10                    | однократно | и/п  |
| 3      | 2×5 | активируемое антитело 1001/LP'/0001 против Jagged | 5               | 10                    | однократно | и/п  |

Оценку in vivo безопасности и эффективности конъюгата содержащее субстрат CM1-CM2 активируемое антитело против Jagged-лекарственное средство проводили так, как указано ниже.

Эффективность против конъюгата содержащее субстрат CM1-CM2 активируемое антитело 2001 против Jagged-лекарственное средство, который содержал активируемое антитело 2001 против Jagged, конъюгированное с майтанзиноидом DM4 (см., например, US 7276497) через линкер SPDB, оценивали на модели ксенотрансплантата опухоли из линии клеток человек рака молочной железы человека HCC1806. Клетки HCC1806 собирали во время логарифмической фазы роста и ресуспендировали в 50% матрикеле (BD Biosciences) в PBS в концентрации of  $5 \times 10^7$  клеток/мл. Мышам подкожно инъецировали в правый бок  $5 \times 10^6$  клеток и оставляли расти до среднего объема 100-150 мм<sup>3</sup>. Мышей случайным образом распределяли и дозировали, как указано в табл. С. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю в течение всего исследования и получали измерения эффективности и безопасности, соответственно.

На фиг. 3 представлено среднее групповое значение объема опухоли ± стандартная ошибка среднего (SEM) для животных, которых обрабатывали PBS, изотип-SPDB-DM4, конъюгата антитело против Jagged-SPDB-DM4-лекарственное средство (ADC), и конъюгата активируемое антитело 2001 против Jagged-лекарственное средство. Ни в одной контрольной группе (PBS или изотип-SPDB-DM4) не выявляли ингибирование роста опухоли, тогда как в группах антитело против Jagged-ADC и конъюгат активируемое антитело 2001 против Jagged-лекарственное средство выявляли регрессию опухоли. У животных, которых обрабатывали антителом против Jagged-ADC, выявляли значительные побочные эффекты, как измеряют по потери массы, как представлено на фиг. 4. Однако у животных, которых обрабатывали конъюгатом активируемое антитело 2001 против Jagged-лекарственное средство, не выявляли потери массы (также представлено на фиг. 4), что демонстрирует, что активность конъюгата активируемое антитело против Jagged CM1-CM2-лекарственное средство была локализована в опухоли.

Таблица С. Группы и режим дозирования для исследования HCC1806

| Группа | Количество | Обработка                                         | Доза (мг/кг) | Режим | Путь |
|--------|------------|---------------------------------------------------|--------------|-------|------|
| 1      | 8          | PBS                                               | 10           | q7d×2 | в/в  |
| 3      | 8          | Изотип-SPDB-DM4                                   | 10           | q7d×2 | в/в  |
| 4      | 8          | антитело против Jagged-SPDB-DM4                   | 10           | q7d×2 | в/в  |
| 5      | 8          | активируемое антитело 2001 против Jagged-SPDB-DM4 | 10           | q7d×2 | в/в  |

Пример 2. Активируемые антитела против EGFR, расщепляемые матриксной металлопротеазой (MMP) и сериновой протеазой (SP).

Этот пример демонстрирует получение и оценку активируемых антител, которые связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), где активируемые антитела активируются в присутствии по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (MMP) и по меньшей мере одной сериновой протеазы.

Активируемые антитела против EGFR, используемые в этом примере, получали способом, аналогичным способом, используемым в примере 1 для получения активируемых антител против Jagged.

В исследовании, описываемом в настоящем описании, использовали следующие ниже последовательности субстрата, где LP' представляет собой сшивающий пептид между CM1 и CM2. Для всех субстратов CM1-CM2 в таблице ниже, LP' представляет собой GSGSGS (SEQ ID NO: 350):

| Субстрат<br>CM1-CM2 | Аминокислотная<br>последовательность       | Нуклеотидная последовательность                                                         |
|---------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 0001                | LSGRSDNH (SEQ ID NO: 18)                   | TTAAGCGGGCGGTCGGACAACCAC (SEQ ID NO: 23)                                                |
| 0002                | LSGRSGNH (SEQ ID NO: 19)                   | CTTAGCGGGCGGAGCGGCAACCAC (SEQ ID NO: 24)                                                |
| 1001                | ISSGLLSS (SEQ ID NO: 20)                   | ATCTCCTCCGGGCTACTGAGTTCT (SEQ ID NO: 25)                                                |
| 1002                | QNQALRMA (SEQ ID NO: 21)                   | CAGAACCAGGCGCTCAGAATGGCA (SEQ ID NO: 26)                                                |
| 2001                | ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 1)               | ATATCATCCGGCCTCCTTAGCGGCCGTTCCGACAATCAC (SEQ ID NO: 27)                                 |
| 2002                | ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 22)              | ATAAGTTCTGGGCTCCTGTCCGGCCGAGTGGAATCAC (SEQ ID NO: 28)                                   |
| 0001/LP'/10         | LSGRSDNHGGSGGSISSGL                        | CTGAGCGGGCGGTCGATAATCATGGTGGTTCAGGAGGG                                                  |
| 01                  | LSS (SEQ ID NO: 11)                        | AGTATTTCTTCCGGCTTACTGAGTAGC (SEQ ID NO: 29)                                             |
| 1001/LP'/00<br>01   | ISSGLLSSGGSGGSLSGRS<br>DNH (SEQ ID NO: 2)  | ATCTCCTCTGGGTTGCTTTCTTCAGGAGGTTACAGGGGGG<br>AGCCTGAGCGGACGCTCCGACAACCAT (SEQ ID NO: 30) |
| 0002/LP'/10<br>01   | LSGRSGNHGGSGGSISSGL<br>LSS (SEQ ID NO: 12) | CTCTCAGGAAGATCCGGAATCATGGGGGGTCTGGGGGG<br>AGTATCTCATCAGGTCTGCTGAGCAGC (SEQ ID NO: 31)   |
| 1001/LP'/00<br>02   | ISSGLLSSGGSGGSLSGRS<br>GNH (SEQ ID NO: 13) | ATCTCAAGTGGGCTGTTAAGTTCCGGCGGCAGTGGAGGG<br>TCCCTAAGCGGCCGAGCGGAATCAC (SEQ ID NO: 32)    |
| 0001/LP'/10<br>02   | LSGRSDNHGGSGGSQNQAL<br>RMA (SEQ ID NO: 14) | CTCTCTGGCCGCTCCGATAATCATGGTGGATCCGGTGGC<br>TCTCAGAACCAGGCACTACGGATGGCA (SEQ ID NO: 33)  |
| 1002/LP'/00<br>01   | QNQALRMAGGSGGSLSGRS<br>DNH (SEQ ID NO: 15) | CAGAACCAGGCGCTCAGGATGGCAGGGGGAGTGGCGGA<br>AGCCTTTCTGGTCGATCCGATAATCAC (SEQ ID NO: 34)   |
| 0002/LP'/10<br>02   | LSGRSGNHGGSGGSQNQAL<br>RMA (SEQ ID NO: 16) | CTTAGCGGACGCTCTGGCAACCACGGAGGATCTGGAGGA<br>AGTCAGAACCAGGCCTTGCATGGCC (SEQ ID NO: 35)    |
| 1002/LP'/00<br>02   | QNQALRMAGGSGGSLSGRS<br>GNH (SEQ ID NO: 17) | CAAAACCAGGCTCTGCGCATGGCTGGGGGTCTGGTGGG<br>AGCCTGAGCGGGCGGTCAGGAAACCAC (SEQ ID NO: 36)   |

Тяжелая цепь (Hc) антитела против EGFR.

Нуклеотидная последовательность

CAGGTACAGCTGAAACAGTCTGGACCCGGGCTTGTACAGCCTAGTCAGTCACTGTCTAT  
CACCTGTACCGTCTCAGGTTTTAGCCTGACAAATTACGGTGTGATTGGGTACGCCAGTCTCCC  
GGTAAGGGGCTGGAGTGGCTCGGCGTGATCTGGTCCGGGGGAACACAGATTATAATACTCCTT  
TCACATCTAGACTGTCCATCAACAAAGACAACCTCCAAATCGCAGGTTTTTTTCAAGATGAATTC  
CCTGCAATCACAGGACACTGCCATCTATTATTGCGCGAGGGCCCTGACTTATTATGACTATGAG  
TTCGCTTATTGGGGCCAGGGGACGCTTGTGACCGTAAGCGCTGCTAGTACCAAGGGCCCCAGTG  
TGTTCCCCCTTGCCCCCAGCAGTAAGTCCACCTCAGGTGGCACAGCTGCCCTTGGGTGCCTTGT  
GAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACCGTGAGCTGGAATTCGGGAGCCCTTACCAGCGGTGTG  
CATACCTTTCCGGCCGTCCTGCAAAGCAGCGGACTTTACAGTCTGTCTAGCGTGGTCACCGTGC  
CCAGCAGCAGCCTGGGTACACAGACGTATATTTGCAACGTTAATCACAAACCCTCAAACACAAA  
GGTGGACAAGAAAGTGGAGCCTAAATCATGTGATAAGACACATACATGCCCTCCCTGCCCTGCA  
CCGGAGCTCTTAGGTGGACCTTCAGTCTTTTTATTTCACCTAAACCCAAAGATACACTTATGA  
TCTCAGGACACCCGAGGTGACCTGCGTTGTCGTGGATGTCTCACACGAAGACCCTGAAGTGAA  
ATTCAATTGGTATGTTGACGGTGTGAGGTGCATAACGCAAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAG



TATAATAGCACCTATAGGGTAGTCAGCGTACTGACTGTTCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGTA  
 AAGAGTACAAATGCAAGGTCTCAAACAAGGCTCTCCCTGCCCCGATCGAGAAGACAATTTCTAA  
 GGCCAAAGGGCAGCCCCGGGAACCACAAGTCTATACCCTGCCACCCAGTCGGGATGAACTAACA  
 AAAAAATCAGGTGTCTCTAACCTGCCTGGTGAAGGGATTTTACCCTTCCGATATAGCTGTGGAGT  
 GGGAGTCTAATGGCCAACCAGAGAATAATTACAAGACTACCCCCCGTTCTTGACAGTGATGG  
 CTCGTCTTCTTATACTCAAATTAACAGTCGACAAATCCCGATGGCAACAGGGCAATGTGTTT  
 AGCTGTAGCGTGATGCATGAAGCCCTGCACAACCATTAACACACAGAAGTCTCTGTCCTGTGCAC  
 CTGGCAAG (SEQ ID NO: 68)

**Аминокислотная последовательность**

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVWSGGNTDY  
 NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGP  
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSL  
 SPGK (SEQ ID NO: 69)

**Легкая цепь антитела против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

ACCCAAATCCTCCTGACCCAGTCCCCTGTTATCCTTTCTGTGTCGCCCCGGGAGCGCGT  
 TAGCTTTAGCTGCCGCGCCAGTCAGTCAATCGGAACAAACATCCATTGGTACCAGCAGCGTACG  
 AACGGCAGTCCAAGGCTGCTGATCAAATACGCAAGTGAATCTATATCGGGGATTCCGTCTCGGT  
 TCAGCGGATCCGGAAGCGGACTGACTTTACGCTCTCCATAAATAGCGTCGAAAGTGAGGACAT  
 TGCAGACTATTACTGTGTCAGCAGAATAACAACCTGGCCGACCACATTTGGGGCCGGAACCAAGTTG  
 GAACTGAAGCGCACTGTGGCAGCTCCTAGTGTTTTATTTTCCCCCCTTCTGACGAGCAACTGA  
 AAAGTGGTACAGCTTCAGTAGTTTGTGTTGCTCAATAATTTCTACCCACGGGAAGCAAAGTGCA  
 GTGGAAAGTCGACAACGCATTACAGAGCGGCAACTCTCAAGAAAGCGTGACGGAGCAGGATAGC  
 AAGGACTCAACATATTCTTGTCTTCCACTCTCACTCTGTCAAGGCTGATTATGAGAAGCATA  
 AGGTGTATGCGTGCGAAGTGACACACCAGGGATTATCAAGCCAGTGACCAAGTCCTTTAACCG  
 TGGCGAATGC (SEQ ID NO: 70)

**Аминокислотная последовательность**

QILLTQSPVILSVSPGERVVFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIP  
 SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111)

**Легкая цепь активируемого антитела 0001 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGCCAGAGCGGCAATGCATCTCCCCCGCGGTTGTCCCGACGGGCCGTACGTGAT  
 GTACGGCAGCTCCGGCGGCAGTGGGGGTAGCGGTGGGTCCGGGCTGAGTGGCCGGTCCGACAAT  
 CACGGGAGCTCGGGAACACAGATTCTGCTGACGCAATCTCCCGTGATCCTCTCGGTCTCACCCG  
 GCGAACGGGTCTCGTTCAGCTGCAGAGCGTCCCAATCAATCGGGACCAATATTCAGTGGTACCA  
 GCAAAGGACTAATGGGTCTCCCCGGCTGCTGATAAAATACGCCTCCGAGTCTATCTCGGGCATC  
 CCATCCCGATTTAGTGGTAGCGGAAGCGGCACTGATTTACCTTGCTATTAAACAGCGTAGAAT  
 CTGAGGACATTGCAGACTATTACTGTGTCAGCAGAATAACAATTGGCCTACAACCTTTCGGCGCCGG  
 GACCAAACCTAGAGTTAAAGCGTACTGTGGCTGCCCCAGCGTTTTTATTTTCCGCCAGCGAC  
 GAACAGCTGAAGTCAGGCACAGCCTCTGTGGTGTGTCTCCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGG  
 CCAAAGTTCAAGTGGAAAGTGACAATGCCTTGAGTCCGGAAACAGTCAAGAGTCCGTGACCGA  
 GCAGGACAGTAAGGATAGCAGTATAGCCTCTCTAGTACTTTAACTACTGTCCAAGGCCGACTAC  
 GAGAAGCACAAGGTGTACGCATGCGAAGTGACCCATCAGGGGCTTCTCTCCCCGTCACCAAGT  
 CTTTCAATCGCGGGGAGTGT (SEQ ID NO: 72)

**Аминокислотная последовательность**

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILS  
 VSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLIN  
 SVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY  
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
 VTGSFNRGEC (SEQ ID NO: 73)

**Легкая цепь активируемого антитела 0001 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATCTCCCCCGCGGTTGTCCCGACGGGCCGTACGTGATGTACGGCAGCTCCGGCGG  
 CAGTGGGGGTAGCGGTGGGTCCGGGCTGAGTGGCCGGTCCGACAATCACGGGAGCTCGGGAACA  
 CAGATTCTGCTGACGAATCTCCCGTGATCCTCTCGGTCTCACCCGGCGAACGGGTCTCGTTCA  
 GCTGCAGAGCGTCCCAATCAATCGGGACCAATATTCACTGGTACCAGCAAAGGACTAATGGGTC  
 TCCCCGGCTGCTGATAAAATACGCCTCCGAGTCTATCTCGGGCATCCCATCCCGATTAGTGGT  
 AGCGGAAGCGGCACTGATTTACCTTGTCTATTAACAGCGTAGAATCTGAGGACATTGCAGACT  
 ATTACTGTGACGAGAATAACAATTGGCTACAACCTTCGGCGCCGGGACCAACTAGAGTTAAA  
 GCGTACTGTGGCTGCCCCAGCGTTTTTATTTTCCGCCAGCGACGAACAGCTGAAGTCAGGC  
 ACAGCCTCTGTGGTGTGTCTCCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTTCAAGTGGAAAG  
 TGGACAATGCCTTGAGTCCGGAACAGTCAAGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGTAAGGATAG  
 CACGTATAGCCTCTCTAGTACTTTAACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTAC  
 GCATGCGAAGTGACCCATCAGGGGCTTTCTCCCCCGTCACCAAGTCTTTCAATCGCGGGGAGT  
 GT (SEQ ID NO: 440)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVSPGER  
 VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESED  
 IADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTGSFN  
 RGEC (SEQ ID NO: 441)

**Легкая цепь активируемого антитела 0002 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGTCAGTCCGGACAGTGTATTTCCCTAGAGGTTGCCCTGACGGGCCGTATGTCAT  
 GTACGGTAGTTCTGGCGGTAGTGGCGGATCTGGCGGCAGTGGGCTGAGCGGACGTAGCGGAAT  
 CACGGCTCATCCGGGACGCAGATACTGCTGACCCAGTCCCCCGTGATCCTGTCCGTGTACCGG  
 GCGAAAGGGTCAGTTTCTTGGCGAGCATCACAGTCCATAGGTACGAATATCCATTGGTACCA  
 GCAGCGGACCAATGGGAGCCCAAGACTGCTCATTAAGTACGCATCTGAGAGTATCTCAGGCATT  
 CCAAGCAGTTTTCCGGCAGTGGGAGCGGCACTGACTTCACCCTCAGCATTAAACAGCGTGAAA  
 GCGAAGACATTGCAGATTACTACTGCCAACAGAACAATAACTGGCTACTACATTGCGGGCAGG  
 AACTAAGTTGGAGCTCAAACGTACCGTCGCTGCTCCTAGCGTATTTATTTCCCTCCTAGCGAT  
 GAACAGTTGAAATCTGGTACCGCTAGTGTGTGTGCTTACTGAACAACTTTATCCCCGGGAGG  
 CCAAGGTACAATGGAAGGTGGACAATGCCCTCCAATCAGGGAACAGCCAGGAGTCTGTTACCGA  
 GCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCTCTACCCTTACATTGAGCAAGGCTGATTAT  
 GAGAAGCATAAGGTCTACGCTTGTGAGGTGACCCATCAGGGGCTCAGCAGCCCGGTGACAAAAA  
 GCTTTAACCGGGGGGAATGC (SEQ ID NO: 74)

**Аминокислотная последовательность:**

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGLSGRSGNHGSSGTQILLTQSPVILS  
 VSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLIN  
 SVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY  
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
 VTGSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

**Легкая цепь активируемого антитела 0002 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGTATTTCCCCTAGAGGTTGCCCTGACGGGCCGTATGTCATGTACGGTAGTTCTGGCGG  
TAGTGGCGGATCTGGCGGCAGTGGGCTGAGCGGACGTAGCGGGAATCACGGCTCATCCGGGACG  
CAGATACTGCTGACCCAGTCCCCCGTGATCCTGTCCGTGTCACCGGGCGAAAGGTCAGTTTCT  
CTTGCCGAGCATCACAGTCCATAGGTACGAATATCCATTGGTACCAGCAGCGGACCAATGGGAG  
CCCAAGACTGCTCATTAAGTACGCATCTGAGAGTATCTCAGGCATTCCAAGCAGGTTTTCCGGC  
AGTGGGAGCGGCACTGACTTCACCCCTCAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAGACATTGCAGATT  
ACTACTGCCAACAGAACATAACTGGCCTACTACATTTCGGGGCAGGAACCTAAGTTGGAGCTCAA  
ACGTACCGCTCGCTGCTCCTAGCGTATTTATTTTCCCTCCTAGCGATGAACAGTTGAAATCTGGT  
ACCGCTAGTGTGTGTGCTTACTGAACAACTTTTATCCCCGGGAGGCCAAGGTACAATGGAAGG  
TGGACAATGCCCTCCAATCAGGGAACAGCCAGGAGTCTGTTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAG  
CACCTACAGCCTGAGCTCTACCCCTTACATTGAGCAAGGCTGATTATGAGAAGCATAAGGTCTAC  
GCTTGTGAGGTGACCCATCAGGGGCTCAGCAGCCCGGTGACAAAAGCTTTAACCGGGGGGAAT  
GC (SEQ ID NO: 442)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSGNHGSSGTQILLTQSPVILSVSPGER  
VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESED  
IADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO: 443)

**Легкая цепь активируемого антитела 1001 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGGCAGTCTGGGCAGTGTATTAGCCCCAGGGGTGCCCCGACGGGCCTTACGTGAT  
GTATGGCAGCTCCGGTGGCAGCGGAGGCTCTGGCGGGAGTGGGATCAGTTCCGGCCTGCTGAGC  
TCCGGGTCAAGCGGGACCCAGATCTTGCTCACCCAATCACCAAGTATCCTAAGCGTGAGCCCTG  
GCGAACGGGTGAGCTTCTCTTGCCGGGCATCTCAGAGTATTGGCACTAACATACACTGGTACCA  
GCAGCGAACCAATGGGTCCCCCGCCTTCTAATCAAATATGCTAGCGAATCCATTTAGGAATT  
CCTAGCCGATTTAGCGGCAGCGGATCAGGCACTGACTTCACTCTGTCAATCAACTCAGTTGAAA  
GCGAGGACATTGCAGACTACTATTGCCAGCAGAATAATAATTGGCCCACTACATTTGGAGCTGG  
AACAAAATTGGAGCTTAAGAGGACAGTGGCTGCGCCTAGTGTATTTATCTTTCCCCCTCTGAC  
GAACAGTTGAAATCGGGAACCGCATCCGTCGTCTGTTTACTGAACAACCTCTATCCAGAGAGG  
CCAAAGTGAGTGGAAAGTGGATAATGCTTTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACGGA  
GCAGGACTCAAAGGATAGTACATACTCCCTGTCTCCACCCTGACTCTGAGTAAGGCCGACTAC  
GAGAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACGCACCAAGGGCTATCGAGCCCGGTACCAAGT  
CTTTCAATCGTGGAGAATGC (SEQ ID NO: 76)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSSGSSGTQILLTQSPVILS  
VSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLIN  
SVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 77)

**Легкая цепь активируемого антитела 1001 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGTATTAGCCCCAGGGGGTGCCCCGACGGGCCCTTACGTGATGTATGGCAGCTCCGGTGG  
 CAGCGGAGGCTCTGGCGGGAGTGGGATCAGTTCGGGCTGCTGAGCTCCGGGTCAAGCGGGACC  
 CAGATCTTGCTACCCAATCACCAGTGATCCTAAGCGTGAGCCCTGGCGAACGGGTGAGCTTCT  
 CTTGCCGGGCATCTCAGAGTATTGGCACTAACATACACTGGTACCAGCAGCGAACCAATGGGTC  
 CCCCCGCTTCTAATCAAATATGCTAGCGAATCCATTTAGGAATTCCTAGCCGATTTAGCGGC  
 AGCGGATCAGGCACTGACTTCACTCTGTCAATCAACTCAGTTGAAAGCGAGGACATTGCAGACT  
 ACTATTGCCAGCAGAATAATAATTGGCCCACTACATTTGGAGCTGGAACAAAATTGGAGCTTAA  
 GAGGACAGTGGCTGCGCCTAGTGTATTTATCTTTCCCCCTCTGACGAACAGTTGAAATCGGGA  
 ACCGCATCCGTCGTCTGTTTACTGAACAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTGCACTGGAAAG  
 TGGATAATGCTTTGCACTGTTGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACGGAGCAGGACTCAAAGGATAG  
 TACATACTCCCTGTCTCCACCCTGACTCTGAGTAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTCTAC  
 GCCTGCGAAGTGACGCACCAAGGGCTATCGAGCCCGGTACCAAGTCTTTCAATCGTGAGAAT  
 GC (SEQ ID NO: 444)

#### Аминокислотная последовательность

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGISSGLLSSGSSGTQILLTQSPVILSVSPGER  
 VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESED  
 IADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
 RGEC (SEQ ID NO: 445)

Легкая цепь активируемого антитела 1002 против EGFR со спейсерной последовательностью.

#### Нуклеотидная последовательность

CAGGGGCAATCAGGACAATGCATCAGCCCTAGGGGCTGCCAGACGGCCCATATGTGAT  
 GTACGGTAGCTCTGGGGGCTCAGGAGCAGCGGGGAAGCGGACAAAACCAGGCCTTACGAATG  
 GCTGGCAGCTCTGGCACCCAGATATTGCTGACGCAGAGTCCAGTTATCCTTAGTGTACGCCCTG  
 GTGAACGGGTTTCATTTAGTTGCCGTGCCTCCAGTCTATTGGAACGAACATTCATTGGTACCA  
 GCAAAGGACCAACGGTTCAACCAGGTGCTTATCAAGTATGCTTCAGAGTCAATCTCCGGGATT  
 CCCTCAAGGTTTTAGGCTCTGGCTCAGGTACCGATTTTACGCTGAGCATCAACTCCGTGGAGA  
 GTGAGGACATTGCTGATTATTACTGTGACGAGAATAACAATTGGCCGACAACTTTCCGCGCCGG  
 CACAAAGCTGGAACCTTAAGCGTACTGTGGCTGCGCCATCTGTCTTCATTTTCCGCCCTCGGAC  
 GAGCAGTTGAAGTCAGGGACCGCCTCTGTCTGTGCCTTCTCAATAACTTCTATCCCAGAGAGG  
 CTAAGTCCAGTGGAAGTTGATAATGCACTTCAGAGCGGGAATAGCCAGGAGAGCGTGACGGA  
 ACAGGACTCTAAGGACTCCACCTATTCTCTCTCATCCACCCTTACTCTCTCTAAAGCCGACTAC  
 GAAAAGCATAAGGTTTATGCTTGCGAAGTCACTCATCAAGGGCTATCTAGTCCGGTCACTAAAA  
 GCTTCAACAGAGGTGAATGT (SEQ ID NO: 78)

#### Аминокислотная последовательность

QQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGQNQALRMAGSSGTQILLTQSPVILS  
 VSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN  
 SVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
 VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 79)

Легкая цепь активируемого антитела 1002 против EGFR.

#### Нуклеотидная последовательность

TGCATCAGCCCTAGGGGCTGCCCAGACGGCCCATATGTGATGTACGGTAGCTCTGGGGG  
 CTCAGGAGGCAGCGGGGAAGCGGACAAAACCAGGCCCTTACGAATGGCTGGCAGCTCTGGCACC  
 CAGATATTGCTGACGCAGAGTCCAGTTATCCTTAGTGTCAGCCCTGGTGAACGGGTTTCATTTA  
 GTTGCCGTGCCTCCAGTCTATTGGAACGAACATTCATTGGTACCAGCAAAGGACCAACGGTTC  
 ACCCAGGTTGCTTATCAAGTATGCTTCAGAGTCAATCTCCGGGATTCCCTCAAGGTTTTCAGGC  
 TCTGGCTCAGGTACCGATTTTACGCTGAGCATCAACTCCGTGGAGAGTGAGGACATTGCTGATT  
 ATTACTGTCAGCAGAATAACAATTGGCCGACAACCTTCGGCGCCGGCACAAGCTGGAACCTAA  
 GCGTACTGTGGCTGCGCCATCTGTCTTCATTTTTCCGCCCTCGGACGAGCAGTTGAAGTCAGGG  
 ACCGCCTCTGTGCTGTGCCTTCTCAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCTAAAGTCCAGTGGAAG  
 TTGATAATGCACTTCAGAGCGGGAATAGCCAGGAGAGCGTGACGGAACAGGACTCTAAGGACTC  
 CACCTATTCTCTCTCATCCACCTTACTCTCTCTAAAGCCGACTACGAAAAGCATAAGGTTTAT  
 GCTTGCGAAGTCACTCATCAAGGGCTATCTAGTCCGGTCACTAAAAGCTTCAACAGAGGTGAAT  
 GT (SEQ ID NO: 446)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSQNQALRMAGSSGTQILLTQSPVILSVSPGER  
 VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESED  
 IADYYCQNNNWPPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
 RGEC (SEQ ID NO: 447)

**Легкая цепь активируемого антитела 2001 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGCCAGTCTGGACAATGTATCAGCCCCGTGGCTGTCCAGACGGTCCCTTACGTTAT  
 GTATGGATCTAGCGGGGCTCTGGAGGGTCTGGCGGCTCTGGAATCTCTAGTGGACTTCTCTCC  
 GGAAGAAGCGATAATCATGGATCCAGCGGGACACAAATCCTGTTGACACAGTCCCCAGTGATCC  
 TGTCAGTCTCGCCCGGAGAAAGGGTGTCTTTCTCTTGTAGGGCTAGTCAGTCTATCGGAACTAA  
 CATCCATTGGTACCAGCAGCGGACAAATGGGAGCCCGAGGCTTCTGATCAAGTATGCTTCAGAG  
 AGTATAAGCGGCATCCCTCAAGATTTAGTGGCAGCGGGTCCGGGACAGATTTACCTTGTCAA  
 TCAATTCTGTGGAATCCGAAGACATTGCAGACTACTATTGCCAGCAAAACAACAACCTGGCCAC  
 CACTTTCGGTGCTGGAACCAAACTCGAGCTGAAACGCACTGTGGCAGCTCCTTCAGTGTTTCATC  
 TTCCACCTAGCGACGAGCAGTTGAAATCGGGGACAGCCTCAGTGGTGTGTCTACTGAACAACT  
 TTTACCCCCCGGAAGCCAACTGCAGTCCAAGCTCCACAATCCGCTGCAATCAGGGAACAGTCA  
 GGAGTCAGTTACAGAGCAGGACTCTAAGGACAGTACATATTCTTTGAGTTCACCTTGACATTA  
 AGCAAGGCAGACTACGAGAAACACAAGGTGTACGCATGTGAAGTTACACACCAGGGCCCTTTCCT  
 CCCAGTTACGAAAAGCTTCAACAGAGGCGAATGC (SEQ ID NO: 80)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGISSGLLSGRSDNHGSSGTQILLTQS  
 PVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF  
 TLSINSVESEDIADYYCQNNNWPPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 81)

**Легкая цепь активируемого антитела 2001 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGTATCAGCCCCGTGGCTGTCCAGACGGTCCTTACGTTATGTATGGATCTAGCGGGG  
 CTCTGGAGGGTCTGGCGGCTCTGGAATCTCTAGTGGACTTCTCTCCGGAAGAAGCGATAATCAT  
 GGATCCAGCGGGACACAAATCCTGTTGACACAGTCCCCAGTGATCCTGTCAGTCTCGCCGGAG  
 AAAGGGTGTCTTTCTCTTGTAGGGCTAGTCAGTCTATCGGAACATAACATCCATTGGTACCAGCA  
 GCGGACAAATGGGAGCCCAGGCTTCTGATCAAGTATGCTTCAGAGAGTATAAGCGGCATCCCC  
 TCAAGATTTAGTGGCAGCGGTCCGGACAGATTTACCTTGTCAATCAATTCTGTGCAATCCG  
 AAGACATTGCAGACTACTATTGCCAGCAAAACAACAAGTGGCCACCCTTTTCGGTGTGGAAC  
 CAAACTCGAGCTGAAACGCACTGTGGCAGCTCCTTCAGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAG  
 CAGTTGAAATCGGGACAGCCTCAGTGGTGTGTCTACTGAACAACTTTTACCCCGGGAAGCCA  
 AAGTGCAGTGGAGGTGACAATGCGCTGCAATCAGGGAACAGTCAGGAGTCAGTTACAGAGCA  
 GGAATCTAAGGACAGTACATATTCTTTGAGTTCACCTTGACATTAAGCAAGGCAGACTACGAG  
 AACACAAGGTGTACGCATGTGAAGTTACACACCAGGGCCTTTCCTCCCAGTTACGAAAAGCT  
 TCAACAGAGGCGAATGC (SEQ ID NO: 448)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGISSGLLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 449)

Легкая цепь активируемого антитела 2002 против EGFR со спейсерной последовательностью.

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGTCAGAGTGGCCAATGCATATCGCCAGAGGATGTCTGACGGACCCTACGTGAT  
 GTACGGGAGTTCTGGGGGAGTGGAGGCTCTGGCGGGTCAGGGATTAGTCCGGCCTCTGTCT  
 GGACGCTCCGGAATCACGGATCATCTGGGACCCAGATCCTCCTGACCCAGTCTCCCGTCATTC  
 TGTCTGTTTCTCCAGGCGAGCGGGTTTCATTTAGCTGTAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACCAA  
 CATCCATTGGTACCAGCAGAGAACTAATGGCAGTCCCAGACTGCTCATTAATATGCAAGCGAA  
 TCAATTTCCGGGATTCTTCTCGCTTCTCGGGATCTGGATCTGGCACCGACTTCACGCTGTCCA  
 TCAACAGCGTGGAGAGTGAGGACATCGCCGATTACTACTGCCAGCAGAACAACAAGTGGCCAAC  
 AACTTTTGGCGCCGGGACCAAGCTTGAGTTAAAGAGAACCGTAGCTGCACCCTCTGTTTTATT  
 TTCCACCCCTCAGACGAGCAGCTTAAGTCAGGAAGTGCAGTGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC  
 TCTACCCGAGAGAGGCTAAAGTCCAGTGAAGGTAGACAATGCCCTTCAGTCTGGCAACTCTCA  
 GGAGAGTGTACAGAGCAGGATTCTAAGGACTCCACGTACAGTCTGAGTTCCACCCTCACCCTC  
 AGTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTCTACGCATGTGAGGTTACTACCCAGGGGCTCAGCT  
 CTCCCGTGACGAAGTCATTTAACAGAGGTGAGTGC (SEQ ID NO: 82)

**Аминокислотная последовательность**

QQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGISSGLLSGRSGNHGSSGTQILLTQS  
 PVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF  
 TLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL  
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 83)

Легкая цепь активируемого антитела 2002 против EGFR.

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATATCGCCAGAGGATGTCTGACGGACCTACGTGATGTACGGGAGTTCTGGGGG  
 GAGTGGAGGCTCTGGCGGGTCAGGGATTAGTTCGGGCTCTTGTCTGGACGCTCCGGAAATCAC  
 GGATCATCTGGGACCCAGATCCTCCTGACCCAGTCTCCCGTCATTCTGTCTGTTTCTCCAGGCG  
 AGCGGGTTTCATTTAGCTGTAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACCAACATCCATTGGTACCAGCA  
 GAGAACTAATGGCAGTCCCAGACTGCTCATTAATATGCAAGCGAATCAATTTCCGGGATTCCCT  
 TCTCGCTTCTCGGGATCTGGATCTGGCACCGACTTCACGCTGTCCATCAACAGCGTGGAGAGTG  
 AGGACATCGCCGATTACTACTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCAACAACCTTTTGGCGCCGGGAC  
 CAAGCTTGAGTTAAAGAGAACCGTAGCTGCACCCTCTGTTTTTCATTTTCCCACCTCAGACGAG  
 CAGCTTAAGTCAGGAACCTGCCAGTGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCGAGAGAGGCTA  
 AAGTCCAGTGAAGGTAGACAATGCCCTTCAGTCTGGCAACTCTCAGGAGAGTGTACAGAGCA  
 GGATTCTAAGGACTCCACGTACAGTCTGAGTTCACCCCTCACCTCAGTAAGGCAGACTACGAG  
 AAGCACAAGTCTACGCATGTGAGGTACTCACCAGGGGCTCAGCTCTCCCGTGACGAAGTCAT  
 TTAACAGAGGTGAGTGC (SEQ ID NO: 450)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSGNHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNREGC (SEQ ID NO: 451)

Легкая цепь активируемого антитела 0001/LP'/1001 против EGFR со спейсерной последовательностью.

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGACAGTCGGGACAGTGCATTTCTCCGAGAGGCTGCCCTGACGGCCCATACGTAAT  
 GTACGGATCATCCGGTGGCAGTGGAGGGTCCGGGGATCCGGTCTAAGCGGCAGAGTGATAAT  
 CATGGAGGCTCTGGCGGGAGCATCAGCTCCGGATTGCTTTCCAGCGGAAGTTCTGGCACTCAAA  
 TTCTGCTGACACAAAGCCCTGTGATCTTGTGTCAGTCTCACCTGGCGAGCGGGTGAGCTTTTCATG  
 CCGGGCTTCCCAGAGCATCGGTACAAATATTTCACTGGTATCAGCAGAGAACCAATGGCAGTCCG  
 CGGTTGCTGATTAGTATGCGAGCGAGAGCATATCAGGCATACCAAGCAGATTTAGCGGGAGTG  
 GCTCTGGGACCGATTTTACACTCAGTATAAATTCAGTGGAGAGCGAGGATATAGCCGACTACTA  
 CTGCCAGCAAAACAATAACTGGCCACCACCTTCGGCGCAGGGACCAAGCTTGAAGTGAAGCGT  
 ACAGTTGCCGCCCAAGCGTATTTATTTTCCCTCCAAGCGACGAACAGCTGAAAAGCGGTACCG  
 CAAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTTTACCAAGGGAAGCTAAGGTGCAGTGAAGGTTGA  
 CAATGCGCTGCAGTCAGGCAACTCCCAGGAATCGGTAACAGAGCAGGACTCCAAGGATTCAACT  
 TATAGTCTTAGTAGTACCCTTACTCTTTCCAAAGCTGATTATGAAAAACACAAAGTGATGCAT  
 GCGAGGTGACCCACCAAGGACTGTATCTCCTGTCACCAAGTCCTTCAACCGGGGAGAGTGT  
 (SEQ ID NO: 84)

**Аминокислотная последовательность**

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSDNHGSGSGSISSGLLSSGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKH  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 85)

Легкая цепь активируемого антитела против EGFR 0001/LP'/1001.

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATTTCTCCGAGAGGCTGCCCTGACGGCCCATACGTAATGTACGGATCATCCGGTGG  
 CAGTGGAGGGTCCGGGGATCCGGTCTAAGCGGCAGAGTGATAATCATGGAGGCTCTGGCGGG  
 AGCATCAGCTCCGGATTGCTTTCCAGCGGAAGTTCTGGCACTCAAATTTGCTGACACAAAGCC  
 CTGTGATCTTGTGTCAGTCTCACCTGGCGAGCGGGTGAGCTTTTCATGCCGGGCTTCCCAGAGCAT  
 CGGTACAAATATTTCACTGGTATCAGCAGAGAACCAATGGCAGTCCGCGGTTGCTGATTAGTAT

GCGAGCGAGAGCATATCAGGCATACCAAGCAGATTTAGCGGGAGTGGCTCTGGGACCGATTTTA  
 CACTCAGTATAAATTCAGTGGAGAGCGAGGATATAGCCGACTACTACTGCCAGCAAAACAATAA  
 CTGGCCACCACCTTCGGCGCAGGGACCAAGCTTGAAGCTGAAGCGTACAGTTGCCGCCCCAAGC  
 GTATTTATTTTCCCTCCAAGCGACGAACAGCTGAAAAGCGGTACCGCAAGCGTTGTGTGCCTGC  
 TGAATAACTTTTACCCAAGGGAAGCTAAGGTGCAGTGAAGGTTGACAATGCGCTGCAGTCAGG  
 CAACTCCCAGGAATCGGTAACAGAGCAGGACTCCAAGGATTCAACTTATAGTCTTAGTAGTACC  
 CTTACTCTTTCCAAAGCTGATTATGAAAAACACAAAGTGTATGCATGCGAGGTGACCCACCAAG  
 GACTGTCATCTCCTGTACCAAGTCCTTCAACCGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 452)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSDNHGGSGSGSISSGLLSSGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 453)

Легкая цепь активируемого антитела 1001/LP'/0001 против EGFR со спейсерной последовательно-  
 стью.

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGTCAGAGCGGCCAGTGCATTAGTCCTCGCGGTTGCCCTGATGGACCATACGTAAT  
 GTATGGAAGCTCTGGTGGATCCGGGGGCTCTGGCGGATCAGGAATCTCCAGCGGGCTGCTCTCA  
 TCAGGTGGCAGCGGGGGCTCATTAAGCGGCCGAAGTGACAATCACGGCTCGTCCGGTACACAGA  
 TTCTGCTCACTCAGTCACCCGTTTACTGTCTGTGTGCGCTGGAGAGCGTGTGAGCTTTTCATG  
 TAGAGCCTCGCAGTCAATAGGCACGAATATACACTGGTACCAGCAGAGAACTAATGGAAGCCCA  
 AGGTTGCTCATCAAATACGCATCTGAGTCGATTAGCGGCATTCCGTCCAGGTTTAGTGGCAGTG  
 GAAGCGGCACCGATTTCACTTTGTCTATTAAGTCTGTGGAAGCGAGGACATCGCCGATTATTA  
 TTGTGTCAGCAGAATAACAATTGGCCCACCACCTTCGGTGCCGGTACTAAGCTGGAGCTGAAACGT  
 ACAGTTGCCGCTCCCTCTGTGTTTATTTTCCCTCCCTCGGATGAGCAACTCAAATCAGGGACAG  
 CGAGTGTCTGATGTCTCCTGAACAATTTTTACCCACGTGAAGCTAAAGTTCAGTGGAAGGTGGA  
 CAACGCTCTGCAGTCCGGCAACAGTCAGGAAAGCGTAACTGAACAGGACTCAAAGGATAGCACT  
 TACTCCTTGAGCAGCACTCTCACTCTTTCCAAGGCTGATTATGAGAAGCACAAGGTGTACGCGT  
 GTGAAGTCACCCATCAGGGACTGTCAAGTCCGGTGACTAAATCATTTAACAGGGGCGAATGC  
 (SEQ ID NO: 86)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGSISSGLLSSGSGSGSLSGRSDNHGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (SEQ ID NO: 87)

Легкая цепь активируемого антитела 1001/LP'/0001 против EGFR.

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATTAGTCCTCGCGGTTGCCCTGATGGACCATACGTAATGTATGGAAGCTCTGGTGG  
 ATCCGGGGGCTCTGGCGGATCAGGAATCTCCAGCGGGCTGCTCTCATCAGGTGGCAGCGGGGGC  
 TCATTAAGCGGCCGAAGTGACAATCACGGCTCGTCCGGTACACAGATTCTGCTCACTCAGTCAC  
 CCGTTTACTGTCTGTGTGCGCTGGAGAGCGTGTGAGCTTTTCATGTAGAGCCTCGCAGTCAAT  
 AGGCACGAATATACACTGGTACCAGCAGAGAACTAATGGAAGCCCAAGGTTGCTCATCAAATAC  
 GCATCTGAGTCGATTAGCGGCATTCCGTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGAAGCGGCACCGATTTCA  
 CTTTGTCTATTAAGTCTGTGGAAGCGAGGACATCGCCGATTATTATTGTGTCAGCAGAATAACAA  
 TTGGCCCACCACCTTCGGTGCCGGTACTAAGCTGGAGCTGAAACGTACAGTTGCCGCTCCCTCT  
 GTGTTTATTTTCCCTCCCTCGGATGAGCAACTCAAATCAGGGACAGCGAGTGTCTGATGTCTCC  
 TGAACAATTTTTACCCACGTGAAGCTAAAGTTCAGTGGAAGGTGGACAACGCTCTGCAGTCCGG  
 CAACAGTCAGGAAAGCGTAACTGAACAGGACTCAAAGGATAGCACTTACTCCTTGAGCAGCACT  
 CTCACCTTTCCAAGGCTGATTATGAGAAGCACAAGGTGTACGCGTGTGAAGTCACCCATCAGG  
 GACTGTCAAGTCCGGTGACTAAATCATTTAACAGGGGCGAATGC (SEQ ID NO: 454)



**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSSGGSGSGSLSGRSDNHGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 455)

Легкая цепь активируемого антитела 0002/LP'/1001 против EGFR со спейсерной последовательностью.

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGCCAGAGTGGGCAGTGTATTTCCCTCGCGGATGTCCCGACGGTCCATACGTAAT  
 GTATGGGTCAAGCGGGGATCAGGAGGAAGTGGAGGCTCCGGACTCAGCGGTGCTCCGGCAAT  
 CACGGGGGGTCTGGCGGATCAATAAGTTCGGGCCTCCTGAGCTCCGGTTCATCTGGCACTCAGA  
 TCCTGCTCACGCAGTCGCCGTAATACTGAGTGTCTCACCAGGCGAGCGTGTGAGCTTCAGCTG  
 TCGCGCTCACAGTCAATCGGCACAAATATCCATTGGTACCAGCAAAGACCAATGGCAGCCCT  
 AGGCTGCTGATAAAATACGCATCCGAGTCAATTCAGGGATTCCATCGAGATTCTCGGGCAGCG  
 GAAGTGGGACCGACTTTACTCTCTCCATCAACAGCGTCGAGTCGGAGGACATCGCGGACTACTA  
 CTGCCAGCAGAATAACAATTTGGCCAACAACATTCGGCGCAGGAACAAAGCTAGAGCTCAAGAGG  
 ACAGTGGCTGCACCCAGTGTATTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAACTGAAGAGCGGGACGG  
 CTTCGTCGTTTGTCTATTAAATAATTTCTATCCCGTGAGGCTAAAGTTCAGTGAAGGTTGA  
 TAATGCGTTGCAGTCCGGCAACTCCCGGAATCCGTACAGAGCAGGATTCTAAGGATTCAACC  
 TATAGCTTAAGCTCTACACTTACGCTTTCTAAAGCCGATTATGAAAAACACAAGGTGTACGCTT  
 GTGAGGTTACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCGTTCAACCGGGGCGAGTGT  
 (SEQ ID NO: 88)

**Аминокислотная последовательность**

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSGNHGSGSGSISSGLLSSGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKH  
 KYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

Легкая цепь активируемого антитела 0002/LP'/1001 против EGFR.

**Нуклеотидная последовательность**

TGTATTTCCCTCGCGGATGTCCCGACGGTCCATACGTAATGTATGGGTCAAGCGGGG  
 ATCAGGAGGAAGTGGAGGCTCCGGACTCAGCGGTGCTCCGGCAATCACGGGGGTCTGGCGGA  
 TCAATAAGTTCGGGCCTCCTGAGCTCCGGTTCATCTGGCACTCAGATCCTGCTCACGCAGTCGC  
 CGGTAATACTGAGTGTCTCACCAGGCGAGCGTGTGAGCTTCAGCTGTGCGCGCTCACAGTCAAT  
 CGGCACAAATATCCATTGGTACCAGCAAAGACCAATGGCAGCCCTAGGCTGCTGATAAAATAC  
 GCATCCGAGTCAATTTAGGGATTCCATCGAGATTCTCGGGCAGCGGAAGTGGGACCGACTTTA  
 CTCTCTCCATCAACAGCGTCGAGTCGGAGGACATCGCGGACTACTACTGCCAGCAGAATAACAA  
 TTGGCCAACAACATTCGGCGCAGGAACAAAGCTAGAGCTCAAGAGGACAGTGGCTGCACCCAGT  
 GTATTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAACTGAAGAGCGGGACGGCTTCCGTCGTTTGTCTAT  
 TAAATAATTTCTATCCCGTGAGGCTAAAGTTCAGTGAAGGTTGATAATGCGTTGCAGTCCGG  
 CAACTCCAGGAATCCGTACAGAGCAGGATTCTAAGGATTCAACCTATAGCTTAAGCTCTACA  
 CTTACGCTTTCTAAAGCCGATTATGAAAAACACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTTACCCACCAGG  
 GCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCGTTCAACCGGGGCGAGTGT (SEQ ID NO: 456)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGSLSGRSGNHGSGSGSISSGLLSSGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 457)

Легкая цепь активируемого антитела 1001/LP'/0002 против EGFR со спейсерной последовательностью.

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGACAGAGCGGACAGTGTATCTCACCTCGCGGCTGCCCCGACGGCCCTTACGTCAT  
GTACGGCTCCTCGGGTGGGTCCGGGGGAAGTGGCGGGTCTGGCATTAGTTCAGGGCTCTTATCT  
TCCGGCGGAAGCGGGGATCTCTTTCCGGGCGGAGTGGCAATCACGGCAGTAGCGGAACCTCAGA  
TCCTACTCACTCAGTCACCAAGTGATCCTGTCTGTCTCAGTCCAGGGGAGAGAGTGTCTTTCAGTTG  
TAGAGCTTCCCAGTCTATTGGGACAAACATTCACTGGTATCAACAGCGAACTAATGGATCGCCA  
AGACTCCTGATTAAATATGCTTCTGAGAGCATCTCTGGAATCCATCAAGATTCTCAGGGAGTG  
GTAGCGGCACCGATTTTACGTTATCGATCAATTCGGTTGAGAGCGAAGATATCGCGGACTATTA  
CTGTCTCAGCAGAACATAAAGTGGCCTACAACGTTCCGGGCGAGGACGAAATTGGAGCTGAAGCGG  
ACCGTCGCGCGCCCAAGCGTGTTCATCTTCCCCCTAGCGACGAGCAATTGAAAAGCGGCACCG  
CAAGTGTGGTTTGCCTGCTGAACAACCTTTATCCTCGCGAGGCGAAAGTGCAGTGAAAGTCGA  
CAATGCACTCCAGTCAGGGAACAGCCAAGAGTCCGTTACTGAACAAGACTCTAAAGATAGTACT  
TATAGCTTATCCAGCACACTGACGCTCAGTAAGGCCGATTATGAAAAACATAAGGTGTATGCGT  
GTGAGGTTACCCATCAAGGATTGTCTACCCCGTCACCAAATCCTTTAACAGAGGAGAATGT

(SEQ ID NO: 90)

**Аминокислотная последовательность**

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGSGISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNHGSS  
GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
SGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 91)

**Легкая цепь активируемого антитела 1001/LP'/0002 против EGFR.****Нуклеотидная последовательность**

TGTATCTCACCTCGCGGCTGCCCCGACGGCCCTTACGTCATGTACGGCTCCTCGGGTGG  
GTCCGGGGGAAGTGGCGGGTCTGGCATTAGTTCAGGGCTCTTATCTTCCGGCGGAAGCGGGGA  
TCTCTTTCCGGGCGGAGTGGCAATCACGGCAGTAGCGGAACCTCAGATCCTACTCACTCAGTCAC  
CAGTGATCCTGTCTGTCTCAGTCCAGGGGAGAGAGTGTCTTTCAGTTGTAGAGCTTCCCAGTCTAT  
TGGGACAAACATTCACTGGTATCAACAGCGAACTAATGGATCGCCAAGACTCCTGATTAAATAT  
GCTTCTGAGAGCATCTCTGGAATCCATCAAGATTCTCAGGGAGTGGTAGCGGCACCGATTTTA  
CGTTATCGATCAATTCGGTTGAGAGCGAAGATATCGCGGACTATTACTGTCTCAGCAGAACATAA  
CTGGCCTACAACGTTCCGGGCGAGGACGAAATTGGAGCTGAAGCGGACCGTCGCGCGCCCAAGC  
GTGTTTCATCTTCCCCCTAGCGACGAGCAATTGAAAAGCGGCACCGCAAGTGTGGTTTGCCTGC  
TGAACAACCTTTATCCTCGCGAGGCGAAAGTGCAGTGAAAGTCGACAATGCACTCCAGTCAGG  
GAACAGCCAAGAGTCCGTTACTGAACAAGACTCTAAAGATAGTACTTATAGCTTATCCAGCACA  
CTGACGCTCAGTAAGGCCGATTATGAAAAACATAAGGTGTATGCGTGTGAGGTTACCCATCAAG  
GATTGTCTACCCCGTCACCAAATCCTTTAACAGAGGAGAATGT (SEQ ID NO: 458)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGSGISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNHGSSGTQILL  
TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 459)

**Легкая цепь активируемого антитела 0001/LP'/1002 против EGFR со спейсерной последовательностью.****Нуклеотидная последовательность**

CAGGGTCAAAGTGGACAGTGTATCTCGCCCCGCGGCTGCCAGACGGCCCATATGTGAT  
 GTATGGTTCTTCCGGTGGATCCGGCGGATCAGGTGGGTCTGGCCTCTCAGGTCGTTCCGACAAC  
 CACGGCGGCTCAGGTGGGTCTCAGAATCAGGCACTGCGGATGGCCGGATCTTCTGGCACCAGAG  
 TATTGCTCACACAGTCACCAAGTTATTCTGTCCGTATCTCCAGGAGAACGGGTATCTTTCTCTTG  
 TAGGGCAAGCCAGTCCATCGGAACAAACATCCATTGGTACCAGCAGCGGACCAATGGCAGTCCA  
 CGGCTTCTGATCAAGTATGCTAGTGAAAGCATTAGCGGGATTCCAAGCCGATTTTCTGGGTCGG  
 GTAGTGGAACCGACTTCACCTGAGCATTAACCTCTGTGCAATCCGAAGATATTGCTGACTATTA  
 CTGTCTCAGCAGAACAAACAAATTGGCCGACTACGTTTGGCGCCGGAACCAATTAGAACTTAAGAGA  
 ACCGTGGCCGCTCCCTCTGTCTTCATTTTCCCGCCTTCCGACGAACAGCTGAAGAGCGGAAGT  
 CCTCCGTGGTGTGCCTGTTGAATAACTTTTATCCAAGGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAGTGGGA  
 CAATGCTCTGCAGTCTGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACTGAACAGGACAGTAAAGACTCAACC  
 TACTCACTGAGCAGTACTCTCACATTATCCAAAGCCGATTATGAAAAGCATAAGGTTTATGCAT  
 GCGAGGTTACCCACCAGGAGTCTGAGCTCCCCCGTGACCAAAAGCTTCAATAGGGGTGAGTGC  
 (SEQ ID NO: 92)

**Аминокислотная последовательность**

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSDNHGGSGGSQNQALRMAGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)

**Легкая цепь активируемого антитела 0001/LP/1002 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGTATCTCGCCCCGCGGCTGCCAGACGGCCCATATGTGATGTATGGTTCTTCCGGTGG  
 ATCCGGCGGATCAGGTGGGTCTGGCCTCTCAGGTCGTTCCGACAACCACGGCGGCTCAGGTGGG  
 TCTCAGAATCAGGCACTGCGGATGGCCGGATCTTCTGGCACCCAGATATTGCTCACACAGTCAC  
 CAGTTATTCTGTCCGTATCTCCAGGAGAACGGGTATCTTTCTCTTGTAGGGCAAGCCAGTCCAT  
 CGGAACAAACATCCATTGGTACCAGCAGCGGACCAATGGCAGTCCACGGCTTCTGATCAAGTAT  
 GCTAGTGAAAGCATTAGCGGGATTCCAAGCCGATTTTCTGGGTGGGTAGTGGAACCGACTTCA  
 CCCTGAGCATTAACCTCTGTGCAATCCGAAGATATTGCTGACTATTACTGTCTCAGCAGAACAA  
 TTGGCCGACTACGTTTGGCGCCGGAACCAAAATTAGAACTTAAGAGAACCGTGGCCGCTCCCTCT  
 GTCTTCATTTTCCCGCCTTCCGACGAACAGCTGAAGAGCGGAAGTGCCTCCGTGGTGTGCCTGT  
 TGAATAACTTTTATCCAAGGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAGTGGACAATGCTCTGCAGTCTGG  
 CAATAGCCAGGAGTCCGTGACTGAACAGGACAGTAAAGACTCAACCTACTCACTGAGCAGTACT  
 CTCACATTATCCAAAGCCGATTATGAAAAGCATAAGGTTTATGCATGCGAGGTTACCCACCAGG  
 GACTGAGCTCCCCCGTGACCAAAAGCTTCAATAGGGGTGAGTGC (SEQ ID NO: 460)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSLSGRSDNHGGSGGSQNQALRMAGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 461)

**Легкая цепь активируемого антитела 1002/LP/0001 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGGCAGTCCGGACAATGCATCAGCCCCGAGGCTGCCCTGATGGCCCCCTACGTGAT  
 GTACGGGTCCAGCGGTGGCAGCGGGGGCTCAGGGGGGAGCGGGCAGAATCAGGCCCTGAGAATG  
 GCGGGTGGATCCGGGGGGTCCCTTTCTGGCAGGTCCGATAACCACGGTTCTAGTGGAACACAGA  
 TTTTGCTGACACAAAGTCCCGTCATCCTCTCTGTGTCTCCCGGTGAGCGGGTCAGTTTTTCCTG  
 CCGAGCGTCCCAGAGCATCGGGACAAATATCCATTGGTACCAGCAGAGAACGAACGGCTCTCCT  
 AGACTGCTCATCAAGTACGCCTCGGAAAGTATTTCCGGCATTCCTCCCGTTTCAGCGGCTCCG  
 GAAGTGGTACAGATTTTACCCTGAGTATTAATTCCGTGGAATCTGAGGACATAGCCGACTACTA  
 TTGCCAACAGAATAACAATTGGCCAACAACTTTGGCGCCGGGACTAAGCTGGAGCTGAAACGG  
 ACCGTCGCAGCACCAAGTGTTTTTCATCTTCCCACCAAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAG  
 CGAGCGTGGTGTGCCTACTCAATAACTTCTATCCACGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGA  
 CAACGCTCTGCAGTCCGGCAATAGCCAGGAAAGCGTGACAGAGCAAGATTCTAAGGACAGTACG  
 TATTCAGTGTCCAGTACGCTCACCTTAAGCAAGGCTGACTACGAAAAACACAAGGTCTACGCCT  
 GTGAGGTCACACATCAGGGCCTCTCCAGTCCGGTTACAAAAAGTTTCAATCGCGGGGAATGT  
 (SEQ ID NO: 94)

**Аминокислотная последовательность**

QQSGQCISPRGCPDGPYVMYSSSGSGSGSGSQNALRMAGSGSGSLSGRSDNHGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)

**Легкая цепь активируемого антитела 1002/LP'/0001 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATCAGCCCCGAGGCTGCCCTGATGGCCCCCTACGTGATGTACGGGTCCAGCGGTGG  
 CAGCGGGGGCTCAGGGGGGAGCGGGCAGAATCAGGCCCTGAGAATGGCGGGTGGATCCGGGGGG  
 TCCCTTTCTGGCAGGTCCGATAACCACGGTTCTAGTGGAACACAGATTTTGCTGACACAAAGTC  
 CCGTCATCCTCTCTGTGTCTCCCGGTGAGCGGGTCAGTTTTTCCTGCCGAGCGTCCCAGAGCAT  
 CGGGACAAATATCCATTGGTACCAGCAGAGAACGAACGGCTCTCCTAGACTGCTCATCAAGTAC  
 GCCTCGGAAAGTATTTCCGGCATTCCTCCCGTTTCAGCGGCTCCGGAAGTGGTACAGATTTTA  
 CCCTGAGTATTAATTCCGTGGAATCTGAGGACATAGCCGACTACTATTGCCAACAGAATAACAA  
 TTGGCCAACAACTTTGGCGCCGGGACTAAGCTGGAGCTGAAACGGACCGTCGCAGCACCAAGT  
 GTTTTCATCTTCCCACCAAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCGAGCGTGGTGTGCCTAC  
 TCAATAACTTCTATCCACGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGAACAGCTCTGCAGTCCGG  
 CAATAGCCAGGAAAGCGTGACAGAGCAAGATTCTAAGGACAGTACGTATTCAGTGTCCAGTACG  
 CTCACCTTAAGCAAGGCTGACTACGAAAAACACAAGGTCTACGCCTGTGAGGTCACACATCAGG  
 GCCTCTCCAGTCCGGTTACAAAAAGTTTCAATCGCGGGGAATGT (SEQ ID NO: 462)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYSSSGSGSGSGSQNALRMAGSGSGSLSGRSDNHGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 463)

**Легкая цепь активируемого антитела 0002/LP'/1002 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAAGGCCAATCCGGTCAGTGCATCAGTCCCAGAGGCTGCCCTGACGGGCCCTACGTGAT  
 GTATGGTAGCTCAGGGGGCTCCGGCGGCTCCGGCGGAAGCGGACTTAGCGGCCGTAGCGGCAAC  
 CATGGGGGTTCTGGAGGATCCCAGAATCAGGCTCTGCGCATGGCTGGAAGCAGCGGTACCCAGA  
 TCCTGCTCACCCAATCACCCGTCATCTTGTCTGTGAGTCCTGGCGAAAGGGTGTCTTCTCTTG  
 TCGCGCGTCCCAGTCCATTGGGACCAACATTCATTGGTACCAGCAGAGGACTAACGGGAGCCCC  
 CGCCTGCTGATCAAATACGCCAGTGAATCTATCTCTGGAATCCCATCACGATTTTCAGGGTCCG  
 GTAGTGGGACCGACTTCACTTTGAGTATTAACAGTGTGGAATCCGAGGACATAGCCGACTATTA  
 CTGTACAGCAGAACAATAACTGGCCAACAACCTTTGGCGCCGGGACAAAGTTAGAGCTTAAGCGG  
 ACTGTTGACGCCCCCTCCGTTTTTATCTTCCCGCCAGTGATGAACAGCTGAAAAGCGGTACCG  
 CCTCCGTAGTGTGCCTTCTCAATAATTTTACCCCAGAGAAGCTAAAGTACAGTGGAAAGTCGA  
 CAACGCCCCCAGAGCGGCAACAGTCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGATTTCTAAAGACTCAACA  
 TATAGCCTTTTCGTCCACCTAACACTTTCAAAAGCAGACTATGAAAAACATAAGGTGTATGCCT  
 GCGAGGTCACACACCAGGGGCTCAGCTCTCCAGTTACTAAGTCATTCAACCGCGGAGAGTGT  
 (SEQ ID NO: 96)

**Аминокислотная последовательность**

QQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGLSGRSGNHGGSGGSQNQALRMAGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 97)

**Легкая цепь активируемого антитела 0002/LP'/1002 против EGFR.**

**Нуклеотидная последовательность**

TGCATCAGTCCCAGAGGCTGCCCTGACGGGCCCTACGTGATGTATGGTAGCTCAGGGGG  
 CTCGGCGGCTCCGGCGGAAGCGGACTTAGCGGCCGTAGCGGCAACCATGGGGTTCTGGAGGA  
 TCCCAGAATCAGGCTCTGCGCATGGCTGGAAGCAGCGGTACCCAGATCCTGCTCACCCAATCAC  
 CCGTCATCTTGTCTGTGAGTCCTGGCGAAAGGGTGTCTTCTCTTGTGCGCGTCCCAGTCCAT  
 TGGGACCAACATTCATTGGTACCAGCAGAGGACTAACGGGAGCCCCCGCTGCTGATCAAATAC  
 GCCAGTGAATCTATCTCTGGAATCCCATCACGATTTTCAGGGTCCGGTAGTGGGACCGACTTCA  
 CTTTGAGTATTAACAGTGTGGAATCCGAGGACATAGCCGACTATTACTGTCAGCAGAACAATAA  
 CTGGCCAACAACCTTTGGCGCCGGGACAAAGTTAGAGCTTAAGCGGACTGTTGCAGCCCCCTCC  
 GTTTTTATCTTCCCGCCAGTGATGAACAGCTGAAAAGCGGTACCGCTCCGTAGTGTGCCTTC  
 TCAATAATTTTACCCCAGAGAAGCTAAAGTACAGTGGAAAGTCGACAACGCCCTCCAGAGCGG  
 CAACAGTCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGATTTCTAAAGACTCAACATATAGCCTTTTCGTCCAC  
 CTAACACTTTTCAAAAGCAGACTATGAAAAACATAAGGTGTATGCCTGCGAGGTCACACACCAGG  
 GGCTCAGCTCTCCAGTTACTAAGTCATTCAACCGCGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 464)

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGLSGRSGNHGGSGGSQNQALRMAGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSSGSGS  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 465)

**Легкая цепь активируемого антитела 1002/LP'/0002 против EGFR со спейсерной последовательностью.**

**Нуклеотидная последовательность**

CAGGGCCAATCAGGTCAGTGCATTAGCCCCGAGGGTGTCCCGATGGGCCCTACGTAAT

GTACGGATCATCGGGCGGATCTGGGGGCTCCGGTGGCTCTGGTCAGAATCAAGCTCTGCGCATG  
 GCCGGAGGTAGCGGTGGAAGCCTGAGCGGCCGAAGTGGAAACCACGGCTCCTCTGGCACTCAGA  
 TTCTTCTCACGCAGTCGCCGTGATCTTGTCCTGAGCCAGGCGAGCGGGTGAGCTTCTCTTG  
 CCGGGCCAGCCAAAGTATAGGTACAAATATTCTACTGGTACCAACAGCGAACCAACGGGTGCGCT  
 AGGTTGCTCATAAAGTACGCATCCGAGAGTATAAGCGGCATACCATCTAGGTTCTCAGGTAGCG  
 GCAGCGGGACCGATTTTACCCTCAGCATTAATTCGGTTGAATCTGAAGATATCGCCGATTATTA  
 TTGTACAGCAGAATAACAATTGGCCTACTACTTTTCGGCGCCGAACAAAGCTGGAACCTAAGCGC  
 ACAGTGGCCGCTCCTTCTGTCTTTATCTTCCCTCCATCTGACGAGCAATTAAGAGTGGGACAG  
 CCTCGGTGGTGTGTTTGTCTCAATAACTTCTATCCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAGTCTGA  
 TAACGCTCTCCAGAGTGGGAATTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGATTCTAAAGATAGCACA  
 TACTCACTGTCTTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTTTACGCCCT  
 GTGAAGTGACACACCAGGGCCTCAGCTCTCCTGTCAAAAGAGTTTTAATCGGGGCGAGTGT

(SEQ ID NO: 98)

#### Аминокислотная последовательность

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYSSSGSGSGSGSQNALRMAGSGGSLSGRSGNHGSS  
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF  
 SSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLK  
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 99)

#### Легкая цепь активируемого антитела 1002/LP/0002 против EGFR.

##### Нуклеотидная последовательность

TGCATTAGCCCCGAGGGTGTCCCGATGGGCCCTACGTAATGTACGGATCATCGGGCGG  
 ATCTGGGGGCTCCGGTGGCTCTGGTCAGAATCAAGCTCTGCGCATGGCCGGAGGTAGCGGTGGA  
 AGCCTGAGCGGCCGAAGTGGAAACCACGGCTCCTCTGGCACTCAGATTCTTCTCACGCAGTCGC  
 CCGTGATCTTGTCCTGAGCCAGGCGAGCGGGTGAGCTTCTTGGCCGGGCCAGCCAAAGTAT  
 AGGTACAAATATTCTACTGGTACCAACAGCGAACCAACGGGTGCGCTAGGTTGCTCATAAAGTAC  
 GCATCCGAGAGTATAAGCGGCATACCATCTAGGTTCTCAGGTAGCGGCAGCGGGACCGATTTTA  
 CCCTCAGCATTAATTCGGTTGAATCTGAAGATATCGCCGATTATTATTGTCAGCAGAATAACAA  
 TTGGCCTACTACTTTTCGGCGCCGAACAAAGCTGGAACCTAAGCGCACAGTGGCCGCTCCTTCT  
 GTCTTTATCTTCCCTCCATCTGACGAGCAATTAAGAGTGGGACAGCCTCGGTGGTGTGTTTGC  
 TCAATAACTTCTATCCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAGGTGATAACGCTCTCCAGAGTGG  
 GAATTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGATTCTAAAGATAGCACATACTCACTGTCTTCCACC  
 CTGACCCTGTCCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTTTACGCCTGTGAAGTGACACACCAGG  
 GCCTCAGCTCTCCTGTCAAAAGAGTTTTAATCGGGGCGAGTGT (SEQ ID NO: 466)

##### Аминокислотная последовательность

CISPRGCPDGPYVMYSSSGSGSGSGSQNALRMAGSGGSLSGRSGNHGSSGTQILL  
 TQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
 TDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 467)

В исследованиях, описываемых в настоящем описании, использовали следующие ниже вещества.

Реагенты и штаммы. u-PA человека (Research & Diagnostics Systems, Inc.) использовали без модификаций. Матриптазу человека (Research & Diagnostics Systems, Inc.) использовали без модификаций. MMP14 человека (Research & Diagnostics Systems, Inc.) активировали согласно протоколу поставщика и использовали без модификаций. Использовали буфер MMP14 HCM (50 mM HEPES (pH 6,8), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Использовали буфер TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, pH 7,4) для u-PA и матриптазы.

Для оценки активности субстрата in vitro в активируемых антителах использовали следующие ниже способы.

Протеолиз субстрата. Способность субстратов в активируемых антителах расщепляться под действием u-PA, матриптазы и/или MMP14 определяли так, как указано ниже. Образцы инкубировали в течение ночи в течение от 16 до 24 ч при 37°C в присутствии или в отсутствии протеазы в PBS pH 7,2. Протеазы подготавливали так, чтобы поддерживать отношение активируемого антитела к протеазе 9 к 1. Протеолиз подтверждали капиллярным электрофорезом, ELISA или SDS-PAGE.

Кинетика расщепления субстрата ( $k_{cat}/K_m$ ): способность активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты, 2001, 2002, 0001/LP'/1001 или 1001/LP'/0001, расщепляться под действием матрип-тазы и/или MMP14, определяли так, как указано ниже. Расщепление протеазой матриптаза проводили в TBST, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4. Расщепление протеазой MMP14 проводили в HCM, 50 mM HEPES (pH 6,8), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Различные концентрации матриптазы с титрованием по активному центру или MMP14 комбинировали с постоянной концентрацией активируемого антитела для поддержания отношения субстрата к протеазе по меньшей мере 50. Образцы, содержащие эти субстраты, инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Для остановки реакции добавляли 5 мкл протеазы к 7 мкл HT Protein Express Sample (Caliper LifeSciences), содержащего 20 mM 2-меркаптоэтанола, в течение 10 мин при 95°C. После тепловой денатурации 32 мкл добавляли ddH<sub>2</sub>O и анализировали образцы на LabChip GXII по инструкциям производителя. Для количественного определения площади пика легкой цепи использовали программное обеспечение LabChip GXII. Преобразование продукта рассчитывали подстановкой площади пика легкой цепи в следующее ниже уравнение: расщепленная LC/(расщепленная LC+нерасщепленная LC), LC=площадь пика легкая цепь. Значение  $k_{cat}/K_m$  определяли по следующему ниже уравнению:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = -\ln(1 - C)/(t \cdot p)$$

где C представляет собой преобразование продукта, t представляет собой (с) и p представляет собой концентрацию протеазы (M), что предполагает, что концентрация субстрата является меньше  $K_m$  и больше концентрации протеазы.

Следующие ниже способы можно использовать для оценки стабильности субстрата *in vivo* активируемых антител, описываемых в настоящем описании.

В этом разделе описан экспериментальный способ оценки стабильности субстратов *in vivo* вариантов осуществления, где их вводят в активируемые антитела против EGFR и инъецируют мышам.

Три бестимусные мыши (Ctrl:NU-Foxn1nu) получали однократную дозу и/п каждого из активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты 2001, 2002, 0001/LP'/1001, 1001/LP'/0001, 1001/LP'/0002, 0001/LP'/1002 или 0002/LP'/1002, в концентрации 12,5 мг/кг на сутки 0. Мышей подвергали эвтаназии на сутки 4 (~96 ч после введения дозы) посредством асфиксии CO<sub>2</sub> и немедленно собирали кровь в виде плазмы-EDTA и хранили при -80°C.

Активируемые антитела против EGFR выделяли из плазмы иммунопреципитацией антителами против IgG человека с использованием магнитных гранул. Получали элюированные активируемые антитела против EGFR для анализа капиллярным электрофорезом, как описано в разделе  $k_{cat}/K_m$ . В кратком изложении, 5 мкл элюируемого IgG добавляли к 7 мкл буфера Protein Express Sample с 2-меркаптоэтанола. Способ количественного определения стабильности в циркулирующей крови являлся идентичным количественному определению преобразования продукта.

Следующие ниже способы используют для оценки эффективности *in vivo* активируемых антител.

В этом разделе описан экспериментальный способ оценки, какие активируемые антитела против EGFR, содержащие расщепляемые матриптазой субстраты, расщепляемые MMP14 субстраты или субстраты вариантов осуществления, т.е. субстраты, расщепляемые матриптазой и MMP14, являются эффективными *in vivo*. Семь активируемых антител против EGFR, содержащих последовательности субстрата 0001, 0002, 1001, 2001, 2002, 0001/LP'/1001 или 1001/LP'/0001, расщепляемые любой или обеими матриптазой и/или MMP14, вводили при 12,5 мг/кг интраперитонеально (и/п) мышам, несущим ксенотрансплантат опухоли H292 (рак легких) на сутки 0. У мышей отбирали образцы крови ретроорбитальным путем на сутки 8 (~192 ч после введения дозы). Кровь собирали немедленно в виде плазмы-EDTA и хранили при -80°C. Активируемые антитела против EGFR выделяли из плазмы иммунопреципитацией антителами против IgG человека с использованием магнитных гранул. Элюированные активируемые антитела против EGFR получали для анализа капиллярным электрофорезом. В кратком изложении, 5 мкл элюированного IgG добавляли к 7 мкл буфера Protein Express Sample 2-меркаптоэтанола. Количественное определение стабильности в циркулирующей крови являлся идентичным количественному определению преобразования продукта.

На сутки 8 для трех активируемых антител против EGFR, содержащих расщепляемые матриптазой субстраты или расщепляемые MMP14 субстраты, 0001, 0002 или 1001, демонстрировали средние значения процента (%) активации в диапазоне от 14 до 15% и для четырех активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты, 2001, 2002, 0001/LP'/1001 или 1001/LP'/0001, вариантов осуществления, т.е. субстраты, расщепляемые матриптазой и MMP14, демонстрировали средние значения активации % от 28 до 33%. Средние значения % активации рассчитывали как

((сумма преобразования продукта тестируемой группы)×100%)/(число животных в тестируемой группе).

Все семь активируемых антител против EGFR, содержащие последовательности субстрата 0001, 0002, 1001, 2001, 2002, 0001/LP'/1001 или 1001/LP'/0001, также содержали маскирующую группу, содержащую аминокислотную последовательность CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 168), и антитело c225v5 против EGFR, содержащее легкую цепь (SEQ ID NO: 111) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 108).

Конфигурация легкой цепи активируемого антитела являлась маскирующая группа - субстрат - легкая цепь C225v5.

На сутки 21 для трех активируемых антител против EGFR, содержащих расщепляемые матриптазой субстраты или расщепляемые MMP14 субстраты 0001, 0002 или 1001, демонстрировали ингибирование роста опухоли в диапазоне от 41 до 57%, как измеряют по среднему значению процента (%) ингибирования, и для четырех активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты, 2001, 2002, 0001/LP'/1001 или 1001/LP'/0001 вариантов осуществления, т.е. субстраты, расщепляемые матриптазой и MMP14, демонстрировали ингибирование роста опухоли в диапазоне от 77 до 80%, как измеряют по среднему значению % ингибирования. Среднее значение % ингибирования рассчитывают как

$$\frac{(\text{среднее значение}(C) - \text{среднее значение}(C_0)) - (\text{среднее значение}(T) - \text{среднее значение}(T_0))}{(\text{среднее значение}(C) - \text{среднее значение}(C_0))} \times 100\%,$$

где T представляет собой текущее значение тестируемой группы, T<sub>0</sub> представляет собой начальное значение текущей тестируемой группы, C представляет собой значение контрольной группы, и C<sub>0</sub> представляет собой начальное значение контрольной группы. В этом исследовании для антитела против EGFR цетуксимаб на сутки 21 демонстрировали 86% ингибирования.

Пример 3. Визуализация In situ активируемых антител против EGFR.

В настоящем примере описано использование визуализации in situ немеченых активируемых антител против EGFR. Расщепление и связывание детектировали с использованием вторичного антитела, которое специфически связывается с участком АВ активируемого антитела.

Визуализация in situ активации и связывания немеченого активируемого антитела против EGFR 3954-2001-C225v5 на опухолевой ткани рака легких H292 проводили так, как указано. Замороженные тканевые срезы наносили на предметные стекла. Наносили раствор, содержащий немеченые активируемые антитела против EGFR, на ткань и инкубировали, например, в течение 1 ч при комнатной температуре (приблизительно 22-24°C) в буфере для инкубации 10 mM буфер Hepes pH 7,4, содержащий 150 mM NaCl, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> и 0,005% Tween 20; активируемое антитело в концентрации приблизительно 1 мкг/мл. Условия такой инкубации можно регулировать так, чтобы они способствовали расщеплению средства в тканевом срезе, например, путем изменения pH раствора (например, в диапазоне приблизительно от pH 7 приблизительно до pH 8,5), температуры инкубации (например, в диапазоне приблизительно от 20°C приблизительно до 40°C, например, комнатная температура или 37°C), времени инкубации (например, в диапазоне приблизительно от 15 мин приблизительно до 150 мин и/или концентраций активируемого антитела (например, в диапазоне приблизительно от 0,05 мкг/мл приблизительно до 10 мкг/мл). Затем ткань тщательно промывали для удаления не связанного вещества. Наличие активированного антитела на ткани детектировали с использованием вторичного антитела IgG против антитела человека, меченного AlexaFluor-647. Условия такой детекции можно регулировать для детекции реагента и детекции способа визуализации (например, флуоресцентно меченого). Например, когда использовали флуоресцентную метку, ткань подвергали флуоресцентной микроскопии. Как представлено на фиг. 6, для активируемого антитела против EGFR 3954-2001-C225v5 демонстрировали окрашивание с интенсивностью и характером сравнимыми с исходным антителом против EGFR. Флуоресцентный сигнал активируемого антитела против EGFR 3954-2001-C225v5 значительно ингибировали предварительной обработкой ткани с разбавлением 1:100 набора смеси широкого спектра ингибиторов PI (539134, EMD Millipore, Billerica, MA) и 50 mM EDTA.

Пример 4. Дополнительные активируемые антитела, расщепляемые матриксной металлопротеазой (MMP) и сериновой протеазой (SP).

Этот пример демонстрирует получение и оценку дополнительных последовательностей субстрата, которые активируются в присутствии по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (MMP) и по меньшей мере одной сериновой протеазы.

В исследовании, описываемом в настоящем описании, использовали следующие ниже последовательности субстрата.

| Субстрат CM1-CM2 | а.к. последовательность | SEQ ID NO: |
|------------------|-------------------------|------------|
| 2001             | ISSGLLSGRSDNH           | 1          |
| 1004/LP'/0003    | AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG  | 3          |
| 1004/LP'/0001    | AVGLLAPPGGLSGRSDNH      | 7          |
| 2003             | ISSGLLSGRSANPRG         | 469        |
| 2004             | AVGLLAPPTSGRSANPRG      | 470        |
| 2005             | AVGLLAPPSGRSANPRG       | 471        |

Способность субстратов 2001, 1004/LP'/0001, 1004/LP'/0003, 2003, 2004 или 2005 подвергаться расщеплению матриптазой человека и/или uPA человека определяли, как описано выше в примере 2.

Для субстрата 2003 демонстрировали увеличение приблизительно в 50 раз кинетики расщепления для матриптазы по сравнению с субстратом 2001 и для субстрата 2005 демонстрировали увеличение приблизительно в 50 раз кинетики расщепления для матриптазы по сравнению с субстратом 1004/LP'/0001.



Для субстратов 2003 и 2005 также демонстрировали умеренные повышения в диапазоне приблизительно от 3 до 4 раз в кинетике uPA по сравнению с 2001 и 1004/LP/0001, соответственно. Было выявлено, что субстраты 2003 и 2005 также подвергаются расщеплению в присутствии uPA мыши.

Субстраты 2003, 2004 и 2005 вводили в следующие ниже активированные антитела.

Тяжелая цепь антитела против EGFR.

Аминокислотная последовательность

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY  
NTPFTSRLSINKDNSKSKQVFFKMNSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLVTVSAASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK (SEQ ID NO: 108)

Легкая цепь антитела против EGFR.

Аминокислотная последовательность

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIP  
SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE  
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111)

Легкая цепь активируемого антитела 2003 против EGFR.

Аминокислотная последовательность:

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSANPRGGSGTQILLTQSPVIL  
SVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI  
NSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 472)

Легкая цепь активируемого антитела 2003 против EGFR со спейсерной последовательностью.

Аминокислотная последовательность

QQSGGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSANPRGGSGTQILLT  
QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGT  
DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV  
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 473)

Легкая цепь активируемого антитела 2005 против EGFR.

Аминокислотная последовательность

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGAVGLLAPPSSGRSANPRGGSGTQILLTQSPV  
ILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL  
SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 474)

Легкая цепь активируемого антитела 2005 против EGFR со спейсерной последовательностью.

Аминокислотная последовательность

QQSGGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGAVGLLAPPSSGRSANPRGGSGTQIL  
LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 475)

Субстраты, используемые во всех активируемых антителах против EGFR, указанных выше, расщеплялись матрипозой человека, uPA человека, матриксной металлопротеазой 14 человека (MMP14) и матриксной металлопротеазой 9 человека (MMP9).

В этом разделе описана оценка различных активируемых антител против EGFR, представленных выше, в исследовании эффективности на опухоли H292 с использованием ксенотрансплантатов опухоли H292 на мышах nu/nu. Исследование эффективности на опухоли H292 описано в пример 2, а также описано в публикации PCT № WO 2013/163631.

В этом исследовании мышей разделяли на группу и дозировали, как указано в табл. ниже, с использованием контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIG), антитела против EGFR цетуксимаб, активируемого антитела против EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2001 против EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 449; активируемого антитела против EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2003 против EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 472; или активируемого антитела против EGFR, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2005 против EGFR, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 474.

| Группа | Количество | Обработка                                | Доза (мг/кг) | Режим            |
|--------|------------|------------------------------------------|--------------|------------------|
| 1      | 8          | IVIG                                     | 9            | Однократная доза |
| 2      | 8          | Цетуксимаб                               | 9            | Однократная доза |
| 3      | 8          | Активированное антитело 2001 против EGFR | 9            | Однократная доза |
| 4      | 8          | Активированное антитело 2003 против EGFR | 9            | Однократная доза |
| 5      | 8          | Активированное антитело 2005 против EGFR | 9            | Однократная доза |

Эффективность субстратов, используемых в антителах против EGFR, указанных выше, оценивали путем измерения объема опухоли (TV мм<sup>3</sup>) в различные моменты времени после введения. Результаты этого исследования представлены на фиг. 8A-8F.

В этом разделе описана оценка различных активируемых антител против Jagged в токсикологическом исследовании способами, аналогичными способам, описанным в пример 2 по отношению к данным представленным на фиг. 4.

В этом исследовании токсичность измеряли в зависимости от потери массы тела (BW) у мышей DBA/1 после введения контроля внутривенным иммуноглобулином (IVIG), дозы 20 мг/кг антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как 4D11, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 162, дозы 10 мг/кг антитела 4D11, дозы 5 мг/кг антитела 4D11, активируемого антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2001 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 420, активируемого антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 1004/LP'/0001 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67, и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 432, активируемого антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 1004/LP'/0003 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 424, активируемого антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2003 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 477, представленные ниже, и активируемого антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как активируемое антитело 2005 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 479, представленные ниже.

Lc активируемого антитела 2003 против Jagged со спейсерной последовательностью.

Аминокислотная последовательность

QGQSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSAS  
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGDTFTLTISL  
QPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 476)

Lc активируемого антитела 2003 против Jagged.

Аминокислотная последовательность

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT  
ITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA  
TYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
EC (SEQ ID NO: 477)

Lc активируемого антитела 2005 против Jagged со спейсерной последовательностью.

Аминокислотная последовательность

QQQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSASVGLLAPPSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLS  
ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 478)

Lc активируемого антитела против 2005 Jagged.

Аминокислотная последовательность

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSASVGLLAPPSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR  
VTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED  
FATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO: 479)

В исследовании, проиллюстрированном на фиг. 9, мышей разделяли на группы и дозировали, как указано в таблице ниже.

| Группа | Количество | Обработка                                         | Доза (мг/кг) | Режим            | Путь |
|--------|------------|---------------------------------------------------|--------------|------------------|------|
| 1      | 3          | IVIG                                              | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 2      | 3          | 4D11                                              | 10 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 3      | 3          | 4D11                                              | 5 мг/кг      | Однократная доза | и/п  |
| 4      | 3          | 4D11                                              | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 5      | 3          | Активируемое антитело 2001 против Jagged          | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 6      | 3          | Активируемое антитело 1004/LP'/0001 против Jagged | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 7      | 3          | Активируемое антитело 2003 против Jagged          | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |
| 8      | 3          | Активируемое антитело 2005 против Jagged          | 20 мг/кг     | Однократная доза | и/п  |

Результаты приведены на фиг. 9 как процент (%) изменения относительной массы тела (BW) в различные моменты времени во время исследования.

Результаты приведены на фиг. 10 как процент (%) изменения относительной массы тела (BW) в различные моменты времени во время исследования.

Как представлено на фиг. 8A-8F, 9 и 10, активируемые антитела, содержащие расщепляемые субстраты по изобретению, являются безопасными и эффективными. В частности, для субстрата 2003 демонстрировали эффективность, сравнимую с субстратом 2001, и безопасность, сравнимую с IVIG, и для субстрата 2005 демонстрировали эффективность, сравнимую с исходным антителом, и безопасность, сравнимую с исходным антителом, дозируемым в 4 раза ниже.

Пример 5. Дополнительные активируемые антитела, расщепляемые матриксной металлопротеазой (MMP) и сериновой протеазой (SP).

Этот пример демонстрирует получение и оценку дополнительных последовательностей субстрата,

которые активируются в присутствии по меньшей мере одной матриксной металлопротеазы (ММП) и по меньшей мере одной сериновой протеазы.

В исследовании, описываемом в настоящем описании, использовали следующие ниже последовательности субстрата.

| Субстрат | Аминокислотная последовательность   | Нуклеотидная последовательность                                         |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| CM1-CM2  |                                     |                                                                         |
| 2006     | ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 483)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACGATCAC (SEQ ID NO: 491)                |
| 2007     | ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 484)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACATACAC (SEQ ID NO: 492)                |
| 2008     | ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 485)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACCAACAC (SEQ ID NO: 493)                |
| 2009     | ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 486)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACACTCAC (SEQ ID NO: 494)                |
| 2010     | ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 487)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACTATCAC (SEQ ID NO: 495)                |
| 2011     | ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 488)      | ATTAGCTCAGGCCTTCTTAGCGGCCGACGACAATCCC (SEQ ID NO: 496)                  |
| 2012     | ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 489)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGCTAATCCC (SEQ ID NO: 497)                |
| 2013     | ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 490)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGCTAATATA (SEQ ID NO: 498)                |
| 2014     | ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 555)      | ATATCGAGTGGATTGCTGTCTGGCAGATCTGACAATATA (SEQ ID NO: 556)                |
| 3006     | AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 515) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACGATCAC (SEQ ID NO: 523) |
| 3007     | AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 516) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACATACAC (SEQ ID NO: 524) |
| 3008     | AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 517) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACCAACAC (SEQ ID NO: 525) |
| 3009     | AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 518) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACACTCAC (SEQ ID NO: 526) |
| 3010     | AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 519) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACTATCAC (SEQ ID NO: 527) |
| 3011     | AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 520) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACAATCCC (SEQ ID NO: 528) |
| 3012     | AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 521) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGCTAATCCC (SEQ ID NO: 529) |
| 3013     | AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 522) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGCTAATATA (SEQ ID NO: 530) |
| 3014     | AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 557) | GCTGTGGGACTGCTGGCTCCTCCTGGTGGCCTGTCTGGCAGATCTGACAATATA (SEQ ID NO: 558) |

Специалистам в данной области понятно, что нуклеотидные последовательности, приведенные в настоящем описании, являются иллюстративными, и специалист в данной области также может использовать другие комбинации кода и/или получать нуклеотидную последовательность(и) для экспрессии той же пептидной последовательности.

Субстраты 2006-2014 и субстраты 3006-3014 вводили в следующие ниже активируемые антитела.

Тяжелая цепь антитела против EGFR.

Аминокислотная последовательность

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY  
 NTPFTSRLSINKDNSKSVFFKMNLSQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK (SEQ ID NO: 108)

**Легкая цепь антитела против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIP  
 SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111)

**Легкая цепь активируемого антитела 2006 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSDDHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 499)

**Легкая цепь активируемого антитела 2007 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSDIHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 500)

**Легкая цепь активируемого антитела 2008 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSDQHSGSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 501)

**Легкая цепь активируемого антитела 2009 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSDTHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 502)

**Легкая цепь активируемого антитела 2010 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGSGISSGLLSGRSDYHGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 503)

**Легкая цепь активируемого антитела 2011 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSDNPGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 504)

**Легкая цепь активируемого антитела 2012 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSANPGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 505)

**Легкая цепь активируемого антитела 2013 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSANIGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 506)

**Легкая цепь активируемого антитела 2014 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSDNIGSSGTQILLTQSPVILSV  
 SPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS  
 VESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 559)

**Легкая цепь активируемого антитела 3006 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDDHGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 531)

**Легкая цепь активируемого антитела 3007 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDIHGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 532)

**Легкая цепь активируемого антитела 3008 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность:**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDQHGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 533)

**Легкая цепь активируемого антитела 3009 против EGFR.**

**Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDTHGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 534)

**Легкая цепь активируемого антитела 3010 против EGFR.****Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGAVGLLAPPGGLSGRSDYHGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 535)

**Легкая цепь активируемого антитела 3011 против EGFR.****Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNPGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 536)

**Легкая цепь активируемого антитела 3012 против EGFR.****Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGAVGLLAPPGGLSGRSANPGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 537)

**Легкая цепь активируемого антитела 3013 против EGFR.****Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGAVGLLAPPGGLSGRSANIGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 538)

**Легкая цепь активируемого антитела 3014 против EGFR.****Аминокислотная последовательность**

CISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNIGSSGTQILLTQSP  
 VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT  
 LSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 560)

Все восемнадцать активируемых антител против EGFR, содержащие последовательности субстрата 2006 (SEQ ID NO: 483), субстрата 2007 (SEQ ID NO: 484), субстрата 2008 (SEQ ID NO: 485), субстрата 2009 (SEQ ID NO: 486), субстрата 2010 (SEQ ID NO: 487), субстрата 2011 (SEQ ID NO: 488), субстрата 2012 (SEQ ID NO: 489), субстрата 2013 (SEQ ID NO: 490), 2014 (SEQ ID NO: 555), субстрата 3006 (SEQ ID NO: 515), субстрата 3007 (SEQ ID NO: 516), субстрата 3008 (SEQ ID NO: 517), субстрата 3009 (SEQ ID NO: 518), субстрата 3010 (SEQ ID NO: 519), субстрата 3011 (SEQ ID NO: 520), субстрата 3012 (SEQ ID NO: 521), субстрата 3013 (SEQ ID NO: 522) или субстрата 3014 (SEQ ID NO: 557), также содержали маскирующую группу, содержащую аминокислотную последовательность CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 168), и антитело против EGFR c225v5, содержащее легкую цепь (SEQ ID NO: 111) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 108). Конфигурация легкой цепи активируемого антитела являлась такой как маскирующая группа - субстрат - легкая цепь C225v5.

Для расщепления активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты 2001, 2006-2010 и 2012, матриптазой человека с использованием техник, аналогичных техникам, описываемым в настоящем описании, демонстрировали диапазон значений  $k_{cat}/K_m$  в диапазоне от  $6E+02$  до  $2E+04$ . Для расщепления активируемых антител против EGFR, содержащих субстраты 2001, 2006-2010, 2012 и 2013 матриксной металлопротеазой 14 человека (MMP14) с использованием техник, аналогичных техникам, описываемым в настоящем описании, демонстрировали диапазон значений  $k_{cat}/K_m$  в диапазоне от  $1E+04$  до  $5E+04$ . In vivo для этих антител также демонстрировали сравнимую стабильность в течение 4 суток у нормальных и несущих опухоль мышей с использованием техник, аналогичных техникам, описываемым в настоящем описании.

В этом разделе описана оценка различных активируемых антител против EGFR, указанный выше, в исследовании эффективности на опухоли H292 с использованием ксенотрансплантатов опухолей H292

на мышах nu/nu. Исследование эффективности на опухоли H292 описано в пример 2, а также описано в публикации PCT № WO 2013/163631, содержание которой полностью включено, таким образом, посредством ссылки.

В этом исследовании мышей разделяли на группы и дозировали, как указано в табл. ниже, с использованием контроля PBS, активируемого антитела, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 111; активируемого антитела C225v5-3954-2001 против EGFR, активируемого антитела C225v5-3954-2006 против EGFR, активируемого антитела C225v5-3954-2007 против EGFR и т.д., как представлено в таблице ниже.

| Группа | Количество | Обработка        | Доза (мг/кг) | режим            |
|--------|------------|------------------|--------------|------------------|
| 1      | 8          | IVIG             | 9            | Однократная доза |
| 2      | 8          | C225v5-3954-2001 | 9            | Однократная доза |
| 3      | 8          | C225v5-3954-2007 | 9            | Однократная доза |
| 4      | 8          | C225v5-3954-2006 | 9            | Однократная доза |
| 5      | 8          | C225v5-3954-2008 | 9            | Однократная доза |
| 6      | 8          | C225v5-3954-2009 | 9            | Однократная доза |
| 7      | 8          | C225v5-3954-2010 | 9            | Однократная доза |
| 8      | 8          | C225v5-3954-2012 | 9            | Однократная доза |
| 9      | 8          | C225v5-3954-2013 | 9            | Однократная доза |

Эффективность субстратов, используемых в антителах к EGFR, представленных выше, оценивали путем измерения объема опухоли (TV мм<sup>3</sup>) в различные моменты времени после введения. Результаты этого исследования представлены на фиг. 11A-11H и 12.

В этом разделе описана оценка различных активируемых антител против Jagged в токсикологическом исследовании способами, аналогичными способом, описанным в пример 2 в отношении данных, приведенных на фиг. 4.

В этом исследовании доза 20 мг/кг антитела против Jagged, обозначаемого в настоящем описании как 4D11, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 162, доза 10 мг/кг антитела 4D11, доза 5 мг/кг антитела 4D11, активируемое антитело против Jagged, обозначаемое в настоящем описании как активируемое антитело 2006 против Jagged, которое содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 67 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 507-514, представлены ниже.

Lc активируемого антитела 2006 против Jagged Аминокислотная последовательность

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDDHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI  
TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C (SEQ ID NO: 507)

Lc активируемого антитела 2007 против Jagged.

Аминокислотная последовательность

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDIHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI  
TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C (SEQ ID NO: 508)

Lc активируемого антитела 2008 против Jagged.

Аминокислотная последовательность

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI  
TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C (SEQ ID NO: 509)

Lc активируемого антитела 2009 против Jagged.

Аминокислотная последовательность



CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDTHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 510)

**Lc активируемого антитела 2010 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDYHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 511)

**Lc активируемого антитела 2011 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 512)

**Lc активируемого антитела 2012 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 513)

**Lc активируемого антитела 2013 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 514)

**Lc активируемого антитела 2014 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI  
 TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C (SEQ ID NO: 561)

**Lc активируемого антитела 3006 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSASVGLLAPPGGLSGRSDDHGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
 EDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 539)

**Lc активируемого антитела 3007 против Jagged.**

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSASVGLLAPPGGLSGRSDIHGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
 EDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 540)

Lc активируемого антитела 3008 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDQHGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 541)

Lc активируемого антитела 3009 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDTHGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 542)

Lc активируемого антитела 3010 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDYHGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 543)

Lc активируемого антитела 3011 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNPGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 544)

Lc активируемого антитела 3012 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSANPGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 545)

Lc активируемого антитела 3013 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSANIGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 546)

Lc активируемого антитела 3014 против Jagged.

**Аминокислотная последовательность**

CNIWLVGDCRGWQGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNIGGGSDIQMTQSPSSLSASVG  
 DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQT VVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
 FNRGEC (SEQ ID NO: 562)

Все восемнадцать активируемых антител против Jagged, содержащих последовательности субстрата 2006 (SEQ ID NO: 483), субстрата 2007 (SEQ ID NO: 484), субстрата 2008 (SEQ ID NO: 485), субстрата 2009 (SEQ ID NO: 486), субстрата 2010 (SEQ ID NO: 487), субстрата 2011 (SEQ ID NO: 488), субстрата 2012 (SEQ ID NO: 489), субстрата 2013 (SEQ ID NO: 490), 2014 (SEQ ID NO: 555); субстрата 3006 (SEQ ID NO: 515); субстрата 3007 (SEQ ID NO: 516); субстрата 3008 (SEQ ID NO: 517); субстрата 3009 (SEQ ID NO: 518); субстрата 3010 (SEQ ID NO: 519); субстрата 3011 (SEQ ID NO: 520); субстрата 3012 (SEQ

ID NO: 521); субстрата 3013 (SEQ ID NO: 522) или субстрата 3014 (SEQ ID NO: 557), также содержали маскирующую группу, содержащую аминокислотную последовательность и антитело 4D11 против Jagged, содержащее легкую цепь (SEQ ID NO: 162) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 67). Конфигурация легкой цепи активируемого антитела явилась такой как маскирующая группа - субстрат - легкая цепь 4D11.

В этом исследовании мышей разделяли на группы и дозировали, как указано в таблице ниже.

| Группа | Количество | Обработка      | Доза (мг/кг) | Режим            |
|--------|------------|----------------|--------------|------------------|
| A      | 3          | IVIG           | 20           | Однократная доза |
| B      | 4          | 4D11           | 5            | Однократная доза |
| C      | 4          | 4D11           | 10           | Однократная доза |
| D      | 4          | 4D11           | 20           | Однократная доза |
| E      | 4          | 4D11-5342-2001 | 20           | Однократная доза |
| F      | 3          | 4D11-5342-2006 | 20           | Однократная доза |
| G      | 3          | 4D11-5342-2007 | 20           | Однократная доза |
| H      | 3          | 4D11-5342-2008 | 20           | Однократная доза |
| I      | 3          | 4D11-5342-2009 | 20           | Однократная доза |
| J      | 3          | 4D11-5342-2010 | 20           | Однократная доза |
| K      | 3          | 4D11-5342-2012 | 20           | Однократная доза |
| L      | 3          | 4D11-5342-2013 | 20           | Однократная доза |

Результаты приведены на фиг. 13 в виде процента (%) изменения относительной массы тела (BW) в различные моменты времени во время исследования.

Как представлено на фиг. 11A-11H, 12 и 13, активируемые антитела, включая расщепляемый субстраты по изобретению, являются безопасными и эффективными.

Пример 6. Визуализация in vivo.

Самкам мышей athymic nu/nu (Charles River Laboratories) в возрасте от 7 до 9 недель подкожно инокулировали  $5 \times 10^6$  NCI-H292 (левый задний пах) и клетки FaDu (правый задний пах). Клетки NCI-H292 (ATCC) и клетки FaDu (ATCC) суспендировали 1:1 с матригелем в не содержащей сыворотки среде или без матригеля в не содержащей сыворотки среде, соответственно. Клинические наблюдения, массы тела и измерения цифровым штангенциркулем объема опухоли проводили два раза в неделю после того, как опухоль становилась поддающейся измерению. Объемы опухолей рассчитывали по формуле  $(ab^2)/2$ , где a является большим и b является меньшим из двух перпендикулярных диаметров. Несущих ксенотрансплантат опухоли H292 и FaDu мышей с объемами опухолей 250-500 мм<sup>3</sup> распределяли по размеру опухоли на 3 группы с n=3 в группе. Животным инъецировали интраперитонеально 15 мг/кг конъюгированного с AlexaFluor 750 (AF750) цетуксимаба (цетуксимаб-AF750) или активируемых антител, содержащих субстраты 2001 и 1004/LP/0001 (Pb2001-AF750 и Pb1004/LP/0001-SF750). Сканы компьютерной томографии (CT) с последующей флуоресцентными изображениями получали с использованием системы визуализации IVIS Spectrum/CT (Caliper Life Sciences, PE). Получали серию изображений флуоресцентного свечения на поверхности на нескольких участках просвечивания, включающих представляющую интерес область, при длинах волн возбуждения и испускания 745 и 800 нм соответственно (фиг. 14). Трехмерную реконструкцию оптических и  $\mu$ CT изображений и их совместную регистрацию проводили с использованием программного обеспечения Living Image 4.2 (Caliper Life Sciences). Получаемые данные визуализации демонстрируют накопление активируемых антител в обоих ксенотрансплантатах опухолей с флуоресцентным сигналом, аналогичным исходному антителу цетуксимабу.

Другие варианты осуществления.

Несмотря на то что изобретение было описано в сочетании с подробным его описанием, указанное выше описание предназначено иллюстрировать, а не ограничивать объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в рамках следующего ниже.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, содержащий субстрат CM1-CM2, содержащий по меньшей мере первую расщепляемую группу (CM1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (CM2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP), где субстрат CM1-CM2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 7, 22, 555 и 557.

2. Выделенный полипептид, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который связывается с мишенью, и по меньшей мере первую расщепляемую группу (CM1), которая является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP), и по меньшей мере вторую расщепляемую группу (CM2), которая является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP), где субстрат CM1-CM2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 7, 22, 555 и 557.

3. Выделенный полипептид по п.2, где MMP, SP или MMP и SP являются колокализованными в ткани с мишенью.

4. Выделенный полипептид по п.2 или 3, где его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scab, dAb, однодоменного антитела с тяжелой цепью и однодоменного антитела с легкой цепью.

5. Выделенный полипептид по любому из пп.2-4, где АВ является связанным с СМ1.

6. Выделенный полипептид по п.5, где АВ является связанным непосредственно с СМ1 или где АВ является связанным с СМ1 через сшивающий пептид.

7. Выделенный полипептид по любому из пп.2-4, где АВ является связанным с СМ2.

8. Выделенный полипептид по п.7, где АВ является связанным непосредственно с СМ2 или где АВ является связанным с СМ1 через сшивающий пептид.

9. Выделенный полипептид по любому из пп.2-8, где выделенный полипептид содержит маскирующую группу (ММ), где ММ имеет одну или более характеристик, выбранных из следующих:

(i) ММ имеет константу диссоциации связывания АВ, которая является больше чем константа диссоциации АВ связывания с мишенью, или

(ii) ММ представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот,

(iii) аминокислотная последовательность ММ отличается от аминокислотной последовательности мишени и является не более чем на 10% идентичной аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию АВ,

(iv) ММ не препятствует или не конкурирует с АВ для связывания с мишенью в расщепленном состоянии.

10. Выделенный полипептид по п.9, где ММ является связанной с СМ1 таким образом, что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-СМ1-СМ2-АВ или АВ-СМ2-СМ1-ММ.

11. Выделенный полипептид по п.10, где выделенный полипептид содержит сшивающий пептид между ММ и СМ1 или где выделенный полипептид содержит сшивающий пептид между СМ2 и АВ.

12. Выделенный полипептид по п.9, где ММ является связанной с СМ2 таким образом, что выделенный полипептид в нерасщепленном состоянии имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже: ММ-СМ2-СМ1-АВ или АВ-СМ1-СМ2-ММ.

13. Выделенный полипептид по п.12, где выделенный полипептид содержит сшивающий пептид между ММ и СМ2 или где выделенный полипептид содержит сшивающий пептид между СМ1 и АВ.

14. Выделенный полипептид по п.9, где выделенный полипептид содержит первый сшивающий пептид (LP1) и второй сшивающий пептид (LP2) и где выделенный полипептид имеет структурную организацию от N-конца к С-концу, как указано ниже в нерасщепленном состоянии: ММ-LP1-СМ1-СМ2-LP2-АВ, АВ-LP2-СМ2-СМ1-LP1-ММ, ММ-LP1-СМ2-СМ1-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ1-СМ2-LP1-ММ, необязательно, где LP1 и LP2 не являются идентичными друг другу, необязательно, где каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной от 1 до 20 аминокислот.

15. Выделенный полипептид по любому из пп.2-14, где выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 432, 507-512, 561 и 562, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67.

16. Выделенный полипептид по любому из пп.2-14, где выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 559 и 560, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 108.

17. Выделенный полипептид по любому из пп.1-14, где выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 420, 432, 561 и 562.

18. Выделенный полипептид по любому из пп.1-14, где выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 449, 451, 559 и 560.

19. Выделенный полипептид по любому из пп.1-18, где MMP представляет собой MMP2, MMP9 или MMP14.

20. Выделенный полипептид по любому из пп.1-18, где SP представляет собой uPA или матриптазу.

21. Конъюгированный полипептид, содержащий выделенный полипептид по любому из пп.2-20, конъюгированный со средством.

22. Конъюгированный полипептид по п.21, где средство конъюгировано с АВ через линкер.

23. Конъюгированный полипептид по п.22, где линкер представляет собой расщепляемый линкер.

24. Конъюгированный полипептид по п.22, где линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

25. Конъюгированный полипептид по любому из пп.21-24, где средство имеет одну или более характеристик, выбранных из следующих:

(i) токсин представляет собой токсин или его фрагмент,

(ii) средство представляет собой ингибитор микротрубочек,

(iii) средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство,

(iv) средство представляет собой доластатин или его производное,

- (v) средство представляет собой ауристатин или его производное,
- (vi) средство представляет собой майтанзиноид или его производное,
- (vii) средство представляет собой дуокармицин или его производное,
- (viii) средство представляет собой калихимицин или его производное,
- (ix) средство представляет собой ауристатин Е или его производное,
- (x) средство представляет собой монометилауристатин Е (MMAE),
- (xi) средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD),
- (xii) средство представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4,
- (xiii) средство представляет собой детектируемую молекулу,
- (xiv) средство представляет собой диагностическое средство.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный полипептид, как по любому из пп.2-25, в эффективном количестве и носитель.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, содержащая дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой терапевтическое средство.

28. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенный полипептид, как по любому из пп.1-20.

29. Экспрессирующий вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.28.

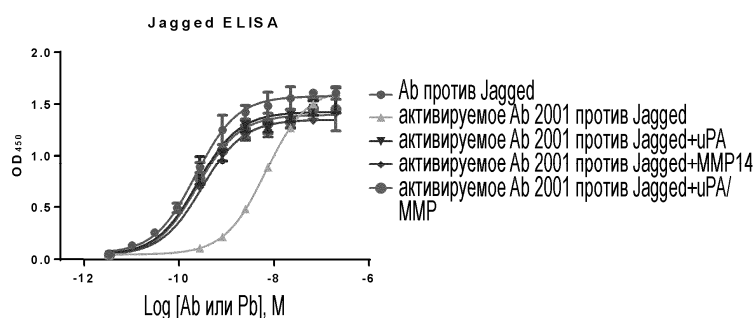
30. Способ получения выделенного полипептида культивированием клетки в условиях, которые приводят к экспрессии выделенного полипептида, как по любому из пп.2-20, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.28.

31. Способ производства выделенного полипептида, которое в активированном состоянии связывается с мишенью, где способ включает:

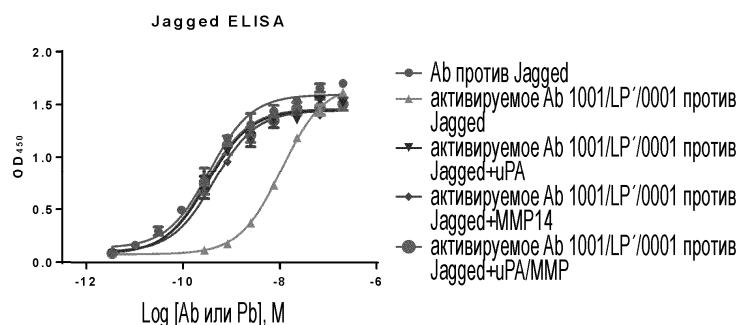
- (a) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенный полипептид по любому из пп.2-20; и
- (b) выделение выделенного полипептида.

32. Способ лечения, облегчения симптома или замедления прогрессирования нарушения или заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного полипептида по любому из пп.2-20, конъюгированного активируемого антитела по любому из пп.21-25 или фармацевтической композиции по любому из пп.26-27, где нарушение или заболевание представляют собой злокачественную опухоль.

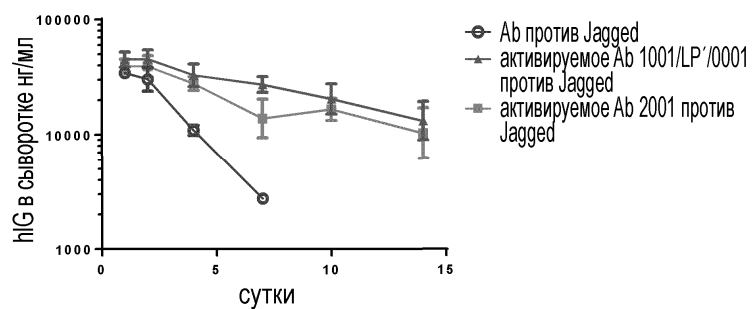
33. Способ по п.32, где способ включает введение индивидууму дополнительного средства, где дополнительное средство представляет собой терапевтическое средство.



Фиг. 1А

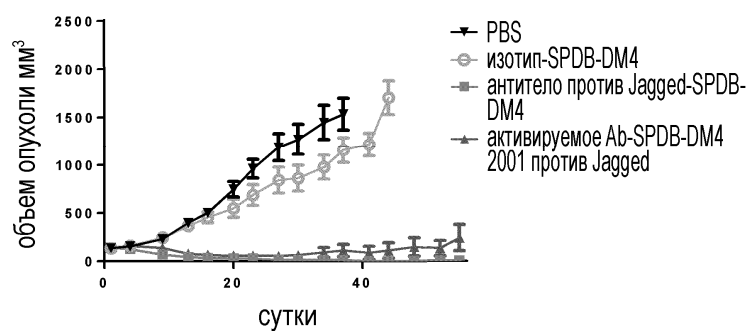


Фиг. 1В



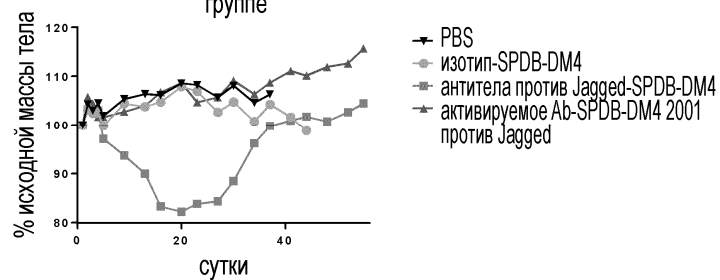
Фиг. 2

модель ксенотрансплантата опухоли HCC1806



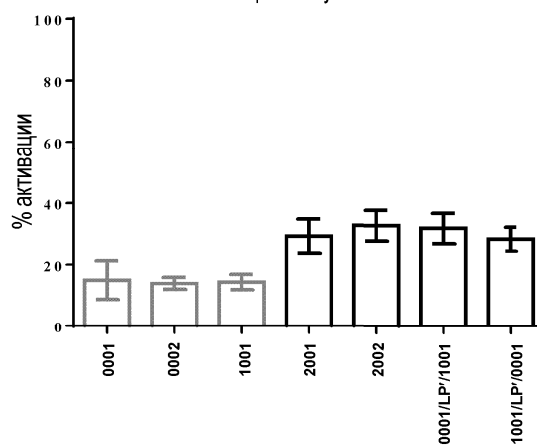
Фиг. 3

Средняя масса тела по группе



Фиг. 4

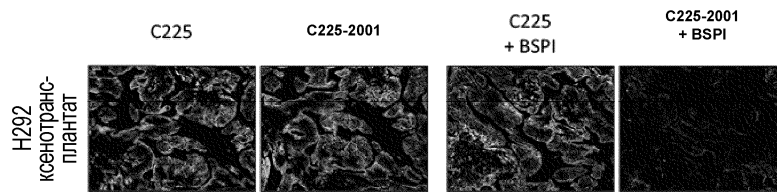
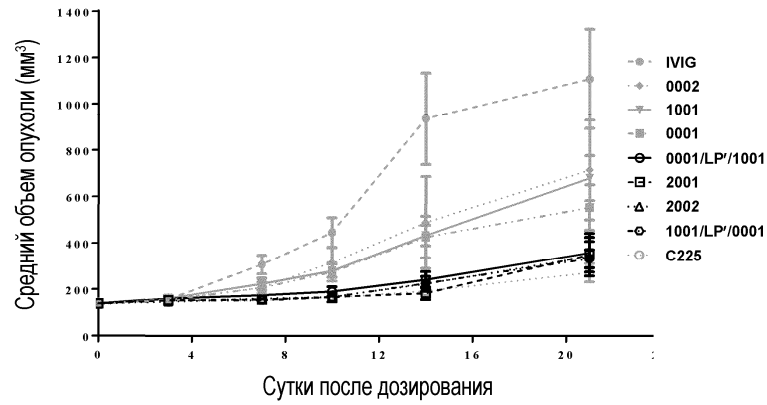
Активация на сутки 8



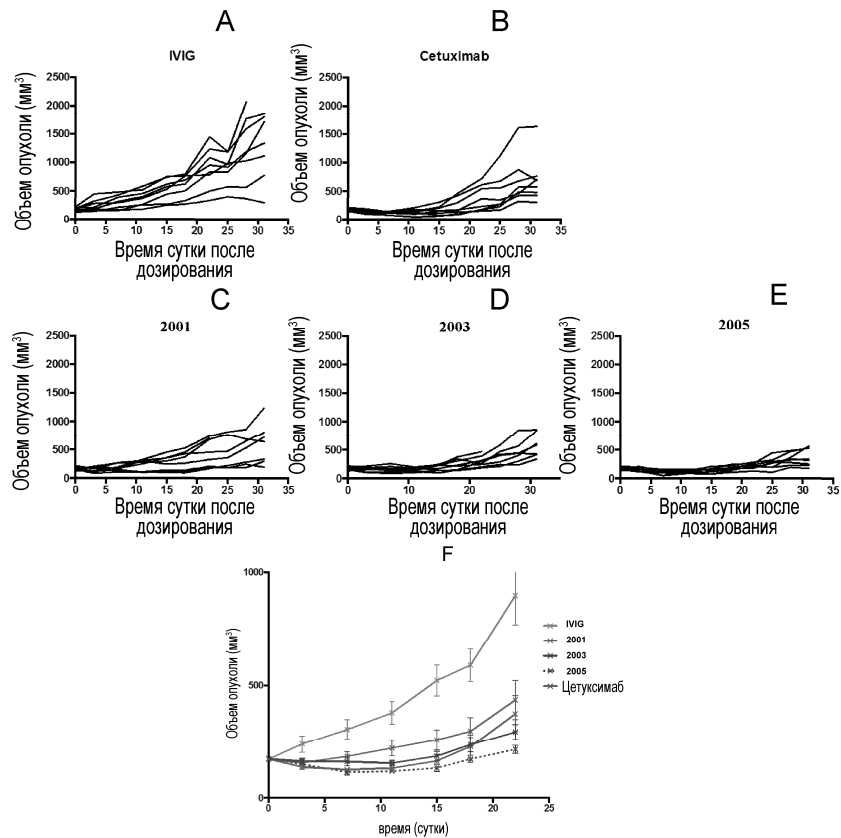
Группа обработки

Фиг. 5

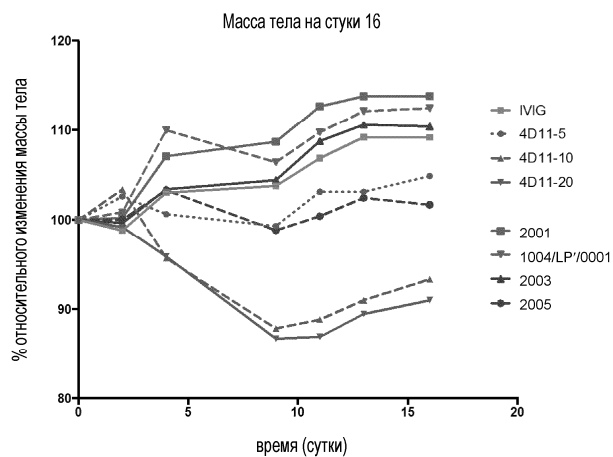
## Исследование эффективности H292



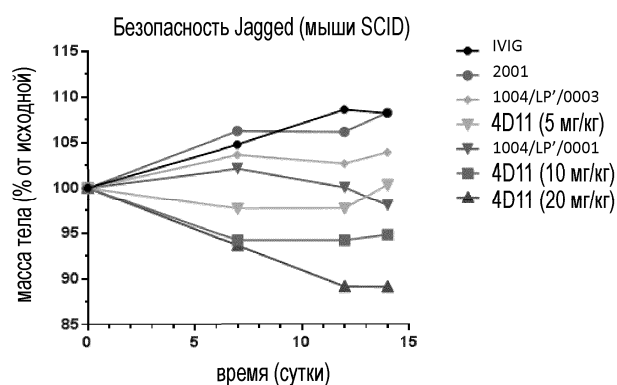
Фиг. 7



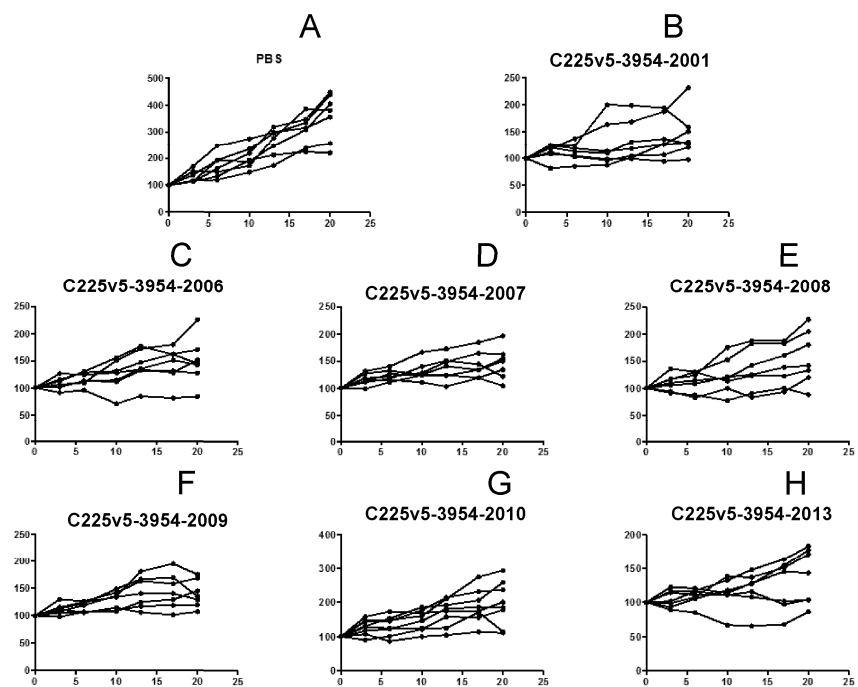
Фиг. 8



Фиг. 9



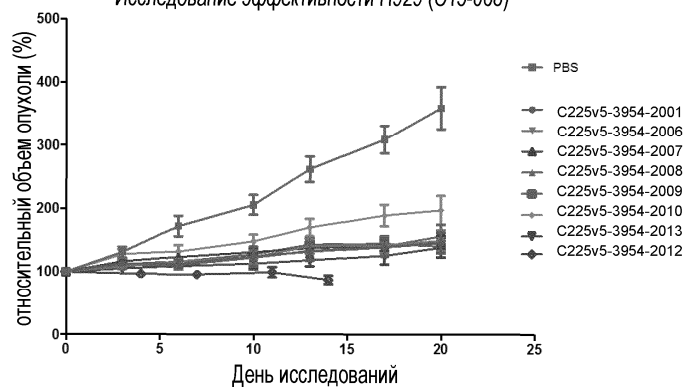
Фиг. 10



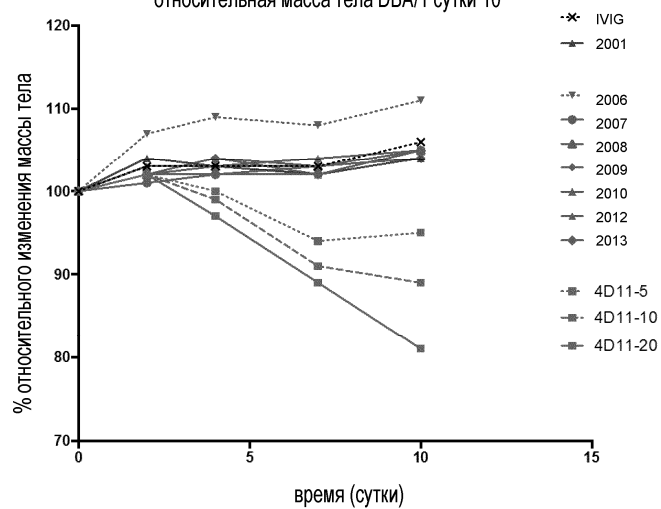
Фиг. 11



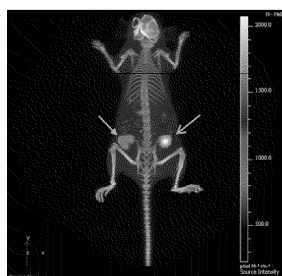
## Исследование эффективности H929 (C15-068)



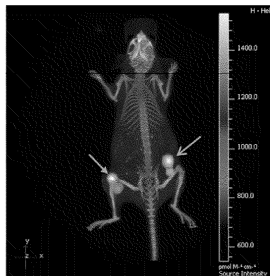
## относительная масса тела DBA/1 сутки 10



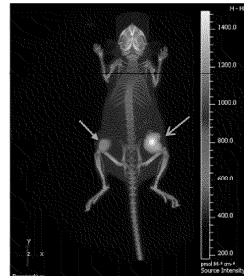
Цетуксимаб



C225-2001



C225-1004/GG/0001



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2