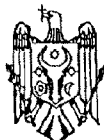




MD/EP 3558391 T2 2022.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3558391 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 47/68** (2017.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
C07K 16/40 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 16/30 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 1243 (22) Data de depozit: 2017.12.21 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17835533.5, 2017.12.21 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3558391, 2019.10.30 (31) Numărul cererii prioritare: 201662438488 P; 201762480201 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.12.23; 2017.03.31 (33) Țara cererii prioritare: US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2022, 2022.05.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 05/2022, 2022.02.02 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31
(71) Solicitanți: IMMUNOGEN, INC., US; MACROGENICS, INC., US (72) Inventatori: HICKS Stuart William, US; YODER Nicholas C., US; BARAT Bhaswati, US; BONVINI Ezio, US; DIEDRICH Gundo, US; JOHNSON Leslie S., US; LOO Deryk, US; SCRIBNER Juniper A., US (73) Titulari: IMMUNOGEN INC., US; MACROGENICS, INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Imunoconjugate care țintesc ADAM9 și procedee de utilizare a acestora

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la imunoconjugate care cuprind un anticorp sau un fragment al acestuia capabil să se lege în mod specific la "Proteina 9 care conține domeniul de dezintegrină și metaloproteinază" ("ADAM9") conjugat cu cel puțin un agent farmacologic. Invenția se referă în special la astfel de imunoconjugate care sunt reactivi încrucișat cu ADAM9 umană și ADAM9 de

2

primată non-umană (cum ar fi o maimuță cynomolgus). Invenția se referă în plus la toți astfel de imunoconjugate care cuprind un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și/sau un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care a fost umanizat și în mod opțional deimunizat astfel încât să prezinte o imunogenitate redusă la administrarea unor astfel de imunoconjugate la un subiect destinat. Invenția se referă, de

MD/EP 3558391 T2 2022.05.31

asemenea, la compoziții farmaceutice ce conțin oricare dintre astfel de imunoconjugăți și la metodele care implică utilizarea oricăroră dintre acești imunoconjugăți în tratamentul cancerului sau a altor boli și condiții.

Secvențe: 154

Revendicări: 17

Figuri: 20

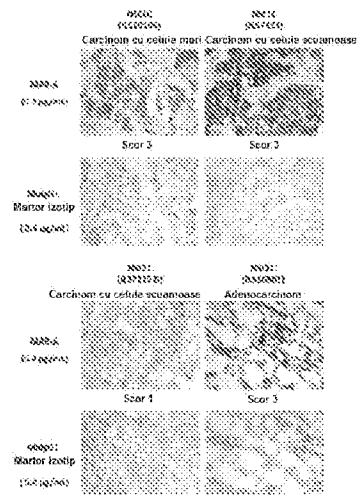


FIG. 1A

(54) Immunoconjugates targeting ADAM9 and methods of use thereof

(57) Abstract:

1

The present invention is directed to immunoconjugates comprising an antibody or fragment thereof capable of specifically binding to "Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 9" ("ADAM9") conjugated to at least one pharmacological agent. The invention particularly concerns such immunoconjugates that are cross-reactive with human ADAM9 and the ADAM9 of a non-human primate (e.g., a cynomolgus monkey). The invention additionally pertains to all such immunoconjugates that comprise a Light Chain Variable (VL) Domain and/or a Heavy Chain Variable (VH) Domain that has

2

been humanized and/or deimmunized so as to exhibit reduced immunogenicity upon administration of such immunoconjugate to a recipient subject. The invention is also directed to pharmaceutical compositions that contain any of such immunoconjugates, and to methods involving the use of any of such immunoconjugates in the treatment of cancer and other diseases and conditions.

Sequences: 154

Claims: 17

Fig.: 20

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

Prezența invenției se referă la imunoconjugăți care cuprind un anticorp sau un fragment al acestuia capabil să se lege în mod specific la "Proteina 9 care conține domeniul de dezintegrină și metaloproteinază" ("ADAM9") conjugat cu cel puțin un agent farmacologic. Invenția se referă în special la astfel de imunoconjugăți care sunt reactivi încrucișat cu ADAM9 umană și ADAM9 de primată non-umană (cum ar fi o maimuță cynomolgus). Invenția se referă în plus la toți astfel de imunoconjugăți care cuprind un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și/sau un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care a fost umanizat și în mod opțional deimunizat astfel încât să prezinte o imunogenitate redusă la administrarea unor astfel de imunoconjugăți la un subiect destinat. Invenția se referă, de asemenea, la compoziții farmaceutice ce conțin oricare dintre astfel de imunoconjugăți și la imunoconjugăți și compoziții farmaceutice pentru utilizare în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu sau caracterizate prin expresia ADAM9 (cum ar fi cancer).

BAZELE INVENȚIEI

ADAM este o familie de proteine implicate în diverse procese fiziologice și patologice (Amendola, R.S. și colab. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Edwards, D.R. și colab. (2008) "The ADAM Metalloproteases," Molec. Aspects Med. 29:258-289). Au fost identificați cel puțin 40 de membri genetici ai familiei și se crede că cel puțin 21 dintre acești membri sunt funcționali la om (Li, J. și colab. (2016) "Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion," J. Invest. Surg. 26(3):127-133; Duffy, M.J. și colab. (2011) "The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?," Clin. Proteomics 8:9:1-13; a se vedea, de asemenea, Publicația de brevet SUA nr. 2013/0045244).

Membrii familiei ADAM au o structură bine conservată, cu 8 domenii, printre care se numără un domeniu de metaloprotează și un domeniu de legare a integrinei (dezintegrină) (Duffy, M.J. și colab. (2009) "The Role Of ADAMs In Disease Pathophysiology," Clin. Chim. Acta 403:31-36). Domeniul de metaloprotează al ADAM acționează ca o sheddază și s-a raportat faptul că modulează o serie de procese biologice prin clivarea proteinelor transmembranare, care apoi pot acționa ca liganzi solubili și pot regla semnalizarea celulară (Amendola, R.S. și colab. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Ito, N. și colab. (2004) "ADAMs, A Disintegrin And Metalloproteinases, Mediate Shedding Of Oxytocinase," Biochem. Biophys. Res. Commun. 314 (2004) 1008-1013).

ADAM9 este un membru al familiei ADAM a moleculei. Acesta este sintetizat ca o formă inactivă care este clivată proteolitic pentru a genera o enzimă activă. Procesarea la situsul din amonte este extrem de importantă pentru activarea proenzimei. ADAM9 este exprimată în fibroblaste (Zigrino, P. și colab. (2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," J. Biol. Chem. 286:6801-6807), celulele musculare netede vasculare activate (Sun, C. și colab. (2010) "ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling," Cardiovasc. Res. 87:348-355), monocite (Namba, K. și colab. (2001) "Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes," Cell. Immunol. 213:104-113), macrofagele activate (Oksala, N. și colab. (2009) "ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study," Ann. Med. 41:279-290).

Activitatea metaloproteazei ADAM9 participă la degradarea componentelor matricei, pentru a permite astfel migrarea celulelor tumorale (Amendola, R.S. și colab. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962). Domeniul dezintegrină al său, care este puternic omolog cu multe dezintegrine de venin de șarpe, permite interacțiunea dintre ADAM9 și integrine și permite ADAM9 să moduleze, pozitiv sau negativ, evenimentele de adeziune celulară (Zigrino, P. și colab. (2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," J. Biol. Chem. 286:6801-6807; Karadag, A. și colab. (2006) "ADAM-9 (MDC-9/Meltrigamma), A Member Of The A Disintegrin And Metalloproteinase Family, Regulates Myeloma-Cell-Induced Interleukin-6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha(v)Beta5 Integrin," Blood 107:3271-3278; Cominetti, M.R. și colab. (2009) "Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow

Conditions," *Biochimie*, 91:1045-1052). S-a demonstrat faptul că domeniul dezintegrină al ADAM9 interacționează cu integrinele $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 5$ și $\alpha 9\beta 1$.

Expresia ADAM9 s-a dovedit a fi relevantă pentru boală, în special pentru cancer. S-a descoperit faptul că ADAM9 clivează și eliberează o serie de molecule cu roluri importante în tumorigeneză și angiogenază, cum ar fi TEK, KDR, EPHB4, CD40, VCAM1 și CDH5. ADAM9 este exprimată de multe tipuri de celule tumorale, inclusiv celulele tumorale ale cancerelor mamare, cancerelor de colon, cancerelor gastrice, gliomelor, cancerelor hepatice, cancerelor pulmonare cu celule non-mici, melanoamelor, mieloamelor, cancerelor pancreatice și cancerelor de prostată (Yoshimasu, T. și colab. (2004) "Overexpression Of ADAM9 In Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Brain Metastasis," *Cancer Res.* 64:4190-4196; Peduto, L. și colab. (2005) "Critical Function For ADAM9 In Mouse Prostate Cancer," *Cancer Res.* 65:9312-9319; Zigrino, P. și colab. (2005) "ADAM-9 Expression And Regulation In Human Skin Melanoma And Melanoma Cell Lines," *Int. J. Cancer* 116:853-859; Fritzsche, F.R. și colab. (2008) "ADAM9 Is Highly Expressed In Renal Cell Cancer And Is Associated With Tumour Progression," *BMC Cancer* 8:179:1-9; Fry, J.L. și colab. (2010) "Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration," *Cancer Res.* 70, 8187-8198; Chang, L. și colab. (2016) "Combined Rnai Targeting Human Stat3 And ADAM9 As Gene Therapy For Non-Small Cell Lung Cancer," *Oncology Letters* 11:1242-1250; Fan, X. și colab. (2016) "ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas," *Int. J. Mol. Sci.* 17:1276:1-11).

În mod semnificativ, s-a descoperit faptul că expresia crescută a ADAM9 se corelează pozitiv cu malignitatea tumorală și potențialul metastatic (Amendola, R.S. și colab. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," *J. Leukocyte Biol.* 97(5):951-962; Fan, X. și colab. (2016) "ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas," *Int. J. Mol. Sci.* 17:1276:1-11; Li, J. și colab. (2016) "Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion," *J. Invest. Surg.* 26(3):127-133). În plus, ADAM9 și izoforma sa solubilă secretată par a fi cruciale pentru diseminarea celulelor canceroase (Amendola, R.S. și colab. (2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," *J. Leukocyte Biol.* 97(5):951-962; Fry, J.L. și colab. (2010) "Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration," *Cancer Res.* 70, 8187-8198; Mazzocca, A. (2005) "A Secreted Form Of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion Through Tumor-Stromal Interactions," *Cancer Res.* 65:4728-4738; a se vedea, de asemenea, Brevetele SUA nr. 9,150,656; 7,585,634; 7,829,277; 8,101,361; și 8,445,198 and Publicația de brevet SUA nr. 2009/0023149).

Prin urmare, o serie de studii au identificat ADAM9 ca țintă potențială pentru terapia împotriva cancerului (Peduto, L. (2009) "ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer," *Curr. Pharm. Des.* 15:2282-2287; Duffy, M.J. și colab. (2009) "Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression" *Clin. Cancer Res.* 15:1140-1144; Duffy, M.J. și colab. (2011) "The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?," *Clin. Proteomics* 8:9:1-13; Josson, S. și colab. (2011) "Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy," *Prostate* 71(3):232-240; a se vedea, de asemenea, Publicațiile de brevet SUA nr. 2016/0138113, 2016/0068909, 2016/0024582, 2015/0368352, 2015/0337356, 2015/0337048, 2015/0010575, 2014/0342946, 2012/0077694, 2011/0151536, 2011/0129450, 2010/0291063, 2010/0233079, 2010/0112713, 2009/0203051, 2004/0092466, 2003/0091568 și 2002/0068062 și Publicațiile PCT nr. WO 2016/077505, WO 2014/205293, WO 2014/186364, WO 2014/124326, WO 2014/108480, WO 2013/119960, WO 2013/098797, WO 2013/049704 și WO 2011/100362). US2009/0285840A1 descrie compoziții și procedee care inhibă expresia produselor genetice ale Adam9, cum ar fi ARNm al ADAM9 și/sau polipeptide ale ADAM9, ca abordare terapeutică pentru tratamentul neovascularizării patologice și al afecțiunilor asociate cu angiogeneza. DE10337368A1 descrie diagnosticul cancerului pancreatic prin detectarea expresiei proteinei ADAM9 utilizând anticorpi specifici și, de asemenea, utilizarea terapeutică a acestor anticorpi și a acizilor nucleici specifici ai ADAM9. În plus, s-a constatat, de asemenea, faptul că expresia ADAM9 este relevantă pentru boala pulmonară și inflamație (a se vedea, *de exemplu*, Publicațiile de brevet SUA nr. 2016/0068909; 2012/0149595; 2009/0233300; 2006/0270618; și 2009/0142301). Anticorpii care se leagă la ADAM9 sunt disponibili pe piață de la Abcam, Thermofisher, Sigma-Aldrich și alte companii.

Cu toate acestea, în ciuda tuturor progreselor anterioare, este încă nevoie de ADAM9 cu afinitate crescută care țintește imunoconjugați care prezintă o legare minimă la țesuturile normale și sunt capabili

să se lege la ADAM9 umană și non-umană cu o afinitate crescută similară. Prezenta invenție se adresează acestei nevoi și nevoii de terapie îmbunătățită pentru cancer.

REZUMATUL INVENȚIEI

Conform unui aspect al invenției, sunt furnizați imunoconjugăți care cuprind un anticorp sau un fragment al acestuia capabil să se lege în mod specific la "Proteina 9 care conține domeniul de dezintegrină și metaloproteinază" ("ADAM9") conjugată cu cel puțin un agent farmacologic astfel cum este definit în revendicarea 1. Imunoconjugății sunt reactivi încrucișat cu ADAM9 umană și ADAM9 de primată non-umană (o maimuță cynomolgus). Imunoconjugății cuprind un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și/sau un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care a fost umanizat (și în mod opțional deimunizat) astfel încât să prezinte o imunogenitate redusă la administrarea unor astfel de imunoconjugăți la un subiect destinat. Conform altor aspecte ale invenției, sunt furnizate o compoziție farmaceutică astfel cum este definită în revendicarea 15 și un imunoconjugat sau o compoziție farmaceutică pentru utilizare în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu sau caracterizate prin expresia ADAM9 (cum ar fi cancer) astfel cum este definit în revendicările 16 și 17.

În detaliu, prezenta invenție furnizează un imunoconjugat care cuprinde un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment al acestuia de legare a ADAM9 care se leagă în mod specific la ADAM9 umană și la ADAM9 de cyno:

(I) în care anticorpus anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul acestuia de legare a ADAM9 menționat este conjugat cu un agent farmacologic; și

(II) în care anticorpus anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul acestuia de legare a ADAM9 menționat cuprinde un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și un domeniu variabil al lanțului greu (VH), în care domeniul variabil al lanțului greu menționat cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3}, iar domeniul variabil al lanțului ușor menționat cuprinde un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3}, în care:

(A) domeniul CDR_{H1} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:8 sau SEQ ID NO:34; și
(B) domeniul CDR_{H2} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:35 sau SEQ ID NO:36; și

(C) domeniul CDR_{H3} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a oricăreia dintre SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45 sau SEQ ID NO:46; și
în care:

(A) domeniul CDR_{L1} menționat are secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 sau SEQ ID NO:64; și

(B) domeniul CDR_{L2} menționat are secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 13; și

(C) domeniul CDR_{L3} menționat are secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 14 sau SEQ ID NO:65.

În anumite variante de realizare, domeniul variabil al lanțului greu (VH) al variantei optimizate a MAB-A este selectat din grupul constând din:

- (5) hMAB-A VH(2A) (SEQ ID NO:20);
- (6) hMAB-A VH(2B) (SEQ ID NO:21);
- (7) hMAB-A VH(2C) (SEQ ID NO:22);
- (8) hMAB-A VH(2D) (SEQ ID NO:23);
- (9) hMAB-A VH(2E) (SEQ ID NO:24);
- (10) hMAB-A VH(2F) (SEQ ID NO:25);
- (11) hMAB-A VH(2G) (SEQ ID NO:26);
- (12) hMAB-A VH(2H) (SEQ ID NO:27);
- (13) hMAB-A VH(2I) (SEQ ID NO:28); și
- (14) hMAB-A VH(2J) (SEQ ID NO:29).

În anumite variante de realizare, domeniul variabil al lanțului ușor (VL) al variantei optimizate a MAB-A este selectat din grupul constând din:

- (1) hMAB-A VL(1) (SEQ ID NO:54);
- (2) hMAB-A VL(2) (SEQ ID NO:55);
- (3) hMAB-A VL(3) (SEQ ID NO:56);
- (4) hMAB-A VL(4) (SEQ ID NO:57).

În anumite variante de realizare, domeniul CDR_{H1} cuprinde secvența de aminoacizi SYWMH (SEQ ID NO:8), domeniul CDR_{H2} cuprinde secvența de aminoacizi E I I P I FGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:35), iar domeniul CDR_{H3} cuprinde secvența de aminoacizi GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO:45)

În anumite variante de realizare, domeniul CDR_{L1} cuprinde secvența de aminoacizi KASQSVSDYSGDSYMN (SEQ ID NO:62), domeniul CDR_{L2} cuprinde secvența de aminoacizi AASDLES (SEQ ID NO:13), iar domeniul CDR_{L3} cuprinde secvența de aminoacizi QQSHEDPFT (SEQ ID NO:14).

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul cuprinde:

- (A) domeniul variabil al lanțului greu (VH) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28); or
- (B) domeniul variabil al lanțului ușor (VL) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55); sau
- (C) domeniul variabil al lanțului greu (VH) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28) și domeniul variabil al lanțului ușor (VL) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55)

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul cuprinde o regiune Fc. În unele variante de realizare, regiunea Fc este o variantă de regiune Fc care cuprinde: (a) una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea variantei de regiune Fc pentru un FcγR; și/sau (b) una sau mai multe modificări de aminoacizi care introduc un rest de cisteină. În unele variante de realizare, una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea variantei de regiune Fc pentru un FcγR cuprind: (A) L234A; (B) L235A; sau (C) L234A și L235A; în care numerotarea menționată este cea din indexul UE Kabat. În unele variante de realizare, una sau mai multe modificări de aminoacizi care introduc un rest de cisteină cuprind S442C, în care numerotarea menționată este cea din indexul UE Kabat.

Imunoconjugatul conform prezentei invenții cuprinde un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care se leagă în mod specific la ADAM9 umană și la ADAM9 de cyno, în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia este conjugat cu agentul farmacologic.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia este optimizat pentru a avea o îmbunătățire de cel puțin 100 de ori a afinității de legare la ADAM9 de cyno și păstrează legarea cu afinitate crescută la ADAM9 umană în comparație cu anticorpul parental himeric sau murinic.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care are secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO: 8, 35 și 37 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (b) SEQ ID NO: 8, 35 și 38 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (c) SEQ ID NO: 8, 35 și 39 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (d) SEQ ID NO: 8, 35 și 40 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (e) SEQ ID NO: 8, 35 și 41 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (f) SEQ ID NO: 8, 35 și 42 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (g) SEQ ID NO: 8, 35 și 43 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (h) SEQ ID NO: 8, 35 și 44 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (i) SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14; și
- (j) SEQ ID NO: 8, 35 și 46 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențe care sunt cel puțin 90%, cel puțin 95% sau cel puțin 99% identice cu secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO:20 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (b) SEQ ID NO:21 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (c) SEQ ID NO:22 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (d) SEQ ID NO:23 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (e) SEQ ID NO:24 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (f) SEQ ID NO:25 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (g) SEQ ID NO:26 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (h) SEQ ID NO:27 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (i) SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55; și
- (j) SEQ ID NO:29 și, respectiv, SEQ ID NO:55.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care are secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO:20 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (b) SEQ ID NO:21 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (c) SEQ ID NO:22 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (d) SEQ ID NO:23 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (e) SEQ ID NO:24 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (f) SEQ ID NO:25 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (g) SEQ ID NO:26 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (h) SEQ ID NO:27 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
- (i) SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55; și
- (j) SEQ ID NO:29 și, respectiv, SEQ ID NO:55.

- În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat este un anticorp de lungime completă care cuprinde o regiune Fc. În unele variante de realizare, regiunea Fc este o variantă de regiune Fc care cuprinde: (a) una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea variantei de regiune Fc pentru un FcγR selectat din grupul constând din: L234A , L235A și L234A și L235A; și/sau (b) o modificare de aminoacizi care introduce un rest de cisteină la S442, în care numerotarea menționată este cea din indexul UE Kabat.

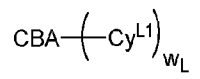
În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO:51 și, respectiv, SEQ ID NO:68; și
- (b) SEQ ID NO:52 și, respectiv, SEQ ID NO:68.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO:141 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
- (b) SEQ ID NO:142 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
- (c) SEQ ID NO:143 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
- (d) SEQ ID NO:151 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
- (e) SEQ ID NO:152 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
- (f) SEQ ID NO:153 și, respectiv, SEQ ID NO:68; și
- (g) SEQ ID NO:154 și, respectiv, SEQ ID NO:68.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:

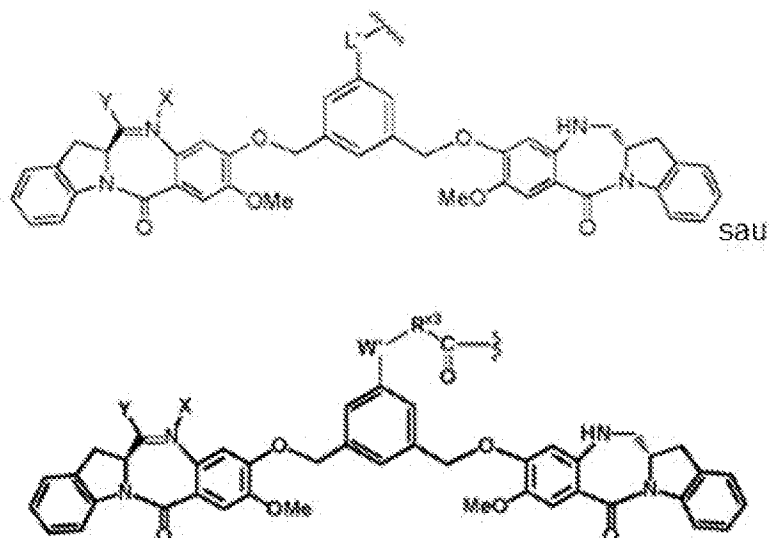


- în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L1} printr-un rest de lizină;

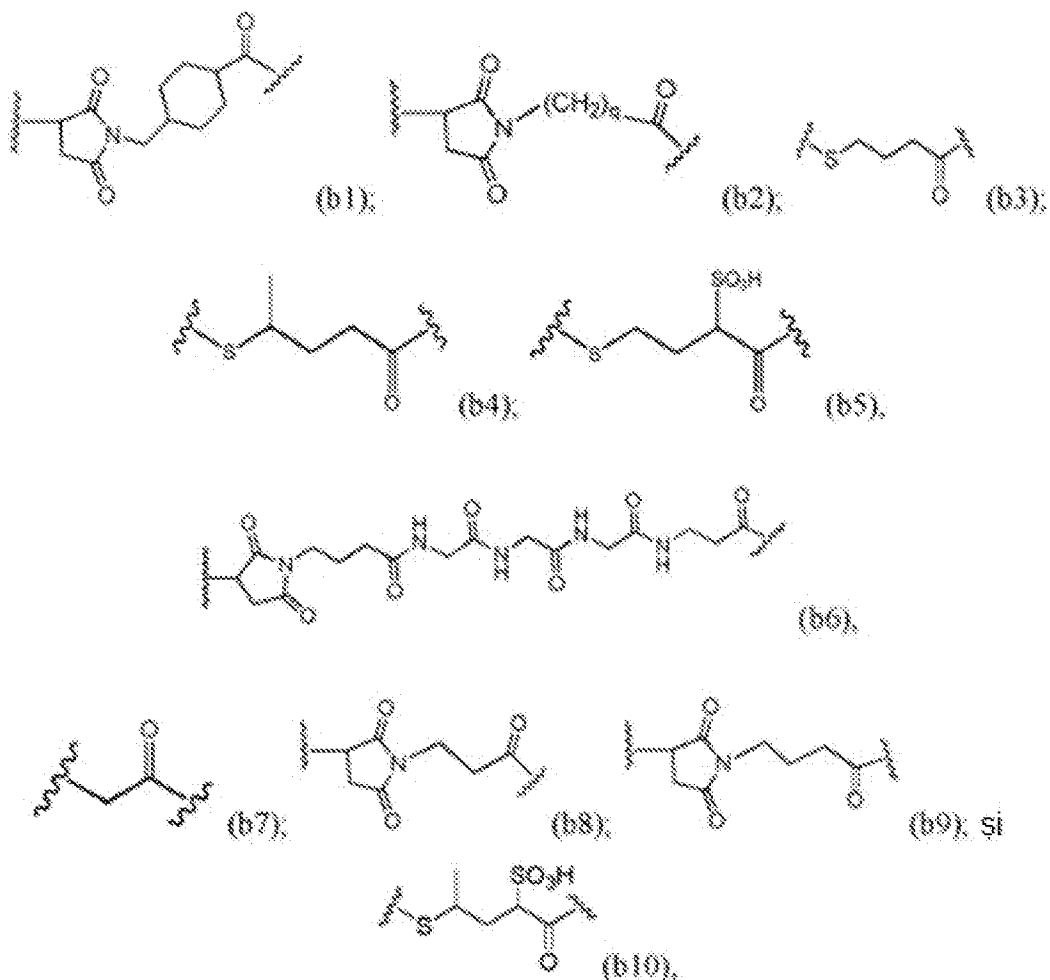
W_L este un număr întreg de la 1 până la 20; și

Cy^{L1} este reprezentat de următoarea formulă:



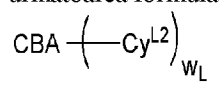
sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

- 5 linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C_1-C_4) alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune de protecție pentru o amină și Y să fie -OH sau $-SO_3H$ sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic;
- W' este $-NR^{e'}$;
- R^{e'} este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
- 10 n este un număr întreg de la 2 până la 6;
- R^k este -H sau -Me;
- R^{x3} este un (C_1-C_6) alchil;
- L' este reprezentat de următoarea formulă:
- 15 - $NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1'); sau
- $NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-$ (B2');
- R₅ este -H sau un (C_1-C_3) alchil;
- P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține între 2 și 20 resturi de aminoacizi;
- R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt fiecare în mod independent -H, (C_1-C_3) alchil sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;
- 20 m este un număr întreg de la 1 până la 6; și
- Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



în care q este un număr întreg de la 1 până la 5.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:

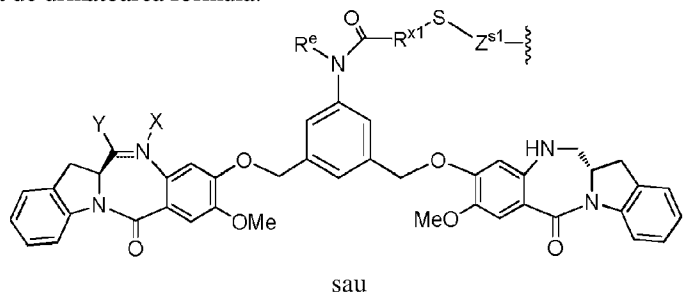


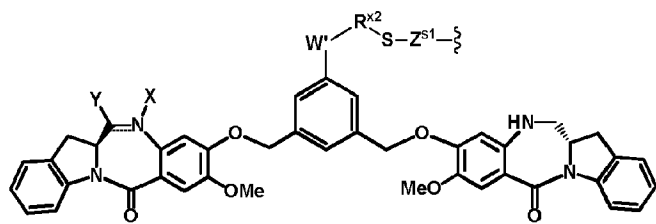
în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L2} printr-un rest de lizină;

W_L este un număr întreg de la 1 până la 20; și

Cy^{L2} este reprezentat de următoarea formulă:





sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune de protecție pentru o amină și Y să fie -OH sau -SO₃H;

R^{x1} și R^{x2} sunt în mod independent (C₁-C₆)alchil;

R^e este -H sau un (C₁-C₆)alchil;

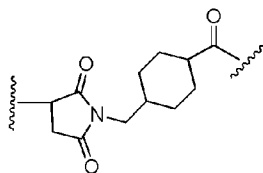
W' este -NR^{e'},

R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

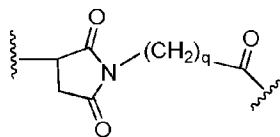
n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

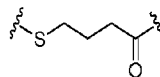
Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



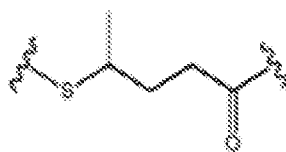
(b1);



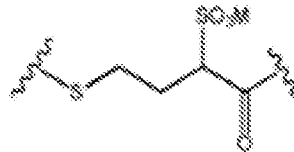
(b2);



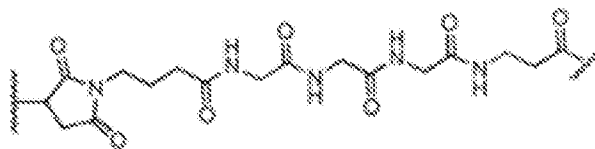
(b3);



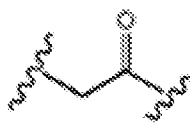
(b4);



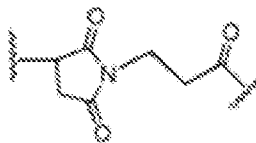
(b5);



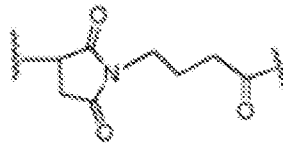
(b6);



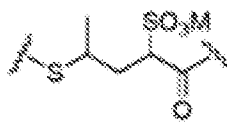
(b7);



(b8);



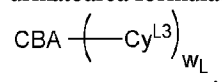
(b9); și



(b10);

în care q este un număr întreg de la 1 până la 5.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:

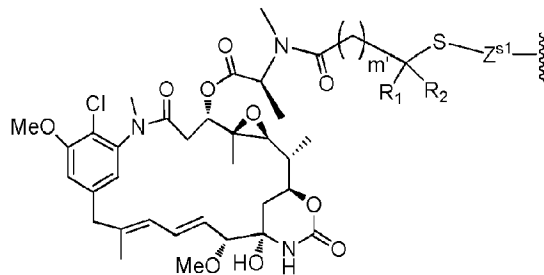


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L3} printr-un rest de lizină;

W_L este un număr întreg de la 1 până la 20;

Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:

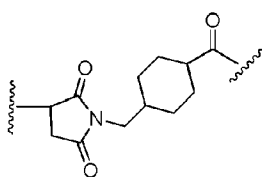


5

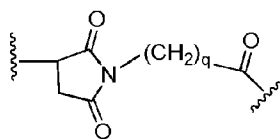
m' este 1 sau 2;

R₁ and R₂, sunt fiecare în mod independent H sau un (C₁-C₃)alchil; și

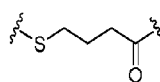
Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



(b1);

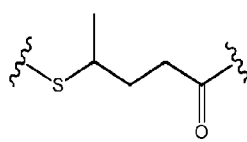


(b2);

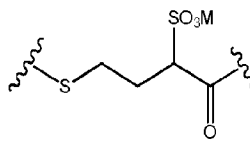


(b3);

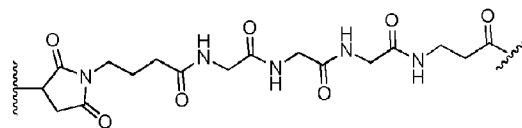
10



(b4);

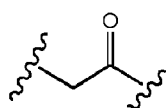


(b5),

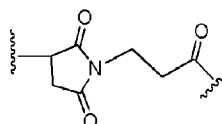


(b6),

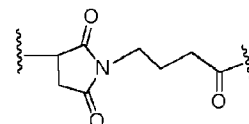
15



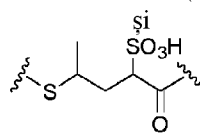
(b7);



(b8);



(b9),



(b10),

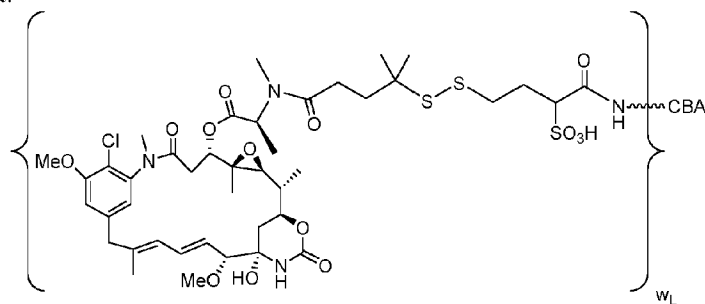
în care q este un număr întreg de la 1 până la 5.

20

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții cuprinde un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia legat la maitansinoidul DM4 prin *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoat (sulfo-SPDB), în care un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} domain care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO:52 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 151 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:52 sau SEQ ID NO:151 este lizină. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:52 sau SEQ ID NO:151 este absent.

30

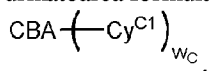
În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:



5 sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care: W_L este un număr întreg de la 1 până la 10;

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO:52 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 151 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:52 sau SEQ ID NO:151 este lizină. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:52 sau SEQ ID NO:151 este absent. În unele variante de realizare, valoarea DAR pentru o compoziție (*de exemplu* compoziții farmaceutice) care cuprinde imunoconjugatul este cuprinsă în intervalul de 1,0 până la 5,0, 1,0 până la 4,0, 1,0 până la 3,4, 1,0 până la 3,0, 1,5 până la 2,5, 2,0 până la 2,5 sau 1,8 până la 2,2. În unele variante de realizare, DAR este mai mic de 4,0, mai mic de 3,8, mai mic de 3,6, mai mic de 3,5, mai mic de 3,0 sau mai mic de 2,5.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:

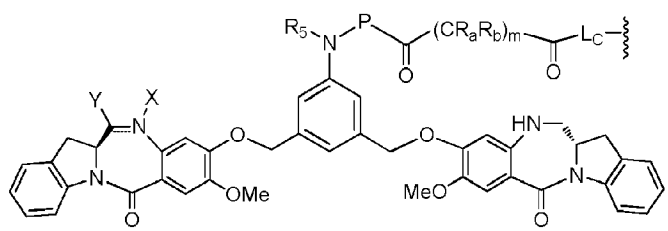


în care:

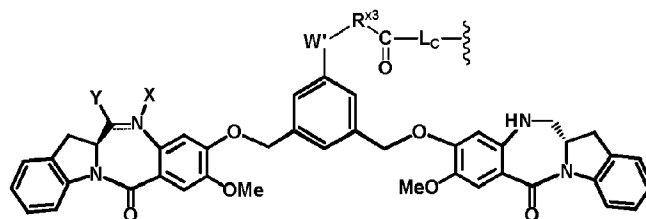
CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C1} printr-un rest de cisteină;

30 W_C este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:



35 sau



sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune de protecție pentru o amină, Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic;

R₅ este -H sau un (C₁-C₃)alchil; P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 resturi de aminoacizi;

R_a and R_b, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H, (C₁-C₃)alchil sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

W' este -NR^{e'},

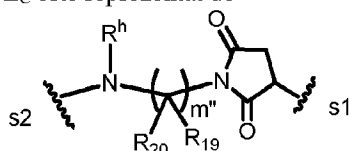
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un (C₁-C₆)alchil; și

L_C este reprezentat de

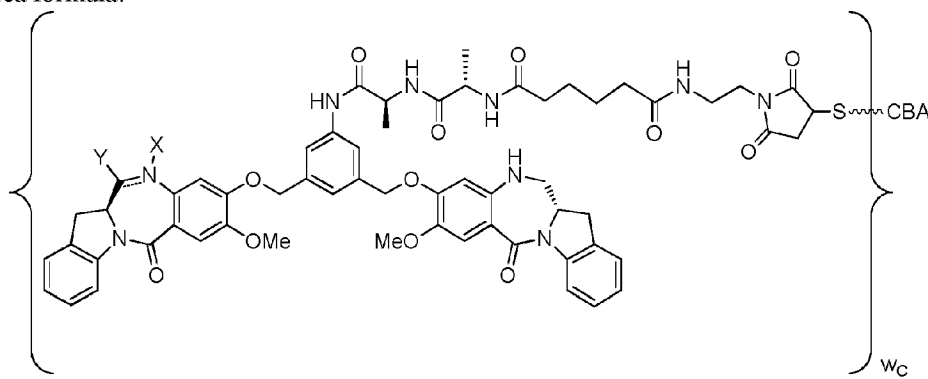


s1 este situsul legat covalent la CBA, iar s2 este situsul legat covalent la gruparea -C(=O)- de pe Cy^{C1}; în care: R₁₉ și R₂₀, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C₁-C₃)alchil;

m'' este un număr întreg cuprins între 1 și 10; și

R^h este -H sau un (C₁-C₃)alchil.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:



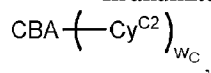
sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H, iar atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -SO₃H sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic;

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ

ID NO: 142 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:142 este lizină. În unele variante de realizare, anticorpii anti-ADAM9 umanizati cuprind un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO:152 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:142 sau SEQ ID NO:152 este lizină. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:142 sau SEQ ID NO:152 este absent.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:

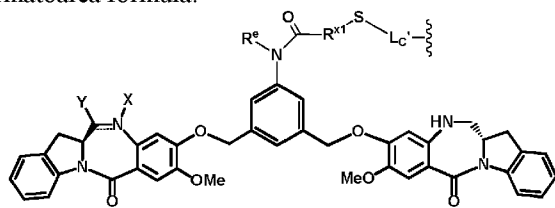


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C2} printr-un rest de cisteină;

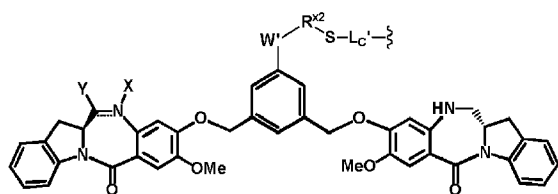
W_C este 1 sau 2;

Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



15

sau



sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune de protecție pentru o amină, Y să fie -OH sau $-\text{SO}_3\text{H}$ sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic;

R^{x1} este un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alchil;

R^{e} este -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alchil;

W' este $-\text{NR}^{\text{e}'}$;

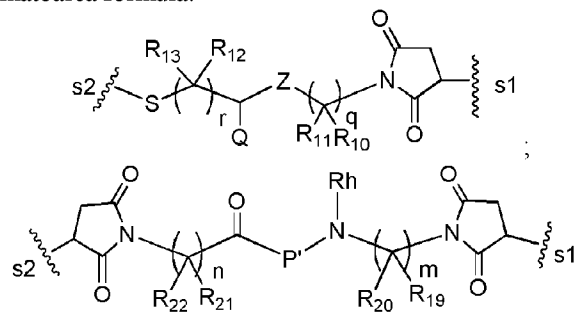
$\text{R}^{\text{e}'}$ este $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^{\text{k}}$;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^{k} este -H sau -Me;

R^{x2} este un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alchil;

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

s1 este situsul legat covalent la CBA și s2 este situsul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C2} ;

Z este $-\text{C}(=\text{O})\text{-NR}_9\text{-}$, sau $-\text{NR}_9\text{-C}(=\text{O})\text{-}$;

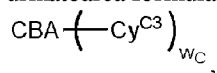
Q este -H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{19} , R_{20} , R_{21} și R_{22} , la fiecare apariție, sunt în mod independent - H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ alchil;

q și r, la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;
 m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;
 R^h este -H sau un (C_1-C_3) alchil; și
 P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi.

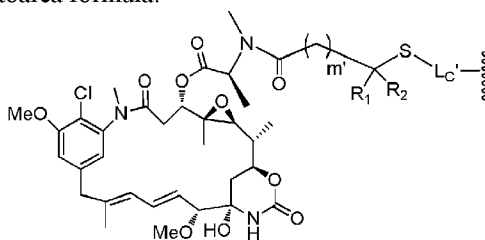
5

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

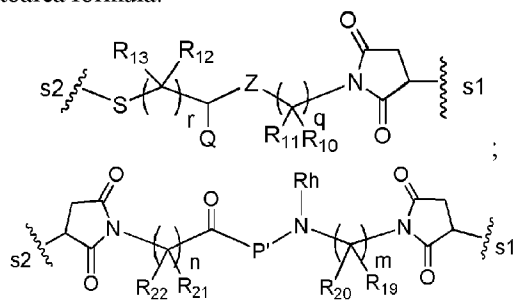
- 10 CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;
 W_C este 1 sau 2;
 Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:



15

în care:

m' este 1 sau 2;
 R_1 și R_2 , sunt fiecare în mod independent -H sau un (C_1-C_3) alchil;
 $L_{C'}$ este reprezentat de următoarea formulă:



20

în care:

s1 este situsul legat covalent la CBA și s2 este situsul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C3} ;
 Z este $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;

Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

- 25 $R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{19}, R_{20}, R_{21}$ and R_{22} , la fiecare apariție, sunt în mod independent - H sau un (C_1-C_3) alchil;

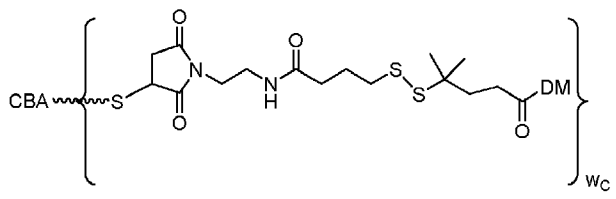
q și r, la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

- 30 R^h este -H sau un (C_1-C_3) alchil; și

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi.

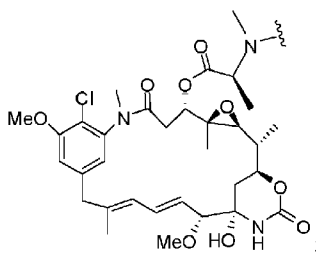
În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:



35

sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:

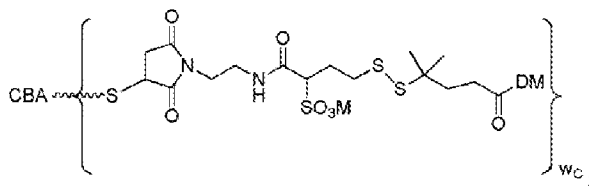
DM este o fracțiune medicamentoasă reprezentată de următoarea formulă:



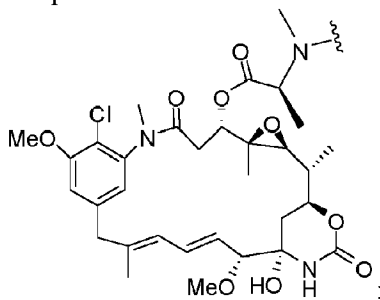
W_C este 1 sau 2;

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 142 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 152 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:142 sau SEQ ID NO: 152 este lizină. În unele variante de realizare, X din SEQ ID NO:142 sau SEQ ID NO:152 este absent. În unele variante de realizare, W_C este 2.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, în care:
DM este o fracțiune medicamentoasă reprezentată de următoarea formulă:



CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 142 și, respectiv, SEQ ID NO:68. În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO: 152 și, respectiv, SEQ ID NO:68; și

W_C este 1 sau 2. În unele variante de realizare, W_C este 2.

Un alt aspect al prezentei invenții este prezentat în revendicarea 15 și furnizează o compoziție farmaceutică ce cuprinde o cantitate eficientă de imunoconjugat astfel cum este descris în prezenta invenție și un purtător, excipient sau diluant acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

Un alt aspect al prezentei invenții este prezentat în revendicarea 16 și furnizează

imunoconjugatul sau compoziția farmaceutică pentru utilizare într-un procedeu de tratare a unei boli sau afecțiuni asociate cu sau caracterizate prin expresia ADAM9 la un subiect, care cuprinde administrarea la subiectul menționat a unei cantități eficiente de imunoconjugat sau compoziție farmaceutică.

În anumite variante de realizare, boala sau afecțiunea asociată cu sau caracterizată prin expresia ADAM9 este cancer. În unele variante de realizare, cancerul este selectat din grupul constând din cancer pulmonar cu celule non-mici, cancer colorectal, cancer gastric, cancer pancreatic, carcinom celular renal, cancer de prostată, cancer esofagian, cancer mamar, cancer de cap și gât, cancer ovarian, cancer hepatic, cancer de col uterin, cancer tiroidian, cancer testicular, cancer mieloid, melanom și cancer limfoid. În anumite variante de realizare, cancerul pulmonar cu celule non-mici este carcinom cu celule scuamoase, adenocarcinom sau carcinom nediferențiat cu celule mari. În anumite variante de realizare, cancerul colorectal este adenocarcinom, tumori carcinoide gastrointestinale, tumori stromale gastrointestinale, limfom colorectal primar, leiomiiosarcom sau carcinom cu celule scuamoase.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

În următoarele exemple, imunoconjugatii care cuprind chMAB-A sau hMAB-A(2.2) sunt prezentați doar în scop ilustrativ și nu fac parte din invenția revendicată în prezentul document.

FIG. 1A-1C ilustrează rezultatele unor studii de imunohistochimie (IHC) și ilustrează capacitatea MAB-A de a eticheta în mod specific o varietate de tipuri de cancer pulmonar cu celule non-mici (**FIG. 1A**), celule de cancer mamar, celule de cancer de prostată, celule de cancer gastric (**FIG. 1B**) și celule de cancer de colon (**FIG. 1C**), în timp ce controlul izotipului nu a reușit să eticheteze în mod specific niciunul dintre aceste tipuri de celule canceroase (**FIG. 1A-1C**).

FIG. 2 ilustrează rezultatele studiilor de colorare celulară și ilustrează faptul că MAB-A se leagă la ADAM9 umană și, într-o măsură mai mică, la ADAM9 de maimuță cynomolgus, exprimată tranzitoriu pe suprafața celulelor 293-FT și CHO-K (panoul de sus și respectiv de jos).

FIG. 3A-3B ilustrează secvențele de aminoacizi ale domeniului murinic anti-ADAM9-VH aliniate cu mai multe variante umanizate/optimize de MAB-A (**FIG. 3A, SEQ ID NO:7, 16, 17, 18,19, 21, 22, 23 și 28**) și domeniul murinic anti-ADAM9-VL aliniat cu mai multe variante umanizate/optimize de MAB-A (**FIG. 3B, SEQ ID NO:11, 51, 52, 53 și 54**). Pozițiile substituie în cadrul CDR în timpul optimizării inițiale sunt subliniate după cum urmează: situsurile potențiale de deamidare și izomerare sunt indicate cu o singură subliniere, resturile de lizină sunt indicate cu dublă subliniere, resturile labile suplimentare sunt indicate cu o subliniere dublă întreruptă. **FIG. 4A-4B** ilustrează curbele de legare ELISA ale celor zece clone hMAB-A optimizate selectate care cuprind variante de CDR_{H3}, hMAB-A parental (2.2) și un anticorp izotip martor. **FIG. 4A** ilustrează curbele de legare pentru cynoADAM9 și **FIG. 4B** ilustrează curbele de legare pentru huADAM9.

FIG. 5A-5B ilustrează curbele de legare ELISA ale variantelor Fc. **FIG. 5A** ilustrează curbele de legare pentru cynoADAM9 și **FIG. 5B** ilustrează curbele de legare pentru huADAM9.

FIG. 6A-6B ilustrează colorarea membranei ADAM9 IHC într-o micromatrice de țesut de carcinom 20 și, respectiv, colorarea membranei ADAM IHC și citoplasmatică în opt indicații selectate.

FIG. 7A-7B ilustrează internalizarea pulsului și internalizarea continuă a diversilor conjugați ai anticorpilor anti-ADAM9.

FIG. 8A-8D ilustrează curbele de legare FACS ale anticorpilor chMAB-A, hMAB-A(2.2), hMAB-A(2C.2) și hMAB-A(2I.2) și imunoconjugatii corespunzatori ai acestora.

FIG. 9A-9H ilustrează citotoxicitatea *in vitro* a diversilor imunoconjugatii anti-ADAM9 (hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4, hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, hMAB-A(2.2)-DGN549 și hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549) pe un panou larg de linii de celule tumorale pozitive ADAM9. Conjugații pe bază de IgG1 fără țintire sunt incluși ca martori negativi.

FIG. 10 ilustrează activitatea antitumorală a hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, în funcție de anticorp) și chMAB-A-DGN549 (10μg/kg, în funcție de sarcina utilă) la modelul de xenogrefă de adenocarcinom pulmonar uman cu celule non-mici Calu-3.

FIG. 11 ilustrează activitatea antitumorală a hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 (0,5μg/kg, 1μg/kg, 3μg/kg și 10μg/kg, în funcție de sarcina utilă) la modelul de xenogrefă de adenocarcinom pulmonar uman cu celule non-mici Calu-3.

FIG. 12 ilustrează activitatea antitumorală a hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, în funcție de anticorp) la modelul de xenogrefă de carcinom cu celule scuamoase cu celule non-mici H1703.

FIG. 13 ilustrează activitatea antitumorală a chMAB-A-sSPDB-DM4 (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg) la modelul de carcinom cu celule scuamoase de cap și gât Detroit562 (volum tumoral 95,76 până la 450,83 mm³).

FIG. 14 ilustrează activitatea antitumorală a chMAB-A-sSPDB-DM4 (1,25 mg/kg și 5 mg/kg) la modelul de carcinom cu celule scuamoase de cap și gât Detroit562 (volum tumoral 277,51 până la 503,49 mm³).

FIG. 15 ilustrează activitatea antitumorală a huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la modelul de xenogrefă de carcinom gastric SNU-5.

FIG. 16 ilustrează activitatea antitumorală a huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la modelul de xenogrefă de carcinom gastric SNU-5.

5 **FIG. 17** ilustrează activitatea antitumorală a huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la modelul de xenogrefă de cancer colorectal SW48.

FIG. 18 ilustrează activitatea antitumorală a huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la modelul de xenogrefă de cancer colorectal SW48.

10 **FIG. 19A** ilustrează legarea a 250nM & 1000nM huFcRn la anticorpii anti-ADAM9 capturați cu și fără mutația YTE la pH 6,0.

FIG. 19B ilustrează legarea a 25nM & 100nM anticorpi anti-ADAM9 cu și fără mutația YTE la FcRn imobilizat la pH 6,0.

15 **FIG. 20** ilustrează datele PK conjugat anticorp-medicament pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 și hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 la maimuța cynomolgus atât la 4mg/kg cât și la 12 mg/kg (doză de anticorpi).

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la imunoconjugăți care cuprind un anticorp sau un fragment al acestuia capabil să se lege în mod specific la "Proteina 9 care conține domeniul de dezintegrină și metaloproteinază" ("ADAM9") conjugată cu cel puțin un agent farmacologic astfel cum este definit în revendicarea 1. Imunoconjugății sunt reactivi încrucișat cu ADAM9 umană și ADAM9 de primată non-umană (o maimuță cynomolgus). Imunoconjugății cuprind un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și/sau un domeniu variabil al lanțului greu (VH) care a fost umanizat (și în mod opțional deimunizat) astfel încât să prezinte o imunogenitate redusă la administrarea unor astfel de imunoconjugăți la un subiect destinat. Invenția se referă, de asemenea, la compoziții farmaceutice astfel cum sunt definite în revendicarea 15 care conțin oricare dintre astfel de imunoconjugăți și la imunoconjugăți sau compoziții farmaceutice pentru utilizare în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu sau caracterizate prin expresia ADAM9 (cum ar fi cancer) astfel cum este definit în revendicările 16 și 17.

30 I. Anticorpii și domeniile de legare ale acestora

Imunoconjugății conform prezentei invenții cuprind un anticorp care se leagă la ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia. "Anticorpii" sunt molecule de imunoglobulină capabile de legarea specifică la o țintă, cum ar fi un carbohidrat, polinucleotidă, lipidă, polipeptidă *etc.*, prin cel puțin un situs de recunoaștere a antigenului, situat în **domeniul variabil** al moleculei de imunoglobulină. Astfel cum sunt utilizați în prezenta invenție, termenii "anticorp" și "anticorpi" se referă la anticorpi monoclonali, anticorpi multispecifici, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi sintetici, anticorpi himerici, anticorpi policlonali, anticorpi camelizați, Fv cu un singur lanț (scFv), anticorpi cu un singur lanț, fragmente Fab, fragmente F(ab'), intracorpi și fragmente de legare a epitopilor ale oricăroră dintre cele menționate anterior. În special, termenul "anticorp" include molecule de imunoglobulină și fragmente active din punct de vedere imunologic de molecule de imunoglobulină, *adică* molecule care conțin un situs de legare a epitopilor. Moleculele de imunoglobulină pot fi de orice tip (*de exemplu* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (*de exemplu* IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ și IgA₂) sau subclasă. În ultimele decenii s-a înregistrat o renaștere a interesului față de potențialul terapeutic al anticorpilor, iar anticorpii au devenit una dintre clasele de top de medicamente derivate din biotehnologie (Chan, C.E. și colab. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases," Singapore Med. J. 50(7):663-666). Pe lângă utilizarea acestora în diagnosticare, anticorpii s-au dovedit a fi utili ca agenți terapeutici. Peste 200 de medicamente pe bază de anticorpi au fost aprobate pentru utilizare sau sunt în curs de dezvoltare.

Anticorpii sunt capabili să se "**lege imunospecific**" la o polipeptidă sau o moleculă proteică sau non-proteică datorită prezenței pe o astfel de moleculă a unui anumit domeniu sau fracțiune sau conformație (un "**epitop**"). O moleculă care conține un epitop poate avea activitate imunogenă, astfel încât determină un răspuns de producere de anticorpi la un animal; astfel de molecule sunt denumite "**antigeni**". Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, se spune că un anticorp se leagă "**imunospecific**" la o regiune a altei molecule (*adică* un epitop) dacă reacționează sau se asociază mai frecvent, mai rapid, cu o durată mai mare și/sau cu o afinitate mai mare cu acel epitop în comparație cu epitopii alternativi. De exemplu, un anticorp care se leagă imunospecific la un epitop viral este un anticorp care se leagă la acel epitop viral cu o afinitate, aviditate mai mare, mai ușor, și/sau cu o durată mai mare decât se leagă imunospecific la alți epitopi virali sau epitopi nevrali. Se înțelege, de asemenea, citind această definiție, faptul că, de exemplu, un anticorp (sau o fracțiune sau un epitop) care se leagă imunospecific la o primă țintă se poate lega sau nu în mod specific sau preferențial la o a doua țintă. Ca atare, "legarea imunospecifică" la un anumit epitop nu necesită neapărat (deși poate include) legarea exclusivă la acel epitop. În general, dar nu neapărat, referirea la legare semnifică legare "imunospecifică".

Se spune că două molecule sunt capabile să se lege una la cealaltă într-o manieră **"fiziospecific"**, dacă o astfel de legare prezintă specificitatea cu care receptorii se leagă de liganzii respectivi ai acestora.

Termenul **"anticorp monoclonal"** se referă la o populație omogenă de anticorpi în care anticorpus monoclonal este compus din aminoacizi (care apar în mod natural sau care apar în mod nenatural) care sunt implicați în legarea selectivă a unui antigen. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici, fiind direcționați împotriva unui singur epitop (sau situs antigenic). Termenul „anticorp monoclonal” cuprinde nu doar anticorpi monoclonali intacti și anticorpi monoclonali cu lungime completă, ci și fragmente ale acestora (cum ar fi Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), cu un singur lanț (scFv), mutanți ai acestora, proteine de fuziune care cuprind o porțiune de anticorp, anticorpi monoclonali umanizați, anticorpi monoclonali himerici și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină care cuprinde un situs de recunoaștere a antigenului cu specificitatea necesară și capacitatea de a se lega la un antigen. Termenul nu se intenționează să fie limitat în ceea ce privește sursa anticorpusului sau modul în care este produs (*de exemplu* prin hibridom, selecție de fagi, expresie recombinată, animale transgenice *etc.*). Termenul include imunoglobuline întregi precum și fragmentele *etc.* descrise anterior sub definiția termenului "anticorp". Metodele de producere a anticorpus monoclonali sunt cunoscute în stadiul tehnicii. Un procedeu care poate fi utilizat este procedeul lui Kohler, G. și colab. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495-497 sau o modificare a acestuia. De obicei, anticorpii monoclonali sunt dezvoltati la șoareci, șobolani sau iepuri. Anticorpii sunt produși prin imunizarea unui animal cu o cantitate imunogenă de celule, extracte celulare sau preparate proteice care conțin epitopul dorit. Imunogenul poate fi, dar fără a se limita la, celule primare, linii celulare cultivate, celule canceroase, proteine, peptide, acizi nucleici sau țesut. Celulele utilizate pentru imunizare pot fi cultivate pentru o perioadă de timp (*de exemplu* cel puțin 24 de ore) înainte de utilizarea acestora ca imunogen. Celulele pot fi utilizate ca imunogeni singure sau în combinație cu un adjuvant nederaturant, cum ar fi Ribi (a se vedea, *de exemplu*, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125). În general, celulele ar trebui să fie păstrate intacte și, de preferat, viabile atunci când sunt utilizate ca imunogeni. Celulele intacte pot permite ca antigenii să fie mai bine detectați decât celulele rupte de către animalul imunizat. Utilizarea adjuvanților denaturanți sau duri, *de exemplu* adjuvantul Freund, poate rupe celulele și, prin urmare, este descurajată. Imunogenul poate fi administrat de mai multe ori la intervale periodice, cum ar fi de două ori pe săptămână sau săptămânal, sau poate fi administrat în așa fel încât să mențină viabilitatea la animal (de exemplu într-un recombinant tisular). În mod alternativ, anticorpii monoclonali existenți și orice alți anticorpi echivalenți care sunt imunospecifici pentru un epitop patogen dorit pot fi secvențiați și produși recombinant prin orice mijloace cunoscute în stadiul tehnicii. Într-o variantă de realizare, un astfel de anticorp este secvențiat și secvența de polinucleotide este apoi clonată într-un vector pentru expresie sau propagare. Secvența care codifică anticorpus de interes poate fi menținută într-un vector într-o celulă gazdă și celula gazdă poate fi apoi extinsă și congelată pentru utilizare ulterioară. Secvența de polinucleotide a unor astfel de anticorpi poate fi utilizată pentru manipularea genetică pentru a genera o afinitate optimizată, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și/sau un anticorp caninizat, pentru a îmbunătăți afinitatea sau alte caracteristici ale anticorpusului, precum și imunoconjugării conform invenției. Principiul general în umanizarea unui anticorp implică reținerea secvenței de bază a porțiunii de legare a antigenului a anticorpusului, în timp ce se schimbă restul non-uman al anticorpusului cu secvențe de anticorp uman.

Anticorpii naturali (cum ar fi anticorpii naturali IgG) sunt alcătuiți din două **"lanțuri ușoare"** complexate cu două **"lanțuri grele."** Fiecare lanț ușor conține un domeniu variabil (**"VL"**) și un domeniu constant (**"CL"**). Fiecare lanț greu conține un domeniu variabil (**"VH"**), trei domenii constante (**"CH1," "CH2"** și **"CH3"**) și o regiune de **"articulație"** (**"H"**) situată între domeniile **CH1** și **CH2**. Spre deosebire de acestea, scFv sunt molecule cu un singur lanț realizate prin legarea domeniilor variabile ale lanțului ușor și greu printr-o peptidă de legătură scurtă.

Prin urmare, unitatea structurală de bază a imunoglobulinelor care apar în mod natural (*de exemplu* IgG) este un tetramer care are două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, de obicei exprimate ca o glicoproteină de aproximativ 150.000 Da. Porțiunea amino-terminală (**"N-terminală"**) a fiecărui lanț include un domeniu variabil de aproximativ 100 până la 110 sau mai mulți aminoacizi responsabili în primul rând pentru recunoașterea antigenului. Porțiunea carboxi-terminală (**"C-terminală"**) a fiecărui lanț definește o regiune constantă, cu lanțuri ușoare care au un singur domeniu constant și lanțuri grele care au de obicei trei domenii constante și o regiune de articulație. Prin urmare, structura lanțurilor ușoare ale unei molecule de IgG este n-VL-CL-c, iar structura lanțurilor grele de IgG este n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (unde n și c reprezintă capătul N-terminal și, respectiv, capătul C-terminal al polipeptidei).

A. Caracteristicile domeniilor variabile ale anticorpilor

Domeniile variabile ale unei molecule de IgG constă din 1, 2 și, cel mai frecvent, 3 regiuni de determinare a complementarității ("CDR", *adică* CDR1, CDR2 și, respectiv, CDR3), care conțin resturile aflate în contact cu epitopul și segmente non-CDR, denumite **regiuni cadru** ("FR"), care, în general, mențin structura și determină poziționarea regiunilor CDR astfel încât să permită o astfel de intrare în contact (deși anumite resturi cadru pot intra în contact, de asemenea, și cu epitopul). Prin urmare, domeniile VL și VH au de obicei structura: **n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c** (unde "n" desemnează capătul N-terminal și "c" desemnează capătul C-terminal). Polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) primul, cel de-al doilea, cel de-al treilea și cel de-al patrulea FR al lanțului ușor al unui anticorp sunt denumite în prezenta invenției, respectiv: domeniul **FR_L1**, domeniul **FR_L2**, domeniul **FR_L3** și domeniul **FR_L4**. În mod similar, polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) primul, cel de-al doilea, cel de-al treilea și cel de-al patrulea FR al lanțului greu al unui anticorp sunt denumite în prezenta invenției, respectiv: domeniul **FR_H1**, domeniul **FR_H2**, domeniul **FR_H3** și domeniul **FR_H4**. Polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) primul, cel de-al doilea și cel de-al treilea CDR al lanțului ușor al unui anticorp sunt denumite în prezenta invenției, respectiv: domeniul **CDR_L1**, domeniul **CDR_L2** și domeniul **CDR_L3**. În mod similar, polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) primul, cel de-al doilea și cel de-al treilea CDR al lanțului greu al unui anticorp sunt denumite în prezenta invenției, respectiv: domeniul **CDR_H1**, domeniul **CDR_H2** și domeniul **CDR_H3**. Prin urmare, termenii domeniu CDR_L1, domeniu CDR_L2, domeniu CDR_L3, domeniu CDR_H1, domeniu CDR_H2 și domeniu CDR_H3 sunt direcționați către polipeptide care, atunci când sunt încorporate într-un anticorp, determină anticorpul să fie capabil să se lege la un anumit epitop.

În cuprinsul prezentei specificații, numerotarea resturilor în domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare mature de imunoglobuline sunt desemnate prin poziția unui aminoacid în lanț. Kabat a descris numeroase secvențe de aminoacizi pentru anticorpi, a identificat o secvență consens de aminoacizi pentru fiecare subgrup și a atribuit un număr de rest fiecărui aminoacid, iar CDR sunt identificate astfel cum sunt definite în Kabat (se va înțelege faptul că CDR_H1 astfel cum este definit de Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917) începe cu cinci resturi mai devreme). Schema de numerotare Kabat se poate extinde la anticorpii care nu sunt incluși în compendiul său prin alinierea anticorpului în cauză cu una dintre secvențele consens din Kabat prin referire la aminoacizii conservați. Acest procedeu de atribuire a numerelor de resturi a devenit standard în domeniu și identifică cu ușurință aminoacizii din poziții echivalente în diverși anticorpi, inclusiv variante himerice sau umanizate. De exemplu, un aminoacid din poziția 50 a unui lanț ușor de anticorp uman ocupă poziția echivalentă cu un aminoacid din poziția 50 a unui lanț ușor de anticorp de șoarece.

Capacitatea unui anticorp de a se lega la un epitop al unui antigen depinde de prezența și secvența de aminoacizi a domeniilor VL și VH ale anticorpului. Interacțiunea lanțului ușor și lanțului greu al unui anticorp și, în special, interacțiunea domeniilor VL și VH ale acestuia formează unul dintre cele două situsuri de legare a epitopului ale unui anticorp natural, cum ar fi o IgG. Anticorpii naturali sunt capabili să se lege doar la o singură specie de epitop (*adică* sunt monospecfici), deși se pot lega la copii multiple ale acelei specii de epitop (*adică* prezintă bivalență sau multivalență).

În consecință, astfel cum este utilizat în prezenta invenției, termenul "**fragment de legare a epitopului**" semnifică un fragment al unui anticorp capabil să se lege imunospecific la un epitop, iar termenul "**situs de legare a epitopului**" se referă la o porțiune a unei molecule care cuprinde un fragment de legare a epitopului. Un fragment de legare a epitopului poate conține oricare 1, 2, 3, 4 sau 5 domenii CDR ale unui anticorp sau poate conține toate cele 6 domenii CDR ale unui anticorp și, deși este capabil să se lege imunospecific la un astfel de epitop, poate prezenta o imunospecificitate, afinitate sau selectivitate față de un astfel de epitop care diferă de cea a unui astfel de anticorp. De preferat, cu toate acestea, un fragment de legare a epitopului va conține toate cele 6 domenii CDR ale unui astfel de anticorp. Un fragment de legare a epitopului al unui anticorp poate fi un singur lanț polipeptidic (*de exemplu* un scFv) sau poate cuprinde două sau mai multe lanțuri polipeptidice, fiecare având un capăt amino terminal și un capăt carboxi terminal (*de exemplu* un fragment Fab, un fragment Fab₂ etc.). Cu excepția cazului în care este menționat în mod specific, ordinea domeniilor moleculelor de proteine descrise în prezenta invenției este în direcția "**capătul N-terminal către capătul C-terminal**".

Invenția cuprinde, de asemenea, imunoconjugați care cuprind fragmente de domeniu variabil cu un singur lanț ("**scFv**") care cuprind un domeniu anti-ADAM9-VL și/sau VH conform invenției. Fragmentele domeniului variabil cu un singur lanț cuprind domeniile VL și VH care sunt legate utilizând o peptidă scurtă "linker". Astfel de linkeri pot fi modificați pentru a furniza funcții suplimentare, cum ar fi pentru a permite atașarea unui medicament sau pentru a permite atașarea la un suport solid. Variantele cu

un singur lanț pot fi produse fie recombinant, fie sintetic. Pentru producția sintetică de scFv, poate fi utilizat un sintetizator automat. Pentru producerea recombinantă de scFv, o plasmidă adecvată care conține o polinucleotidă care codifică scFv poate fi introdusă într-o celulă gazdă adecvată, fie eucariotă, cum ar fi celule de drojdie, plante, insecte sau mamifere, fie procariotă, cum ar fi E. coli. Polinucleotidele care codifică scFv de interes pot fi realizate prin manipulări de rutină, cum ar fi legarea polinucleotidelor. ScFv rezultat poate fi izolat utilizând tehnici standard de purificare a proteinelor cunoscute în stadiul tehnicii.

Termenul anticorp "**umanizat**" se referă la o moleculă himerică ce are un situs de legare a epitopului unei imunoglobuline dintr-o specie non-umană și o structură de imunoglobulină rămasă care se bazează pe structura și /sau secvența unei imunoglobuline umane. Anticorpii umanizați sunt în general preparați utilizând tehnici recombinante. Imunoconjugatii conform prezentei invenții pot cuprinde variante umanizate, himerice sau caninizate ale unui anticorp care este desemnat în prezenta invenție ca "**MAB-A**". Secvențele polinucleotidice care codifică domeniile variabile ale MAB-A pot fi utilizate pentru manipularea genetică pentru a genera derivați MAB-A care posedă caracteristici îmbunătățite sau modificate (*de exemplu* afinitate, reactivitate încrucișată, specificitate *etc.*). Principiul general în umanizarea unui anticorp implică reținerea secvenței de bază a porțiunii de legare a epitopului a anticorpului, în timpul schimbării restului non-uman al anticorpului cu secvențe de anticorpi umani. Există patru etape generale pentru umanizarea unui anticorp monoclonal. Acestea sunt: (1) determinarea nucleotidei și a secvenței de aminoacizi prezise a domeniului variabil ușor și greu al anticorpului inițial; (2) conceperea anticorpului umanizat sau a anticorpului caninizat, *adică* decizia regiunii cadru a anticorpului care să fie utilizată în timpul procesului de umanizare sau caninizare; (3) utilizarea metodologiilor/tehnicilor propriu-zise de umanizare sau caninizare; și (4) transfectarea și expresia anticorpului umanizat. A se vedea, de exemplu, Brevetele SUA nr. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; și 6,331,415. Termenul anticorp "**optimizat**" se referă la un anticorp care are cel puțin un aminoacid care este diferit de anticorpul părinte în cel puțin o regiune de determinare a complementarității (CDR) din regiunea variabilă a lanțului ușor sau greu, care conferă o afinitate de legare mai crescută, de exemplu o afinitate de legare (de 2 ori sau mai mare) mai crescută, la ADAM9 umană și/sau ADAM9 de maimuță cynomolgus, în comparație cu anticorpul parental. Se va înțelege din informațiile furnizate în prezenta invenție faptul că anticorpii conform invenției sunt umanizați și în mod opțional optimizați.

Situsul de legare a epitopului poate cuprinde fie un domeniu variabil complet fuzionat cu unul sau mai multe domenii constante, fie doar CDR ale unui astfel de domeniu variabil grefate în regiuni cadru adecvate. Situsurile de legare a epitopului pot fi de tip sălbatic sau pot fi modificate prin una sau mai multe substituții, inserții sau deleții de aminoacizi. O astfel de acțiune elimină parțial sau complet capacitatea regiunii constante de a servi ca imunogen la beneficiari (*de exemplu* indivizi umani), cu toate acestea, posibilitatea unui răspuns imun la domeniul variabil străin rămâne (LoBuglio, A.F. și colab. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 86:4220-4224). O altă abordare se concentrează nu doar pe furnizarea de regiuni constante derivate de la om, ci și pe modificarea domeniilor variabile, precum și pentru a le remodela cât mai aproape de o formă găsită la imunoglobulinele umane. Se știe faptul că domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpilor conțin trei CDR care variază ca răspuns la antigenii în cauză și determină capacitatea de legare, flancate de cele patru regiuni cadru, care sunt relativ conservate la o specie dată și care se presupune că furnizează o schelă pentru CDR. Atunci când anticorpii non-umani sunt preparați cu privire la un anumit antigen, domeniile variabile pot fi "reformate" sau "umanizate" prin grefarea CDR derivate din anticorpi non-umani pe FR prezente în anticorpul uman care urmează să fie modificat. Aplicarea acestei abordări la diverși anticorpi a fost raportată de Sato, K. și colab. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. și colab. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. și colab. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. și colab. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. și colab. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. și colab. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. și colab. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. și colab. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 88:2869-2873; Carter, P. și colab. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 89:4285-4289; și Co, M.S. și colab. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. Conform invenției

revendicate, anticorpii umanizați au una sau mai multe CDR (unu, doi, trei, patru sau cinci) care diferă în ceea ce privește secvența în raport cu CDR ale anticorpului original.

Au fost descrise o serie de molecule de anticorpi umanizați care cuprind un situs de legare a epitopului derivat dintr-o imunoglobulină non-umană, inclusiv anticorpi himerici care au un domeniu variabil de rozătoare sau modificat de rozătoare și regiuni de determinare a complementarității (CDR) ale acestora asociate fuzionate cu domeniile constante umane (a se vedea, de exemplu, Winter și colab. (1991) "Man-made Antibodies," Nature 349:293-299; Lobuglio și colab. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 86:4220-4224; Shaw și colab. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," J. Immunol. 138:4534-4538; și Brown și colab. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47:3577-3583). Alte referințe descriu CDR de rozătoare grefate într-o regiune cadru (FR) umană de suport înainte de fuziunea cu un domeniu constant de anticorp uman adecvat (a se vedea, de exemplu, Riechmann, L. și colab. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. și colab. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; și Jones și colab. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525). O altă referință descrie CDR de rozătoare susținute de regiunile cadru de rozătoare placate recombinant (a se vedea, de exemplu, Publicația de brevet european nr. 519,596). Aceste molecule "umanizate" sunt concepute pentru a minimiza răspunsul imunologic nedorit față de moleculele de anticorp anti-uman de rozătoare, ceea ce limitează durata și eficacitatea aplicațiilor terapeutice ale acelor fracțiuni la beneficiarii umani. Alte procedee de umanizare a anticorpilor care pot fi de asemenea utilizate sunt descrise de Daugherty și colab. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 și în Brevetele SUA nr. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; și 5,866,692.

B. Caracteristicile domeniilor constante ale anticorpilor

În cuprinsul prezentei specificații, numerotarea resturilor din regiunea constantă a unui lanț greu de IgG este cea din indexul UE din Kabat și colab., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991) ("Kabat"). Termenul "indexul UE astfel cum este stabilit în Kabat" se referă la numerotarea domeniilor constante ale anticorpului uman IgG1 UE furnizată în Kabat. Acest procedeu de atribuire a numerelor de resturi a devenit standard în domeniu și identifică cu ușurință aminoacizii în poziții echivalente în regiunile constante ale diverselor izotipuri de anticorpi.

1. Regiunile constante ale lanțului ușor

Astfel cum s-a indicat anterior, fiecare lanț ușor al unui anticorp conține un domeniu variabil ("VL") și un domeniu constant ("CL").

Un domeniu CL preferat este un domeniu CL Kappa de IgG umană. Secvența de aminoacizi a unui domeniu CL Kappa uman exemplificativ este (SEQ ID NO:69):
RTVAAPSVFEI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

În mod alternativ, un domeniu CL exemplificativ este un domeniu CL Lambda de IgG umană. Secvența de aminoacizi a unui domeniu CL Lambda uman exemplificativ este (SEQ ID NO:70):
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAFTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNNYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

2. Regiunile constante ale lanțului greu

a. Regiuni Fc care apar în mod natural

Astfel cum este furnizat în prezenta invenție, imunoconjugatii conform invenției pot cuprinde o regiune Fc. Regiunea Fc a unor astfel de imunoconjugatii conform invenției poate fi de orice izotip (de exemplu IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4). Imunoconjugatii conform invenției pot cuprinde în plus un domeniu CH1 și/sau o regiune de articulație. Atunci când este prezent, domeniul CH1 și/sau regiunea de

articulație poate fi de orice izotip (*de exemplu* IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4) și este de preferat de același izotip ca și regiunea Fc dorită.

5 Regiunea Fc a imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții poate fi o regiune Fc completă (*de exemplu* o regiune Fc IgG completă) sau doar un fragment al unei regiuni Fc. În mod opțional, regiunii Fc a imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții îi lipsește restul de aminoacid lizină C-terminal.

10 Domeniile CH1 ale celor două lanțuri grele ale unui complex de anticorpi cu regiunea constantă "CL" a lanțului ușor al anticorpului și sunt atașate la domeniile CH2 ale lanțurilor grele printr-un domeniu de articulație intermediar.

Un domeniu CH1 exemplificativ este un domeniu CH1 IgG1 uman. Secvența de aminoacizi a unui domeniu CH1 IgG1 uman exemplificativ este (SEQ ID NO:71):
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
15 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Un domeniu CH1 exemplificativ este un domeniu CH1 IgG2 uman. Secvența de aminoacizi a unui domeniu CH1 IgG2 uman exemplificativ este (SEQ ID NO:72):
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
20 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Un domeniu CH1 exemplificativ este un domeniu CH1 IgG4 uman. Secvența de aminoacizi a unui domeniu CH1 IgG4 uman exemplificativ este (SEQ ID NO:73):
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVDHKPS NTKVDKRV

25 O regiune de articulație exemplificativă este o regiune de articulație IgG1 umană. Secvența de aminoacizi a unei regiuni de articulație IgG1 umană exemplificativă este (SEQ ID NO:74): EPKSCDKTHTCPPCP.

O altă regiune de articulație exemplificativă este o regiune de articulație IgG2 umană. Secvența de aminoacizi a unei regiuni de articulație IgG2 umană exemplificativă este (SEQ ID NO:75): ERKCCVECPPCP.

O altă regiune de articulație exemplificativă este o regiune de articulație IgG4 umană. Secvența de aminoacizi a unei regiuni de articulație IgG4 umană exemplificativă este (SEQ ID NO:76): ESKYGPPCPSCP. Astfel cum s-a descris anterior, o regiune de articulație IgG4 poate cuprinde o mutație stabilizatoare, cum ar fi substituția S228P. Secvența de aminoacizi a unei regiuni de articulație IgG4 stabilizată exemplificativă este (SEQ ID NO:77): ESKYGPPCPSCP.

40 Domeniile CH2 și CH3 ale celor două lanțuri grele ale unui anticorp interacționează pentru a forma o "regiune Fc," care este un domeniu care este recunoscut de "receptorii Fc celulari," inclusiv, dar fără a se limita la, receptorii gamma Fc ("FcyR"). Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, termenul "regiune Fc" este utilizat pentru a defini regiunea C-terminală a unui lanț greu de IgG care cuprinde domeniile CH2 și CH3 ale acelui lanț. Se spune că o regiune Fc este dintr-un anumit izotip, o anumită clasă sau subclasă IgG dacă secvența de aminoacizi a acesteia este cea mai omoloagă cu acel izotip, în raport cu alte izotipuri IgG.

45 Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unei IgG1 umane exemplificative este (SEQ ID NO:1)

231 240 250 260 270 280
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 440 447

ALHNHYTQKS LSLSPGX

astfel cum este numerotat în indexul UE Kabat, în care X este o lizină (K) sau este absent.

- 5 Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unei IgG2 umane exemplificative este (SEQ ID NO:2):

231 240 250 260 270 280
 APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 440 447

ALHNHYTQKS LSLSPGX

astfel cum este numerotat în indexul UE Kabat, în care X este o lizină (K) sau este absent.

- 10 Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unei IgG3 umane exemplificative este (SEQ ID NO:3):

231 240 250 260 270 280
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSV MHE
 440 447

ALHNRFTQKS LSLSPGX

astfel cum este numerotat în indexul UE Kabat, în care X este o lizină (K) sau este absent.

Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unei IgG4 umane exemplificative este (SEQ

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

      340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE

      440      447

```

ID NO:4): ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

      340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

5 astfel cum este numerotat în indexul UE Kabat, în care X este o lizină (K) sau este absent.

Polimorfismele au fost observate la o serie de poziții diferite în regiunile constante ale anticorpilor (*de exemplu* pozițiile Fc, inclusiv, dar fără a se limita la, pozițiile 270, 272, 312, 315, 356, și 358 astfel cum este numerotat în indexul UE Kabat) și, prin urmare, pot exista mici diferențe între secvența prezentată și secvențele din stadiul tehnicii. Formele polimorfe ale imunoglobulinelor umane au fost bine caracterizate. În prezent, sunt cunoscute 18 alotipuri Gm: G1m (1, 2, 3, 17) or G1m (a, x, f, z), G2m (23) or G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) or G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, și colab., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis of Structure, Function And Regulation." Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. și colab., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Se are în vedere în mod specific faptul că anticorpii conform prezentei invenții pot încorpora orice alotip, izoalotip sau haplotip al oricărei gene de imunoglobuline și nu se limitează la alotipul, izoalotipul sau haplotipul secvențelor furnizate în prezenta invenție. În plus, în unele sisteme de expresie, restul de aminoacid C-terminal (îngroșat anterior) al domeniului CH3 poate fi îndepărtat post-tranlațional. În consecință, restul C-terminal al domeniului CH3 este un rest de aminoacid opțional în imunoconjugății conform invenției. Prezenta invenție cuprinde în mod specific imunoconjugății care sunt lipsiți de restul C-terminal al domeniului CH3. De asemenea, prezenta invenție cuprinde în mod specific astfel de constructe care cuprind restul de lizină C-terminal al domeniului CH3.

b. Receptorii Fcγ (FcγR)

25 În funcția imună tradițională, interacțiunea complexelor anticorp-antigen cu celulele sistemului imunitar are ca rezultat o gamă largă de răspunsuri, variind de la funcții efectoare, cum ar fi citotoxicitatea dependentă de anticorpi, degranularea mastocitelor și fagocitoza, până la semnale imunomodulatoare, cum ar fi reglarea proliferării limfocitelor și secreția de anticorpi. Toate aceste interacțiuni sunt inițiate prin legarea regiunii Fc a anticorpilor sau a complexelor imune la receptorii de suprafață celulară specializați pe celulele hematopoietice și în special la receptori (denumiți în mod singular "receptor gamma Fc" "FcγR" și în mod colectiv "FcγR") găsiți pe suprafețele mai multor tipuri de celule ale sistemului imunitar (*de exemplu* limfocite B, celule dendritice foliculare, celule natural killer, macrofage, neutrofile, eozinofile, bazofile și mastocite).

35 Diversitatea răspunsurilor celulare declanșate de anticorpi și complexe imune rezultă din eterogenitatea structurală a celor trei receptori Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) și FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) și FcγRIII (CD16) sunt receptori de activare (*adică* de îmbunătățire a

sistemului imunitar); FcγRIIB (CD32B) este un receptor de inhibare (*adică* de amortizare a sistemului imunitar). În plus, interacțiunea cu receptorul Fc neonatal (FcRn) mediază reciclarea moleculelor de IgG de la endozom la suprafața celulară și eliberarea în sânge. Secvențele de aminoacizi ale IgG1 de tip sălbatic exemplificative (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3) și IgG4 (SEQ ID NO:4) sunt prezentate anterior.

Capacitatea diverselor FcγR de a media funcții diametral opuse reflectă diferențele structurale între diversele FcγR și, în special, reflectă faptul dacă FcγR legat posedă un motiv de activare pe bază de tirozină imunoreceptoare ("ITAM") sau un motiv de inhibare pe bază de tirozină imunoreceptoare ("ITIM"). Recrutarea diverselor enzime citoplasmice la aceste structuri dictează rezultatul răspunsurilor celulare mediate de FcγR. FcγR care conțin ITAM includ FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA și activează sistemul imunitar atunci când se leagă la regiunile Fc (*de exemplu* regiunile Fc agregate prezente într-un complex imun). FcγRIIB este singurul FcγR natural cunoscut în prezent care conține ITIM; acționează pentru a amortiza sau inhiba sistemul imunitar atunci când este legat la regiunile Fc agregate. Neutrofilele umane exprimă gena FcγRIIA. Gruparea FcγRIIA prin complexe imune sau reticulare cu anticorpi specifici servește la agregarea ITAM cu kinaze asociate receptorilor care facilitează fosforilarea ITAM. Fosforilarea ITAM servește ca un situs de andocare pentru kinaza Syk, a cărei activare are ca rezultat activarea substraturilor din aval (*de exemplu* PI₃K). Activarea celulară conduce la eliberarea de mediatori proinflamatori. Gena FcγRIIB este exprimată pe limfocitele B; domeniul extracelular al acesteia este identic în proporție de 96% cu FcγRIIA și se leagă la complexe IgG într-o manieră care nu se poate distinge. Prezența unui ITIM în domeniul citoplasmatic al FcγRIIB definește această subclasă inhibitorie a FcγR. Recent s-a stabilit baza moleculară a acestei inhibiții. Atunci când este co-ligat împreună cu un FcγR de activare, ITIM din FcγRIIB devine fosforilat și atrage domeniul SH2 al inozitol polifosfat 5'-fosfatazei (SHIP), care hidrolizează mesagerii fosfoinozitol eliberați ca urmare a activării tirozin kinazei mediate de FcγR care conține ITAM, împiedicând în consecință influxul de Ca⁺⁺ intracelular. Prin urmare, reticularea FcγRIIB atenuează răspunsul de activare la ligatura FcγR și inhibă sensibilitatea celulară. Prin urmare, activarea celulelor B, proliferarea celulelor B și secreția de anticorpi sunt întrerupte.

c. Variante de regiuni Fc

Modificarea regiunii Fc poate conduce la un fenotip alterat, de exemplu timp de înjumătățire plasmatică alterat, stabilitate alterată, susceptibilitate alterată la enzimele celulare sau funcție efectoare alterată. Prin urmare, poate fi de dorit modificarea unei molecule care conține regiunea Fc conform prezentei invenții în ceea ce privește funcția efectoare, de exemplu astfel încât să sporească eficacitatea unei astfel de molecule în tratarea cancerului. Reducerea sau eliminarea funcției efectoare este de dorit în anumite cazuri, de exemplu în cazul anticorpilor al căror mecanism de acțiune implică blocarea sau antagonismul, dar nu distrugerea celulelor care poartă un antigen țintă. Creșterea funcției efectoare este în general de dorit atunci când este direcționată către celule nedorite, cum ar fi celule tumorale și străine, unde FcγR sunt exprimate la niveluri scăzute, de exemplu celule B specifice tumorale cu niveluri scăzute de FcγRIIB (*de exemplu* limfom non-Hodgkin's, LLC și limfom Burkitt). Imunoconjugatii conform invenției care posedă o astfel de activitate a funcției efectoare conferită sau modificată sunt utili pentru tratarea și/sau prevenirea unei boli, tulburări sau infecții în care se dorește o eficacitate sporită a activității funcției efectoare.

În consecință, în anumite variante de realizare, regiunea Fc a imunoconjugatilor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții poate fi o variantă modificată a regiunii Fc. Deși regiunea Fc a imunoconjugatilor conform prezentei invenții poate avea capacitatea de a se lega la unul sau mai mulți receptori Fc (*de exemplu* FcγR), mai de preferat o astfel de variantă de regiune Fc are legarea modificată la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (CD16b) (în raport cu legarea prezentată de o regiune Fc de tip sălbatic), *de exemplu*, vor avea o legare îmbunătățită la un receptor de activare și/sau vor avea o capacitate în mod substanțial redusă sau inexistentă de a se lega la unul sau mai mulți receptori inhibitori. Prin urmare, regiunea Fc a imunoconjugatilor conform prezentei invenții poate include o parte sau tot domeniul CH2 și/sau o parte sau tot domeniul CH3 al unei regiuni Fc complete, sau poate cuprinde o variantă CH2 și/sau o variantă de secvență CH3 (care poate include, de exemplu, una sau mai multe inserții și/sau una sau mai multe deleții cu privire la domeniile CH2 sau CH3 ale unei regiuni Fc complete). Asemenea regiuni Fc pot cuprinde porțiuni polipeptidice non-Fc sau pot cuprinde porțiuni de regiuni Fc necomplete în mod natural sau pot cuprinde orientări nenaturale ale domeniilor CH2 și/sau CH3 (cum ar fi, de exemplu, două domenii CH2 sau două domenii CH3 sau în direcția capăt N-terminal către capăt C-terminal, un domeniu CH3 legat la un domeniu CH2 *etc.*).

Modificările regiunii Fc identificate ca alterând funcția efectoră sunt cunoscute în stadiul tehnicii, inclusiv modificări care cresc legarea la receptorii de activare (*de exemplu* FcγRIIA (CD16A) și reduc legarea la receptorii de inhibare (*de exemplu* FcγRIIB (CD32B) (a se vedea, *de exemplu*, Stavenhagen, J.B. și colab. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors," Cancer Res. 57(18):8882-8890). **Tabelul 1** prezintă substituții simple, duble, triple, cvadruple și cvintuple exemplificative (numerotarea este cea din indexul UE Kabat, iar substituțiile se referă la secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO:1**) de modificare exemplificativă care cresc legarea la receptorii de activare și/sau reduc legarea la receptorii de inhibare.

Tabelul 1 Variații ale regiunilor Fc de activare preferate			
Variații cu un singur situs			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Variații cu două situsuri			
F243L și R292P	F243L și Y300L	F243L și P396L	R292P și Y300L
D270E și P396L	R292P și V305I	P396L și Q419H	P247L și N421K
R292P și P396L	Y300L și P396L	R255L și P396L	R292P și P305I
K392T și P396L			
Variații cu trei situsuri			
F243L, P247L și N421K		P247L, D270E și N421K	
F243L, R292P și Y300L		R255L, D270E și P396L	
F243L, R292P și V305I		D270E, G316D și R416G	
F243L, R292P și P396L		D270E, K392T și P396L	
F243L, Y300L și P396L		D270E, P396L și Q419H	
V284M, R292L și K370N		R292P, Y300L și P396L	
Variații cu patru situsuri			
L234F, F243L, R292P și Y300L		F243L, P247L, D270E și N421K	
L234F, F243L, R292P și Y300L		F243L, R255L, D270E și P396L	
L235I, F243L, R292P și Y300L		F243L, D270E, G316D și R416G	
L235Q, F243L, R292P și Y300L		F243L, D270E, K392T și P396L	
P247L, D270E, Y300L și N421K		F243L, R292P, Y300L și P396L	
R255L, D270E, R292G și P396L		F243L, R292P, V305I și P396L	
R255L, D270E, Y300L și P396L		F243L, D270E, P396L și Q419H	
D270E, G316D, P396L și R416G			
Variații cu cinci situsuri			
L235V, F243L, R292P, Y300L și P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L și P396L	
L235P, F243L, R292P, Y300L și P396L			

Variante exemplificative ale regiunilor Fc IgG1 umane cu legare redusă la CD32B și/sau cu legare crescută la CD16A conțin substituții F243L, R292P, Y300L, V305I sau P396L, în care numerotarea este cea din indexul UE Kabat. Aceste substituții de aminoacizi pot fi prezente într-o regiune Fc IgG1 umană în orice combinație. Într-o variantă de realizare, varianta de regiune Fc IgG1 umană conține o substituție F243L, R292P și Y300L. Într-o altă variantă de realizare, varianta de regiune Fc IgG1 umană conține o substituție F243L, R292P, Y300L, V305I și P396L.

În anumite variante de realizare, este de preferat ca regiunile Fc ale imunoconjugatelor conform prezentei invenții să prezinte legare redusă (sau în mod substanțial nicio legare) la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (CD16b) (în raport cu legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Într-o variantă de realizare specifică, imunoconjugatii conform prezentei invenții cuprind o regiune Fc IgG care prezintă o funcție efectoră a

ADCC redusă. Într-o variantă de realizare preferată, domeniile CH2-CH3 ale imunoconjugatelor includ oricare 1, 2, 3 sau 4 dintre substituțiile: L234A, L235A, D265A, N297Q și N297G, în care numerotarea este cea din indexul UE Kabat. Într-o altă variantă de realizare, domeniile CH2-CH3 conțin o substituție N297Q, o substituție N297G, substituții L234A și L235A sau o substituție D265A, deoarece aceste mutații elimină legarea FcR. În mod alternativ, este utilizat un domeniu CH2-CH3 al unei regiuni Fc care apare în mod natural care prezintă în mod inerent legare redusă (sau în mod substanțial nicio legare) la FcγRIIIA (CD16a) și/sau funcție efectoare redusă (în raport cu funcția de legare și efectoare prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Într-o variantă de realizare specifică, imunoconjugatăii conform prezentei invenții cuprind o regiune Fc IgG2 (**SEQ ID NO:2**) sau o regiune Fc IgG4 (**SEQ ID NO:4**). Atunci când este utilizată o regiune Fc IgG4, prezenta invenție cuprinde, de asemenea, introducerea unei mutații de stabilizare, cum ar fi substituția regiunii de articulație S228P descrisă anterior (a se vedea, *de exemplu*, **SEQ ID NO:77**). Deoarece substituțiile N297G, N297Q, L234A, L235A și D265A elimină funcția efectoare, în circumstanțe în care se dorește funcția efectoare, ar fi de preferat ca aceste substituții să nu fie utilizate.

O secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții care are o funcție efectoare redusă sau eliminată va cuprinde substituțiile L234A/L235A (ilustrate subliniate) (**SEQ ID NO:78**):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

O a doua secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții cuprinde o substituție S442C (ilustrată subliniată), care permite ca două domenii CH3 să fie legate covalent între ele printr-o legătură disulfurică sau conjugarea unui agent farmaceutic. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (**SEQ ID NO:79**):

APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LCLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

O a treia secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatelor care conțin regiunea Fc conform prezentei invenții cuprinde substituții L234A/L235A (ilustrate subliniate) care reduc sau elimină funcția efectoare și substituția S442C (ilustrată subliniată) care permite ca două domenii CH3 să fie legate covalent între ele printr-o legătură disulfurică sau conjugarea unui agent farmaceutic. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (**SEQ ID NO:80**):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LCLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

Timul de înjumătățire plasmatică a proteinelor care cuprind regiunile Fc poate fi crescut prin creșterea afinității de legare a regiunii Fc pentru FcRn. Termenul "timp de înjumătățire" astfel cum este utilizat în prezenta invenție semnifică o proprietate farmacocinetică a unei molecule care este o măsură a timpului mediu de supraviețuire al moleculelor după administrarea acestora. Timpul de înjumătățire poate fi exprimat ca timpul necesar pentru a elimina cincizeci la sută (50%) dintr-o cantitate cunoscută de moleculă din organismul unui subiect (*de exemplu* un pacient uman sau alt mamifer) sau un compartiment specific al acestuia, de exemplu, măsurat în ser, *adică* timpul de înjumătățire circulant sau în alte țesuturi. În general, o creștere a rezultatelor de înjumătățire la o creștere a mediei timpului de ședere (MRT) în circulație în cazul moleculelor administrate.

În unele variante de realizare, imunoconjugatii conform prezentei invenții cuprind o variantă de regiune Fc care cuprinde cel puțin o modificare a aminoacizilor în raport cu o regiunea Fc de tip sălbatic, astfel că molecula menționată are un timp de înjumătățire crescut (în raport cu o moleculă care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic). În unele variante de realizare, imunoconjugatii conform prezentei invenții cuprind o variantă de regiune Fc IgG, în care varianta de regiune Fc menționată cuprinde o substituție de aminoacizi care extinde timpul de înjumătățire la una sau mai multe poziții selectate din grupul constând din 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 și 436, în care numerotarea este cea din indexul UE Kabat. Numeroase mutații capabile să crească timpul de înjumătățire al unei molecule care conține o regiune Fc sunt cunoscute în stadiul tehnicii și includ, de exemplu, M252Y, S254T, T256E și combinații ale acestora. De exemplu, a se vedea mutațiile descrise în Brevetele SUA nr. 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376; Publicațiile SUA nr. 2002/0147311; 2007/0148164; și Publicațiile PCT nr. WO 98/23289; WO 2009/058492; și WO 2010/033279. Imunoconjugatii cu timp de înjumătățire crescut le includ, de asemenea, pe cele care posedă variante de regiuni Fc care cuprind substituții la două sau mai multe dintre resturile regiunii Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435, și 436, în care numerotarea este cea din indexul UE Kabat. În special, două sau mai multe substituții selectate dintre: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K și Y436I, în care numerotarea este cea din indexul UE Kabat.

Într-o variantă de realizare specifică, un imunoconjugat conform prezentei invenții posedă o variantă de regiune Fc IgG care cuprinde substituțiile:

- (A) M252Y, S254T și T256E;
- (B) M252Y și S254T;
- (C) M252Y și T256E;
- (D) T250Q și M428L;
- (E) T307Q și N434A;
- (F) A378V și N434A;
- (G) N434A și Y436I;
- (H) V308P și N434A; sau
- (I) K288D și H435K.

Într-o variantă de realizare preferată, imunoconjugatul conform prezentei invenții posedă o variantă de regiune Fc IgG care cuprinde oricare 1, 2 sau 3 dintre substituțiile: M252Y, S254T și T256E.

Invenția cuprinde în plus imunoconjugatii care posedă variante de regiuni Fc care cuprind:

- (A) una sau mai multe mutații care modifică funcția efectoare și/sau FcγR; și
- (B) una sau mai multe mutații care prelungesc timpul de înjumătățire plasmatică.

O a patra secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatilor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții cuprinde substituțiile M252Y, S254T și T256E (ilustrate subliniate), astfel încât să prelungescă timpul de înjumătățire plasmatică în ser. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (SEQ ID NO:147):

APELLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

O a cincea secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatilor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții cuprinde substituțiile M252Y, S254T și T256E (ilustrate subliniate), astfel încât să prelungescă timpul de înjumătățire plasmatică în ser și substituția S442C (ilustrată subliniată), astfel încât să permită ca două domenii CH3 să fie legate covalent unul la celălalt printr-o legătură disulfurică sau să permită conjugarea unei fracțiuni de medicament. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (SEQ ID NO: 148):

APELLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

în care, **X** este o lizină (K) sau este absent.

- 5 O a șasea secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții cuprinde substituțiile L234A/L235A (ilustrate subliniate) care reduc sau elimină funcția efectoare și substituțiile M252Y, S254T și T256E (ilustrate subliniate), astfel încât să prelungească timpul de înjumătățire plasmatică în ser. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (**SEQ ID NO: 149**):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

- 10 în care, **X** este o lizină (K) sau este absent.

- 15 O a șaptea secvență preferată de IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3 ale imunoconjugatelor care conțin regiuni Fc conform prezentei invenții cuprinde substituțiile L234A/L235A (ilustrate subliniate) care reduc sau elimină funcția efectoare și substituțiile M252Y, S254T și T256E (ilustrate subliniate), astfel încât să prelungească timpul de înjumătățire plasmatică în ser și substituția S442C (ilustrată subliniată), astfel încât să permită ca două domenii CH3 să fie legate covalent unul la celălalt printr-o legătură disulfurică sau să permită conjugarea unei fracțiuni de medicament. Secvența de aminoacizi a unei astfel de molecule este (**SEQ ID NO:150**):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

- 20 în care, **X** este o lizină (K) sau este absent.

II. Anticorpi anti-ADAM9 exemplificativi

- 25 Anticorpii particulari și fragmentele de legare a antigenului ale acestora capabile să se lege în mod specific la ADAM9 sunt utili în generarea imunoconjugatelor conform invenției.

O polipeptidă ADAM9 umană reprezentativă (secvența NCBI NP_003807, care include o secvență semnal de 28 de resturi de aminoacizi, ilustrată subliniată), ilustrată doar în scopuri ilustrative și nu conform invenției revendicate, are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:5**):

MGSGARFPSG TLRVRLLLL GLVGPVLGAA RPFQQTSHL SSYEIITPWR
 LTREERREAPR PYSKQVSIVI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
 GTLITDHPNI QNHCHYRGYV EGVHNSSIAL SDCFGLRGLL HLENASYGIE
 PLQNSSHFEH IIRMDDVYK EPLKCGVSNK DIEKETAKDE EEEPPSMTQL
 LRRRRRAVLPO TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
 IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIVGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
 AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSAGGI NVFGQITVET FASIVAHELK
 HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGR NFSSCSAEDF EKLTLNKGGN
 CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDG GTPKECELDP CCEGSTCKLK
 SFACAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNSSS QFCQPDVFIQ
 NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
 GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTHK
 WGVDFQLGSD VPDGPMVNEG TKCGAGKICR NFQCVDAVL NYDCDVQKKK
 HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
 VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRSYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
 GSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFAVPTYAA KQPQQFSPRP PPPQPKVSSQ
 GNLIARPAP APPLYSLT

Dintre cele 819 resturi de aminoacizi ale ADAM9 (SEQ ID NO:5), resturile 1-28 sunt o secvență semnal, resturile 29-697 sunt domeniul extracelular, resturile 698-718 sunt domeniul transmembrantar, iar resturile 719-819 sunt domeniul intracelular. Trei domenii structurale sunt localizate în domeniul extracelular: un domeniu de metaloprotează de zinc din familia reprotină (M12B) (aproximativ la resturile 212-406); un domeniu de dezintegrină (aproximativ la resturile 423-497); și un domeniu asemănător EGF (aproximativ la resturile 644-697). Au fost identificate o serie de modificări și izoforme post-tranlaționale, iar proteina este clivată proteolitic în rețeaua trans-Golgi înainte de a ajunge la membrana plasmatică pentru a genera o proteină matură. Îndepărtarea pro-domeniului are loc prin clivare la două situsuri diferite. Procesat cel mai probabil de o pro-protein convertază, cum ar fi furina, la limita dintre pro-domeniu și domeniul catalitic (Arg-205/Ala-206). Un situs suplimentar al pro-protein convertazei de clivare în amonte (Arg-56/Glu-57) are un rol important în activarea ADAM9.

O polipeptidă ADAM9 reprezentativă a maimuței cynomolgus (secvența NCBI XM_005563126.2, care include o posibilă secvență semnal de 28 de resturi de aminoacizi, ilustrată subliniată), ilustrată doar în scopuri ilustrative și nu conform invenției revendicate, are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:6):

MGSGVGSPSG TLRVRWLLLL CLVGPVLGAA RPFQQTSHL SSYEIITPWR
LTRERREAPR PYSKQVSYLI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVTYNKE
GTVITDHPNI QNHCHFRGYV EGVYNSSVAL SNCFGLRGLL HLENASYGIE
PLQNSSHFEH IYRMDDVHK EPLKCGVSNK DIEKETTKDE EEEPPSMTQL
LRRRAVLQPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIAGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGHITVET FASIVAHEL
HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTNLKGGN
CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDC GTPKECELDP CCEGSTCKLK
SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNSS QFCQPDVFIQ
NGYPCQNNKA YCYNMCMQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLCQENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTC
WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGADKICR NFQCVDAVL NYDCDIQKKC
HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRRYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
VSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFPVPTYAA KQPQQFSPRP PPPQPKVSSQ
GNLIPARPAP APPLYSSLT

Domeniul de metaloprotează de zinc din familia reprotină (M12B) al proteinei se află aproximativ la resturile 212-406; domeniul de dezintegrină al proteinei se află aproximativ la resturile 423-497.

În anumite variante de realizare, imunoconjugatii care cuprind anticorpii anti-ADAM9 și fragmentele de legare a ADAM9 ale acestora conform invenției sunt caracterizați prin oricare, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt sau nouă dintre următoarele criterii:

- (1) capacitatea de a se lega imunospecific la ADAM9 umană astfel cum este exprimată endogen pe suprafața unei celule canceroase;
- (2) se leagă în mod specific la ADAM9 umană și de primată non-umană (de exemplu ADAM9 de maimuță cynomolgus) cu o afinitate de legare similară;
- (3) se leagă în mod specific la ADAM9 umană cu o constantă de legare de echilibru (K_D) de 4 nM sau mai mică;
- (4) se leagă în mod specific la ADAM9 de primată non-umană cu o constantă de legare de echilibru (K_D) de 4 nM sau mai mică;
- (5) se leagă în mod specific la ADAM9 umană cu o rată de activare (k_a) de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ sau mai mare;
- (6) se leagă în mod specific la ADAM9 de primată non-umană cu o rată de activare (k_a) de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ sau mai mare;
- (7) se leagă în mod specific la ADAM9 umană cu o rată de oprire (k_d) de $1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sau mai mică;
- (8) se leagă în mod specific la ADAM9 de primată non-umană cu o rată de oprire (k_d) de $9 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ sau mai mică.
- (9) optimizați pentru a avea o îmbunătățire de cel puțin 100 de ori (de exemplu o îmbunătățire de cel puțin 100 de ori, de cel puțin 150 de ori, de cel puțin 200 de ori, de cel puțin 250 de ori, de cel puțin 300 de ori,

de cel puțin 350 de ori, de cel puțin 400 de ori, de cel puțin 450 de ori, de cel puțin 500 de ori, de cel puțin 550 de ori sau de cel puțin 600 de ori) a afinității de legare (de exemplu măsurată prin analiza BIACORE®) la ADAM9 de cyno și mențin legarea cu afinitate crescută la ADAM9 umană (de exemplu analiza BIACORE®) în comparație cu anticorpii parental himeric sau murinic.

Astfel cum sunt descrise în prezenta invenție, constantele de legare ale unui anticorp anti-ADAM9 sau ale unui fragment de legare a ADAM9 al acestuia pot fi determinate utilizând rezonanța plasmonului de suprafață, *de exemplu*, printr-o analiză BIACORE®. Datele de rezonanță a plasmonilor de suprafață pot fi adaptate la un model de legare Langmuir 1:1 (ka kd simultan) și o constantă de legare de echilibru K_D calculată din raportul constantelor ratei kd/ka. Astfel de constante de legare pot fi determinate pentru un anticorp anti-ADAM9 monovalent sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia (*adică* o moleculă care cuprinde un singur situs de legare a epitopului ADAM9), un anticorp anti-ADAM9 bivalent sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia (*adică* un moleculă care cuprinde două situsuri de legare a epitopului ADAM9) sau anticorpi anti-ADAM9 și fragmente de legare a ADAM9 ale acestora care au o valență mai mare (*de exemplu* o moleculă care cuprinde trei, patru sau mai multe situsuri de legare a epitopului ADAM9).

Prezenta invenție cuprinde în special imunoconjugate care posedă un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care cuprinde un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) anti-ADAM9 și un domeniu variabil al lanțului greu (VH) anti-ADAM9 care se leagă imunospecific la un epitop al unei polipeptide ADAM9 umane. Cu excepția cazului în care se specifică altfel, toți astfel de anticorpi anti-ADAM9 și fragmentele de legare a ADAM9 ale acestora sunt capabile să se lege imunospecific la ADAM9 umană. Astfel cum sunt utilizate în prezenta invenție, astfel de domenii variabile ale ADAM9 sunt denumite "anti-ADAM9-VL" și, respectiv, "anti-ADAM9-VH".

A. Anticorpi murinici anti-ADAM9 umană

Un anticorp murinic anti-ADAM9 care blochează activitatea de procesare a proteinei țintă a ADAM9, este internalizat și a fost identificat cu activitate anti-tumorală (a se vedea, *de exemplu*, Brevetul SUA nr. 8,361,475). Acest anticorp, desemnat în Brevetele SUA nr. 7,674,619 și 8,361,475 ca un anticorp "anti-KID24" produs de clona hibridom ATCC PTA-5174, este desemnat în prezenta invenție ca "MAB-A." MAB-A prezintă o legare preferențială puternică la tumori față de țesuturile normale (a se vedea FIG. 7A-7C). MAB-A a prezentat o colorare slabă sau deloc pe un panou mare de tipuri de celule normale (Tabelul 2).

Tabelul 2	
Țesut	MAB-A (1,25 μg/mL)
Suprarenale	Negativ
Vezica urinară	Negativ
Măduvă osoasă	Negativ
Sân	Negativ
Cerebel	Negativ
Creier	ND
Col uterin	Negativ
Colon	Negativ
Esofag	Mușchi neted +/- la 1+ (gr c) < 5%
Țesut	MAB-A (1,25 μg/mL)
Oviduct	Negativ
Cord	Negativ
Rinichi	Negativ
Ficat	Negativ
Plămân	Negativ
Ganglion limfatic	Negativ
Ovar	Negativ
Pancreas	Foarte rar (posibil acinar) 1+ (c)

Tabelul 2	
Paratiroidă	Celulele parenchimatoase epiteliale 1+ (gr c), 1% Celule (favorizează celulele principale) 2+ (m,c) 5% 1+ (m,c) 10% apicale în primul rând
Pituitară	Celulele lobului posterior (eventual celule neuronale și/sau pituicite 1+ (c>m) < 5%
Placentă	Celule de căptușeală vasculară din placa corionică 1+ (gr c>m) Celule mezenchimale ale plăcii corionice 1-2+ (gr c), 5%
Prostată	Epiteliu glandular 2+ (gr c) 5% și 1+ (gr c) 5%
Retină + Corp ciliar	Favor negativ (strat epipigmentat 3-4+ (gr c) din cauza pigmentului necolorat)
Glanda submandibulară	Epiductal +/- (c) 10%
Mușchi scheletic	Negativ
Piele	Negativ
Intestin subțire	Negativ
Măduva spinării	Neuropil 1+ (gr c) < 1%
Splină	Negativ
Stomac	Negativ
Testicul	Tubul seminifer 1+ (gr c) < 5% Celule interstițiale (posibil celule Leydig) 2-3+ (gr c) < 5% și 1+ (gr c) 10%
Glanda tiroidă	Negativ
Amigdală	Endocelule 2-3+ (c,m) < 5% și 1+ (m,c) 15%
Ureter	Epiteliu de tranziție 1+ (m,c) < 5% și 1+ (m,c) 5%; Endocelule 1+ (c) < 5%
Țesut	MAB-A (1,25 μg/mL)
Uter	Negativ
Peletă de celule A498	2-3+ (m,c), 50%, 1+ (m,c) 45%

Astfel cum este ilustrat în **FIG. 2**, MAB-A se leagă la ADAM9 umană cu afinitate crescută, dar se leagă la ADAM9 de primare non-umane (*de exemplu* maimuța cynomolgus) într-o măsură mai mică.

- 5 Secvențele de aminoacizi ale domeniilor VL și VH ale MAB-A sunt furnizate mai jos în scop ilustrativ și nu sunt conform invenției revendicate n. Domeniile VH și VL ale MAB-A au fost umanizate, iar CDR au fost optimizate pentru a îmbunătăți afinitatea și/sau pentru a elimina potențialele pasive de aminoacizi. CDR_{H3} a fost optimizat în plus pentru a îmbunătăți legarea la ADAM9 de primată non-umană, menținând în același timp afinitatea crescută pentru ADAM9 umană.
- 10 Imunoconjugatii preferați conform prezentei invenții care cuprind 1, 2 sau toate cele 3 CDR_H ale unui domeniu VH și 1 sau 2 CDR_L ale domeniului VL ale unei variante optimizate de MAB-A și, de preferat, posedă în plus regiuni-cadru umanizate ("FR") ale domeniilor VH și/sau VL ale MAB-A umanizat. Alți imunoconjugatii preferați conform prezentei invenții posedă întregul domeniu VH al unei variante umanizate/optimizate de MAB-A.
- 15 Invenția se referă în special la imunoconjugatii care cuprind:
 - (A)
 - (1) cele trei CDR_L ale domeniului VL al MAB-A; și
 - (2) cele patru FR ale domeniului VL al unei variante umanizate de MAB-A; sau
 - (B) cele trei CDR_H ale domeniului VH al unei variante optimizate de MAB-A; și cele trei CDR_L ale domeniului VL al MAB-A; sau
 - (C)
 - (1) cele trei CDR_H ale domeniului VH al unei variante optimizate de MAB-A; și
 - (2) cele patru FR ale domeniului VH al unei variante umanizate de MAB-A; sau
 - (D)
 - (1) domeniul VH al unei variante umanizate/optimizate de MAB-A; și
 - (2) domeniul VL al unei variante umanizate/optimizate de anticorp murin MAB-A "MAB-A"

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al anticorpului murinic anti-ADAM9 MAB-A este **SEQ ID NO:7**, ilustrată doar în scop ilustrativ și nu conform invenției revendicate, (resturile CDR_H sunt ilustrate subliniate):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE

IIPINGHTNY NEKFKSKATL TLDKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARGGG

YYYYGSRDYF DYWGQGTTLT VSS

5

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{H1} al MAB-A este (**SEQ ID NO:8**): SYWMH.

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{H2} al MAB-A este (**SEQ ID NO:9**): EIIPINGHTNYNEKFKS.

10

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{H3} al MAB-A este (**SEQ ID NO:10**): GGYYYYGSRDYFDY.

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al anticorpului murinic anti-ADAM9 MAB-A este **SEQ ID NO:11**, ilustrată doar în scop ilustrativ și nu conform invenției revendicate, (resturile CDR_L sunt ilustrate subliniate):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSDV YDGDSYMNWY QQIPGQPPKL

LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSHEDPF

TFGGGTKLEI K

15

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{L1} al MAB-A este (**SEQ ID NO: 12**): KASQSDVDYDGD SYMN.

20

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{L2} al MAB-A este (**SEQ ID NO: 13**): AASDLES.

Secvența de aminoacizi a domeniului CDR_{L3} al MAB-A este (**SEQ ID NO: 14**): QQSHEDPFT.

25

B. Domenii VH și VL anti-ADAM9 umanizate/optimizate exemplificative

1. Variante de domenii VH ale MAB-A

Secvențele de aminoacizi ale anumitor domenii VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate preferate ale MAB-A sunt variante de domeniu VH ADAM9 al MAB-A (**SEQ ID NO:7**).

30

Secvențele de aminoacizi ale anumitor domenii VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate preferate ale MAB-A:

hMAB-A VH(2D)	(SEQ ID NO:23)
hMAB-A VH(2E)	(SEQ ID NO:24)
hMAB-A VH(2F)	(SEQ ID NO:25)
hMAB-A VH(2A) (SEQ ID NO:20)	hMAB-A VH(2G) (SEQ ID NO:26)
hMAB-A VH(2B) (SEQ ID NO:21)	hMAB-A VH(2H) (SEQ ID NO:27)
hMAB-A VH(2C) (SEQ ID NO:22)	hMAB-A VH(2I) (SEQ ID NO:28)
și hMAB-A VH(2J) (SEQ ID NO:29)	

sunt prezentate mai jos (resturile CDR_H sunt ilustrate cu o singură subliniere; diferențele în raport cu hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:7**) sunt ilustrate cu subliniere dublă).

35

Secvențele de aminoacizi ale domeniilor VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate ale MAB-A:

hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:16**)

hMAB-A VH(2) (**SEQ ID NO:17**)

hMAB-A VH(3) (**SEQ ID NO:18**)

hMAB-A VH(4) (**SEQ ID NO:19**)

40

sunt de asemenea prezentate mai jos, dar secvențele menționate anterior nu fac parte din invenția revendicată în prezentul document.

hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:16**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

IIPINGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRLAED TAVYYCARGGG

YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

25	hMAB-A	VH(2J)	(SEQ	ID
	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYWMHWVRQA</u> PGKGLEWVGE
	<u>IIPIFGHTNY</u>	<u>NEKFKSRFTI</u>	SLDNSKNTLY	LQMGSLRAED TAVYYCARG <u>GG</u>
	YYYYYNSGTL	DYWGOGTTVT	VSS	

Secvențe de aminoacizi adecvate pentru FR ale unui domeniu VH anti-ADAM9 umanizat și/sau optimizat al MAB-A sunt:

Domeniul FR_{H1} (**SEQ ID NO:30**): EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS

Domeniul FR_{H2} (**SEQ ID NO:31**): WVRQAPGKGLEWVG

5 Domeniul FR_{H3} (**SEQ ID NO:32**): RFTISLDNSKNTLYLQMGSRAEDTAVYYCAR

Domeniul FR_{H4} (**SEQ ID NO:33**): WGQGT TVTVSS

Secvența de aminoacizi pentru domeniul CDR_{H1} al unui domeniu VH anti-ADAM9 este una dintre:

10 **SEQ ID NO:8**: SYWMH

SEQ ID NO:34: SYWIIH

Secvența de aminoacizi pentru domeniul CDR_{H2} al unui domeniu VH anti-ADAM9 este una dintre:

15 **SEQ ID NO:9**: EIIPINGHTNYNEKFKS

SEQ ID NO:35: EIIPFGHTNYNEKFKS

SEQ ID NO:36: EIIPFGHTNYNERFQG

Secvența de aminoacizi pentru domeniul CDR_{H3} al unui domeniu VH anti-ADAM9 este una dintre:

20 **SEQ ID NO:37**: GGYYYFNSGTLDY

SEQ ID NO:38: GGYYYIGKGVLDY

SEQ ID NO:39: GGYYYPRFGWLDY

SEQ ID NO:40: GGYYYTGKGVLDY

25 **SEQ ID NO:41**: GGYYYDSNAVL DY

SEQ ID NO:42: GGYYYFHS GTLDY

SEQ ID NO:43: GGYYYFNKAVLDY

SEQ ID NO:44: GGYYYGGSGVLDY

SEQ ID NO:45: GGYYYPRQGFLDY

30 **SEQ ID NO:46**: GGYYYNSGTLDY

Un prim lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A care nu se încadrează în domeniul de aplicare al invenției revendicate în prezentul document conține domeniul hMAB-A VH (2) (**SEQ ID NO:17**) și are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:50**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

IIPFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG

YYYGSRDYF DYWGQTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC

LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG

TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP

PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR

EPQVYTLPPS REEMTKNQS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT

PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL

35 PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

Un al doilea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2C) (**SEQ ID NO:22**) și are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:51**):

40 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

IIPFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG

YYYPRFGWL DYWGQTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC

LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG

TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP

PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR

EPQVYTLPPS REEMTKNQS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT

PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL

PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

Un al treilea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:52):

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRTFI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
```

5 PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

Astfel cum este furnizat anterior, domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc pot fi modificate, de exemplu, pentru a reduce funcția efectoră și/sau pentru a introduce un situs de conjugare și/sau pentru a prelungi timpul de înjumătățire serică. În anumite variante de realizare, domeniile CH2-CH3 ale lanțurilor grele IgG1 umanizate/optimizate exemplificative conform invenției cuprind una sau mai multe substituții selectate dintre: L234A, L235A, M252Y, S254T, T256E și S442C.

Prin urmare, un al patrulea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile L234A și L235A în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:78) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:141)

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRTFI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL A AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
```

PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

Un al cincilea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituția S442C în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:79) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:142):

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRTFI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
```

PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

Un al șaselea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile

L234A, L235A și S442C în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:80) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:143):

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
PGX
```

în care X este o lizină (K) sau este absent.

- 5 Un al șaptelea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile M252Y, S254T și T256E în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:147) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:151):

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
PGX
```

- 10 în care X este o lizină (K) sau este absent.

Un al optulea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile M252Y, S254T, T256E și S442C în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:148) și are

- 15 secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:152):

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
PGX
```

în care X este o lizină (K) sau este absent.

- 20 Un al nouălea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile L234A, L235A, M252Y, S254T și T256E în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:149) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:153):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGGFL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG
 PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

- 5 Un al zecelea lanț greu IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28) și cuprinde în plus substituțiile L234A, L235A, M252Y, S254T, T256E și S442C în domeniile CH2-CH3 ale regiunii Fc (SEQ ID NO:150) și are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:154):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGGFL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
 PGX

în care X este o lizină (K) sau este absent.

10

2. Variante de domenii VL ale MAB-A

Secvențele de aminoacizi ale domeniilor VL anti-ADAM9 umanizate/optimizate preferate ale MAB-A sunt variante de domeniu VL ADAM9 al MAB-A (SEQ ID NO:11).

- 15 Secvențele de aminoacizi ale unui domeniu VL anti-ADAM9 umanizat preferat al MAB-A: hMAB-A VL(1) (SEQ ID NO:54) și ale anumitor domenii VL anti-ADAM9 umanizate/optimizate preferate ale MAB-A: hMAB-A VL(2) (SEQ ID NO:55), hMAB-A VL(3) (SEQ ID NO:56), and hMAB-A VL(4) (SEQ ID NO:57), sunt prezentate mai jos (resturile CDR_L sunt ilustrate cu o singură subliniere; diferențele în raport cu hMAB-A VL(1) (SEQ ID NO:54) sunt ilustrate cu subliniere dublă).

- 20 hMAB-A VL(1) (SEQ ID NO:54):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSV YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

hMAB-A VL(2) (SEQ ID NO:55):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSV YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

hMAB-A VL(3) (SEQ ID NO:56):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSV YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

25

hMAB-A VL(4) (SEQ ID NO:57):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSV YSGDSYLNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSYSTPF
TFGQGTKLEI K

- 30 În consecință, secvențe de aminoacizi adecvate pentru FR ale unui domeniu VL anti-ADAM9 umanizat și/sau optimizat al MAB-A sunt:

Domeniul FR_L1 (**SEQ ID NO:58**): DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC

Domeniul FR_L2 (**SEQ ID NO:59**): WYQQKPGQPPKLLIY

Domeniul FR_L3 (**SEQ ID NO:60**):

GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYC

5 Domeniul FR_L4 (**SEQ ID NO:61**): FGQGTKLEIK

Secvența de aminoacizi pentru domeniul CDR_L1 al unui domeniu VL anti-ADAM9 este una dintre:

SEQ ID NO:12: KASQSVDDYDGD SYMN

10 **SEQ ID NO:62**: KASQSVDDYSGD SYMN

SEQ ID NO:63: RASQSVDDYSGD SYMN

SEQ ID NO:64: RASQSVDDYSGD SYLN

Secvența de aminoacizi pentru domeniul CDR_L3 al unui domeniu VL anti-ADAM9 este una dintre:

15 **SEQ ID NO:14**: QQSHEDPFT

SEQ ID NO:65: QQSYSTPFT

Un lanț ușor IgG1 umanizat/optimizat exemplificativ al unui derivat/al unei variante de MAB-A conține domeniul hMAB-A VL (2) (**SEQ ID NO:55**) și are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:68**):

20 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVDD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Invenția are în vedere în plus astfel de imunoconjugate care cuprind în plus oricare dintre MAB-A FR_H1, FR_H2, FR_H3 sau FR_H4, FR_L1, FR_L2, FR_L3 sau FR_L4 umanizați furnizați anterior și în special are
25 în vedere astfel de imunoconjugate care cuprind FR_H1, FR_H2, FR_H3 și FR_H4 și/sau care cuprind FR_L1, FR_L2, FR_L3, FR_L4 și FR_H1.

În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat/optimizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia include un domeniu CDR_H1, un domeniu CDR_H2 și un domeniu CDR_H3 și
30 un domeniu CDR_L1, un domeniu CDR_L2 și un domeniu CDR_L3 care au secvențele selectate din grupul constând din:

(a) SEQ ID NO: 8, 35 și 37 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(b) SEQ ID NO: 8, 35 și 38 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(c) SEQ ID NO: 8, 35 și 39 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

35 (d) SEQ ID NO: 8, 35 și 40 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(e) SEQ ID NO: 8, 35 și 41 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(f) SEQ ID NO: 8, 35 și 42 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(g) SEQ ID NO: 8, 35 și 43 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

(h) SEQ ID NO: 8, 35 și 44 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;

40 (i) SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14; și

(j) SEQ ID NO: 8, 35 și 46 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat/optimizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia include un domeniu CDR_H1, un domeniu CDR_H2 și un domeniu CDR_H3 și
45 un domeniu CDR_L1, un domeniu CDR_L2 și un domeniu CDR_L3 care au secvențele SEQ ID NO: 8, 35 și 45 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14.

În unele variante de realizare, anticorpul anti-ADAM9 umanizat/optimizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia include un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențe care sunt cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 99% sau sunt 100%
50 identice cu secvențele după cum urmează:

(a) SEQ ID NO:20 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

(b) SEQ ID NO:21 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

(c) SEQ ID NO:22 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

(d) SEQ ID NO:23 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

55 (e) SEQ ID NO:24 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

(f) SEQ ID NO:25 și, respectiv, SEQ ID NO:55;

- (g) SEQ ID NO:26 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
 (h) SEQ ID NO:27 și, respectiv, SEQ ID NO:55;
 (i) SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55; și
 (j) SEQ ID NO:29 și, respectiv, SEQ ID NO:55

Prin "în mod substanțial identică" sau "identică" se înțelege o polipeptidă care prezintă cel puțin 50% identitate cu o secvență de aminoacizi de referință (de exemplu oricare dintre secvențele de aminoacizi descrise în prezenta invenție). De preferat, o astfel de secvență este cel puțin 60%, mai de preferat cel puțin 80% sau cel puțin 85% și mai de preferat cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 99% sau chiar 100% identică la nivel de aminoacizi sau acid nucleic cu secvența utilizată pentru comparație.

Identitatea de secvență este de obicei măsurată utilizând un software de analiză a secvențelor (de exemplu pachetul Sequence Analysis Software Package de la Genetics Computer Group, Centrul de biotehnologie al Universității din Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705, programele BLAST, BESTFIT, GAP sau PILEUP/PRETTYBOX). Un astfel de software potrivește secvențe identice sau similare prin atribuirea unor grade de omologie diverselor substituții, deleții și/sau alte modificări. Substituțiile conservatoare includ de obicei substituții în cadrul următoarelor grupări: glicină, alanină, valină, izoleucină, leucină; acid aspartic, acid glutamic, asparagină, glutamină; serină, treonină, lizină, arginină; și fenilalanină, tirozină. Într-o abordare exemplificativă pentru determinarea gradului de identitate, poate fi utilizat un program BLAST, cu un scor de probabilitate între e^{-3} și e^{-100} care indică o secvență strâns înrudită.

În anumite variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia include un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențe care sunt cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 99% sau sunt 100% identice cu secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55.

În anumite variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat cuprinde o secvență de lanț greu și o secvență de lanț ușor, după cum urmează:

- (a) SEQ ID NO:51 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (b) SEQ ID NO:52 și, respectiv, SEQ ID NO:68
 (c) SEQ ID NO: 141 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (d) SEQ ID NO:142 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (e) SEQ ID NO: 143 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (f) SEQ ID NO: 151 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (g) SEQ ID NO: 152 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (h) SEQ ID NO:153 și, respectiv, SEQ ID NO:68; și
 (i) SEQ ID NO: 154 și, respectiv, SEQ ID NO:68.

În anumite variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat cuprinde un lanț greu care are secvența SEQ ID NO:52 și un lanț ușor care are secvența SEQ ID NO:68. În alte anumite variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat cuprinde un lanț greu care are secvența SEQ ID NO:142 și un lanț ușor care are secvența SEQ ID NO:68. În alte variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat este modificat pentru a prelungi timpul de înjumătățire serică și cuprinde un lanț greu care are secvența SEQ ID NO:151 și un lanț ușor care are secvența SEQ ID NO:68. În alte anumite variante de realizare, anticorpus anti-ADAM9 umanizat/optimizat este modificat pentru a prelungi timpul de înjumătățire serică și pentru conjugarea specifică situsului și cuprinde un lanț greu care are secvența SEQ ID NO: 152 și un lanț ușor care are secvența SEQ ID NO:68.

Prezenta invenție are în vedere, de asemenea, în mod expres imunoconjugate care se leagă imunospecific la un epitop al unei polipeptide ADAM9 umane și care cuprind oricare dintre domeniile VL sau VH anti-ADAM9 MAB-A umanizate/optimizate furnizate anterior. Prezenta invenție are în vedere în special astfel de anticorpi anti-ADAM9 și fragmente de legare a ADAM9 ale acestora care cuprind oricare dintre următoarele combinații de domenii VL sau VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate:

Combinații hMAB-A VH / hMAB-A VL	
	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(1)
	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(2)
	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(3)

Combinatii hMAB-A VH / hMAB-A VL	
	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(4)
	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(1)
	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(2)
	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(3)
	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(4)
	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(1)
	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(2)
	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(3)
	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(4)
	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(1)
	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(2)
	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(3)
	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(4)

Prezenta invenție cuprinde în mod specific imunoconjugate care cuprind un domeniu VL și/sau VH anti-ADAM9 umanizat/optimizat, astfel cum este furnizat anterior. În anumite variante de realizare, imunoconjugate conform prezentei invenții cuprind (i) un domeniu VL și/sau VH anti-ADAM9 umanizat/optimizat astfel cum este furnizat anterior și (ii) o regiune Fc.

Deși anumite modificări ale domeniilor VH și VL anti-ADAM9 sunt rezumate mai sus și comparate în **FIG. 3A-3B**, nu este necesară modificarea tuturor sau a majorității acestor resturi atunci când se modifică un domeniu VH sau VL anti-ADAM9 umanizat și/sau optimizat conform invenției. Prezenta invenție cuprinde, de asemenea, variații minore ale acestor secvențe VH și VL care includ, de exemplu, substituții de aminoacizi ale resturilor de aminoacizi C-terminale și/sau N-terminale care pot fi introduse pentru a facilita subclonarea.

III. Conjugate medicamentoși cu anticorpi

Definiții

Termenul "**imunoconjugat**," "**conjugat**" sau "**ADC**" astfel cum este utilizat în prezenta invenție, se referă la un compus sau un derivat al acestuia (un agent farmacologic) care este legat la sau conjugat cu un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia, astfel cum este descris în prezenta invenție.

Un "**linker**" este orice fracțiune chimică ce este capabilă să se lege la un agent farmacologic descris în prezenta invenție (*de exemplu* compuși maitansinoizi sau (indolinobenzodiazepină)), la un anticorp anti-ADAM9 sau la un fragment de legare a ADAM9 al acestuia, într-un mod covalent stabil. Linkerii pot fi susceptibili sau pot fi în mod substanțial rezistenți la clivarea indusă de acid, clivarea indusă de lumină, clivarea indusă de peptidază, clivarea indusă de esterază și clivarea legăturii disulfurice,

în condițiile în care compusul sau anticorpusul rămâne activ. Linkeri adecvați sunt bine cunoscuți în domeniu și includ, de exemplu, grupări de disulfură, grupări de tioeter, grupări labile acide, grupări fotolabile, grupări labile de peptidază și grupări labile de esterază. Linkerii includ, de asemenea, linkeri cu sarcină și forme hidrofile ale acestora, astfel cum este descris în prezenta invenție și cunoscut în stadiul tehnicii.

Termenul "alchil" astfel cum este utilizat în prezenta invenție se referă la un radical de hidrocarbură monovalent saturat cu lanț liniar sau ramificat cu unul până la douăzeci de atomi de carbon. Exemple de alchil includ, dar fără a se limita la, metil, etil, 1-propil, 2-propil, 1-butil, 2-metil-1-propil, -CH₂CH(CH₃)₂, 2-butil, 2-metil-2-propil, 1-pentil, 2-pentil 3-pentil, 2-metil-2-butil, 3-metil-2-butil, 3-metil-1-butil, 2-metil-1-butil, 1-hexil, 2-hexil, 3-hexil, 2-metil-2-pentil, 3-metil-2-pentil, 4-metil-2-pentil, 3-metil-3-pentil, 2-metil-3-pentil, 2,3-dimetil-2-butil, 3,3-dimetil-2-butil, 1-heptil, 1-octil și altele asemenea. De preferință, alchilul are unul până la zece atomi de carbon. Mai de preferat, alchilul are unul până la patru atomi de carbon.

Numărul de atomi de carbon dintr-o grupare poate fi specificat aici prin prefixul "C_{x-xx}", în care x și xx sunt numere întregi. De exemplu, "C₁₋₄alchil" este o grupare alchil care are de la 1 până la 4 atomi de carbon.

Termenii "**compus**" sau "**compus citotoxic**" sau "**agent citotoxic**" sunt utilizați în mod interschimbabil. Se intenționează ca aceștia să includă compuși pentru care a fost dezvoltată în prezenta invenție o structură sau o formulă sau pentru care a fost încorporat/ă prin referință o structură sau o formulă sau orice derivat al acestora. Termenul include, de asemenea, stereoisomeri, izomeri geometrici, tautomeri, solvați, metaboliți și săruri (*de exemplu* săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic) ale unui compus cu toate formulele dezvoltate în prezenta invenție. Termenul include, de asemenea, orice solvați, hidrați și polimorfi ai oricăruia dintre cei menționați anterior. Menționarea specifică a "stereoisomerilor," "izomerilor geometrici," "tautomerilor," "solvaților," "metaboliților," "sărurilor," "conjugatilor," "sărurilor conjugatilor," "solvaților," "hidraților" sau "polimorfilor" în anumite aspecte ale invenției descrise în prezenta cerere, nu trebuie interpretată ca o omisiune intenționată a acestor forme în alte aspecte ale invenției, atunci când termenul "compus" se utilizează fără menționarea acestor alte forme.

Termenul "**chiral**" se referă la molecule care au proprietatea de non-superimpozabilitate a imaginii în oglindă a partenerului, în timp ce termenul "achiral" se referă la molecule care sunt superimpozabile cu imaginea în oglindă a partenerului acestora.

Termenul "**stereoisomer**" se referă la compuși care au o constituție chimică și conectivitate identică, însă orientări diferite în spațiu ale atomilor acestora care nu pot fi interconvertite prin rotație în jurul unei legături unice.

"**Diastereomer**" se referă la un stereoisomer cu doi sau mai mulți centri de chiralitate și ale cărui molecule nu sunt imaginea în oglindă una a celeilalte. Diastereomerii au proprietăți fizice diferite, de exemplu puncte de topire, puncte de fierbere, proprietăți spectrale și reactivități. Amestecurile de diastereoisomeri se pot separa prin procedee analitice de înaltă rezoluție, cum ar fi cristalizarea, electroforeza și cromatografia.

"**Enantiomeri**" se referă la doi stereoisomeri ai unui compus care sunt imagini în oglindă non-superimpozabile unul a celuilalt.

Definițiile și convențiile stereochemice utilizate în prezenta invenție respectă, în general S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; și Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Compușii conform invenției pot conține centri asimetrici sau chirali și, prin urmare, există sub diverse forme stereoisomerică. Se intenționează ca toate formele stereoisomerică ale compușilor conform invenției, care includ diastereoisomeri, enantiomeri și atropizomeri, precum și amestecuri ale acestora, cum ar fi amestecurile racemice, să facă parte din prezenta invenție. Mulți compuși organici există în forme active din punct de vedere optic, *adică* aceștia au capacitatea de a roti planul luminii polarizate în plan. În descrierea unui compus activ din punct de vedere optic, prefixele D și L sau R și S, sunt utilizate pentru a indica configurația absolută a moleculei în jurul centrului sau centrilor chiral(i) al(ai) acestuia(ora). Prefixele d și l sau (+) și (-) sunt utilizate pentru a desemna semnul de rotație al planului luminii polarizate de către compus, (-) sau l însemnând faptul că respectivul compus este

levorotator. Un compus cu prefixul cu (+) sau d este dextrorotator. Pentru o structură chimică dată, acești stereoizomeri sunt identici, cu excepția cazului în care reprezintă imagini în oglindă unul a celuilalt. Un stereoizomer specific poate fi denumit, de asemenea, enantiomer, iar un amestec de astfel de izomeri este adesea denumit amestec enantiomeric. Un amestec 50:50 de enantiomeri este denumit un amestec racemic sau un racemat, care poate apărea acolo unde nu a existat o stereoselecție sau stereospecificitate într-o reacție sau procedeu chimic. Termenii "amestec racemic" și "racemat" se referă la un amestec echimolar format din două specii enantiomerice, lipsit de activitate optică.

Termenul "**tautomer**" sau "**formă tautomerică**" se referă la izomeri structurali cu energii diferite care sunt interconvertibili printr-o barieră energetică scăzută. De exemplu, tautomerii protonici (cunoscuți și sub denumirea de tautomeri prototropici) includ interconversii prin migrarea unui proton, cum ar fi izomerizări ceto-enolice și imino-enaminice. Tautomerii de valență includ interconversii prin reorganizarea unora dintre electronii de legare.

Termenul "reactiv la imină" se referă la un reactiv care este capabil să reacționeze cu o grupare iminică. Exemple de reactiv la imină includ sulfiți (H_2SO_3 , H_2SO_2 sau o sare a HSO_3^- , SO_3^{2-} sau HSO_2^- formată cu un cation), metabisulfit ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ sau o sare a $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formată cu un cation), mono, di, tri și tetra-tiofosfați (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 sau o sare a PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} sau PS_4^{3-} formată cu un cation), esterii ai tiofosfaților ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), diverse amine (hidroxilamină (*de exemplu* NH_2OH), hidrazină (*de exemplu* NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^i\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ tiosulfat ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sau o sare a $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formată cu un cation), ditionit ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sau o sare a $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formată cu un cation), fosforoditioat ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ sau o sare a acestuia formată cu un cation), acid hidroxic ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ sau o sare formată cu un cation), hidrazidă ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), sulfoxilat de formaldehidă ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ sau o sare a $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formată cu un cation, cum ar fi $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), nucleotidă glicată (cum ar fi GDP-manoză), fludarabină sau un amestec al acestora, în care R^i și R^j sunt fiecare în mod independent un alchil liniar sau ramificat care are 1 până la 10 atomi de carbon și sunt substituiți cu cel puțin un substituent selectat dintre $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ și $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i și R^j pot fi în mod opțional substituiți suplimentar cu un substituent pentru un alchil descris în prezenta invenție; R^j este un alchil liniar sau ramificat care are 1 până la 6 atomi de carbon; și R^k este un alchil, alchenil sau alchil liniar, ramificat sau ciclic care are 1 până la 10 atomi de carbon, aril, heterociclic sau heteroaril (de preferat, R^k este un alchil liniar sau ramificat care are 1 până la 4 atomi de carbon; mai de preferat, R^k este metil, etil sau propil). De preferat, cationul este un cation monovalent, cum ar fi Na^+ or K^+ . De preferat, reactivul imin-reactiv este selectat dintre sulfiți, hidroxilamină, uree și hidrazină. Mai de preferat, reactivul la imină este NaHSO_3 sau KHSO_3 .

Termenul "cation" se referă la un ion cu sarcină pozitivă. Cationul poate fi monovalent (de exemplu Na^+ , K^+ , NH_4^+ etc.), bivalent (de exemplu Ca^{2+} , Mg^{2+} etc.) sau multivalent (de exemplu Al^{3+} etc.). De preferat, cationul este monovalent.

Termenul "**sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic**" astfel cum este utilizat în prezenta invenție, se referă la săruri organice sau anorganice acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale unui compus conform invenției. Exemple de săruri includ sulfat, citrat, acetat, oxalat, clorură, bromură, iodură, azotat, bisulfat, fosfat, fosfat acid, izonicotinat, lactat, salicilat, citrat acid, tartrat, oleat, tanat, pantotemat, bitartrat, ascorbat, succinat, maleat, gentisinat, fumarat, gluconat, glucuronat, zaharat, format, benzoat, glutamat, metansulfonat "mesilat", etansulfonat, benzensulfonat, p-toluensulfonat, săruri de pamoat (*adică* 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoat)), săruri de metale alcaline (*de exemplu* sodiu și potasiu), săruri de metale alcalino-pământoase (*de exemplu* magneziu) și săruri de amoniu. O sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic poate implica includerea unei alte molecule, cum ar fi un ion de acetat, un ion de succinat sau alt contra-ion. Contra-ionul poate fi orice fragment organic sau anorganic ce stabilizează sarcina de pe compusul părinte. În plus, o sare acceptabilă farmaceutic poate avea în structura sa mai mult de un atom cu sarcină. În cazuri în care din sarea acceptabilă farmaceutic fac parte mai mulți atomi cu sarcină, pot exista mai mulți contra-ioni. Prin urmare, o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic poate avea unul sau mai mulți atomi cu sarcină și/sau unul sau mai mulți contra-ioni.

În cazul în care compusul este o bază, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic dorită poate fi preparată prin orice procedeu adecvat disponibil în stadiul tehnicii, de exemplu, tratarea bazei libere cu un acid anorganic, cum ar fi acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid azotic, acid metansulfonic, acid fosforic și altele asemenea sau cu un acid organic, cum ar fi acid acetic, acid maleic, acid succinic, acid mandelic, acid fumaric, acid malonic, acid piruvic, acid oxalic, acid glicolic, acid salicilic, un acid piranozidilic, cum ar fi acid glucuronic sau acid galacturonic, un alfa-hidroxi-acid, cum ar fi acid citric sau acid tartric, un aminoacid, cum ar fi acid aspartic sau acid glutamic, un acid aromatic,

cum ar fi acid benzoic sau acid cinamic, un acid sulfonic, cum ar fi acid p-toluensulfonic sau acid etansulfonic sau altele asemenea.

În cazul în care compusul este un acid, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic dorită poate fi preparată prin orice procedeu adecvat, de exemplu tratarea acidului liber cu o bază anorganică sau organică, cum ar fi o amină (primară, secundară sau terțiară), un hidroxid de metal alcalin sau hidroxid de metal alcalino-pământos sau altele asemenea. Exemple ilustrative de săruri adecvate includ săruri organice derivate din aminoacizi, cum ar fi glicină și arginină, amoniac, amine primare, secundare și terțiare și amine ciclice, cum ar fi piperidină, morfolină și piperazină și săruri anorganice derivate din sodiu, calciu, potasiu, magneziu, mangan, fier, cupru, zinc, aluminiu și litiu.

Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, termenul "**solvat**" semnifică un compus care include suplimentar o cantitate stoichiometrică sau non-stoichiometrică de solvent cum ar fi apă, izopropanol, acetonă, etanol, metanol, DMSO, acetat de etil, acid acetic și etanolamină diclorometan, 2-propanol sau altele asemenea, legate prin forțe intermoleculare necovalente. Solvații sau hidrații compușilor sunt preparați ușor prin adăugarea a cel puțin unui echivalent molar al unui solvent hidroxilic cum ar fi metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol sau apă la compus pentru a rezulta solvatarea sau hidratarea fracțiunii de imină.

Un "**metabolit**" sau "**catabolit**" este un produs, produs prin metabolizarea sau catabolizarea în organism a unui compus specificat, a unui derivat al acestuia sau a unui conjugat al acestuia sau a sării acestuia. Metaboliții unui compus, un derivat al acestuia sau un conjugat al acestuia, pot fi identificați utilizând tehnici de rutină cunoscute în stadiul tehnicii și activitățile acestora pot fi determinate utilizând teste cum ar fi cele descrise în prezenta invenție. Astfel de produse pot rezulta, de exemplu, din oxidarea, hidroxilarea, reducerea, hidroliza, amidarea, deamidarea, esterificarea, deesterificarea, clivajul enzimatic și altele asemenea ale compusului administrat.

Termenul "**acceptabil din punct de vedere farmaceutic**" indică faptul că substanța sau compoziția trebuie să fie compatibilă din punct de vedere chimic și/sau toxicologic, cu celelalte ingrediente cuprinse într-o formulare și/sau cu mamiferul tratat cu aceasta.

Termenul "**grupare protectoare**" sau "**fracțiune protectoare**" se referă la un substituent care se utilizează de obicei pentru a bloca sau a proteja o anumită funcționalitate în timpul reacției altor grupări funcționale de pe compus, un derivat al acestuia sau un conjugat al acestuia. De exemplu, o "grupare amino-protectoare" sau o "fracțiune amino-protectoare" este un substituent atașat la o grupare amino care blochează sau protejează funcționalitatea amino din compus. Astfel de grupări sunt bine cunoscute în stadiul tehnicii (a se vedea, de exemplu, P. Wuts și T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Capitolul 7, J. Wiley & Sons, NJ) și sunt exemplificate prin carbamați cum ar fi carbamat de metil și etil, Fmoc, carbamați de etil substituiți, carbamați clivați prin eliminarea 1,6-β (denumită, de asemenea, "auto-imolativă"), uree, amide, peptide, alchil și derivați ai arilului. Grupări amino-protectoare adecvate includ acetil, trifluoroacetil, t-butoxicarbonil (BOC), benziloxicarbonil (CBZ) și 9-fluorenilmetilenoxicarbonil (Fmoc). Pentru o descriere generală a grupărilor protectoare și a utilizării acestora, a se vedea P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007.

Termenul "**aminoacid**" se referă la aminoacizi care apar în mod natural sau aminoacizi care apar în mod nenatural. Într-o variantă de realizare, aminoacidul este reprezentat de $\text{NH}_2\text{-C(R}^{aa}\text{R}^{aa'})\text{-C(=O)OH}$, în care R^{aa} și $\text{R}^{aa'}$ sunt fiecare în mod independent H, un alchil, alchenil sau alchilil liniar, ramificat sau ciclic în mod opțional substituit, care are 1 până la 10 atomi de carbon, un aril, heteroaril sau heterociclic sau R^{aa} și atomul de azot N-terminal pot forma împreună un inel heterociclic (de exemplu ca în prolina). Termenul "**rest de aminoacid**" se referă la restul corespunzător atunci când este îndepărtat un atom de hidrogen din capătul de amină și/sau carboxi al aminoacidului, cum ar fi $\text{-NH-C(R}^{aa}\text{R}^{aa'})\text{-C(=O)O-}$.

Termenul "**peptidă**" se referă la lanțuri scurte de monomeri de aminoacizi legați prin legături peptidice (amidice). În unele variante de realizare, peptidele conțin 2 până la 20 de resturi de aminoacizi. În alte variante de realizare, peptidele conțin 2 până la 10 de resturi de aminoacizi. În alte variante de realizare, peptidele conțin 2 până la 5 de resturi de aminoacizi. Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, atunci când o peptidă este o porțiune a unui agent citotoxic sau atunci când un linker descris în prezenta invenție este reprezentat de o anumită secvență de aminoacizi, peptida poate fi conectată la restul de agent citotoxic sau la linker în ambele direcții. De exemplu, o dipeptidă XI-X2 include XI-X2 și X2-X1. În mod similar, o tripeptidă X1-X2-X3 include X1-X2-X3 și X3-X2-X1 și o tetrapeptidă X1-X2-X3-X4 include X1-X2-X3-X4 și X4-X2-X3-X1. X1, X-2, X3 și X4 reprezintă un rest de aminoacid.

Termenul "**grupare esterică reactivă**" se referă la o grupare esterică ce poate reacționa cu

ușurință cu o grupare amino pentru a forma o legătură amidică. Grupări esterice reactive exemplificative includ esteri de N-hidroxisuccinimidă, esteri de N-hidroxi ftalimidă, esteri de N-hidroxi sulfo-succinimidă, esteri de para-nitrofenil, esteri de dinitrofenil, esteri de pentafluorofenil și derivații acestora, în care derivații menționați facilitează formarea legăturii amidice. În anumite variante de realizare, gruparea

Termenul "**grupare reactivă la amină**" se referă la o grupare care poate reacționa cu o grupare amino pentru a forma o legătură covalentă. Grupări reactive la amină exemplificative includ grupări esterice reactive, halogenuri de acil, halogenură de sulfonil, imidoester sau o grupare tioesterică reactivă. În anumite variante de realizare, gruparea reactivă la amină este o grupare esterică reactivă. Într-o variantă de realizare, gruparea reactivă la amină este un ester de N-hidroxisuccinimidă sau un ester de N-hidroxi sulfo-succinimidă.

Termenul "**grupare reactivă la tiol**" se referă la o grupare care poate reacționa cu o grupare tiol (-SH) pentru a forma o legătură covalentă. Grupări reactive la tiol exemplificative includ maleimidă, haloacetil, aloacetamidă, vinil sulfonă, vinil sulfonamidă sau vinil piridină. Într-o variantă de realizare, gruparea reactivă la tiol este maleimidă.

Astfel cum sunt utilizate în prezenta dezvăluire și în revendicări, formele de singular "**un**", "**o**" și "**respectivul/respectiva**" includ formele de plural, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar altfel.

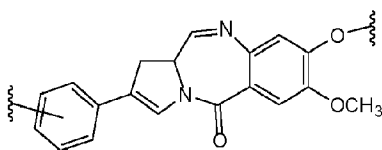
Se înțelege faptul că ori de câte ori sunt descrise în prezenta invenție variante de realizare cu termenul "**care cuprind**," sunt furnizate de asemenea și variante de realizare analoage descrise cu termenii "**constând din**" și/sau "**constând în esență din**".

A. Imunoconjugăți exemplificativi

Prezenta invenție se referă la imunoconjugăți care cuprind un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia (astfel cum este definit în prezenta invenție) conjugat cu cel puțin un agent farmacologic. Agenții farmacologici includ, dar fără a se limita la, citotoxine, (*de exemplu* un agent citostatic sau citocid), agenți terapeutici și ioni metalici radioactivi, (*de exemplu* emițători alfa. Citotoxinele sau agenții citotoxici includ orice agent care este dăunător celulelor, cum ar fi, de exemplu, exotoxina *Pseudomonas*, toxina *Diphtheria*, o toxină botulinică A până la F, ricin abrină, saporină și fragmente citotoxice ale unor astfel de agenți. Agenții terapeutici includ orice agent care are un efect terapeutic pentru a trata din punct de vedere profilactic sau terapeutic o tulburare. Astfel de agenți terapeutici pot fi agenți terapeutici chimici, agenți terapeutici proteici sau polipeptidici și includ agenți terapeutici care posedă o activitate biologică dorită și/sau care modifică un răspuns biologic dat. Exemple de agenți terapeutici includ agenți de alchilare, inhibitori de angiogeneză, agenți anti-mitotici, agenți de terapie hormonală și anticorpi utili pentru tratamentul tulburărilor proliferative celulare. În anumite variante de realizare, agenții terapeutici sunt compuși maitansinoizi, cum ar fi cei descriși în Brevetele SUA nr. 5,208,020 și 7,276,497. În anumite variante de realizare, agenții terapeutici sunt compuși benzodiazepinici, cum ar fi pirolbenzodiazepină (PBD) (cum ar fi cei descriși în WO2010/043880, WO2011/130616, WO2009/016516, WO 2013/177481 și WO 2012/112708) și compuși indolinobenzodiazepinici (IGN) (cum ar fi cei descriși în WO/2010/091150 și WO 2012/128868 și Cererea SUA nr. 15/195,269, depusă în data de 28 iunie 2016, intitulată "CONJUGAȚI AI ANTICORPILOR MODIFICAȚI CU CISTEINĂ").

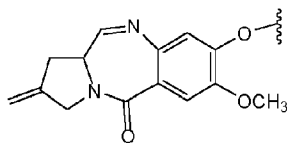
Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, un compus "**pirolbenzodiazepinic**" (PBD) este un compus care are o structură de nucleu pirolbenzodiazepinic. Pirolbenzodiazepina poate fi substituită sau nesubstituită. Acesta include, de asemenea, un compus care are două nuclee pirolbenzodiazepinice legate printr-un linker. Funcționalitatea iminică (-C=N-) ca parte a nucleului indolinobenzodiazepinic poate fi redusă.

În anumite variante de realizare, compusul pirolbenzodiazepinic cuprinde o structură de nucleu reprezentată prin



care poate fi în mod opțional substituit.

În anumite variante de realizare, compusul pirolobenzodiazepinic cuprinde o structură de nucleu reprezentată prin

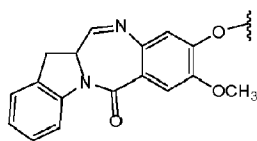


5 care poate fi în mod opțional substituit.

Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, un compus "**indolinobenzodiazepinic**" (IGN) este un compus care are o structură de nucleu indolinobenzodiazepinic. Indolinobenzodiazepina poate fi substituită sau nesubstituită. Acesta include, de asemenea, un compus care are două nucleu

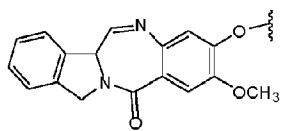
10 indolinobenzodiazepinice legate printr-un linker. Funcționalitatea iminică (-C=N-) ca parte a nucleului indolinobenzodiazepinic poate fi redusă.

În anumite variante de realizare, compusul indolinobenzodiazepinic cuprinde o structură de nucleu reprezentată prin



15 care poate fi în mod opțional substituit.

În anumite variante de realizare, compusul indolinobenzodiazepinic cuprinde o structură de nucleu reprezentată prin



20 care poate fi substituit în plus.

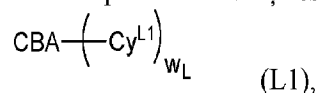
Agentul farmacologic poate fi cuplat sau conjugat fie direct cu anticorpul anti-ADAM9 sau cu fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia, fie indirect, printr-un linker utilizând tehnici cunoscute în

25 stadiul tehnicii pentru a produce un "imunoconjugat," "conjugat" sau "ADC."

Într-o primă variantă de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții cuprinde un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în prezenta invenție, legat covalent la un agent farmacologic descris în prezenta invenție prin gruparea ε-amino a unuia sau mai

30 multor resturi de lizină situate pe anticorpul anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia.

Într-o primă variantă de realizare specifică a primei variante de realizare, imunoconjugatul conform prezentei invenții este reprezentat de următoarea formulă:

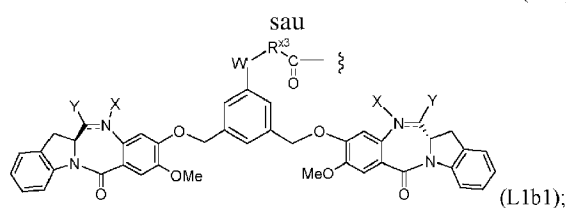
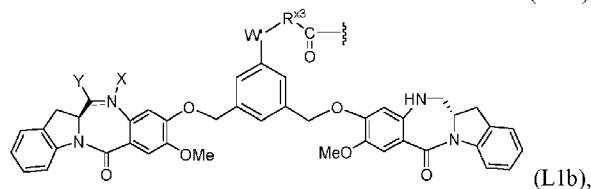
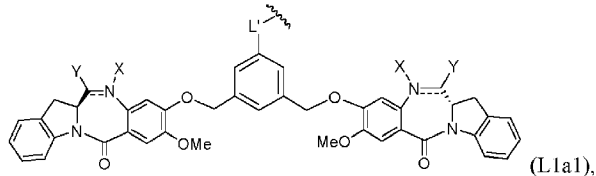
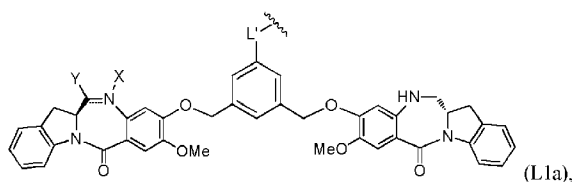


35 în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris anterior în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L1} printr-un rest de lizină;

W_L este un număr întreg de la 1 până la 20; și

40 Cy^{L1} este un compus citotoxic reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

W' este -NR^{e'},

R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un (C₁-C₆)alchil;

L' este reprezentat de următoarea formulă:

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)- (B1'); sau

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}- (B2');

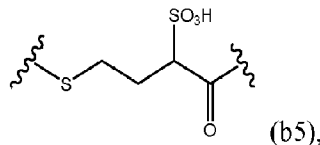
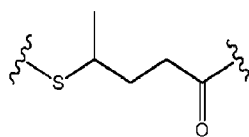
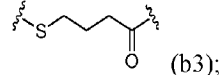
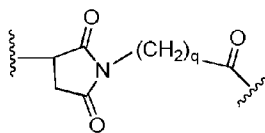
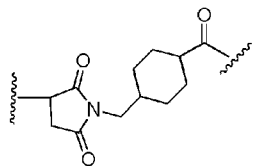
R₅ este -H sau un (C₁-C₃)alchil;

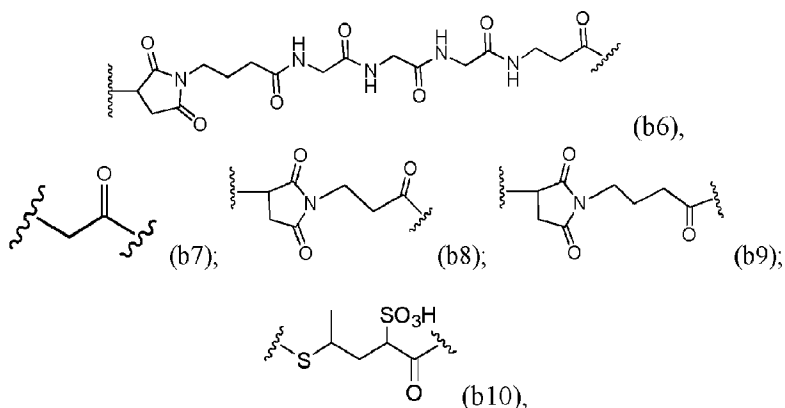
P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține între 2 și 20 de resturi de aminoacizi;

R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt fiecare în mod independent -H, (C₁-C₃)alchil sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

m este un număr întreg de la 1 până la 6; și

Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:





și

5 în care q este un număr întreg de la 1 până la 5.

Într-o a 2^a variantă de realizare specifică a conjugaților cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1a) sau (L1a1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima variantă de realizare specifică.

10

Într-o a 3^a variantă de realizare specifică a conjugaților cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1b) sau (L1b1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima variantă de realizare specifică. Mai precis, R^{x3} este un (C_2-C_4) alchil.

15

Într-o a 4^a variantă de realizare specifică a conjugaților cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1a); R_a și R_b sunt ambii H; R_5 este H sau Me și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima variantă de realizare specifică.

20

Într-o a 5^a variantă de realizare specifică, P este o peptidă care conține 2 până la 5 resturi de aminoacizi; și variabilele rămase sunt descrise anterior în prima, cea de-a 2^a sau cea de-a 4^a variantă de realizare specifică. Într-o variantă de realizare mai specifică, P este selectată din grupul constând din Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:144, β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:145), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:146), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe și Gln-Ala. Mai precis, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala sau D-Ala-D-Ala.

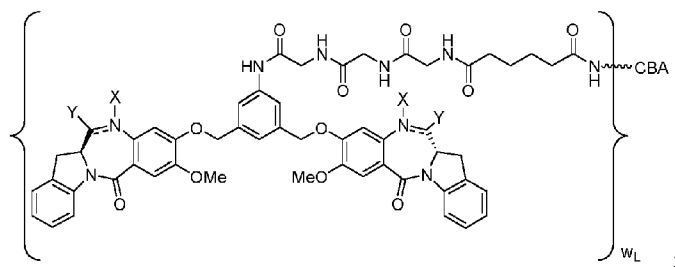
25

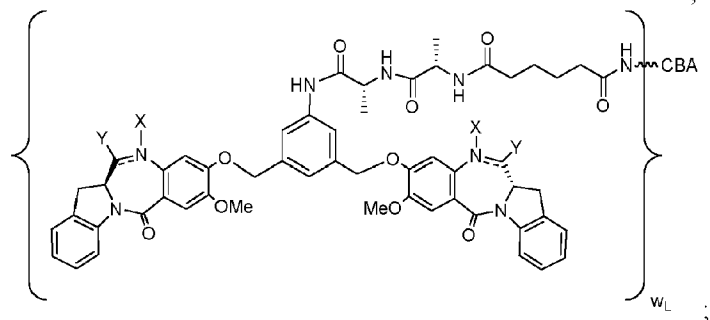
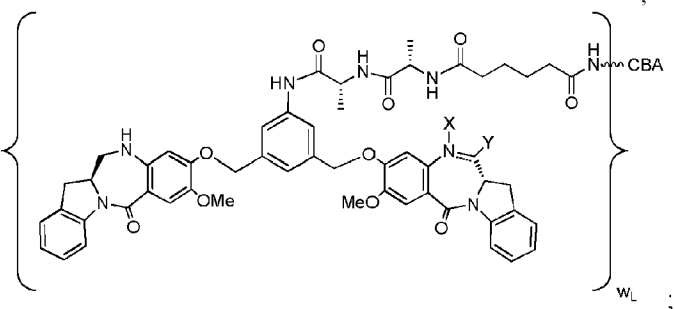
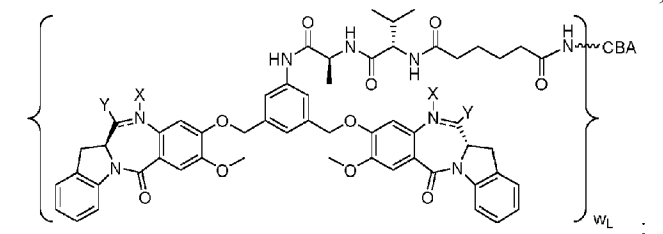
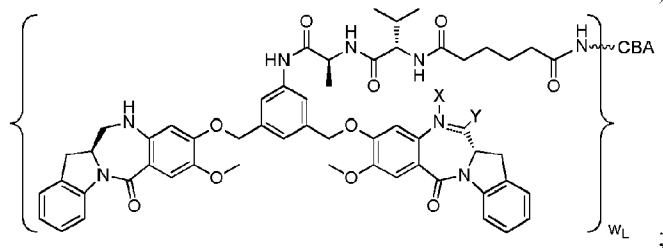
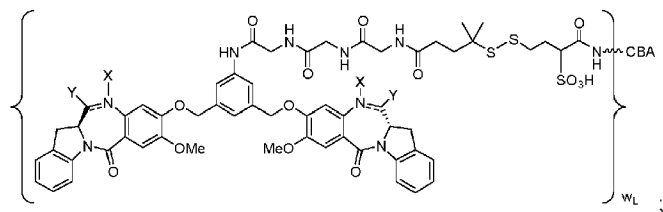
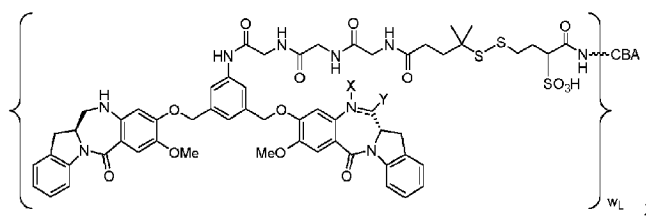
30

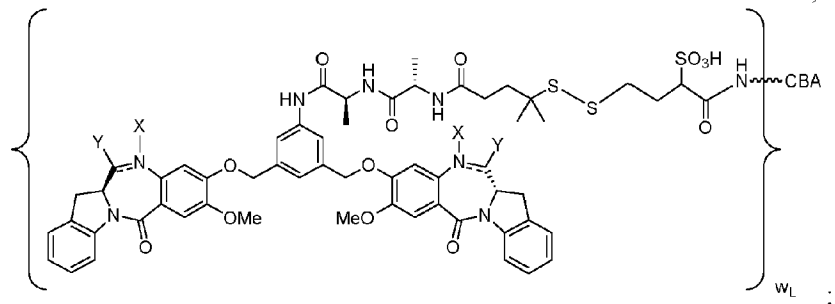
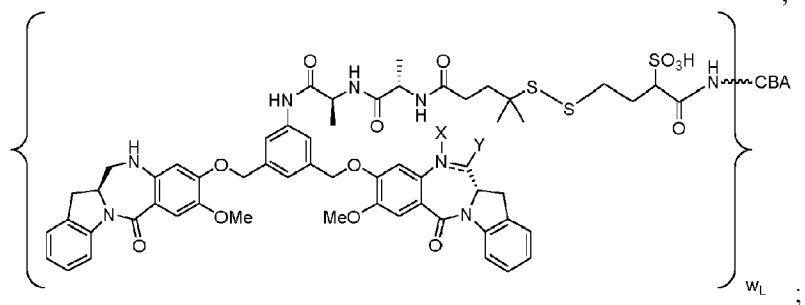
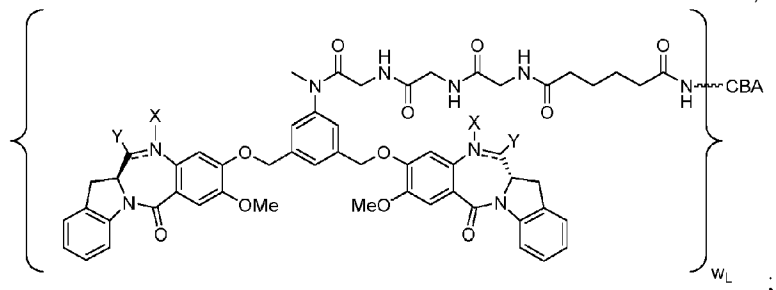
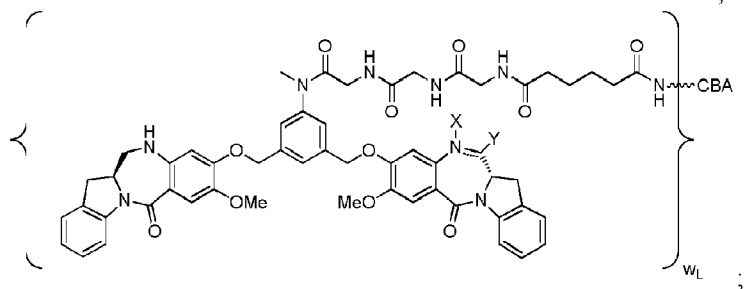
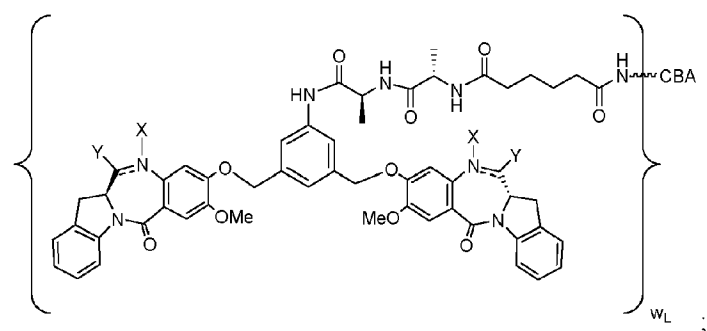
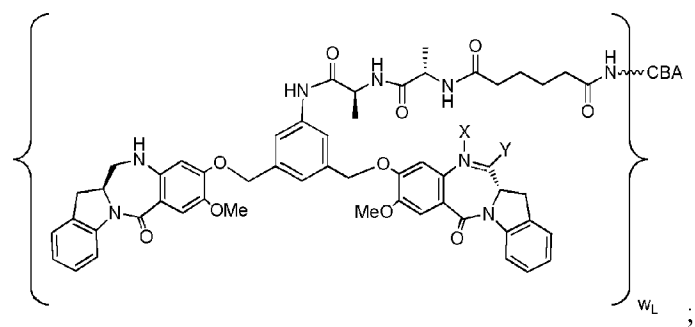
Într-o a 6^a variantă de realizare specifică, Q este $-SO_3H$ sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima, cea de-a 2^a, cea de-a 4^a sau cea de-a 5^a variantă de realizare specifică sau oricare alte variante de realizare specifice descrise în prezenta invenție.

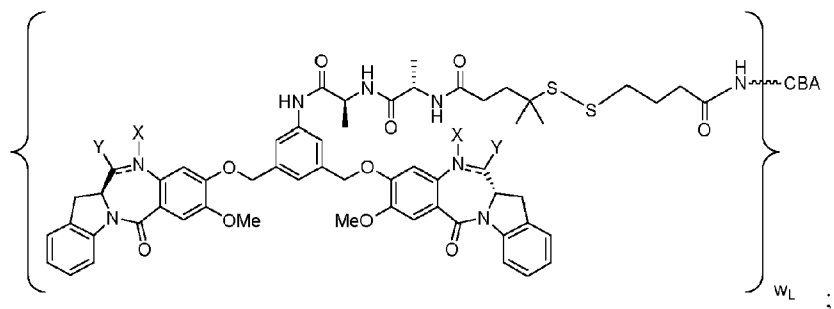
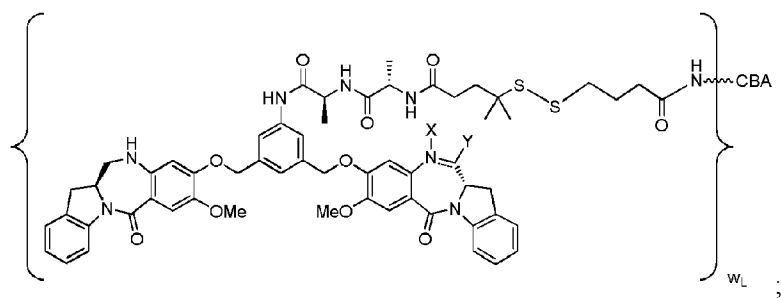
35

Într-o a 7^a variantă de realizare specifică, imunoconjugaatul primei variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

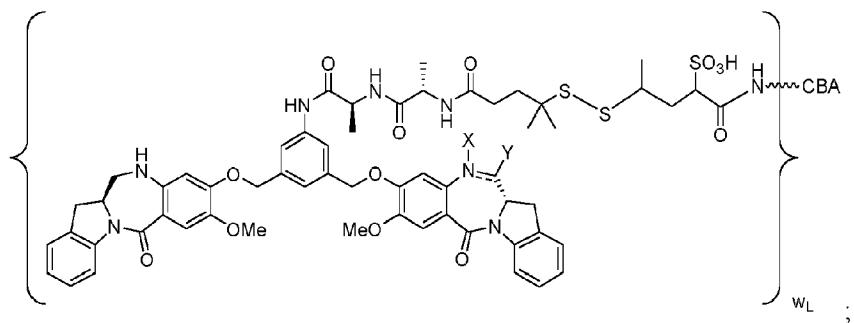
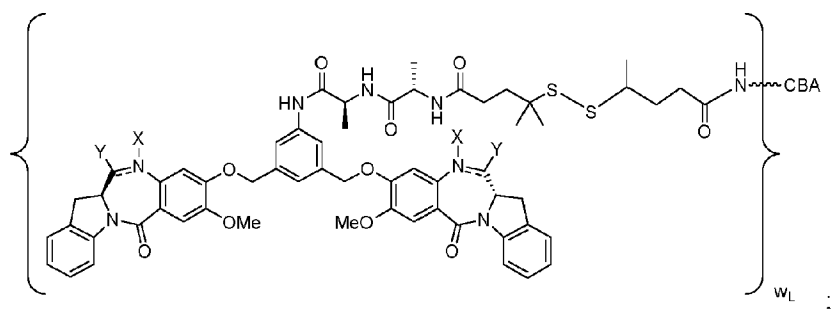
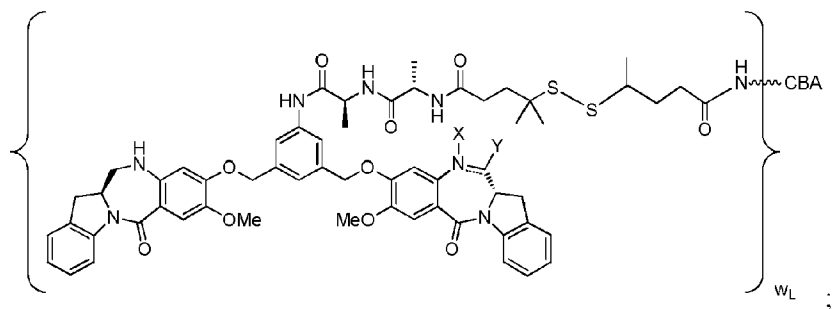




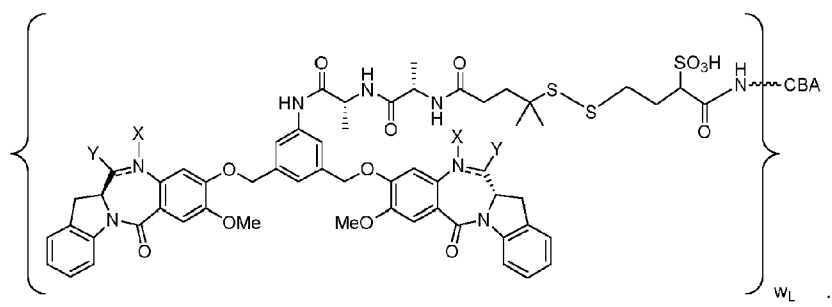
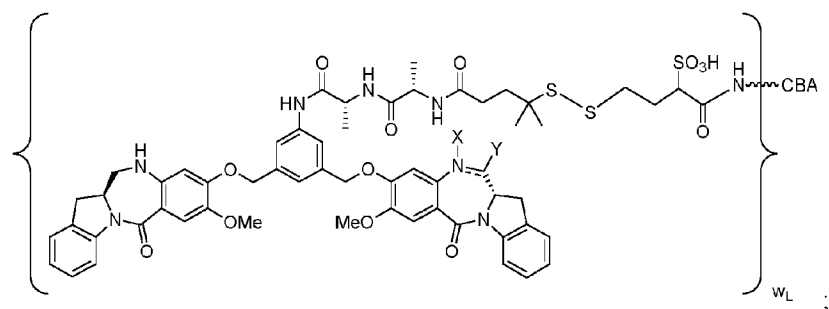
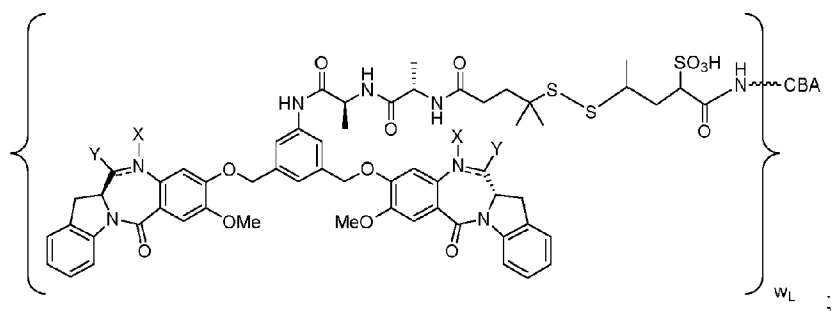




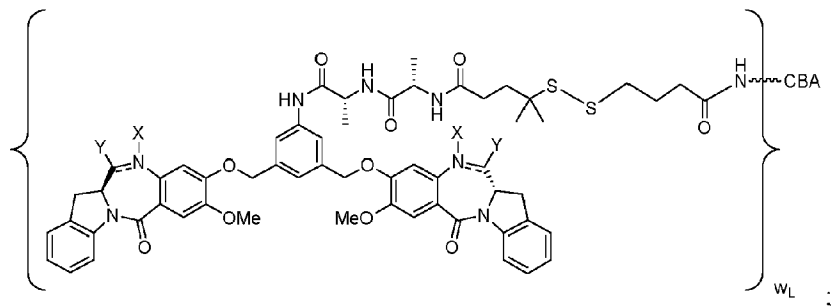
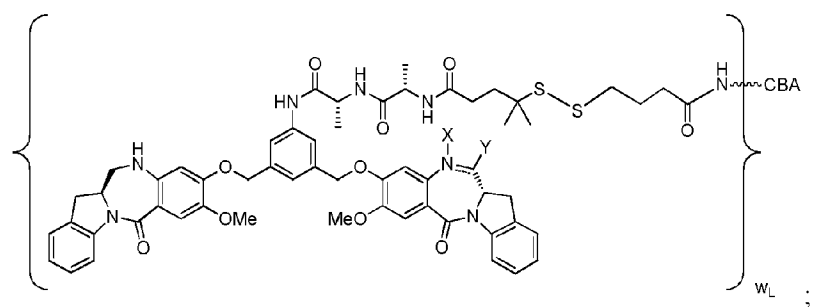
5



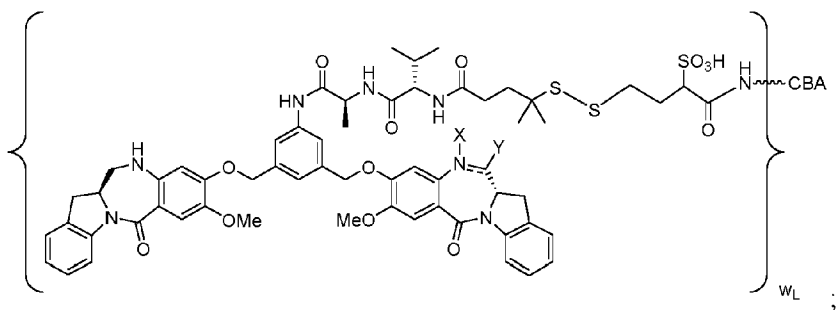
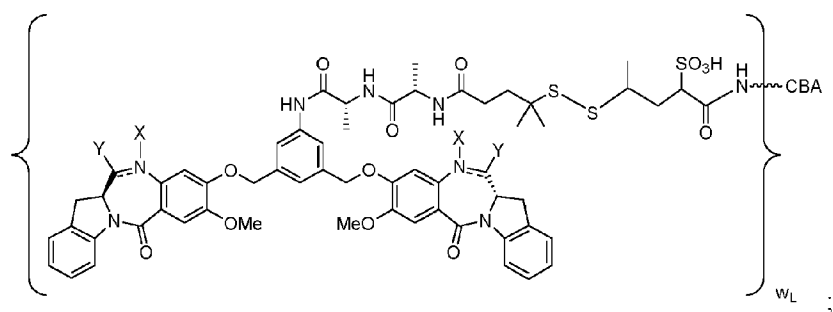
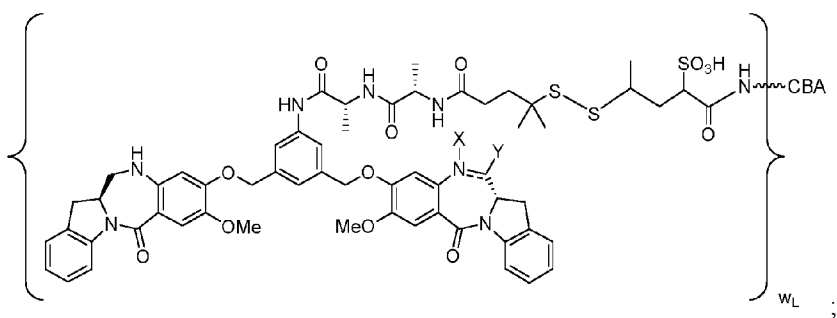
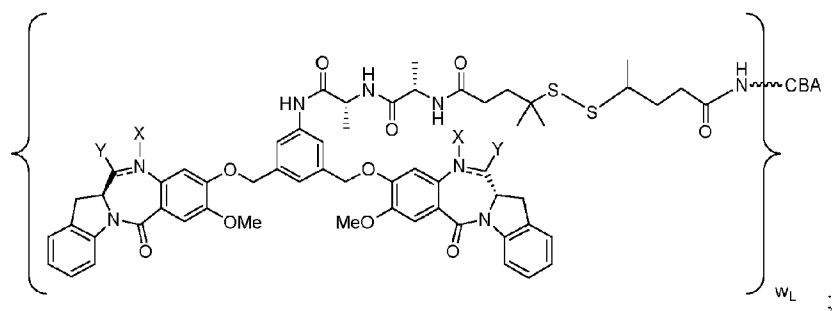
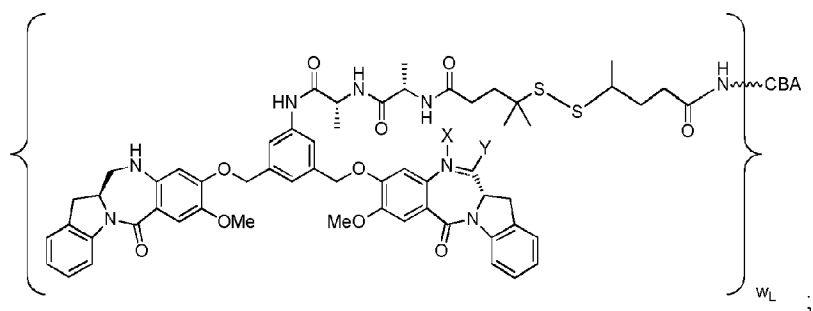
10



5

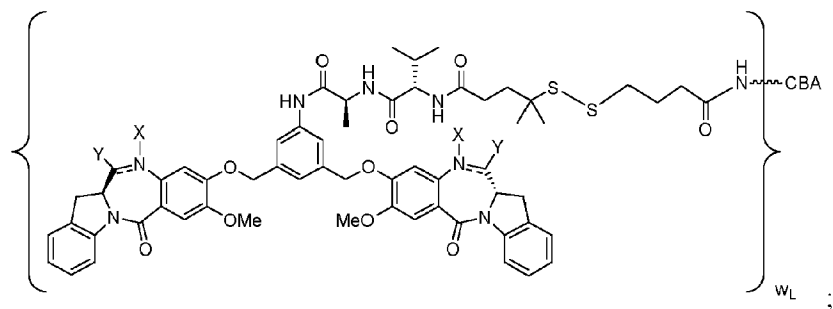
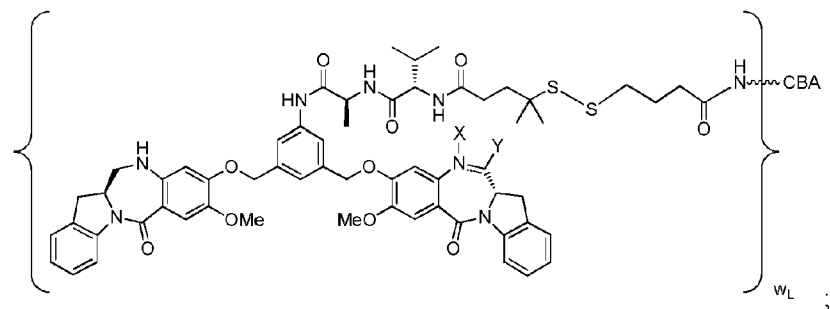
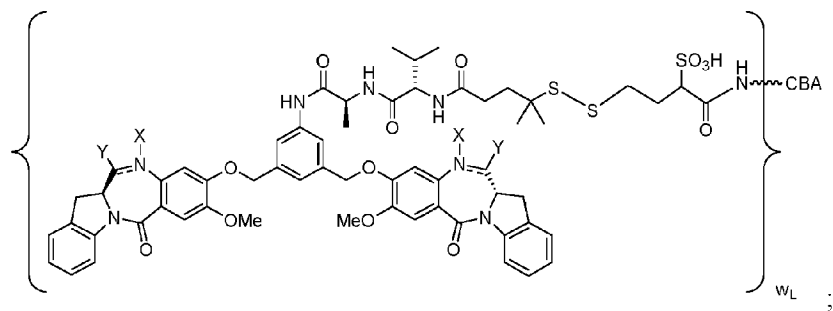


10

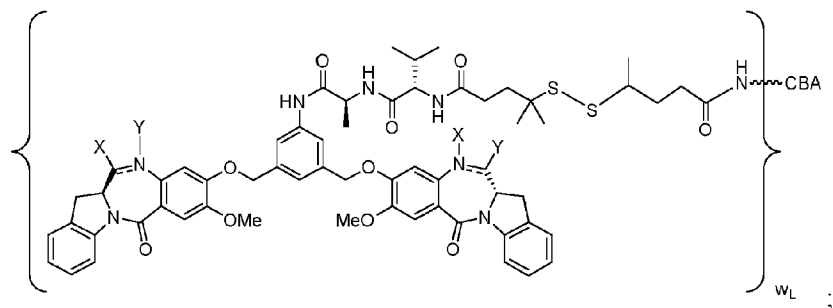
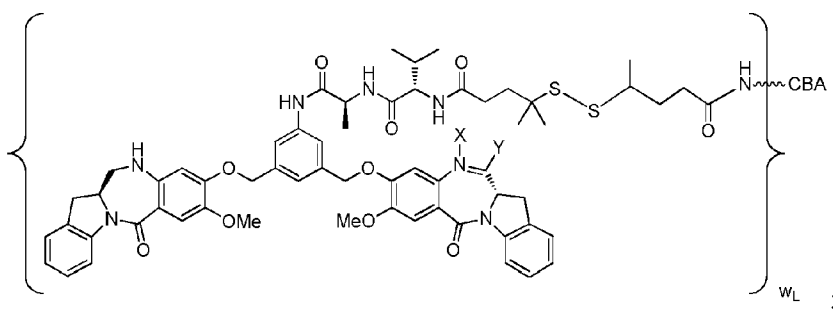


5

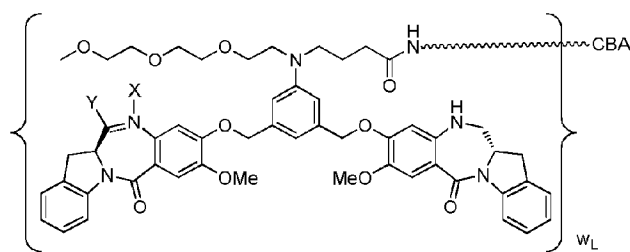
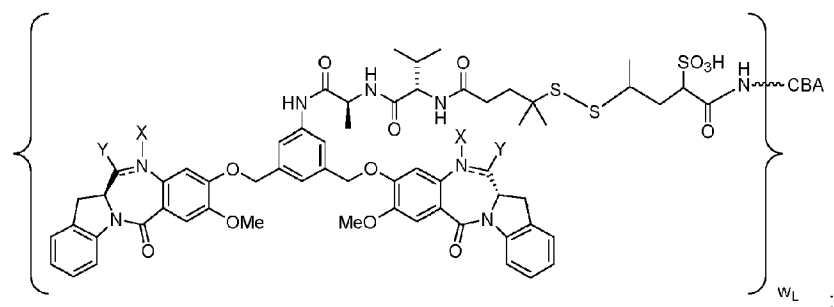
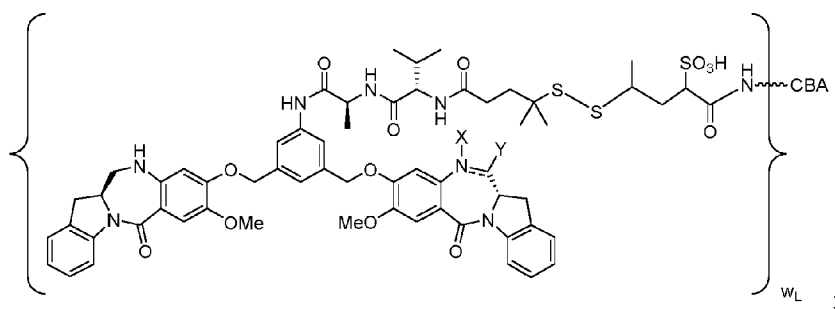
10



5

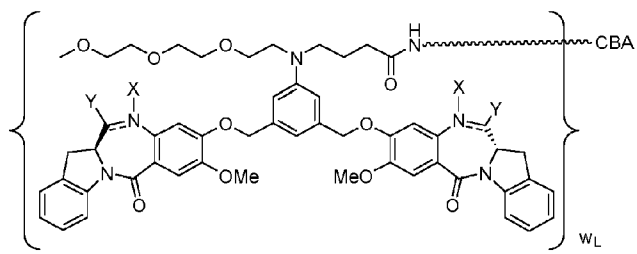


10



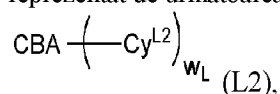
5

sau



- 10 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 până la 10; linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Într-o
- 15 variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

- 20 Într-o a 8^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul primei variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

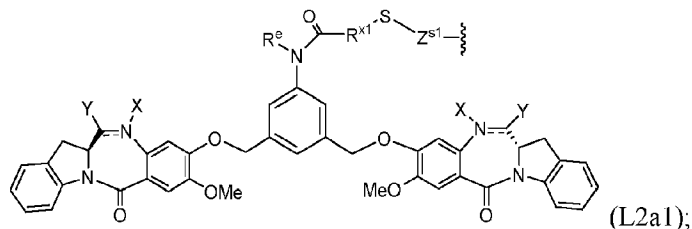
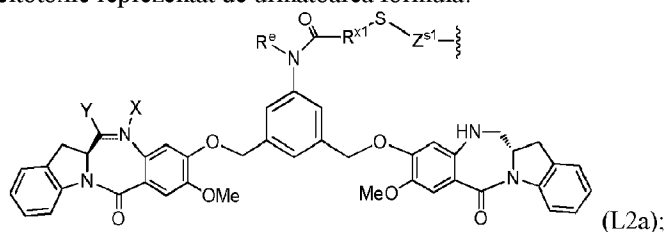


în care:

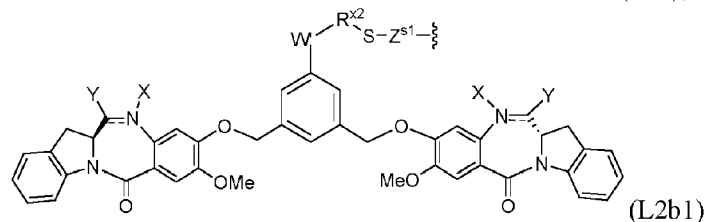
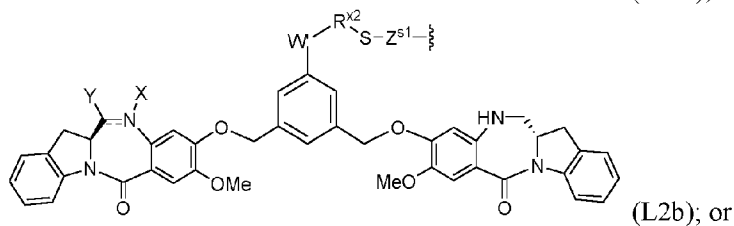
CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris anterior în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L2} printr-un rest de lizină;

W_L este un număr întreg de la 1 până la 20; și

Cy^{L2} este un compus citotoxic reprezentat de următoarea formulă:

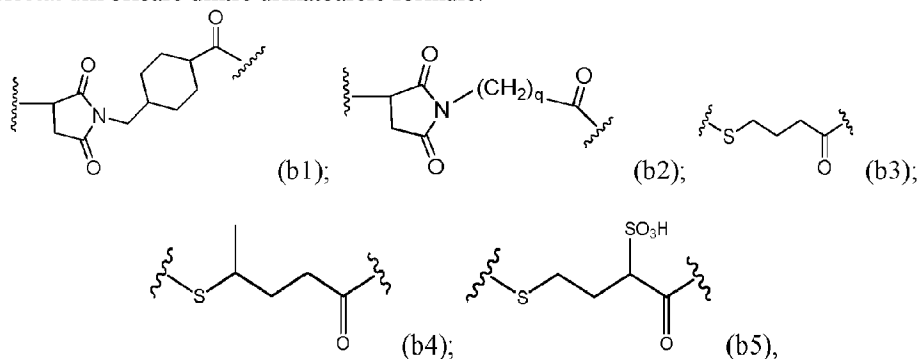


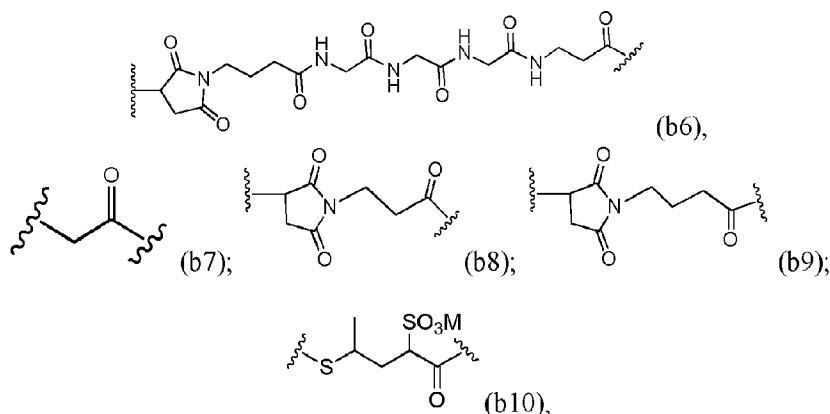
sau



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

- 10 linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C_1-C_4) alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină, și Y să fie -OH sau $-SO_3H$ sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;
 R^{x1} și R^{x2} sunt în mod independent (C_1-C_6) alchil;
 15 R^e este -H sau un (C_1-C_6) alchil;
 W' este $-NR^{e'}$,
 $R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
 n este un număr întreg de la 2 până la 6;
 R^k este -H sau -Me;
 20 Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:





și

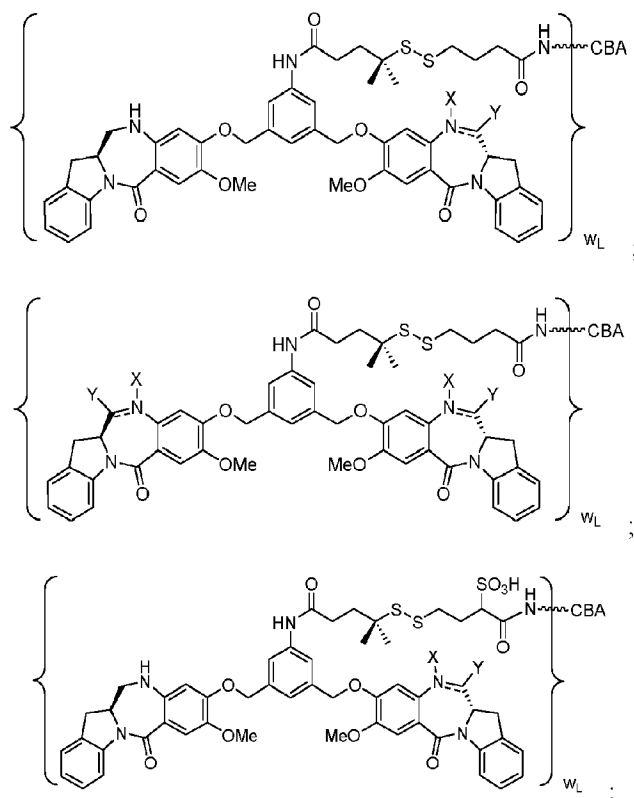
5 în care q este un număr întreg de la 1 până la 5.

Într-o a 9^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatilor cu formula (L2), Cy^{L2} este reprezentat de formula (L2a) sau (L2a1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 8^a variantă de realizare specifică.

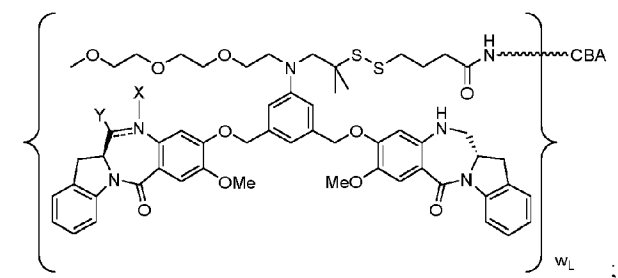
10 Într-o a 10^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatilor cu formula (L2), Cy^{L2} este reprezentat de formula (L2b) sau (L2b1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 8^a variantă de realizare specifică.

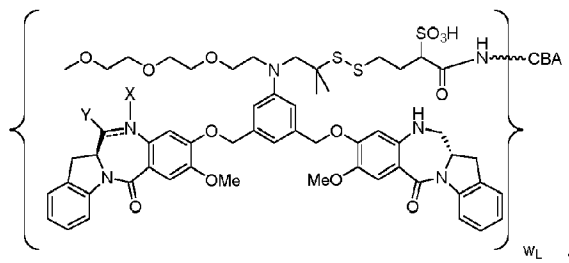
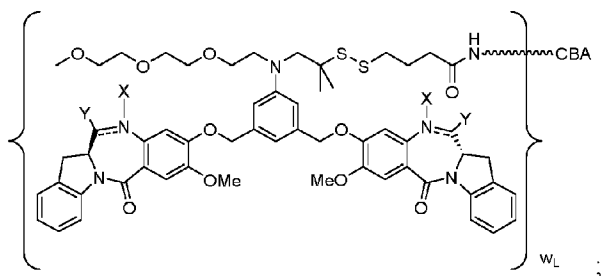
15 Într-o a 11^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatilor cu formula (L2), R^e este H sau Me; R^{x1} și R^{x2} sunt în mod independent $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, în care R^f și R^g sunt fiecare în mod independent -H sau un (C_1-C_4) alchil; și p este 0, 1, 2 sau 3; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 8^a, a 9^a sau a 10^a variantă de realizare specifică. Mai precis, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selectați dintre -H și -Me.

20 Într-o a 12^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul primei variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

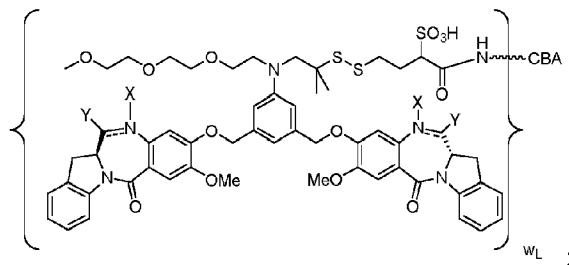


25





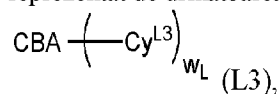
sau



5

sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 până la 10; linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

15 Într-o a 13^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul primei variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

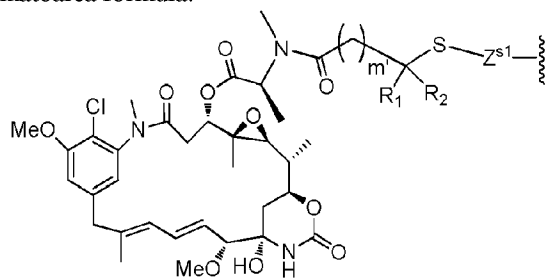


în care:

20 CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris anterior în prezenta invenție, care este legat covalent la Cy^{L3} printr-un rest de Lys;

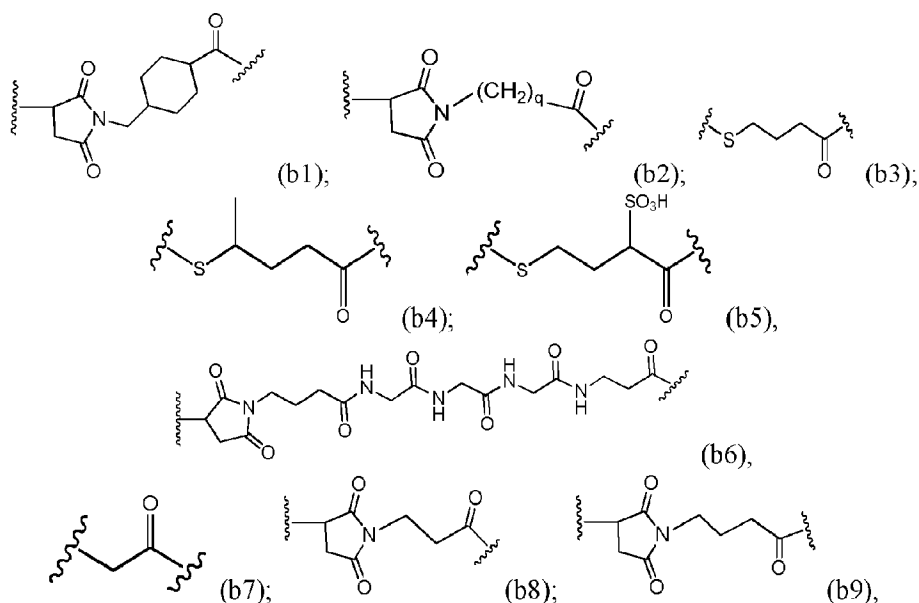
W_L este un număr întreg de la 1 până la 20;

Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:



m' este 1 sau 2;

25 R_1 și R_2 , sunt fiecare în mod independent H sau un (C₁-C₃)alchil; și Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



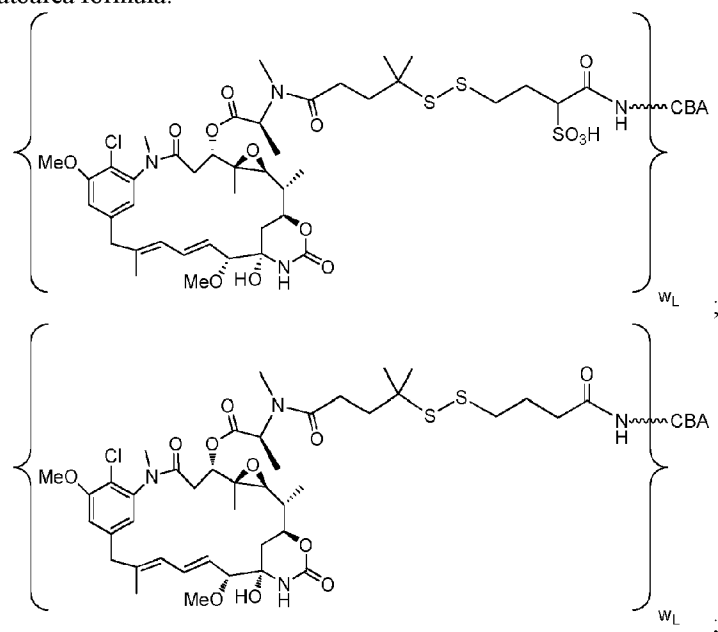
și

în care q este un număr întreg de la 1 până la 5;

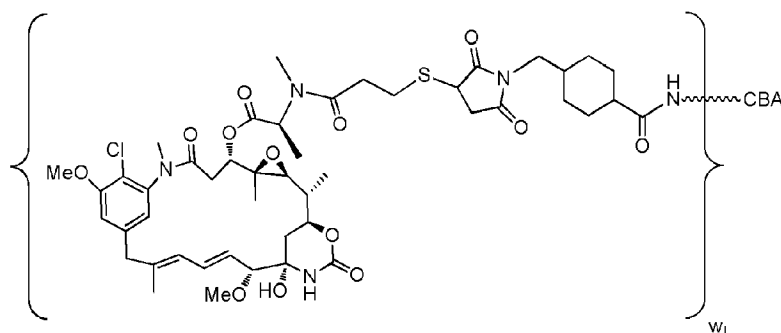
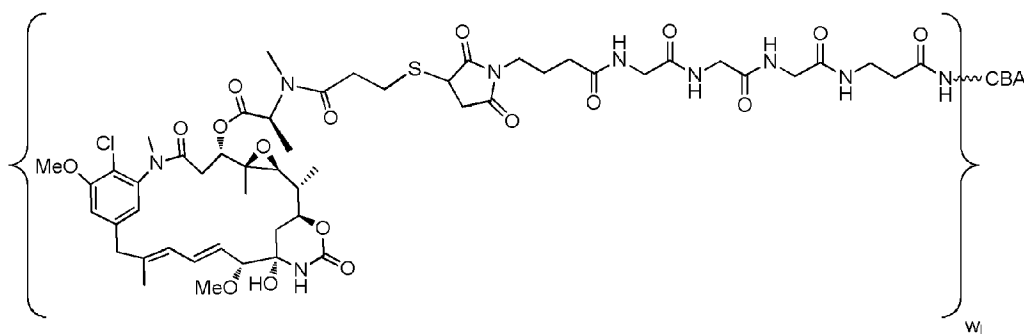
Într-o a 14^a variantă de realizare specifică a imunoconjugăților cu formula (L3), m' este 1, iar R₁ și R₂ sunt ambii H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 13^a variantă de realizare specifică.

Într-o a 15^a variantă de realizare specifică a imunoconjugăților cu formula (L3), m' este 2, iar R₁ și R₂ sunt ambii Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 13^a variantă de realizare specifică.

Într-o a 16^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul primei variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



sau



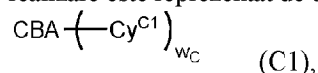
5 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 până la 10.

Într-o a 17^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor primei variante de realizare, Y este $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{Na}$ sau $-\text{SO}_3\text{K}$; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre prima până la cea de-a 16^a variantă de realizare specifică sau oricare variantă de realizare mai
10 specifică descrisă în prezenta invenție. Într-o variantă de realizare, Y este $-\text{SO}_3\text{Na}$.

În anumite variante de realizare a compozițiilor (*de exemplu* compoziții farmaceutice) care cuprind imunoconjugăți ai primei variante de realizare, prima, cea de-a 2^a, a 3^a, a 4^a, a 5^a, a 6^a, a 7^a, a 8^a, a 9^a, a 10^a, a 11^a, a 12^a, a 13^a, a 14^a, a 15^a, a 16^a sau a 17^a variantă de realizare specifică, cantitatea medie de
15 agent citotoxic per moleculă de anticorp (*adică* valoarea medie a w_L), cunoscut și sub denumirea de Raportul Medicament-Anticorp (DAR) din compoziție este cuprins în intervalul de la 1,0 până la 8,0. În unele variante de realizare, DAR este cuprins în intervalul de la 1,0 până la 5,0, 1,0 până la 4,0, 1,0 până la 3,4, 1,0 până la 3,0, 1,5 până la 2,5, 2,0 până la 2,5 sau 1,8 până la 2,2. În unele variante de realizare, DAR este mai puțin de 4,0, mai puțin de 3,8, mai puțin de 3,6, mai puțin de 3,5, mai puțin de 3,0 sau mai puțin de 2,5.
20

Într-o a doua variantă de realizare, imunoconjugății conform prezentei invenții cuprind un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris anterior, legat covalent la un agent citotoxic descris în prezenta invenție prin gruparea tiol ($-\text{SH}$) a unuia sau mai multor resturi de cisteină localizate pe anticorpul anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia.
25

Într-o primă variantă de realizare specifică, imunoconjugatul celei de-a doua variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

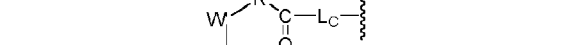
CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C1} printr-un rest de cisteină;

w_C este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:

(C1a).

(C1a1):


(C1b).

5 sau

(C1b1)

sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

10 linia dublă dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină, și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

R₅ este -H sau un (C₁-C₃)alchil;

15 P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi;
R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H, (C₁-C₃)alchil sau un substituent cu sarcină sau o
grupare ionizabilă Q;

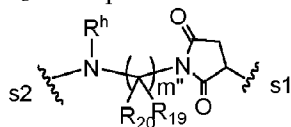
W' este $-NR^e$,

20 n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un (C₁-C₆)alchil; și

L_C este reprezentat de:



25 în care s1 este situsul legat covalent la CBA și s2 este situsul legat covalent la gruparea -C(=O)- de pe Cy^{Cl} ; în care:

R₁₉ și R₂₀, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C₁-C₃)alchil;

m'' este un număr întreg cuprins între 1 și 10; și

R^h este -H sau un (C₁-C₃)alchil.

30

Într-o a 2^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1a) sau (C1a1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare.

5 Într-o a 3^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1b) sau (C1b1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare.

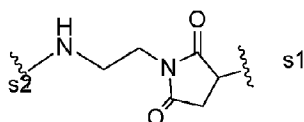
10 Într-o a 4^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1a) sau (C1a1); R_a și R_b sunt ambii H; și R₅ este H sau Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima sau cea de-a 2^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare.

15 Într-o a 5^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), P este o peptidă care conține 2 până la 5 resturi de aminoacizi; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima, cea de-a 2^a sau cea de-a 4^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare. Într-o variantă de realizare mai specifică, P este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 144), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 145), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:146), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe și Gln-Ala. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala sau D-Ala-D-Ala.

25 Într-o a 6^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), Q este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima, cea de-a 2^a, cea de-a 4^a sau cea de-a 5^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

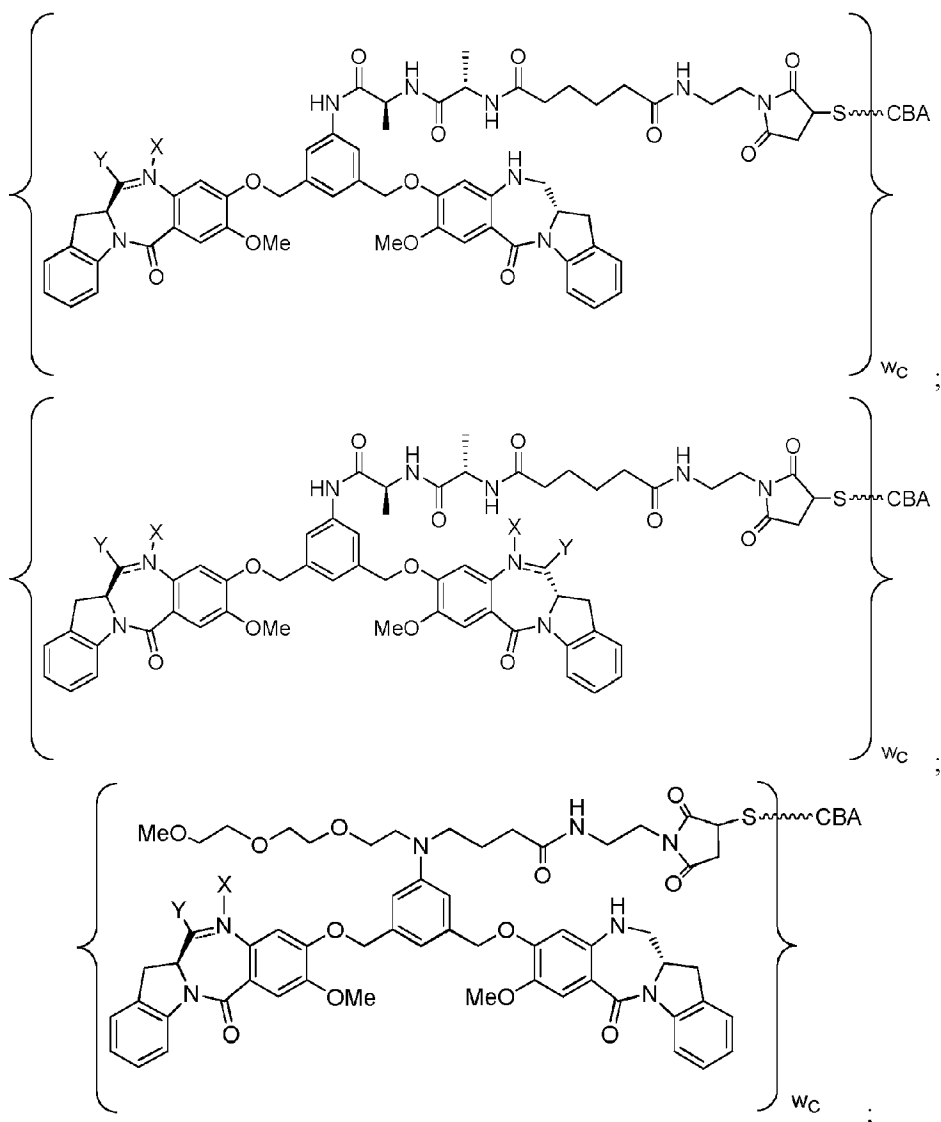
30 Într-o a 7^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), R₁₉ și R₂₀ sunt ambii H; și m" este un număr întreg de la 1 până la 6; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima, cea de-a 2^a, cea de-a 3^a, cea de-a 4^a, cea de-a 5^a sau cea de-a 6^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

Într-o a 8^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatului cu formula (C1), -L-Lc- este reprezentat de următoarea formulă:



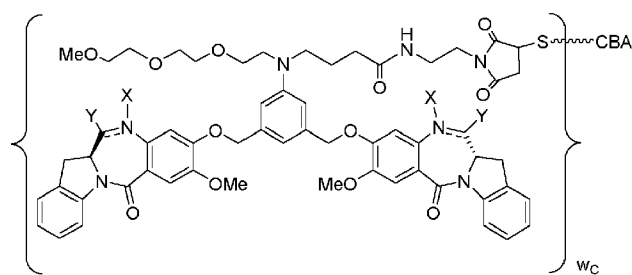
40 și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în prima, cea de-a 2^a, cea de-a 3^a, cea de-a 4^a, cea de-a 5^a, cea de-a 6^a sau cea de-a 7^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

45 Într-o a 9^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul celei de-a doua variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



5

sau



10

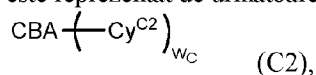
sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Într-o variantă de realizare mai specifică,

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Într-o altă variantă de

15

realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

Într-o a 10^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul celei de-a doua variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

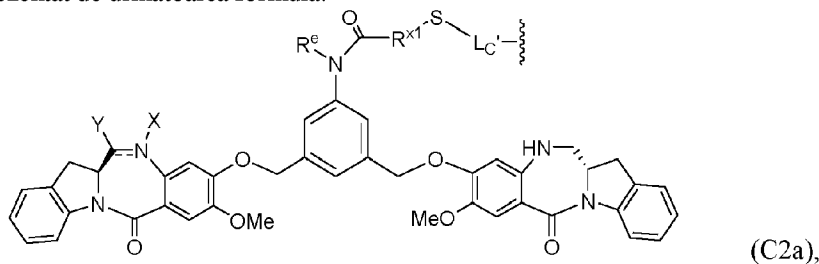


5 în care:

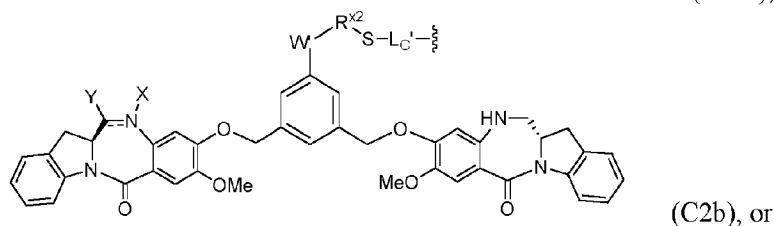
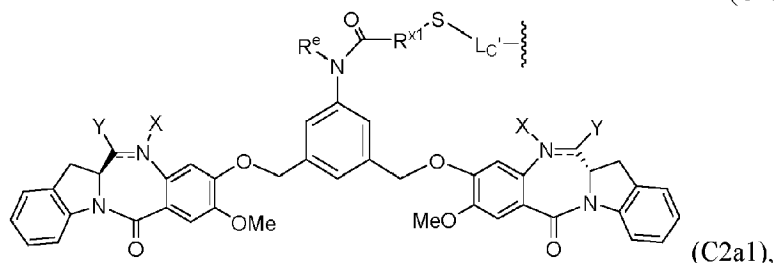
CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C2} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

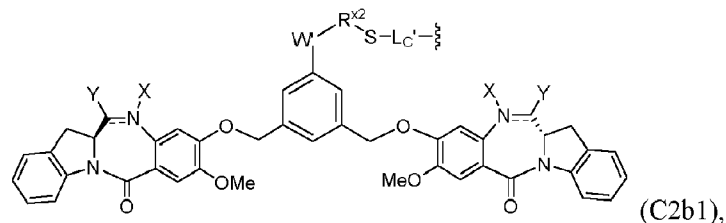
Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



10



sau



15

sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

20

R^{x1} este un (C₁-C₆)alchil;

R^e este -H sau un (C₁-C₆)alchil;

Wⁱ este -NR^e;

R^e este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

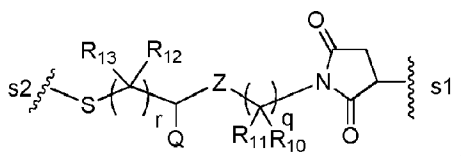
n este un număr întreg de la 2 până la 6;

25

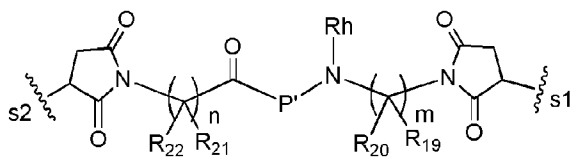
R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un (C₁-C₆)alchil;

L_C' este reprezentat de următoarea formulă:



sau



în care:

s1 este situsul legat covalent la CBA și s2 este situsul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C2};

Z este -C(=O)-NR₉- sau -NR₉-C(=O)-;

Q este -H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₉, R₂₀, R₂₁ și R₂₂, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C₁-C₃)alchil;

q și r, la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

R^h este -H sau un (C₁-C₃)alchil; și

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi.

Într-o variantă de realizare mai specifică, q și r sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 1 și 6, mai precis, un număr întreg cuprins între 1 și 3. Și mai precis, R₁₀, R₁₁, R₁₂ și R₁₃ sunt toți H.

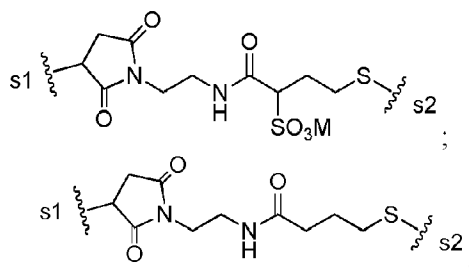
Într-o altă variantă de realizare mai specifică, m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 1 și 6, mai precis, un număr întreg cuprins între 1 și 3. Și mai precis, R₁₉, R₂₀, R₂₁ și R₂₂ sunt toți H.

Într-o a 11^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C2), Cy^{C2} este reprezentat de formula (C2a) or (C2a1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 10^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

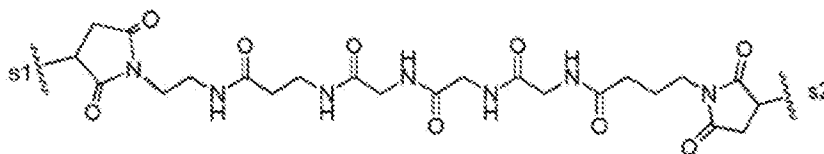
Într-o a 12^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C2), Cy^{C2} este reprezentat de formula (C2b) sau (C2b1); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 10^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare.

Într-o a 13^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C2), P' este o peptidă care conține 2 până la 5 resturi de aminoacizi; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 10^a, cea de-a 11^a sau cea de-a 12^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție. Într-o variantă de realizare mai specifică, P' este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:144), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 145), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 146), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe și Gln-Ala. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, P' este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala sau D-Ala-D-Ala.

Într-o a 14^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C2), -Lc'- este reprezentat de următoarea formulă:

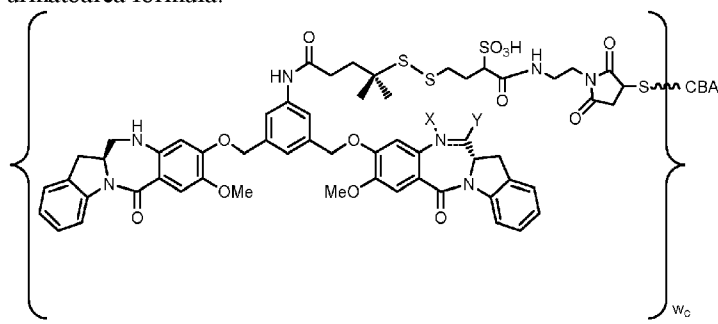


sau

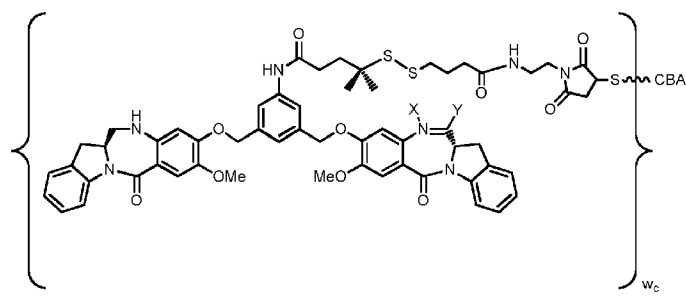
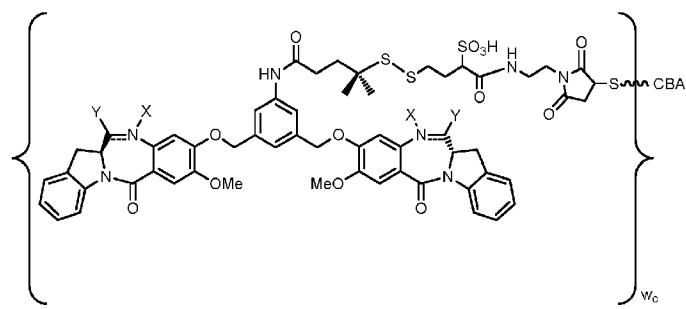


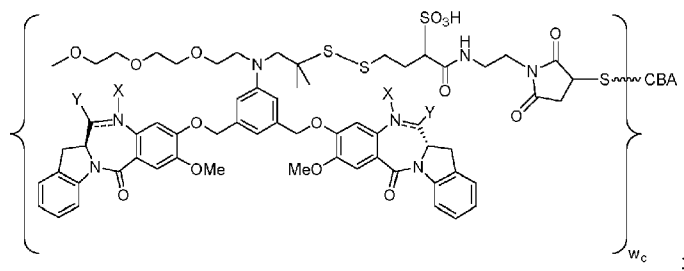
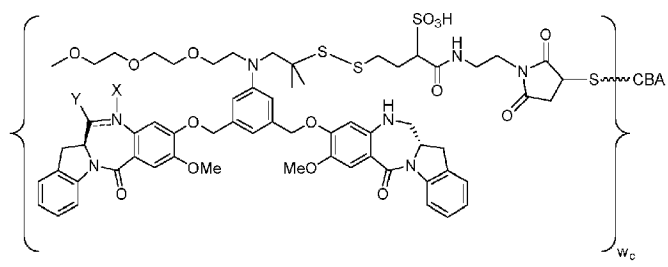
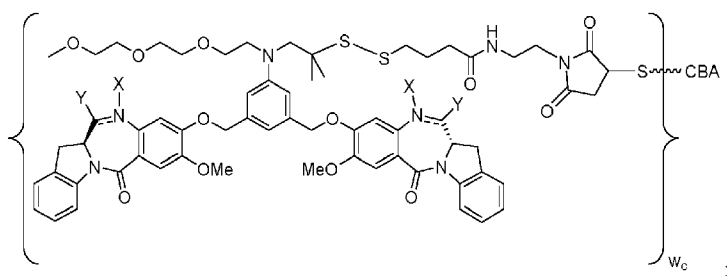
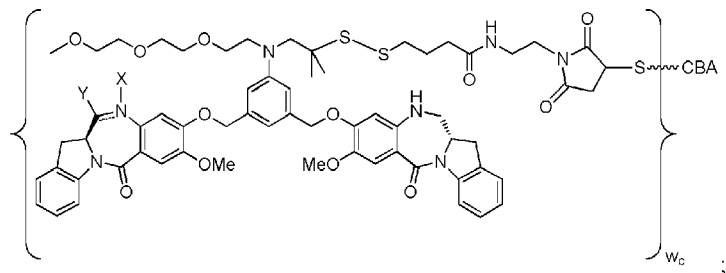
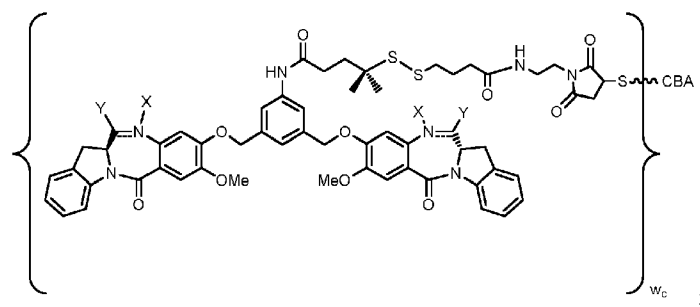
- 5 Într-o a 15^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C2), R^e este H sau Me; R^{x1} este -(CH₂)_p-(CR^fR^g)- și R^{x2} este -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, în care R^f și R^g sunt fiecare în mod independent -H sau un (C₁-C₄)alchil; și p este 0, 1, 2 sau 3; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 10^a, cea de-a 11^a, cea de-a 12^a, cea de-a 13^a sau cea de-a 14^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare. Mai precis, R^f și R^g sunt identici sau diferiți și sunt selectați dintre -H și -Me.
- 10

Într-o a 16^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul celei de-a doua variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



15





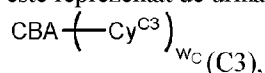
5

10

sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Într-o variantă de realizare mai specifică,

15 linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Într-o altă variantă de realizare specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

Într-o a 17^a variantă de realizare specifică, imunoconjugatul celei de-a doua variante de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

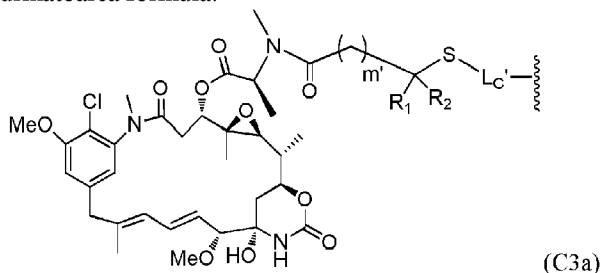


5 în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în prezenta invenție, legat covalent la Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:

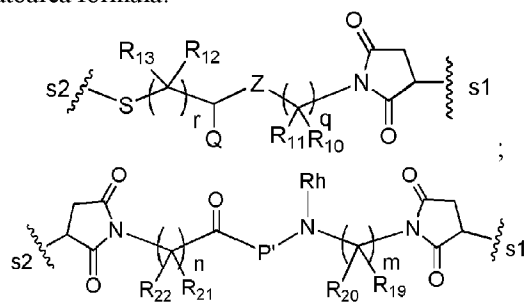


10 în care:

m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare în mod independent -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ alchil;

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



15 în care:

$s1$ este situsul legat covalent la CBA și $s2$ este situsul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C3} ;

Z este $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ sau $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$;

20 Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{19} , R_{20} , R_{21} și R_{22} , la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ alchil;

q și r , la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

25 R^h este -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ alchil; și

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi.

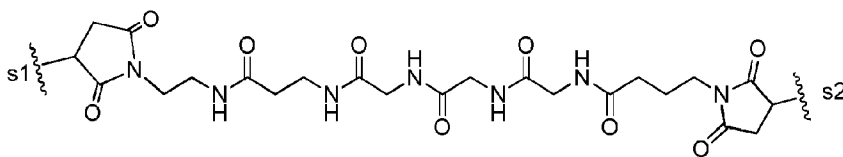
Într-o variantă de realizare mai specifică, q și r sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 1 și 6, mai precis, un număr întreg de la 1 până la 3. Și mai precis, R_{10} , R_{11} , R_{12} și R_{13} sunt toți H.

Într-o altă variantă de realizare mai specifică, m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 1 și 6, mai precis, un număr întreg de la 1 până la 3. Și mai precis, R_{19} , R_{20} , R_{21} și R_{22} sunt toți H.

Într-o a 18^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C3), P' este o peptidă care conține 2 până la 5 resturi de aminoacizi; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în cea de-a 17^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție. Într-o variantă de realizare mai specifică, P' este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:144), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 145), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 146), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-

5

10 sau



15

20

25

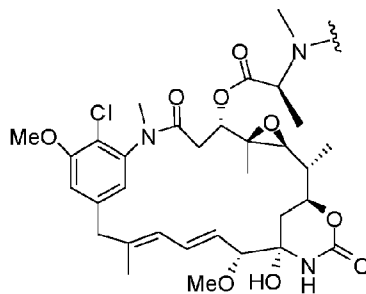
$$\left\{ \text{CBA} \sim \text{S} - \text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M} - \text{S} - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{DM} \right\}_{w_C},$$

$$\left\{ \text{CBA} \sim \text{S} - \text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S} - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{DM} \right\}_{w_C}$$

30

[illegible]

35 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care DM este o fracțiune medicamentoasă reprezentată de următoarea formulă:



Într-o a 23^a variantă de realizare specifică a imunoconjugatelor celei de-a doua variante de realizare, Y este -SO₃H, -SO₃Na sau -SO₃K; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre prima până la cea de-a 22^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție. Într-o variantă de realizare, Y este -SO₃Na.

C. Molecule de linker exemplificative

Orice linker adecvat cunoscut în stadiul tehnicii poate fi utilizat în prepararea imunoconjugatelor conform prezentei invenții. În anumite variante de realizare, linkerii sunt linkeri bifuncționali. Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, termenul "**linker bifuncțional**" se referă la agenți modulatori care posedă două grupări reactive; dintre care una este capabilă să reacționeze cu un agent de legare celulară, în timp ce cealaltă reacționează cu compusul citotoxic pentru a lega cele două fracțiuni. Astfel de agenți de reticulare bifuncționali sunt bine cunoscuți în stadiul tehnicii (a se vedea, de exemplu, Isalm and Dent in Bioconjugation capitolul 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). De exemplu, agenți de reticulare bifuncționali care permit legarea printr-o legătură tioeterică includ N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilat (SMCC) pentru a introduce grupări maleimido sau cu N-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoat (SIAB) pentru a introduce grupări iodoacetil. Alți agenți de reticulare bifuncționali care introduc grupări maleimido sau grupări haloacetil pe un agent de legare celulară sunt bine cunoscuți în stadiul tehnicii (a se vedea Cererile de brevet SUA nr. 2008/0050310, 20050169933, disponibili de la Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) și includ bis-maleimidopoli(etilenglicol) (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, ester N-(β-maleimidopropiloxi)succinimidic (BMPS), ester N-succinimidic al acidului γ-maleimidobutiric (GMBS), ester N-hidroxisuccinimidic al acidului ε-maleimidocaproic (EMCS), acid 5-maleimidovaleric NHS, HBVS, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproat), care este un analog cu "lanț lung" al SMCC (LC-SMCC), ester m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidic (MBS), hidrazida sau sarea HCl a acidului 4-(4-N-maleimidofenil)-butiric (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionat de N-succinimidil (SBAP), iodoacetat de N-succinimidil (SIA), ester N-succinimidic al acidului κ-maleimidoundecanoic (KMUA), 4-(p-maleimidofenil)-butirat de N-succinimidil (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoat (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoat (SVSB), ditiobis-maleimidoetan (DTME), 1,4-bis-maleimidobutan (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutan (BMDB), bis-maleimidohexan (BMH), bis-maleimidoetan (BMOE), 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxilat sulfosuccinimidilic (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-iodo-acetil)aminobenzoat (sulfo-SIAB), ester m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimidic (sulfo-MBS), ester N-(γ-maleimidobutiriloxy)sulfosuccinimidic (sulfo-GMBS), ester N-(ε-maleimidocaproiloxy)sulfosuccinimidic (sulfo-EMCS), ester N-(κ-maleimidoundecanoiloxy)sulfosuccinimidic (sulfo-KMUS) și 4-(p-maleimidofenil)butirat de sulfosuccinimidil (sulfo-SMPB).

Agenții de reticulare heterobifuncționali sunt agenți de reticulare bifuncționali care au două grupări reactive diferite. Agenții de reticulare heterobifuncționali care conțin atât o grupare N-hidroxisuccinimidică reactivă la amină (grupare NHS) cât și o grupare hidrazină reactivă la carbonil pot fi utilizați, de asemenea, pentru a lega compuși citotoxici descriși în prezentul document la un agent de legare celulară (de exemplu anticorp). Exemple de astfel de agenți de reticulare heterobifuncționali disponibili pe piață includ hidrazonă de acetonă de succinimidil 6-hidrazinonicotinamidă (SANH), clorhidrat de succinimidil 4-hidrazidotereftalat (SHTH) și clorhidrat de nicotinat de succinimidil hidraziniu (SHNH). Conjugatii care poartă o legătură labilă la acid pot fi preparați, de asemenea, utilizând un derivat de benzodiazepină purtător de hidrazină conform prezentei invenții. Exemplele de agenți de reticulare bifuncționali care pot fi utilizați includ benzoat de succinimidil-p-formil (SFB) și p-formilfenoxiacetatul de succinimidil (SFPFA).

Agenții de reticulare bifuncționali care permit legarea agentului de legare celulară la compuși

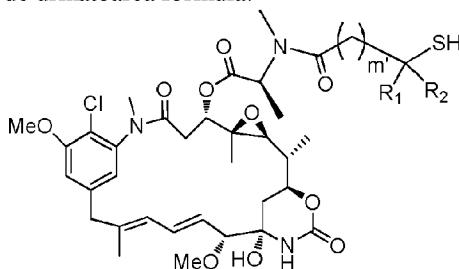
citotoxici prin legături disulfurice sunt cunoscuți în stadiul tehnicii și includ *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionat (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoat (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoat (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfobutanoat (sulfo-SPDB) pentru a introduce grupări ditiopiridil. Alți agenți de reticulare bifuncționali care pot fi utilizați pentru a introduce grupări disulfurice sunt cunoscuți în stadiul tehnicii și sunt dezvăluiți în Brevetele SUA 6,913,748, 6,716,821 și Publicațiile de brevete SUA 20090274713 și 20100129314. În mod alternativ, pot fi utilizați de asemenea agenți de reticulare cum ar fi 2-iminotiolan, tiolactonă de homocisteină sau anhidridă *S*-acetilsuccinică, ce introduc grupări tiol.

În anumite variante de realizare, linkerii bifuncționali sunt reprezentați de oricare dintre formulele (a1L) - (a10L) descrise mai jos.

D. Agenți farmacologici exemplificativi

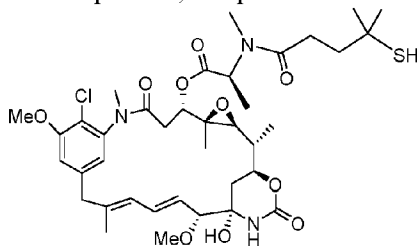
1. Maitansinoid

În anumite variante de realizare, agentul farmacologic este un compus maitansinoidic, cum ar fi cei descriși în Brevetele SUA nr. 5,208,020 și 7,276,497. În anumite variante de realizare, compusul maitansinoidic este reprezentat de următoarea formulă:

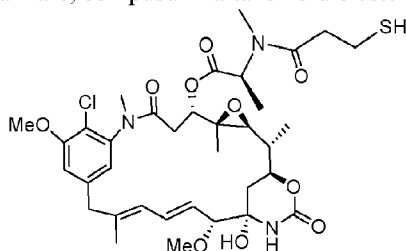


în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre cea de-a 13^a până la a 17^a variantă de realizare specifică a primei variante de realizare anterioare și în oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

Într-o variantă de realizare mai specifică, compusul maitansinoidic este DM4:



Într-o altă variantă de realizare, compusul maitansinoidic este DM1:



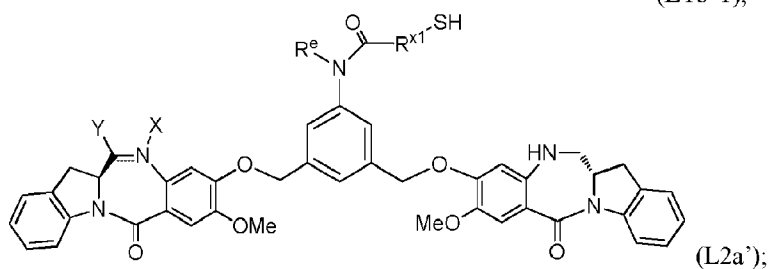
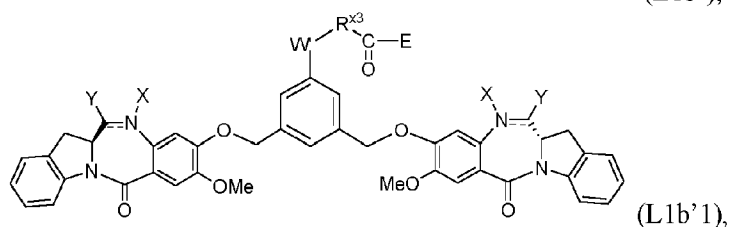
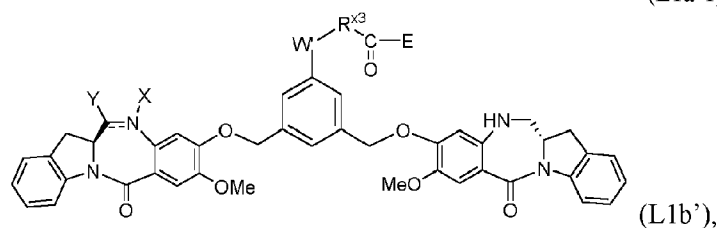
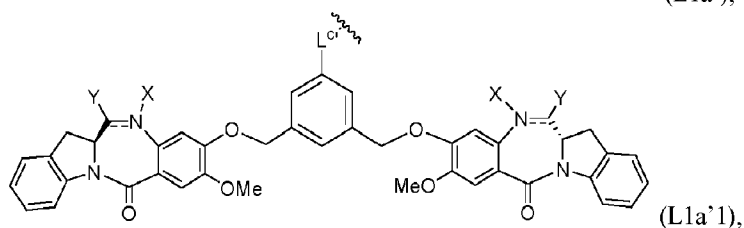
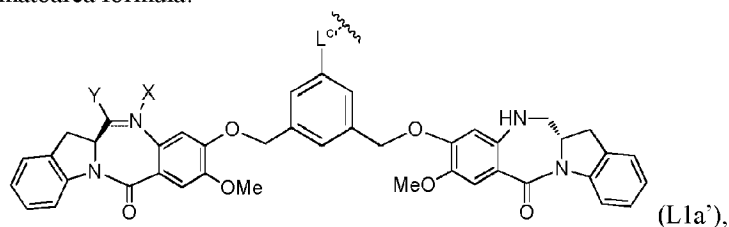
2. Benzodiazepină

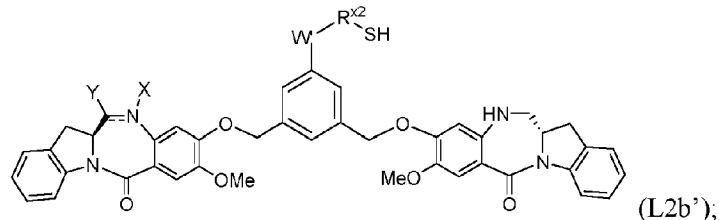
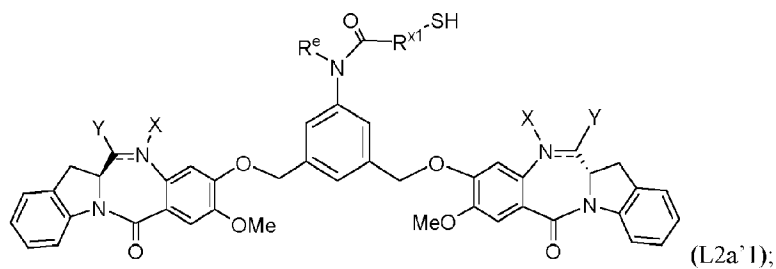
În anumite variante de realizare, agentul farmacologic este un compus benzodiazepinic, cum ar fi pirolbenzodiazepină (PBD) (cum ar fi cei descriși în WO2010/043880, WO2011/130616, WO2009/016516, WO 2013/177481 și WO 2012/112708) și compuși indolinobenzodiazepinici (IGN) (cum ar fi cei descriși în WO/2010/091150 și WO 2012/128868 și Cererea SUA nr. 15/195,269, depusă în data de 28 iunie 2016, intitulată "CONJUGAȚII AI ANTICORPILOR MODIFICATE CU CISTEINĂ"). Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, un compus "benzodiazepinic" este un compus care are o structură de nucleu benzodiazepinic. Nucleul benzodiazepinic poate fi substituit sau nesubstituit și/sau poate fi fuzionat cu una sau mai multe structuri inelare. De asemenea, acesta include un compus care are

două nuclee benzodiazepinice legate printr-un linker. Funcționalitatea iminică ($-C=N-$) ca parte a nucleului benzodiazepinic poate fi redusă.

Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, un compus "pirolbenzodiazepinic" (PBD) este un compus care are o structură de nucleu pirolbenzodiazepinic. Pirolbenzodiazepina poate fi substituită sau nesubstituită. De asemenea, aceasta include un compus care are două nuclee pirolbenzodiazepinice legate printr-un linker. Funcționalitatea iminică ($-C=N-$) ca parte a nucleului indolinbenzodiazepinic poate fi redusă.

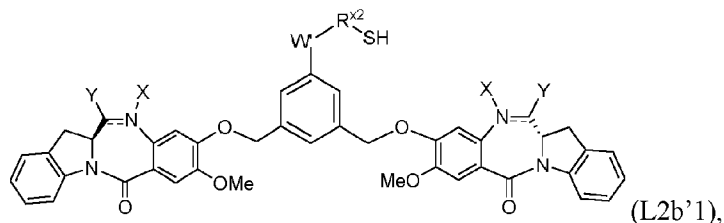
În anumite variante de realizare, agentul farmacologic este un compus indolinbenzodiazepinic reprezentat prin următoarea formulă:





sau

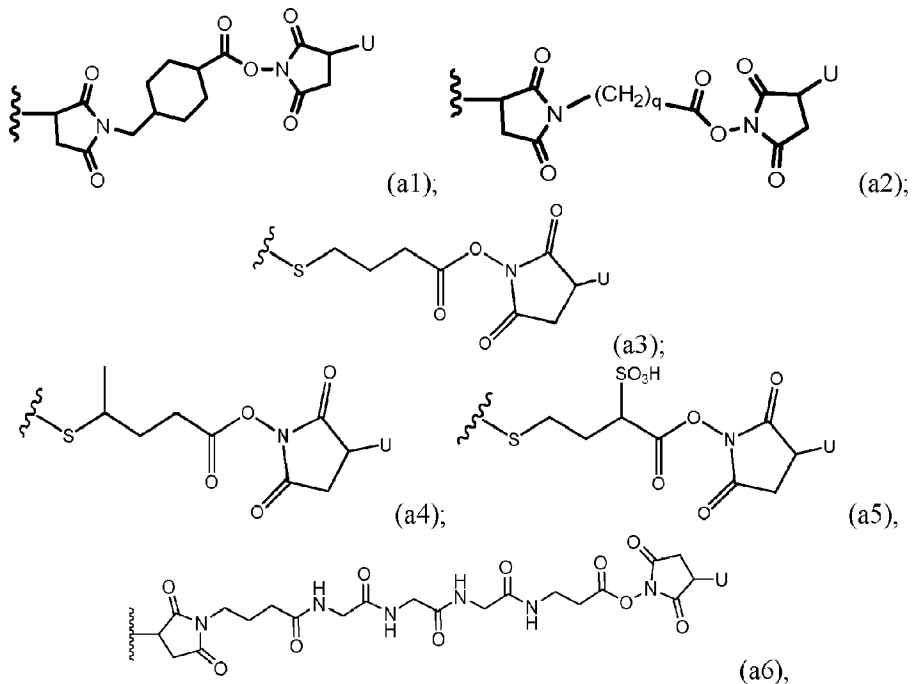
5

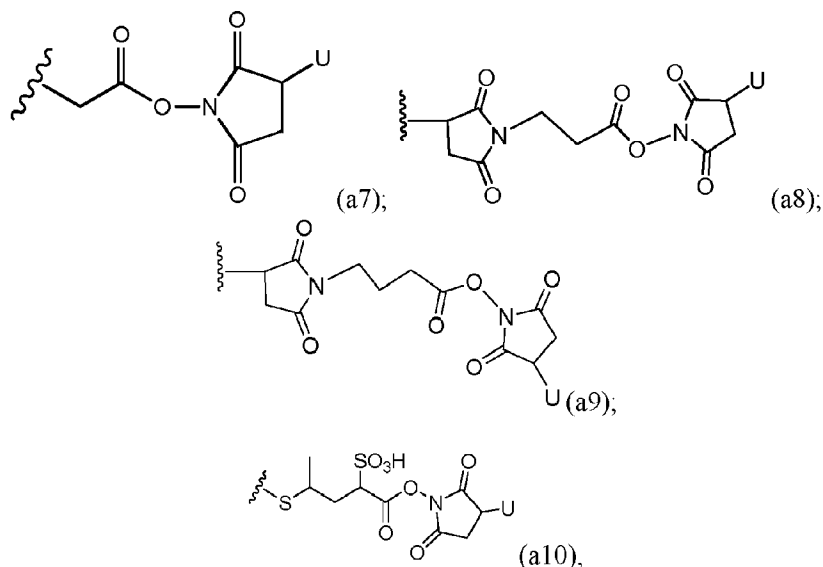


sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

L^c este reprezentat de următoarea formulă:- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)E (B1); sau10 - NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s (B2)

C(=O)E este o grupare esterică reactivă, cum ar fi ester N-hidroxisuccinimdic, ester N-hidroxi sulfosuccinimdic, ester nitrofenil (*de exemplu* 2 sau 4-nitrofenilic), ester dinitrofenil (*de exemplu* 2,4-dinitrofenilic), ester sulfo-tetrafluorfenilic (*de exemplu* 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilic) sau ester pentafluorfenilic, de preferat ester N-hidroxisuccinimdic;

15 Z^s este reprezentat de următoarea formulă:



și

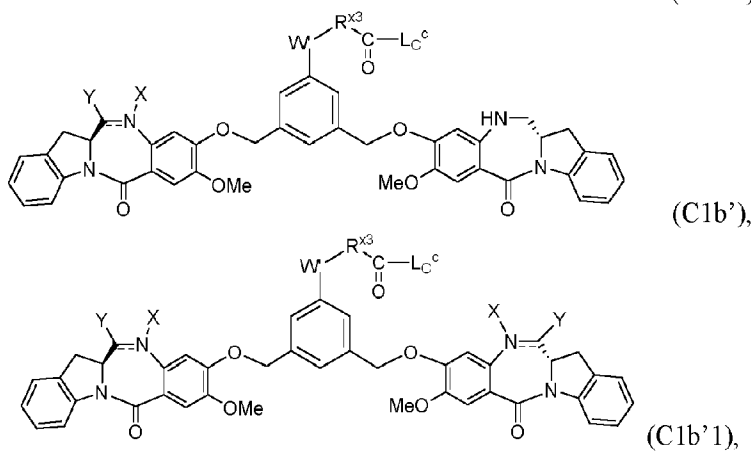
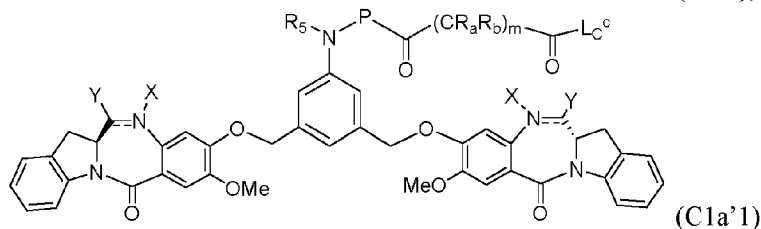
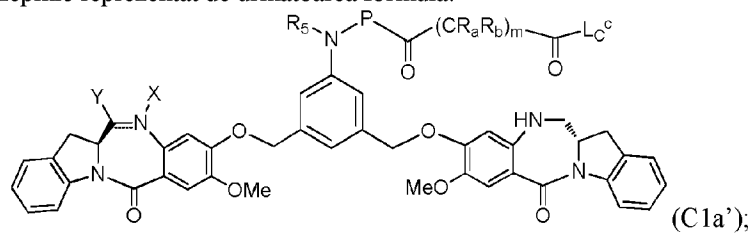
5 în care:

q este un număr întreg de la 1 până la 5; și

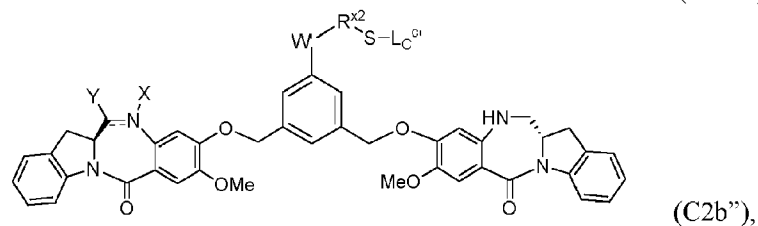
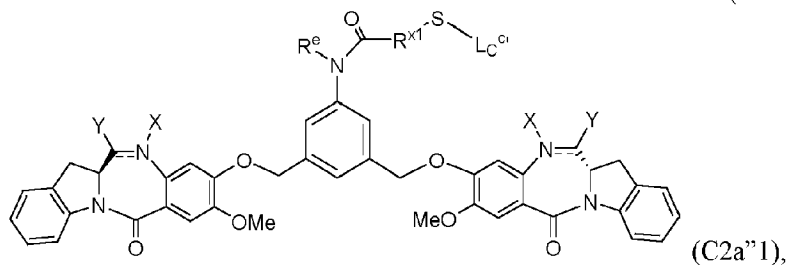
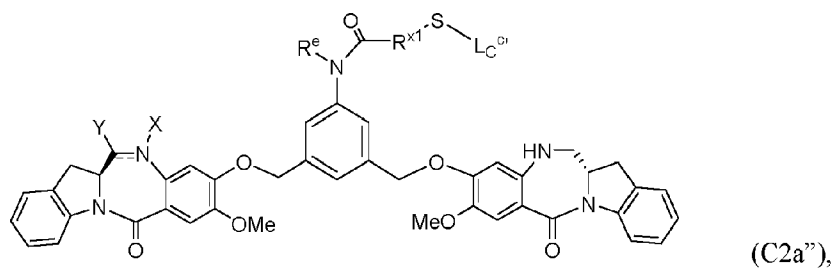
U este -H sau SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în oricare dintre prima până la cea de-a 12^a și a 17^a variantă de realizare specifică a primei variante de realizare descrise anterior sau oricare variante de realizare mai

10 specifice descrise în prezenta invenție.

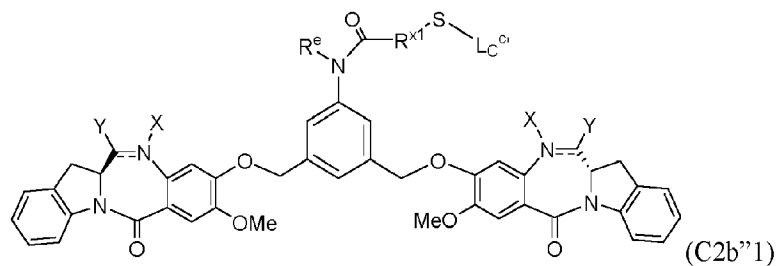
În anumite variante de realizare, agentul farmacologic este un compus indolinobenzodiazepinic reprezentat de următoarea formulă:



15

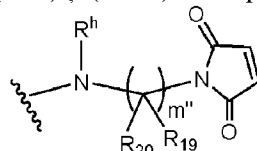


5 sau



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

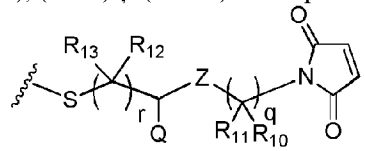
—L_C^c pentru formulele (C1a'), (C1a'1), (C1b') și (C1b'1) este reprezentat de următoarea formulă:



10

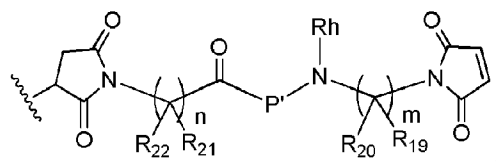
în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre prima până la cea de-a 9^a și a 23^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție; și

L_C^{c1} pentru formulele (C2a''), (C2a''1), (C2b'') și (C2b''1) este reprezentat de următoarea formulă:



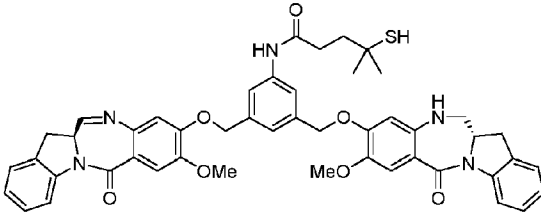
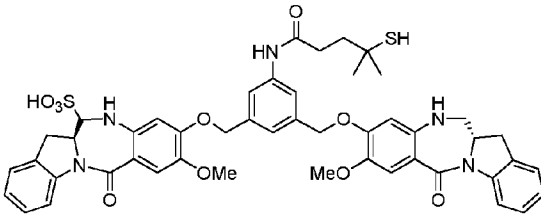
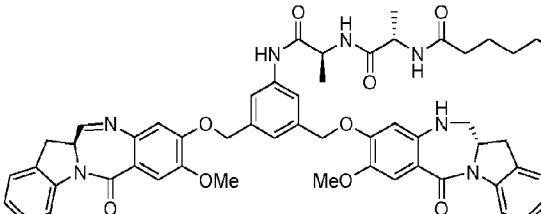
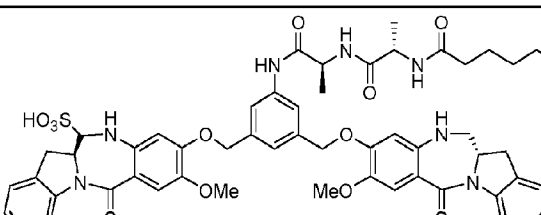
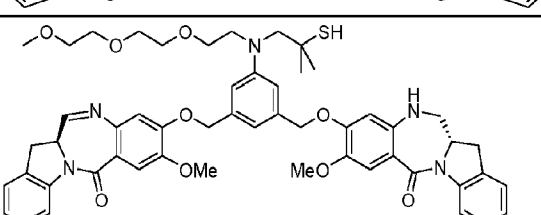
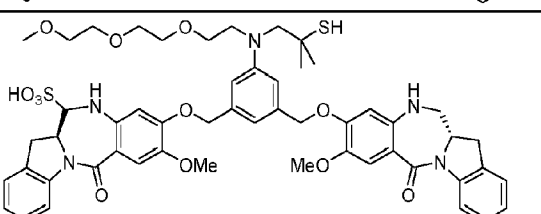
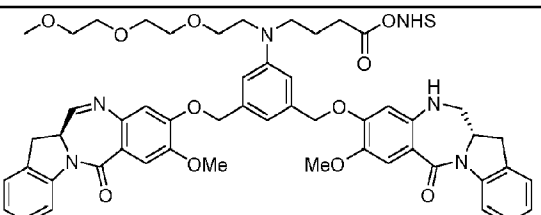
15

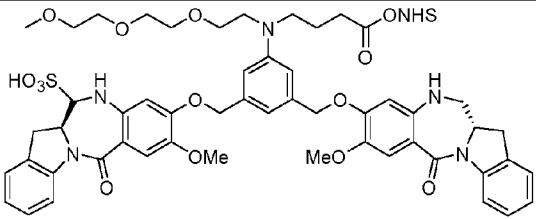
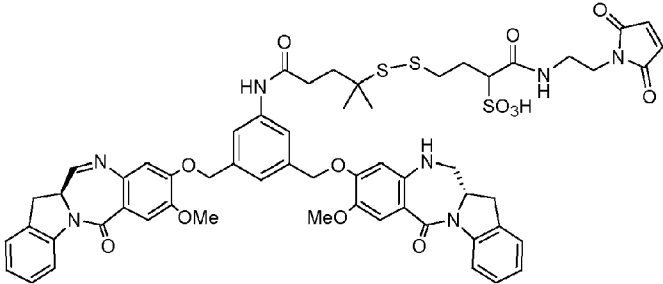
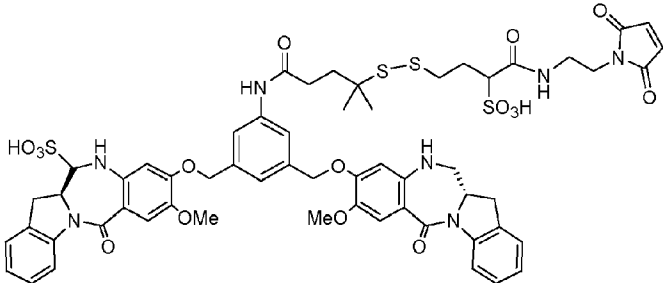
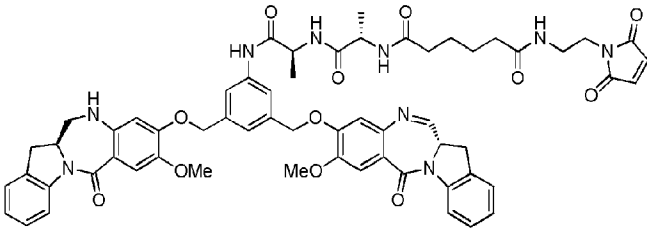
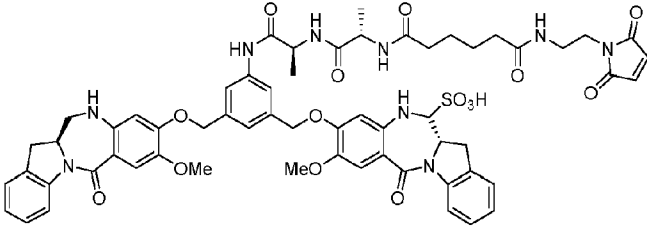
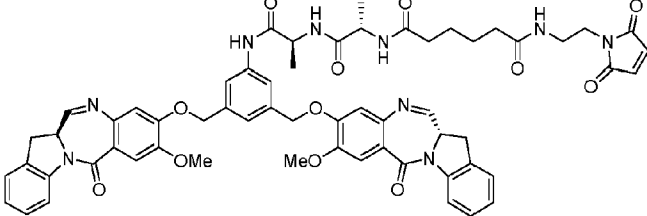
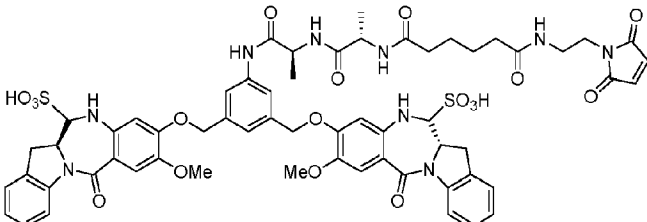
sau



în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre cea de-a 10^a până la a 16^a și a 23^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

- 5 În anumite variante de realizare, agentul farmacologic este un compus indolinobenzodiazepinic al oricăreia dintre următoarele sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia:

Nr. compus	Structură
D1	
sD1	
D2	
sD2	
DGN462	
sDGN462	
D3	

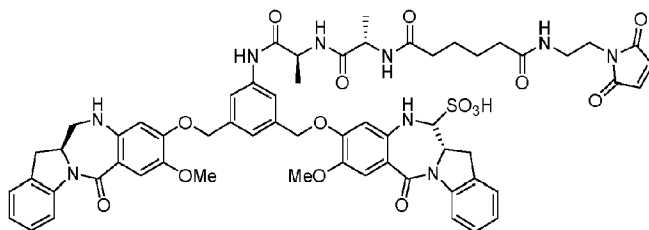
Nr. compus	Structură
sD3	
D4	
sD4	
D5	
sD5	
D5'	
sD5'	

Compușii D1, sD1, D2, sD2, DGN462, sDGN462, D3 și sD3 ilustrați anterior pot fi preparați conform procedurilor descrise în Brevetele SUA nr. 9,381,256, 8,765,740, 8,426,402 și 9,353,127 și Publicația de cerere SUA US2016/0082114.

În anumite variante de realizare, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a compușilor ilustrați anterior (*de exemplu* sD1, sD2, sD4, sDGN462, sD3, sD4, sD5, sD5', sD6 sau sD7) este o sare de sodiu sau potasiu. Mai precis, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu.

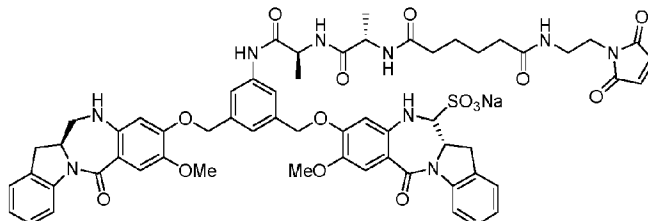
COC1=CC=C(C=C1)C2=C(C=C1)C(=O)N3C(=O)C4=CC=CC=C4N3C2=CC=C1COC5=CC=C(C=C5)C6=CC=C(C=C6)C7=C(C=C5)C(=O)N8C(=O)C9=CC=CC=C9N8C7=CC=C5COC10=CC=C(C=C10)C11=C(C=C9)C(=O)N12C(=O)C13=CC=CC=C13N12C11=CC=C9COC14=CC=C(C=C14)C15=C(C=C13)C(=O)N16C(=O)C17=CC=CC=C17N16C15=CC=C13COC18=CC=C(C=C18)C19=C(C=C17)C(=O)N20C(=O)C21=CC=CC=C21N20C19=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C22=C(C=C17)C(=O)N23C(=O)C24=CC=CC=C24N23C22=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C25=C(C=C17)C(=O)N26C(=O)C27=CC=CC=C27N26C25=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C28=C(C=C17)C(=O)N29C(=O)C30=CC=CC=C30N29C28=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C31=C(C=C17)C(=O)N32C(=O)C33=CC=CC=C33N32C31=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C34=C(C=C17)C(=O)N35C(=O)C36=CC=CC=C36N35C34=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C37=C(C=C17)C(=O)N38C(=O)C39=CC=CC=C39N38C37=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C40=C(C=C17)C(=O)N41C(=O)C42=CC=CC=C42N41C40=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C43=C(C=C17)C(=O)N44C(=O)C45=CC=CC=C45N44C43=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C46=C(C=C17)C(=O)N47C(=O)C48=CC=CC=C48N47C46=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C49=C(C=C17)C(=O)N50C(=O)C51=CC=CC=C51N50C49=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C52=C(C=C17)C(=O)N53C(=O)C54=CC=CC=C54N53C52=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C55=C(C=C17)C(=O)N56C(=O)C57=CC=CC=C57N56C55=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C58=C(C=C17)C(=O)N59C(=O)C60=CC=CC=C60N59C58=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C61=C(C=C17)C(=O)N62C(=O)C63=CC=CC=C63N62C61=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C64=C(C=C17)C(=O)N65C(=O)C66=CC=CC=C66N65C64=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C67=C(C=C17)C(=O)N68C(=O)C69=CC=CC=C69N68C67=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C70=C(C=C17)C(=O)N69C(=O)C71=CC=CC=C71N69C70=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C72=C(C=C17)C(=O)N73C(=O)C74=CC=CC=C74N73C72=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C75=C(C=C17)C(=O)N76C(=O)C77=CC=CC=C77N76C75=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C78=C(C=C17)C(=O)N79C(=O)C80=CC=CC=C80N79C78=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C81=C(C=C17)C(=O)N82C(=O)C83=CC=CC=C83N82C81=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C84=C(C=C17)C(=O)N85C(=O)C86=CC=CC=C86N85C84=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C87=C(C=C17)C(=O)N88C(=O)C89=CC=CC=C89N88C87=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C90=C(C=C17)C(=O)N89C(=O)C91=CC=CC=C91N89C90=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C92=C(C=C17)C(=O)N93C(=O)C94=CC=CC=C94N93C92=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C95=C(C=C17)C(=O)N96C(=O)C97=CC=CC=C97N96C95=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C98=C(C=C17)C(=O)N99C(=O)C100=CC=CC=C100N99C98=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C101=C(C=C17)C(=O)N102C(=O)C103=CC=CC=C103N102C101=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C104=C(C=C17)C(=O)N105C(=O)C106=CC=CC=C106N105C104=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C107=C(C=C17)C(=O)N108C(=O)C109=CC=CC=C109N108C107=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C110=C(C=C17)C(=O)N109C(=O)C111=CC=CC=C111N109C110=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C112=C(C=C17)C(=O)N112C(=O)C113=CC=CC=C113N112C112=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C114=C(C=C17)C(=O)N114C(=O)C115=CC=CC=C115N114C114=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C116=C(C=C17)C(=O)N116C(=O)C117=CC=CC=C117N116C116=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C118=C(C=C17)C(=O)N118C(=O)C119=CC=CC=C119N118C118=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C120=C(C=C17)C(=O)N120C(=O)C121=CC=CC=C121N120C120=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C122=C(C=C17)C(=O)N122C(=O)C123=CC=CC=C123N122C122=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C124=C(C=C17)C(=O)N124C(=O)C125=CC=CC=C125N124C124=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C126=C(C=C17)C(=O)N126C(=O)C127=CC=CC=C127N126C126=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C128=C(C=C17)C(=O)N128C(=O)C129=CC=CC=C129N128C128=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C130=C(C=C17)C(=O)N130C(=O)C131=CC=CC=C131N130C130=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C132=C(C=C17)C(=O)N132C(=O)C133=CC=CC=C133N132C132=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C134=C(C=C17)C(=O)N134C(=O)C135=CC=CC=C135N134C134=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C136=C(C=C17)C(=O)N136C(=O)C137=CC=CC=C137N136C136=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C138=C(C=C17)C(=O)N138C(=O)C139=CC=CC=C139N138C138=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C140=C(C=C17)C(=O)N140C(=O)C141=CC=CC=C141N140C140=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C142=C(C=C17)C(=O)N142C(=O)C143=CC=CC=C143N142C142=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C144=C(C=C17)C(=O)N144C(=O)C145=CC=CC=C145N144C144=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C146=C(C=C17)C(=O)N146C(=O)C147=CC=CC=C147N146C146=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C148=C(C=C17)C(=O)N148C(=O)C149=CC=CC=C149N148C148=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C150=C(C=C17)C(=O)N150C(=O)C151=CC=CC=C151N150C150=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C152=C(C=C17)C(=O)N152C(=O)C153=CC=CC=C153N152C152=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C154=C(C=C17)C(=O)N154C(=O)C155=CC=CC=C155N154C154=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C156=C(C=C17)C(=O)N156C(=O)C157=CC=CC=C157N156C156=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C158=C(C=C17)C(=O)N158C(=O)C159=CC=CC=C159N158C158=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C160=C(C=C17)C(=O)N160C(=O)C161=CC=CC=C161N160C160=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C162=C(C=C17)C(=O)N162C(=O)C163=CC=CC=C163N162C162=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C164=C(C=C17)C(=O)N164C(=O)C165=CC=CC=C165N164C164=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C166=C(C=C17)C(=O)N166C(=O)C167=CC=CC=C167N166C166=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C168=C(C=C17)C(=O)N168C(=O)C169=CC=CC=C169N168C168=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C170=C(C=C17)C(=O)N170C(=O)C171=CC=CC=C171N170C170=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C172=C(C=C17)C(=O)N172C(=O)C173=CC=CC=C173N172C172=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C174=C(C=C17)C(=O)N174C(=O)C175=CC=CC=C175N174C174=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C176=C(C=C17)C(=O)N176C(=O)C177=CC=CC=C177N176C176=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C178=C(C=C17)C(=O)N178C(=O)C179=CC=CC=C179N178C178=CC=C17COC19=CC=C(C=C19)C180=C(C=C17)C(=O)

sau



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Într-o variantă de realizare specifică, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu.

Într-o altă variantă de realizare specifică, agentul farmacologic este reprezentat de următoarea formulă:



IV. Procedee de producție

Anticorpilor anti-ADAM9 și fragmentele de legare a ADAM9 ale acestora conform prezentei invenții sunt cel mai de preferat produși prin expresia recombinantă a moleculelor de acid nucleic care codifică astfel de polipeptide, astfel cum este bine cunoscut în stadiul tehnicii.

Polipeptidele conform invenției pot fi preparate în mod convenabil utilizând sinteza peptidelor în fază solidă (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

Într-o alternativă, anticorpilor pot fi obținuți recombinant și exprimați utilizând orice procedeu cunoscut în stadiul tehnicii. Anticorpilor pot fi obținuți recombinant prin izolarea mai întâi a anticorpilor obținuți de la animale gazdă, obținerea secvenței genetice și utilizarea secvenței genetice pentru a exprima anticorpii recombinanți în celulele gazdă (*de exemplu* celule CHO). Un alt procedeu care poate fi utilizat este exprimarea secvenței de anticorpi în plante (*de exemplu* tutun) sau lapte transgenic. Au fost dezvoltate procedee adecvate pentru exprimarea recombinantă a anticorpilor în plante sau lapte (a se vedea, *de exemplu*, Peeters și colab. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19:2756; Lonberg, N. și colab. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock și colab. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," J. Immunol Methods 231:147-157). Suitable methods for making derivatives of antibodies, *e.g.*, humanized, single-chain, *etc.* are known in the art, and have been described above. Într-o altă alternativă, anticorpilor pot fi obținuți recombinant prin tehnologia de afișare a fagilor (a se vedea, *de exemplu*, Brevetele SUA nr. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; și Winter, G. și colab. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

Vectorii care conțin polinucleotide de interes (*de exemplu* polinucleotide care codifică lanțurile polipeptidice ale anticorpilor anti-ADAM9 și fragmentele de legare a ADAM9 ale acestora conform prezentei invenții) pot fi introduși în celula gazdă prin oricare dintre o serie de mijloace adecvate, inclusiv electroporare, transfecție utilizând clorură de calciu, clorură de rubidiu, fosfat de calciu, DEAE-dextran sau alte substanțe; bombardament cu microproiectile; lipofecție; și infecție (*de exemplu* în cazul în care vectorul este un agent infecțios cum ar fi virusul vaccinia). Alegerea introducerii vectorilor sau polinucleotidelor va depinde adesea de caracteristicile celulei gazdă.

Orice celulă gazdă capabilă să supraexprime ADN-uri heteroloage poate fi utilizată în scopul exprimării unei polipeptide sau proteine de interes. Exemple nelimitative de celule gazdă de mamifer adecvate includ, dar fără a se limita la, celule COS, HeLa și CHO.

Invenția include imunoconjugăți care cuprind o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-

ADAM9 sau fragment de legare a ADAM9 al acestuia conform prezentei invenții. Polipeptidele conform prezentei invenții pot fi produse prin procedee cunoscute în stadiul tehnicii. Polipeptidele pot fi produse prin degradarea proteolitică sau de altă natură a anticorpilor, prin procedee recombinante (*adica* polipeptide simple sau de fuziune) astfel cum este descris anterior sau prin sinteză chimică. Polipeptidele anticorpilor, în special polipeptidele mai scurte până la aproximativ 50 de aminoacizi, sunt obținute în mod convenabil prin sinteză chimică. Procedeele de sinteză chimică sunt cunoscute în stadiul tehnicii și sunt disponibile pe piață.

Modificarea polipeptidelor este o practică de rutină în stadiul tehnicii și nu trebuie descrisă în detaliu în prezenta invenție. Exemple de polipeptide modificate includ polipeptide cu substituții conservatoare ale resturilor de aminoacizi, una sau mai multe deleții sau adaosuri de aminoacizi care nu modifică în mod semnificativ activitatea funcțională sau utilizarea analogilor chimici. Resturile de aminoacizi care pot fi înlocuite conservator unele cu altele includ: glicină/alanină; serină/treonină; valină/izoleucină/leucină; asparagină/glutamină; acid aspartic/acid glutamic; lizină/arginină; și nd fenilalanină/tirozină. Aceste polipeptide includ, de asemenea, polipeptide glicozilate și neglicozilate, precum și polipeptide cu alte modificări post-tranlaționale, cum ar fi, de exemplu, glicozilare cu diverse zaharuri, acetilare și fosforilare. De preferat, substituțiile de aminoacizi ar fi conservatoare, *adica* aminoacidul substituit ar poseda proprietăți chimice similare cu cele ale aminoacidului original. Astfel de substituții conservatoare sunt cunoscute în stadiul tehnicii și exemplele au fost furnizate anterior. Modificările aminoacizilor pot varia de la schimbarea sau modificarea unuia sau mai multor aminoacizi până la reconceperea completă a unei regiuni, cum ar fi domeniul variabil. Modificările în domeniul variabil pot modifica afinitatea de legare și/sau specificitatea. Alte procedee de modificare includ utilizarea tehnicilor de cuplare cunoscute în stadiul tehnicii, inclusiv mijloace enzimaticе, substituție oxidativă și chelare. Modificările pot fi utilizate, de exemplu, pentru atașarea marcajelor pentru imunotestare, cum ar fi atașarea fracțiunilor radioactive pentru radioimunotestare. Polipeptidele modificate sunt produse utilizând proceduri stabilite în stadiul tehnicii și pot fi analizate utilizând teste standard cunoscute în stadiul tehnicii.

Invenția cuprinde imunoconjugăți care cuprind proteine de fuziune care posedă unul sau mai multe dintre VL și/sau VH anti-ADAM9 conform prezentei invenții. Într-o variantă de realizare, este furnizată o polipeptidă de fuziune care cuprinde un lanț ușor, un lanț greu sau atât un lanț ușor, cât și un lanț greu. Într-o altă variantă de realizare, polipeptida de fuziune conține o regiune constantă de imunoglobulină heteroloagă. Într-o altă variantă de realizare, polipeptida de fuziune conține un domeniu variabil al lanțului ușor și un domeniu variabil al lanțului greu al unui anticorp produs dintr-un hibridom depus public. În scopul prezentei invenții, o proteină de fuziune a anticorpului conține unul sau mai multe domenii polipeptidice care se leagă în mod specific la ADAM9 și o altă secvență de aminoacizi la care nu este atașată în molecula nativă, de exemplu, o secvență heteroloagă sau o secvență omoloagă dintr-o altă regiune.

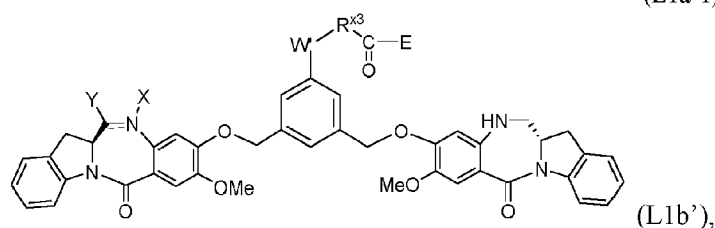
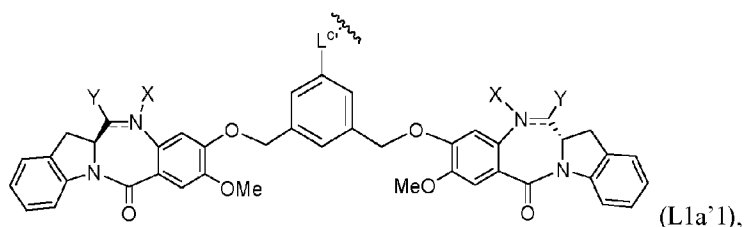
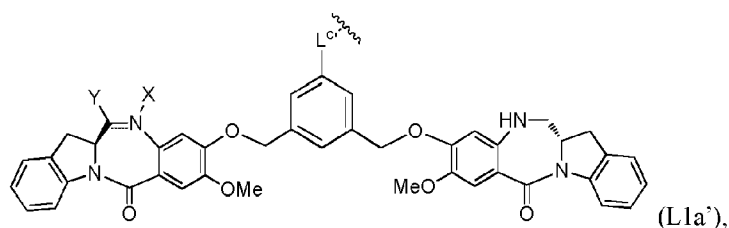
V. Conjugarea medicamentelor

Imunoconjugății care cuprind un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia legat covalent la un agent farmacologic prin gruparea ε-amino a unuia sau mai multor resturi de lizină situate pe anticorpul anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia, astfel cum este descris în prima variantă de realizare anterioară sau oricare variante de realizare specifice descrise în prezenta invenție pot fi preparați conform oricăror procedee cunoscute în stadiul tehnicii, a se vedea, de exemplu, WO 2012/128868 și WO2012/112687.

În anumite variante de realizare, imunoconjugății conform primei variante de realizare pot fi preparați printr-un prim procedeu care cuprinde etapele de reacționare a CBA cu un agent citotoxic care are o grupare reactivă la amină.

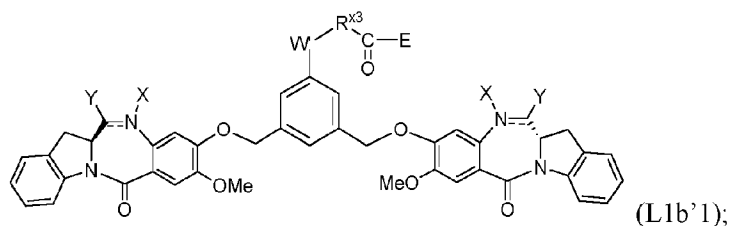
Într-o variantă de realizare, pentru primul procedeu descris anterior, reacția poate fi efectuată în prezența unui reactiv la imină, cum ar fi NaHSO_3 .

Într-o variantă de realizare, pentru primul procedeu descris anterior, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la imină este reprezentat de următoarea formulă:



5

sau



10

sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care definițiile pentru variabile sunt descrise anterior pentru formulele (L1a'), (L1a'1), (L1b') și (L1b'1).

În anumite variante de realizare, imunoconjugății conform primei variante de realizare pot fi preparați printr-un al doilea procedeu care cuprinde următoarele etape:

15

- (a) reacționarea unui agent citotoxic cu un compus linker care are o grupare reactivă la amină și o grupare reactivă la tiol pentru a forma un compus agent citotoxic-linker care are gruparea reactivă la amină legată la acesta; și
- (b) reacționarea CBA cu compusul agent citotoxic-linker.

20

Într-o variantă de realizare, pentru cel de-al doilea procedeu descris anterior, reacția din etapa (a) este efectuată în prezența unui reactiv la imină (*de exemplu* NaHSO_3).

25

Într-o variantă de realizare, pentru cel de-al doilea procedeu descris anterior, compusul agent citotoxic-linker poate fi reacționat cu CBA fără purificare. În mod alternativ, compusul agent citotoxic-linker poate fi purificat înainte de reacționarea cu CBA.

30

În anumite variante de realizare, imunoconjugății conform primei variante de realizare pot fi preparați printr-un al treilea procedeu care cuprinde următoarele etape:

- (a) reacționarea CBA cu un compus linker care are o grupare reactivă la amină și o grupare reactivă la tiol pentru a forma un CBA modificat care are o grupare reactivă la tiol legată la acesta; și
- (b) reacționarea CBA modificat cu agentul citotoxic.

35

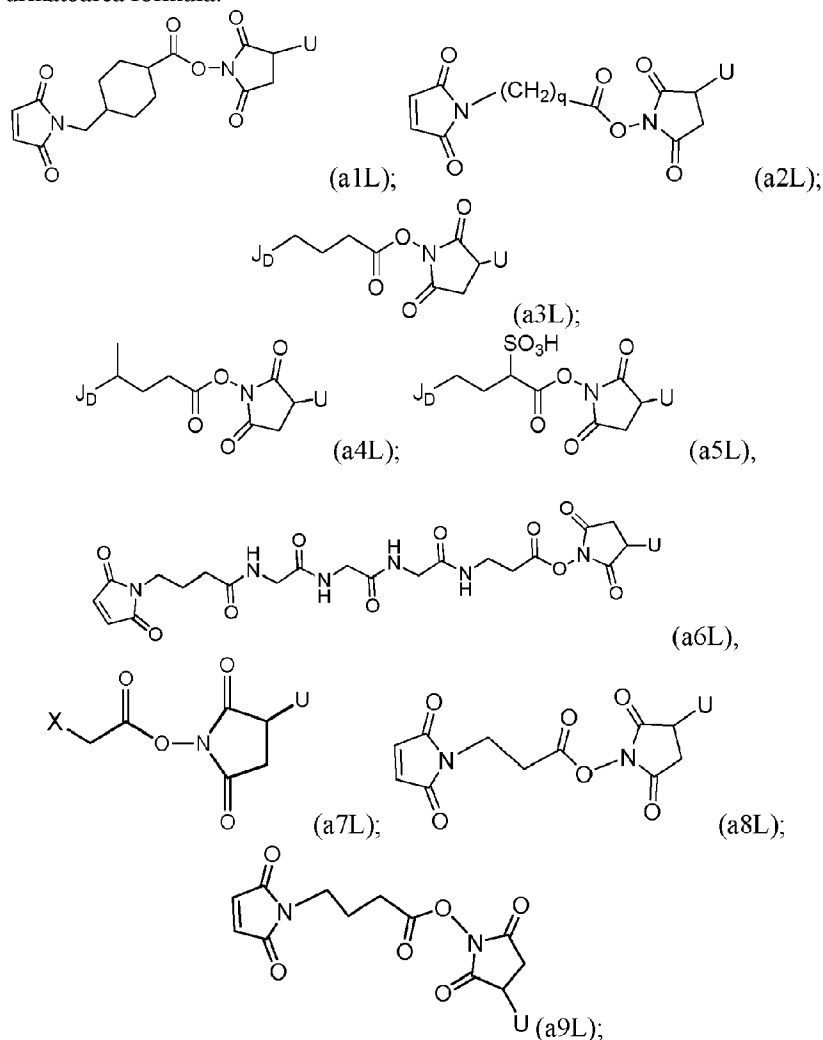
Într-o variantă de realizare, pentru cel de-al treilea procedeu descris anterior, reacția din etapa (b) este efectuată în prezența unui reactiv la imină (*de exemplu* NaHSO_3).

În anumite variante de realizare, imunoconjugății conform primei variante de realizare pot fi

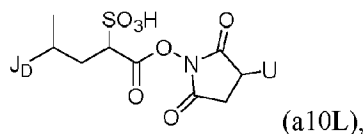
preparați printr-un al patrulea procedeu care cuprinde etapele de reacționare a CBA, un compus citotoxic și un compus linker care are o grupare reactivă la amină și o grupare reactivă la tiol.

Într-o variantă de realizare, pentru cel de-al patrulea procedeu, reacția este efectuată în prezența unui agent reactiv la imină (*e.g.*, NaHSO_3).

În anumite variante de realizare, pentru cel de-al doilea, al treilea sau al patrulea procedeu descris anterior, compusul linker care are o grupare reactivă la amină și o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:

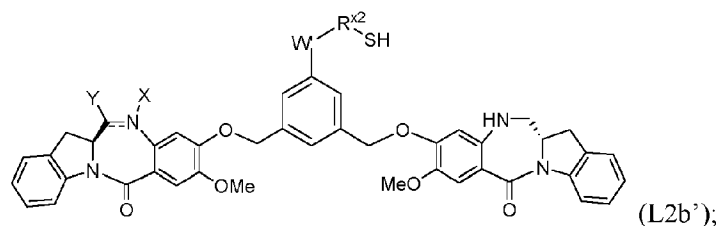
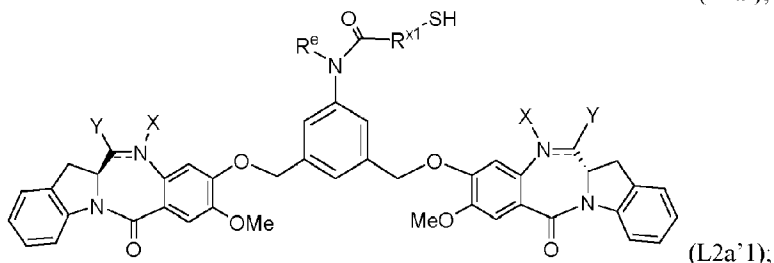
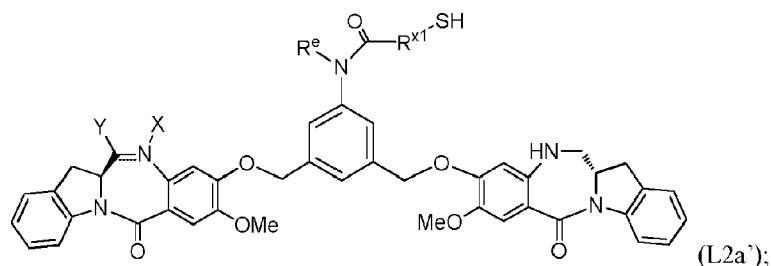


și



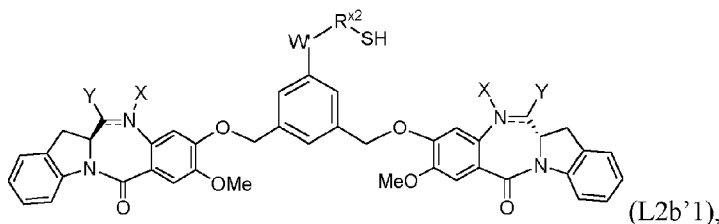
în care X este halogen; J_D -SH, -SSR^d sau -SC(=O)R^s; R^d este fenil, nitrofenil, dinitrofenil, carboxinitrofenil, piridil sau nitropiridil; R^s este un alchil; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior pentru formula (a1) - (a10); și agentul citotoxic este reprezentat de următoarea formulă:

85



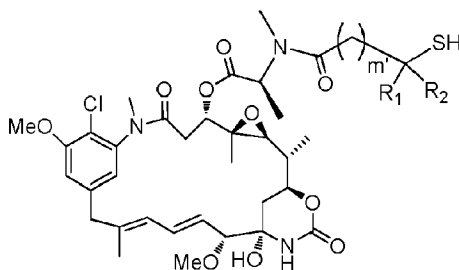
5

sau



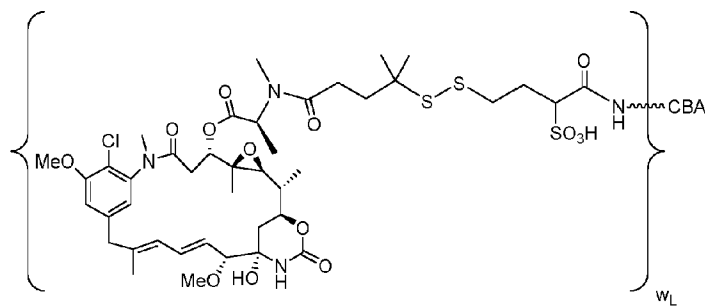
10 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior pentru formulele (L1a'), (L1a'1), (L1b'), (L1b'1), (L2a'), (L2a'1), (L2b') și (L2b'1).

15 În anumite variante de realizare, pentru cel de-al doilea, al treilea sau al patrulea procedeu descris anterior, compusul linker care are o grupare reactivă la amină și o grupare reactivă la tiol este reprezentat de oricare dintre formulele (a1L) - (a10L) și agentul citotoxic este reprezentat de următoarea formulă:



20 în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre cea de-a 13^a până la a 17^a variantă de realizare specifică a primei variante de realizare descrise anterior și oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

25 Într-o variantă de realizare specifică, pentru cel de-al doilea, al treilea sau al patrulea procedeu descris anterior, linkerul este sulfo-SPDB, agentul citotoxic este DM4 și imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:

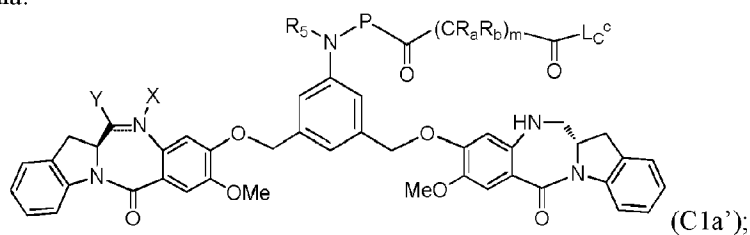


sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 până la 10.

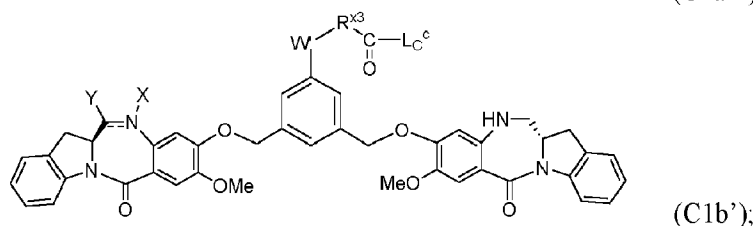
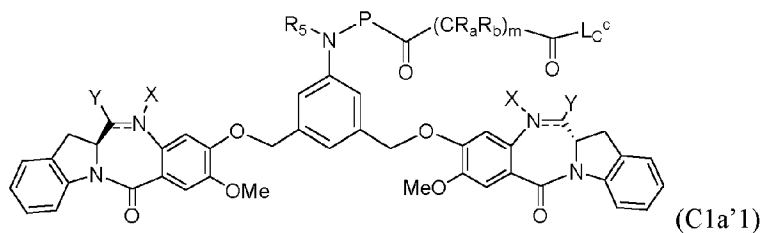
- 5 Imunoconjugății care cuprind un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia legat covalent la un agent citotoxic prin gruparea tiol (-SH) a unui sau mai multor resturi de cisteină situate pe anticorpul anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia astfel cum este descris în cea de-a doua variantă de realizare anterioară (de exemplu imunoconjugății conform oricăreia dintre 1^a până la cea de-a 23^a variantă de realizare specifică sau oricare variante de realizare specifice descrise în prezenta invenție) pot fi preparați prin reacționarea CBA care are una sau mai multe
- 10 cisteine libere cu un agent citotoxic care are o grupare reactivă la tiol descrisă în prezenta invenție.

- Într-o variantă de realizare preferată, imunoconjugății conform prezentei invenții posedă o variantă de regiune Fc IgG care cuprinde un rest de cisteină suplimentar, astfel încât să permită
- 15 conjugarea unui agent farmacologic cu o astfel de moleculă (*de exemplu* SEQ ID NO: 79 și 80).

Într-o variantă de realizare, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:

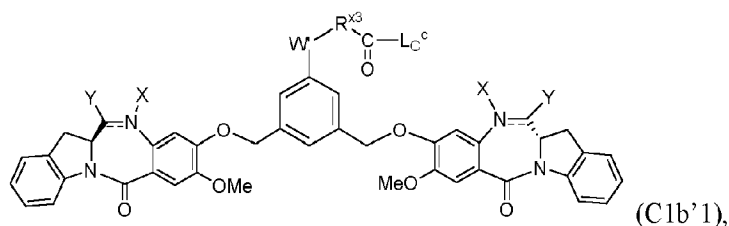


20

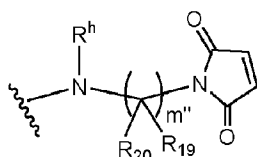


sau

25

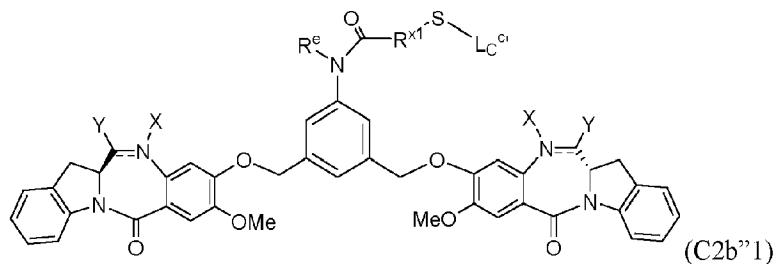
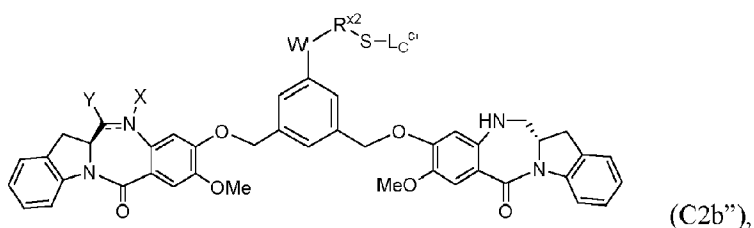
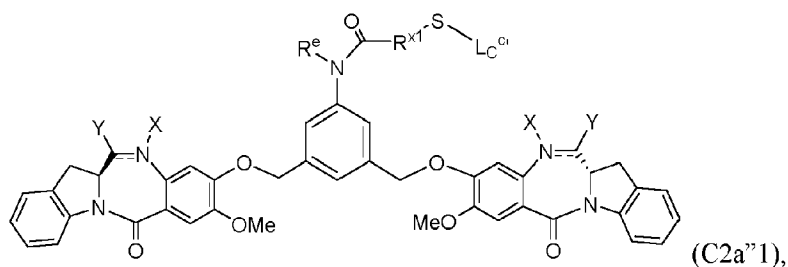
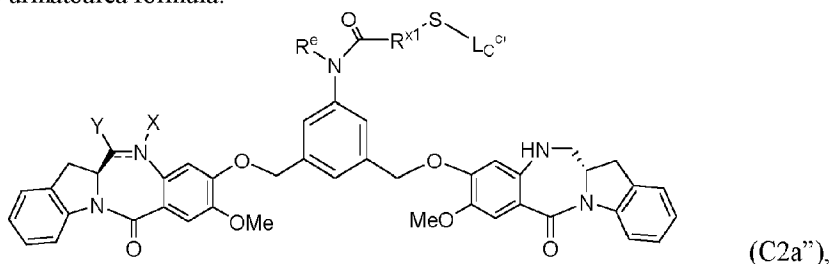


sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care $-L_{C^c}$ este reprezentat de următoarea formulă:

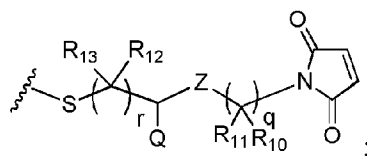


- 5 în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre prima până la cea de-a 9^a și a 23^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

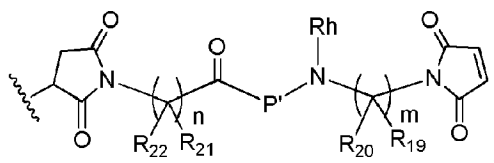
- 10 Într-o altă variantă de realizare, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:



- 20 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care L_{C^c} este reprezentat de următoarea formulă:

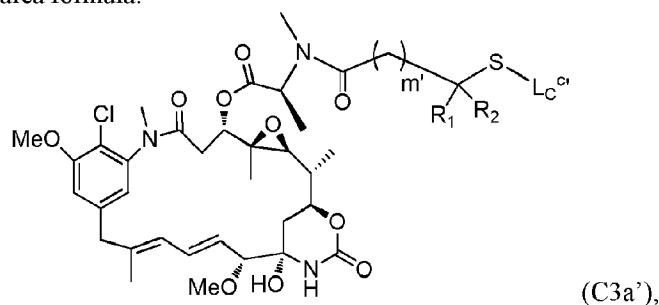


sau



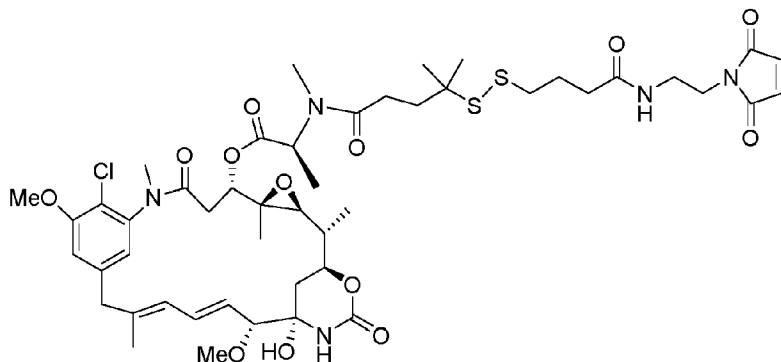
5 în care variabilele sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre cea de-a 10^a până la a 16^a și a 23^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

Într-o altă variantă de realizare, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:



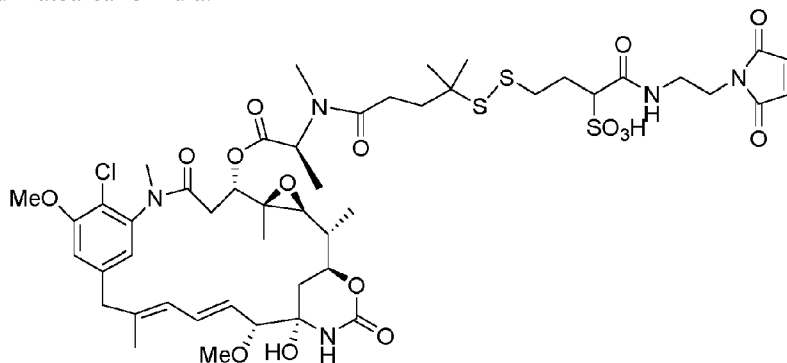
10 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care Lc^{Cl} este descris anterior și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise anterior în oricare dintre cea de-a 17^a până la a 23^a variantă de realizare specifică a celei de-a doua variante de realizare sau oricare variante de realizare mai specifice descrise în prezenta invenție.

15 Într-o variantă de realizare specifică, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

20 Într-o altă variantă de realizare specifică, agentul citotoxic care are o grupare reactivă la tiol este reprezentat de următoarea formulă:

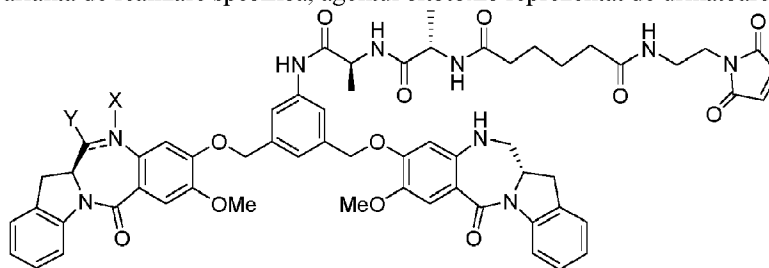


sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia.

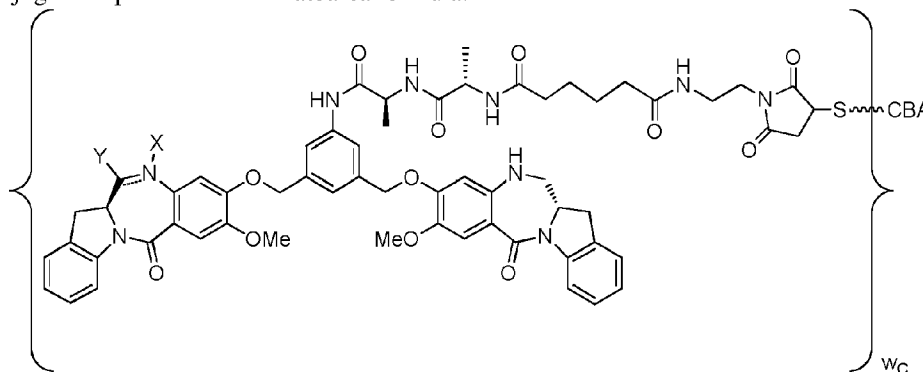
25 În anumite variante de realizare, în reacția CBA cu agentul citotoxic se pot utiliza solvenți

organici pentru a solubiliza agentul citotoxic. Solvenți organici exemplificativi includ, dar fără a se limita la, dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol *etc.* Într-o variantă de realizare, reacția CBA cu agentul citotoxic este efectuată în prezența DMA și propilenglicolului.

5 Într-o variantă de realizare specifică, agentul citotoxic reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, este reacționat cu un CBA (*de exemplu* un anticorp anti-ADAM9 sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia) pentru a forma imunoconjugatul reprezentat de următoarea formulă:



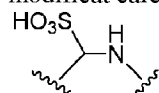
10 sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H și Y să fie -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia; și W_C să fie 1 sau 2. Într-o

15 variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent

și Y este -H. Într-o altă variantă de realizare mai specifică, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia. Și mai precis, sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu.

20 În anumite variante de realizare, atunci când Y este —SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, imunoconjugatul pot fi preparați prin (a) reacționarea fracțiunii iminice din agentul citotoxic care conține imină care are o grupare reactivă la tiol descrisă anterior (*adică* formula (C1a'), (C1a''), (C1b'), (C1b''), (C2a'), (C2a''), (C2b') sau (C2b''), în care linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H) cu un dioxid de sulf, sare de bisulfid sau o sare de metabisulfid într-o soluție apoasă la un pH de 1,9 până la 5,0 pentru a forma un agent citotoxic



25 modificat care cuprinde o fracțiune iminică modificată reprezentată prin următoarea formulă:
sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia; și (b) reacționarea agentului citotoxic modificat cu anticorpul anti-ADAM9 sau cu un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în

30 prezenta invenție pentru a forma imunoconjugatul.

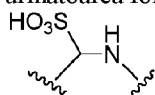
Într-un prim aspect, pentru procedeul descris anterior, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 1,9 până la 5,0. Mai precis, pH-ul este 2,5 până la 4,9, 1,9 până la 4,8, 2,0 până la 4,8, 2,5 până la 4,5, 2,9 până la 4,5, 2,9 până la 4,0, 2,9 până la 3,7, 3,1 până la 3,5 sau 3,2 până la 3,4. Într-o altă variantă de realizare specifică, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 sau 5,0. Într-o altă variantă de realizare specifică, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 3,3.

35

Astfel cum este utilizată în prezenta invenție, o valoare specifică a pH-ului semnifică valoarea specifică $\pm 0,05$.

În unele variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată în prezența unei soluții tampon. Orice soluție tampon adecvată cunoscută în stadiul tehnicii poate fi utilizată în procedeele conform prezentei invenții. Soluții tampon adecvate includ, de exemplu, un tampon citrat, un tampon acetat, un tampon succinat, un tampon fosfat, un tampon care conține glicină (de exemplu tampon glicină-HCl), un tampon ftalat (de exemplu o soluție tampon care cuprinde sodiu sau ftalat acid de potasiu) și o combinație a acestora. În unele variante de realizare, soluția tampon este un tampon succinat. În unele variante de realizare, soluția tampon este un tampon fosfat. În unele variante de realizare, tamponul este un tampon citrat-fosfat. În unele variante de realizare, tamponul este un tampon citrat-fosfat care cuprinde acid citric și Na_2HPO_4 . În alte variante de realizare, tamponul este un tampon citrat-fosfat care cuprinde acid citric și K_2HPO_4 . În unele variante de realizare, concentrația de soluție tampon descrisă anterior poate fi cuprinsă în intervalul 10 până la 250 mM, 10 până la 200 mM, 10 până la 150 mM, 10 până la 100 mM, 25 până la 100 mM, 25 până la 75 mM, 10 până la 50 mM sau 20 până la 50 mM.

Într-un al 2^{lea} aspect, reacția din etapa (a) este efectuată în absența unei soluții tampon (de exemplu tamponaile descrise în primul aspect). În unele variante de realizare, prezentul procedeu cuprinde următoarele etape: (a) reacționarea fracțiunii iminice din agentul citotoxic care conține imină care are o grupare reactivă la tiol descrisă anterior (*adică* formula (C1a'), (C1a''), (C1b'), (C1b''), (C2a'), (C2a''), (C2b'), (C2b''), în care linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H) cu un dioxid de sulf, sare de bisulfat sau o sare de metabisulfat într-o soluție apoasă pentru a forma un agent citotoxic modificat care cuprinde o fracțiune iminică modificată reprezentată prin următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care soluția apoasă nu cuprinde un tampon; și (b) reacționarea agentului citotoxic modificat cu anticorpul anti-ADAM9 sau cu un fragment de legare a ADAM9 al acestuia descris în prezenta invenție pentru a forma imunoconjugatul. În unele variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată într-un amestec de solvent organic și apă. Mai precis, reacția din etapa (a) este efectuată într-un amestec de dimetilacetamidă (DMA) și apă. În unele variante de realizare, amestecul de DMA și apă cuprinde mai puțin de 60% DMA în volum. Și mai precis, raportul de volum dintre DMA și apă este 1:1.

Într-un al 3^{lea} aspect, pentru procedeele descrise anterior sau în primul sau cel de-al 2^{lea} aspect, se utilizează 0,5 până la 5,0 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,25 sau 2,5 echivalenți de sare de metabisulfat pentru fiecare 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină în reacția din etapa (a). În unele variante de realizare, se utilizează 0,5 până la 4,5, 0,5 până la 4,0, 0,5 până la 3,5, 0,5 până la 4,0, 0,5 până la 3,5, 0,5 până la 3,0, 0,5 până la 2,5, 0,8 până la 2,0, 0,9 până la 1,8, 1,0 până la 1,7, 1,1 până la 1,6, 1,2 până la 1,5 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,25 până la 2,25, 0,25 până la 2,0, 0,25 până la 1,75, 0,25 până la 2,0, 0,25 până la 1,75, 0,25 până la 1,5, 0,25 până la 1,25, 0,4 până la 1,0, 0,45 până la 0,9, 0,5 până la 0,85, 0,55 până la 0,8 sau 0,6 până la 0,75 echivalenți de sare de metabisulfat pentru fiecare echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, se utilizează 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 4,0, 4,5 sau 5,0 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 2,0, 2,25 sau 2,5 echivalenți de sare de metabisulfat pentru fiecare echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, se utilizează 1,4 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,7 echivalenți de sare de metabisulfat pentru fiecare echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, se utilizează 1,2 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,6 echivalenți de sare de metabisulfat pentru fiecare echivalent de agent citotoxic care conține imină.

Astfel cum este utilizat în prezenta invenție, un echivalent specific semnifică valoarea specifică $\pm 0,05$.

Într-un al 4^{lea} aspect, pentru procedeele descrise anterior, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 2,9 până la 3,7 și 1,0 până la 1,8 echivalenți de sare de bisulfat sau 0,5 până la 0,9 echivalenți de sare de metabisulfat reacționează cu 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină. În unele variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 3,1 până la 3,5 și 1,1 până la 1,6 echivalenți

de sare de bisulfid sau 0,55 până la 0,8 echivalenți de sare de metabisulfid reacționează cu 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 3,2 până la 3,4 și 1,3 până la 1,5 echivalenți de sare de bisulfid sau 0,65 până la 0,75 echivalenți de sare de metabisulfid reacționează cu 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 3,3 și 1,4 echivalenți de sare de bisulfid sau 0,7 echivalenți de sare de metabisulfid reacționează cu 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină. În alte variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată la un pH de 3,3 și 1,4 echivalenți de bisulfid de sodiu reacționează cu 1 echivalent de agent citotoxic care conține imină.

Într-un al 5^{lea} aspect, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea} sau al 4^{lea} aspect, reacția din etapa (a) este efectuată într-un amestec de solvent organic și apă. Poate fi utilizat orice solvent organic adecvat. Exemple de solvenți organici includ alcooli (de exemplu metanol, etanol, propanol etc.), dimetilformamidă (DMF), dimetilsulfoxid (DMSO), acetonitril, acetona, clorură de metilen etc. În unele variante de realizare, solventul organic este miscibil cu apa. În alte variante de realizare, solventul organic nu este miscibil cu apa, adică reacția din etapa (a) este efectuată într-o soluție bifazică. În unele variante de realizare, solventul organic este dimetilacetamidă (DMA). Solventul organic (de exemplu DMA) poate fi prezent în cantitate de 1%-99%, 1-95%, 10-80%, 20-70%, 30-70%, 1-60%, 5-60%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 45-55%, 10-50% sau 20-40%, în volum din volumul total de apă și solventul organic. În unele variante de realizare, reacția din etapa (a) este efectuată într-un amestec de DMA și apă, în care raportul de volum dintre DMA și apă este 1:1.

Într-un al 6^{lea} aspect, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea} sau al 5^{lea} aspect, reacția din etapa (a) poate fi efectuată la orice temperatură adecvată. În unele variante de realizare, reacția este efectuată la o temperatură de la 0 °C până la 50 °C, de la 10 °C până la 50 °C, de la 10 °C până la 40 °C sau de la 10 °C până la 30 °C. În alte variante de realizare, reacția este efectuată la o temperatură de la 15 °C până la 30 °C, de la 20 °C până la 30 °C, de la 15 °C până la 25 °C, de la 16 °C până la 24 °C, de la 17 °C până la 23 °C, de la 18 °C până la 22 °C sau de la 19 °C până la 21 °C. În alte variante de realizare, reacția poate fi efectuată la 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C sau 25 °C. În unele variante de realizare, reacția poate fi efectuată de la 0 °C până la 15 °C, de la 0 °C până la 10 °C, de la 1 °C până la 10 °C, de la 5 °C până la 15 °C sau de la 5 °C până la 10 °C.

Într-un al 7^{lea} aspect, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea}, al 5^{lea} sau al 6^{lea} aspect, reacția din etapa (a) este efectuată timp de 1 minut până la 48 ore, 5 minute până la 36 ore, 10 minute până la 24 ore, 30 minute până la 24 ore, 30 minute până la 20 ore, 1 oră până la 20 ore, 1 oră până la 15 ore, 1 oră până la 10 ore, 2 ore până la 10 ore, 3 ore până la 9 ore, 3 ore până la 8 ore, 4 ore până la 6 ore sau 1 oră până la 4 ore. În unele variante de realizare, reacția este lăsată să continue timp de 4 până la 6 ore. În alte variante de realizare, reacția este lăsată să continue timp de 10 minute, 15 minute, 20 minute, 30 minute, 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore, 6 ore, 7 ore, 8 ore, 9 ore, 10 ore, 11 ore, 12 ore, 13 ore, 14 ore, 15 ore etc. În alte variante de realizare, reacția este lăsată să continue timp de 4 ore. În alte variante de realizare, reacția este lăsată să continue timp de 2 ore.

Într-un al 8^{lea} aspect, pentru procedeele conform prezentei invenții descrise în prezenta invenție sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea}, al 5^{lea}, al 6^{lea} sau al 7^{lea} aspect, reacția din etapa (b) este efectuată la un pH de 4 până la 9. În unele variante de realizare, reacția din etapa (b) este efectuată la un pH de 4,5 până la 8,5, 5 până la 8,5, 5 până la 8, 5 până la 7,5, 5 până la 7, 5 până la 6,5 sau 5,5 până la 6,5. În alte variante de realizare, reacția din etapa (b) este efectuată la pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 sau 8,0.

În unele variante de realizare, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea}, al 5^{lea}, al 6^{lea}, al 7^{lea} sau al 8^{lea} aspect, reacția din etapa (b) este efectuată într-o soluție apoasă care cuprinde un amestec de apă și un solvent organic. Poate fi utilizat orice solvent organic adecvat descris anterior. Mai precis, solventul organic este DMA. În unele variante de realizare, soluția apoasă cuprinde mai puțin decât 50%, mai puțin decât 40%, mai puțin decât 30%, mai puțin decât 25%, mai puțin decât 20%, mai puțin decât 15%, mai puțin decât 10%, mai puțin decât 5%, mai puțin decât 3%, mai puțin decât 2%, sau mai puțin decât 1% solvent organic (de exemplu DMA) din volum.

În unele variante de realizare, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea}, al 5^{lea}, al 6^{lea}, al 7^{lea} sau al 8^{lea} aspect, sarea de bisulfid este bisulfid de sodiu sau potasiu, iar sarea de metabisulfid este metabisulfid de sodiu sau potasiu. Într-o variantă de realizare specifică, sarea de bisulfid este bisulfid de sodiu, iar sarea de metabisulfid este metabisulfid de sodiu.

În unele variante de realizare, pentru procedeele descrise anterior sau în primul, cel de-al 2^{lea}, al 3^{lea}, al 4^{lea}, al 5^{lea}, al 6^{lea}, al 7^{lea} sau al 8^{lea} aspect, agentul citotoxic modificat nu este purificat înainte de a reacționa cu agentul de legare celular în etapa (b). În mod alternativ, agentul citotoxic modificat este purificat înainte de a reacționa cu agentul de legare celular în etapa (b). Orice procedeu adecvat descrisă în prezenta invenție poate fi utilizat pentru a purifica agentul citotoxic modificat.

În unele variante de realizare, pentru procedeele descrise anterior, reacția din etapa (a) nu are ca rezultat o sulfonare substanțială a grupării maleimidice. În unele variante de realizare, mai puțin de 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% sau 1% din gruparea maleimidică este sulfonată. Procentul de sulfonare a maleimidei este egal cu cantitatea totală de agent citotoxic maleimid-sulfonat (agentul citotoxic care are sulfonare doar pe maleimidă) și agent citotoxic disulfonat (agentul citotoxic care are sulfonare atât pe fracțiunile maleimidice, cât și pe cele iminice) împărțită la cantitatea inițială de agent citotoxic care conține imină înainte de reacționarea acestuia cu sarea de bisulfat sau cu sarea de metabisulfat.

În unele variante de realizare, imunoconjugatii preparați prin orice procedee descrise anterior sunt supuși unei etape de purificare. În acest sens, imunoconjugatul poate fi purificat din celelalte componente ale amestecului utilizând filtrare în flux tangențial (TFF), cromatografie neadsorbivă, cromatografia adsorbivă, filtrare adsorbivă, precipitare selectivă sau orice alt proces de purificare adecvat, precum și combinații ale acestora.

În unele variante de realizare, imunoconjugatul este purificat utilizând o singură etapă de purificare (de exemplu TFF). De preferat, conjugatul este purificat și schimbat în formularea adecvată utilizând o singură etapă de purificare (de exemplu TFF). În alte variante de realizare a invenției, imunoconjugatul este purificat utilizând două etape de purificare secvențiale. De exemplu, imunoconjugatul poate fi mai întâi purificat prin precipitare selectivă, filtrare adsorbivă, cromatografie adsorbivă sau cromatografie neadsorbivă, urmată de purificare prin TFF. Un specialist în domeniu va aprecia faptul că purificarea imunoconjugatului permite izolarea unui conjugat stabil care cuprinde agentul de legare celulară cuplat din punct de vedere chimic cu agentul citotoxic.

Orice sisteme TFF adecvate pot fi utilizate pentru purificare, inclusiv un sistem de tip Pellicon (Millipore, Billerica, Mass.), un sistem Sartoclon Cassette (Sartorius AG, Edgewood, NY) și un sistem de tip Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

Orice rășină de cromatografie adsorbivă adecvată poate fi utilizată pentru purificare. Rășinile de cromatografie adsorbivă preferate includ cromatografia cu hidroxiapatită, cromatografia de inducere a sarcinii hidrofobe (HCIC), cromatografia de interacțiune hidrofobă (HIC), cromatografia cu schimb de ioni, cromatografia cu schimb de ioni în mod mixt, cromatografia de afinitate cu metal imobilizat (IMAC), cromatografia cu ligand colorant, cromatografia de afinitate, cromatografia cu fază inversă și combinații ale acestora. Exemple de rășini de hidroxiapatită adecvate includ hidroxiapatită ceramică (CHT Tip I și Tip II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), hidroxiapatită HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY) și fluoroapatită ceramică (CFT Tip I și Tip II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Un exemplu de rășină HCIC adecvată este rășina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Exemple de rășini HIC adecvate includ rășini butil-sefaroză, hexil-sefaroză, fenil-sefaroză și octil-sefaroză (toate de la GE Healthcare, Piscataway, NJ), precum și rășini Macro-prep Metil și Macro-Prep t-Butil (Biorad Laboratories, Hercules, California). Exemple de rășini cu schimb de ioni adecvate includ rășini SP-Sepharose, CM-Sepharose și Q-Sepharose (toate de la GE Healthcare, Piscataway, NJ) și rășină Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Exemple de schimbătoare de ioni în mod mixt adecvate includ rășina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Exemple de rășini IMAC adecvate includ rășina Chelating Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) și rășina IMAC Profinity (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Exemple de rășini ligand colorante adecvate includ rășina Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) și rășina Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Exemple de rășini de afinitate adecvate includ rășină Protein A Sepharose (de exemplu MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), unde agentul de legare celulară este un anticorp și rășini de afinitate pentru lectină, de exemplu rășină Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), unde agentul de legare celulară poartă situsuri de legare a lectinei adecvate. În mod alternativ, poate fi utilizat un anticorp specific pentru agentul de legare celulară. Un astfel de anticorp poate fi imobilizat la, de exemplu, rășina Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Exemple de rășini cu fază inversă adecvate includ rășini C4, C8 și C18 (Grace Vydac, Hesperia, California).

Orice rășină de cromatografie non-adsorbivă adecvată poate fi utilizată pentru purificare. Exemple de rășini de cromatografie non-adsorbivă adecvate includ rășini SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (de exemplu S-200 și S-300), rășini SUPERDEX™ (de exemplu SUPERDEX™ 75 și SUPERDEX™ 200), rășini BIO-GEL® (de exemplu P-6, P-10, P-30, P-60 și P-100) și altele cunoscute specialiștilor în domeniu.

VI. Utilizări ale imunoconjugatelor conform prezentei invenții

Prezenta invenție cuprinde compoziții farmaceutice care cuprind imunoconjugatii conform prezentei invenții.

Astfel cum este furnizat în prezenta invenție, imunoconjugatii conform prezentei invenții, care cuprind domeniile VL și/sau VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate furnizate în prezenta invenție, au capacitatea de a se lega la ADAM9 prezentă pe suprafața unei celule și de a media distrugerea celulelor. În special, imunoconjugatii conform prezentei invenții care cuprind un agent farmacologic, sunt internalizați și mediază distrugerea celulelor prin activitatea agentului farmacologic. O astfel de activitate de distrugere a celulelor poate fi sporită de imunoconjugatul care induce citotoxicitatea mediată de celule dependentă de anticorpi (ADCC) și/sau citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

Prin urmare, imunoconjugatii conform prezentei invenții, care cuprind domeniile VL și/sau VH anti-ADAM9 umanizate/optimizate furnizate în prezenta invenție, au capacitatea de a trata orice boală sau afecțiune asociată cu sau caracterizată prin expresia ADAM9. Astfel cum s-a discutat anterior, ADAM9 este un antigen oncoembrionar exprimat în numeroase afecțiuni maligne sanguine și solide care este asociat cu tumori de grad înalt care prezintă o morfologie mai puțin diferențiată și este corelat cu rezultate clinice slabe. Prin urmare, fără limitare, imunoconjugatii conform prezentei invenții pot fi utilizați în tratamentul cancerului, în special al unui cancer caracterizat prin expresia ADAM9.

În alte anumite variante de realizare, imunoconjugatii conform prezentei invenții pot fi utili în tratamentul cancerului pulmonar (de exemplu cancer pulmonar cu celule non-mici), cancerului colorectal, cancerului vezicii urinare, cancerului gastric, cancerului pancreatic, carcinomului cu celule renale, cancerului de prostată, cancerului esofagian, cancerului mamă, cancerului de cap și gât, cancerului uterin, cancerului ovarian, cancerului hepatic, cancerului de col uterin, cancerului tiroidian, cancerului testicular, cancerului mieloid, melanomului și cancerului limfoid.

În alte variante de realizare, imunoconjugatii conform prezentei invenții pot fi utili în tratamentul cancerului pulmonar cu celule non-mici (celule scuamoase, adenocarcinom sau carcinom nediferențiat cu celule mari) și al cancerului colorectal (adenocarcinom, tumori carcinoide gastrointestinale, tumori stromale gastrointestinale, limfom colorectal primar, leiomiiosarcom sau carcinom cu celule scuamoase).

Pe lângă utilitatea acestora în terapie, imunoconjugatii conform prezentei invenții pot fi marcați în mod detectabil și utilizați în diagnosticul cancerului sau în imagistica tumorilor și celulelor tumorale.

VII. Compoziții farmaceutice

Compozițiile conform invenției includ compoziții de medicamente în vrac utile în fabricarea compozițiilor farmaceutice (de exemplu compoziții impure sau nesterile) și a compozițiilor farmaceutice (adică compoziții care sunt adecvate pentru administrare la un subiect sau pacient) care pot fi utilizate în prepararea formelor de dozare unitară. Astfel de compoziții cuprind o cantitate eficientă din punct de vedere profilactic sau terapeutic din imunoconjugatii conform prezentei invenții sau o combinație de astfel de agenți și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. De preferat, compozițiile conform invenției cuprind o cantitate eficientă din punct de vedere profilactic sau terapeutic din imunoconjugatii conform prezentei invenții și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Invenția cuprinde, de asemenea, astfel de compoziții farmaceutice care includ în plus un al doilea anticorp terapeutic (de exemplu anticorp monoclonal specific tumoral) care este specific pentru un anumit antigen canceros și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

Într-o variantă de realizare specifică, termenul "acceptabil din punct de vedere farmaceutic" semnifică aprobat de o agenție de reglementare a guvernului federal sau de stat sau listat în Farmacopeea SUA sau altă farmacopee general recunoscută pentru utilizare la animale și mai în special la oameni. Termenul "purtător" se referă la un diluant, adjuvant (de exemplu adjuvant Freund (complet și incomplet), excipient sau vehicul cu care este administrat medicamentul. În general, ingredientele compozițiilor conform invenției sunt furnizate fie separat, fie amestecate împreună în formă de dozare

unitară, de exemplu sub formă de pulbere liofilizată uscată sau concentrat fără apă într-un recipient închis ermetic, cum ar fi o fiolă sau un pliculeț care indică cantitatea de agent activ. Acolo unde compoziția urmează să fie administrată prin perfuzie, aceasta poate fi eliberată cu o sticlă de perfuzie care conține apă sterilă de calitate farmaceutică sau ser fiziologic. Acolo unde compoziția este administrată prin injecție, poate fi furnizată o fiolă cu apă sterilă pentru injecție sau o soluție salină, astfel încât ingredientele să poată fi amestecate înainte de administrare.

Invenția furnizează, de asemenea, un pachet sau un kit farmaceutic care cuprinde unul sau mai multe recipiente umplute cu imunoconjugăți conform prezentei invenții, singure sau cu un astfel de purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. În plus, unul sau mai mulți alți agenți profilactici sau terapeutici utili pentru tratamentul unei boli pot fi de asemenea incluși în pachetul sau kitul farmaceutic. Invenția furnizează, de asemenea, un pachet sau un kit farmaceutic care cuprinde unul sau mai multe recipiente umplute cu unul sau mai multe dintre ingredientele compozițiilor farmaceutice conform invenției. În mod opțional asociat cu un astfel de recipient poate fi o notificare în forma prescrisă de o agenție guvernamentală care reglementează fabricarea, utilizarea sau vânzarea produselor farmaceutice sau a produselor biologice, notificare care reflectă aprobarea de către agenția de fabricare, utilizare sau vânzare pentru administrare la oameni.

Prezenta invenție furnizează kituri care pot fi utilizate în procedeele menționate anterior. Un kit poate cuprinde oricare dintre imunoconjugății conform prezentei invenții. Kitul poate cuprinde în plus unul sau mai mulți alți agenți profilactici și/sau terapeutici utili pentru tratamentul cancerului, în unul sau mai multe recipiente.

VIII. Procedee de administrare

Compozițiile conform prezentei invenții pot fi furnizate pentru utilizare în tratamentul, profilaxia și ameliorarea unuia sau mai multor simptome asociate cu o boală, tulburare prin administrarea la un subiect a unei cantități eficiente de imunoconjugat conform invenției. Într-un aspect preferat, astfel de compoziții sunt în mod substanțial purificate (*adică* în mod substanțial lipsite de substanțe care le limitează efectul sau produc efecte secundare nedorite). Într-o variantă de realizare specifică, subiectul este un animal, de preferat un mamifer, cum ar fi non-primat (*de exemplu* bovin, ecvin, felin, canin, rozător *etc.*) sau primat (*de exemplu* maimuță, cum ar fi o maimuță *cynomolgus*, un omul *etc.*). Într-o variantă de realizare preferată, subiectul este un om.

Diverse sisteme de administrare sunt cunoscute și pot fi utilizate pentru a administra compozițiile, *de exemplu* încapsulare în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime anticorpul sau proteina de fuziune, endocitoză mediată de receptor (a se vedea, *de exemplu*, Wu și colab. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcția unui acid nucleic ca parte a unui vector retroviral sau alt vector *etc.*

Procedeele de administrare a imunoconjugăților pentru utilizare conform invenției includ administrarea parenterală (*de exemplu* intradermică, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă și subcutanată), epidurală și mucoasă (*de exemplu* căile intranasale și orale). Într-o variantă de realizare specifică, imunoconjugății pentru utilizare conform prezentei invenții sunt administrați intramuscular, intravenos sau subcutanat. Compozițiile pot fi administrate pe orice cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injecție în bolus, și pot fi administrate împreună cu alți agenți activi din punct de vedere biologic. Administrarea poate fi sistemică sau locală.

Invenția furnizează, de asemenea, faptul că preparatele de imunoconjugăți conform prezentei invenții sunt ambalate într-un recipient închis ermetic, cum ar fi o fiolă sau un pliculeț care indică cantitatea de moleculă. Într-o variantă de realizare, astfel de molecule sunt furnizate sub formă de pulbere liofilizată uscată sterilizată sau concentrat fără apă într-un recipient închis ermetic și pot fi reconstituite, *de exemplu* cu apă sau soluție salină la concentrația adecvată pentru administrare la un subiect. De preferat, imunoconjugății conform prezentei invenții sunt furnizați sub formă de pulbere liofilizată sterilă uscată într-un recipient închis ermetic.

Preparatele liofilizate de imunoconjugăți conform prezentei invenții trebuie păstrate la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C în recipientul original al acestora, iar moleculele trebuie administrate în decurs de 12 ore, de preferat 6 ore, 5 ore, 3 ore sau 1 oră după reconstituire. Într-o variantă de realizare alternativă, astfel de molecule sunt furnizate sub formă lichidă într-un recipient închis ermetic care indică cantitatea și concentrația de moleculă, proteină de fuziune sau moleculă conjugată. De

preferat, astfel de imunoconjugăți, atunci când sunt furnizați sub formă lichidă, sunt furnizați într-un recipient închis ermetic.

Astfel cum este utilizată în prezenta invenție, o "**cantitate eficientă**" dintr-o compoziție farmaceutică este o cantitate suficientă pentru a obține rezultate benefice sau dorite, inclusiv rezultate clinice, cum ar fi scăderea simptomelor rezultate din boală, atenuarea unui simptom de infecție (de exemplu încărcătură virală, febră, durere, sepsis etc.) sau a unui simptom de cancer (de exemplu proliferarea celulelor canceroase, prezența tumorii, metastaze tumorale etc.), crescând astfel calitatea vieții celor care suferă de boală, reducând doza de alte medicamente necesare pentru a trata boala, sporind efectul unui alt medicament, cum ar fi prin țintirea și/sau internalizarea, întârzierea progresiei bolii și/sau prelungirea supraviețuirii indivizilor.

O cantitate eficientă poate fi administrată în una sau mai multe administrări. În scopul prezentei invenții, o cantitate eficientă de medicament, compus sau compoziție farmaceutică este o cantitate suficientă: pentru a distruge și/sau reduce proliferarea celulelor canceroase și/sau pentru a elimina, reduce și/sau întârzia dezvoltarea metastazelor dintr-un situs primar al cancerului. În unele variante de realizare, o cantitate eficientă dintr-un medicament, compus sau compoziție farmaceutică poate sau poate să nu fie obținută împreună cu un alt medicament, compus sau compoziție farmaceutică. Prin urmare, o "cantitate eficientă" poate fi luată în considerare în contextul administrării unuia sau mai multor agenți chimioterapeutici și un singur agent poate fi considerat a fi administrat într-o cantitate eficientă dacă, împreună cu unul sau mai mulți alți agenți, poate fi obținut sau se obține un rezultat dorit.

Pentru imunoconjugății pentru utilizare conform invenției, doza administrată la un pacient este de preferat determinată pe baza greutateii corporale (kg) a subiectului beneficiar.

Doza și frecvența de administrare a unui imunoconjugat pentru utilizare conform prezentei invenții pot fi reduce sau modificate prin creșterea absorbției și penetrării tisulare a moleculei prin modificări cum ar fi, de exemplu, lipidarea.

Doza de imunoconjugat pentru utilizare conform invenției administrată la un pacient poate fi calculată pentru utilizare ca terapie cu un singur agent. În mod alternativ, molecula poate fi utilizată în combinație cu alte compoziții terapeutice și doza administrată la un pacient este mai mică decât atunci când moleculele menționate sunt utilizate ca terapie cu un singur agent.

Compozițiile farmaceutice pentru utilizare conform invenției pot fi administrate local în zona care necesită tratament; aceasta poate fi realizată, de exemplu, prin perfuzie locală, prin injectare sau prin intermediul unui implant, implantul menționat fiind dintr-un material poros, neporos sau gelatinos, care include membrane, cum ar fi membrane sialastice sau fibre. De preferat, atunci când se administrează un imunoconjugat pentru utilizare conform invenției, trebuie avut grijă să se utilizeze materiale pe care molecula nu le absoarbe.

Compozițiile pentru utilizare conform invenției pot fi eliberate într-o veziculă, în special un lipozom (*a se vedea* Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249: 1527-1533); Treat et al., in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

Tratamentul unui subiect cu o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic sau profilactic dintr-un imunoconjugat conform prezentei invenții poate include un singur tratament sau, de preferat, poate include o serie de tratamente. Se va aprecia, de asemenea, faptul că doza eficientă de molecule utilizate pentru tratament poate crește sau scădea pe parcursul unui anumit tratament.

EXEMPLE

După ce acum a fost descrisă în general invenția, aceasta va fi mai ușor de înțeles prin referire la următoarele Exemple. Următoarele exemple ilustrează diverse procedee pentru compoziții în procedeele de diagnostic sau tratament conform invenției. Exemplele sunt destinate să ilustreze, dar în niciun caz să limiteze, domeniul de aplicare al invenției.

Exemplul 1.

Specificitatea celulelor tumorale ale anticorpului anti-ADAM9 MAB-A

S-a identificat un anticorp murinic anti-ADAM9 (denumit în prezenta invenție MAB-A) care: (1) blochează activitatea de procesare a proteinei țintă a ADAM9; (2) este internalizat; și (3) are activitate

anti-tumorală (a se vedea, *de exemplu*, Brevetul SUA nr. 8361475). S-a investigat specificitatea celulelor tumorale ale MAB-A prin IHC. S-a pus în contact țesut tumoral cu MAB-A (0,4 μg/mL) sau un martor izotip (0,4 μg/mL) și s-a vizualizat gradul de colorare. S-a descoperit faptul că MAB-A marchează puternic o varietate de tipuri de celule canceroase pulmonare de carcinom cu celule mari, carcinom cu celule scuamoase și adenocarcinom cu celule non-mici (**FIG. 1A**), celule canceroase mamare, celule canceroase de prostată, celule canceroase gastrice (**FIG. 1B**), precum și probe de cancer de colon (**FIG. 1C**). S-a pus în contact țesut normal cu MAB-A (1,25 μg/mL) și s-a vizualizat gradul de colorare. Astfel cum s-a rezumat anterior în **Tabelul 2**, MAB-A a prezentat puțină colorare sau deloc a unei game largi de țesuturi normale. Se va observa faptul că concentrația de MAB-A utilizată în aceste studii a fost de aproape 3 ori mai mare decât cea utilizată pentru colorarea celulelor tumorale. Rezultatele acestor studii IHC indică faptul că MAB-A prezintă o legare preferențială puternică la celulele tumorale față de celulele normale.

Exemplul 2.

Reactivitate încrucișată a speciilor

S-a examinat legarea MAB-A la ADAM9 umană (huADAM9) și la ADAM9 de maimuță cynomolgus (cynoADAM9). Pe scurt, celulele 293-FT și CHO-K care exprimă tranzitoriu huADAM9, cynoADAM9, un antigen neînrudit sau celulele parentale netransfectate au fost incubate cu MAB-A urmat de anticorp secundar de capră anti-murinic-PE și au fost analizate prin FACS. Astfel cum este ilustrat în **FIG. 2**, MAB-A prezintă o legare puternică la huADAM9 exprimată tranzitoriu pe ambele tipuri de celule. MAB-A prezintă o legare slabă la cynoADAM9. MAB-A nu s-a legat la celulele parentale sau la celulele care exprimă un antigen irelevant. Niveluri scăzute similare de legare la cynoADAM au fost observate în testele ELISA.

Exemplul 3

Umanizare și optimizare inițială

Umanizarea MAB-A a produs un domeniu VH umanizat, denumit în prezenta invenție "hMAB-A VH(1)" și un domeniu VL umanizat denumit în prezenta invenție "hMAB-A VL(1)". Domeniile variabile umanizate au fost apoi optimizate pentru a spori activitatea de legare și/sau pentru a îndepărta resturile de aminoacizi potențial labile astfel cum este descris în detaliu mai jos. Această primă rundă de optimizare a produs trei domenii VH umanizate suplimentare, denumite în prezenta invenție "hMAB-A VH(2)", "hMAB-A VH(3)" și "hMAB-A VH(4)" și alte trei domenii VL umanizate denumite în prezenta invenție "hMAB-A VL(2)", "hMAB-A VL(3)" și "hMAB-A VL(4)". În plus, a fost generată o versiune himerică a MAB-A ("chMAB-A") care are domeniile VH și VL murinice și regiuni constante umane. Secvențele de aminoacizi ale domeniilor VH și VL murinice și umanizate/optimizate sunt furnizate anterior, o aliniere este furnizată în **FIG. 3A** și **3B**. Secvența de consens a acestor domenii VH și VL umanizate/optimizate este furnizată anterior. Acolo unde s-au generat mai multe domenii variabile umanizate, domeniile variabile umanizate ale lanțului greu și ușor ale unui anumit anticorp anti-ADAM9 (*de exemplu* MAB-A) pot fi utilizate în orice combinație și se face referire la anumite combinații de lanțuri umanizate prin referire la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp care cuprinde hMAB-A VH(1) și hMAB-A VL(2) este denumit în mod specific "hMAB-A (1.2)".

În următoarele exemple, orice imunoconjugat care cuprinde următoarele domenii VH este ilustrat doar în scopuri ilustrative și nu face parte din invenția revendicată în prezentul document:

hMAB-A VH	(1)
hMAB-A VH	(2)
hMAB-A VH	(3)
hMAB-A VH	(4).

În următoarele exemple, orice imunoconjugat care cuprinde versiunea himerică a MAB-A (chMAB-A) este ilustrat doar în scopuri ilustrative și nu face parte din invenția revendicată în prezentul document.

hMAB-A VH(1) a fost generat având regiuni cadru derivate din liniile germinale umane VH3-21 și VH3-64 și hMAB-A VL(1) a fost generat având regiuni cadru derivate din liniile germinale umane B3 și L6. CDR murinice au fost reținute în aceste domenii variabile umanizate.

Un potențial situs de deamidare a fost identificat în CDR_{H2} (ilustrat cu o singură subliniere în **FIG. 3A**) și un potențial situs de izomerizare a acidului aspartic a fost identificat în CDR_{L1} (ilustrat cu o singură subliniere în **FIG. 3B**). Substituțiile de aminoacizi la aceste poziții au fost examinate pentru a identifica substituții pentru a elimina aceste situsuri menținând în același timp afinitatea de legare. S-a

selectat o substituție a fenilalaninei la poziția 54 (N54F) a CDR_{H2} (prezentă în hMAB-A VH(2)) și la serină la poziția 28 (D28S) a CDR_{L1} (prezentă în hMAB-A VL(2)), în care numerotarea este în conformitate cu Kabat. Substituțiile identificate pot fi utilizate separat sau în combinație. În mod surprinzător, s-a descoperit faptul că anticorpii care cuprind substituția N54F prezintă o creștere de

Au fost generate variante suplimentare, optimizate pentru a minimiza numărul de resturi de lizină prezente în CDR. Două resturi de lizină sunt prezente în CDR_{H2} (indicate cu o subliniere dublă în **FIG. 3A**) și o lizină este prezentă în CDR_{L1} (indicată cu o subliniere dublă în **FIG. 3B**). Substituțiile de aminoacizi la aceste poziții au fost examinate pentru a identifica substituțiile care au menținut afinitatea de legare. Substituțiile argininei la poziția 62 (K62R), a glutaminei la poziția 64 (K64Q) și a serinei la poziția 65 (S65G) au fost selectate pentru CDR_{H2} (prezentă în hMAB-A VH(3)), în care numerotarea este în conformitate cu Kabat. O substituție a unei arginine la poziția 24 (K24R) a fost selectată pentru CDR_{L1} (prezentă în hMAB-A VL(3)). Substituțiile identificate pot fi utilizate separat sau în combinație.

Au fost identificate alte resturi potențial labile prezente în CDR (indicate cu o subliniere punctată în **FIG. 3A-3B**), un rest de metionină în CDR_{H1} la poziția 34 (M34), un rest de metionină în CDR_{L1} la poziția 33 (M33), și resturi de histidină, acid glutamic și acid aspartic la pozițiile 92 (H93), 93 (E93) și 94 (D94), în CDR_{L3}, în care numerotarea este în conformitate cu Kabat. Substituțiile de aminoacizi la aceste poziții au fost examinate pentru a identifica substituțiile care au menținut afinitatea de legare. Substituția izoleucinei la poziția 34 (M34I) a fost selectată pentru CDR_{H1} și substituțiile de leucină, tirozină, serină și treonină au fost selectate pentru pozițiile 33 (M33L), 92 (H93Y), 93 (E93S) și 94 (D94T) ale CDR_{L3}, în care numerotarea este conform Kabat. Fiecare dintre aceste poziții ar putea fi înlocuită cu ușurință în combinație cu toate substituțiile detaliate anterior pentru a produce hMAB-A VH(4) și hMAB-A VL(4), care, atunci când sunt asociate împreună, generează un anticorp care a reținut o mică îmbunătățire a afinității în comparație cu anticorpusul murinic parental și care are un potențial mult redus de deamidare sau oxidare și fără resturi de lizină în CDR.

Afinitatea de legare relativă a anticorpilor hMAB-A (1.1), hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (3.3), hMAB-A (4.4) umanizați/optimizați și a chMAB-A himeric (care are domeniile VH/VL murinice) la huADAM a fost investigată utilizând analiza BIACORE®, în care ADAM9 umană solubilă marcată cu His ("shADAM9-His," care conține o porțiune extracelulară de ADAM9 umană fuzionată cu o proteină care conține histidină) a fost trecută pe o suprafață acoperită cu anticorp imobilizat. Pe scurt, fiecare anticorp a fost capturat pe o suprafață Fab2 de capră anti-Fc umană și apoi a fost incubat în prezența diverselor concentrații (6,25-100 nM) de proteină shADAM9-His. Cinetica de legare a fost determinată prin legarea analizei BIACORE® (normalizată 1:1 model de legare Langmuir). k_a , k_d și K_D calculate din aceste studii sunt prezentate în **Tabelul 3**. Legarea la cynoADAM9 a fost examinată prin FACS astfel cum este descris anterior și prin ELISA.

Tabelul 3.

Anticorp	pI	huADAM9		
		k_a ($\times 10^6$)	k_d ($\times 10^{-3}$)	K_D (nM)
chMAB-A	6,61	1,3	4,7	3,6
hMAB-A (1.1)	6,44	1,5	5,2	3,5
hMAB-A (2.2)	6,58	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (2.3)	6,58	1,3	1,7	1,3
hMAB-A (3.3)	6,44	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (4.4)	6,73	1,0	2,0	2,0

Rezultatele acestor studii demonstrează faptul că anticorpii umanizați/optimizați au aceeași afinitate de legare la ADAM9 umană sau mai mare decât anticorpusul murinic parental. În special, s-a observat faptul că introducerea mutației N54F în anticorpii umanizați a condus la o legare îmbunătățită la huADAM9 (adică hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3) și hMAB-A (3.3)). Această mutație a furnizat, de asemenea, o ușoară îmbunătățire a legării la cynoADAM9, astfel cum s-a determinat prin FACS și ELISA, cu toate acestea, acești anticorpi au continuat să prezinte legare slabă la cynoADAM9. Aceste studii au identificat, de asemenea, substituții suplimentare care ar putea fi introduse pentru a elimina

resturile de lizină din CDR fără a reduce afinitatea. Au fost identificate substituții suplimentare pentru a elimina alte resturi potențial labile, cu un impact minim asupra afinității.

Exemplul 4.

5 Optimizarea legării la ADAM9 de primate non-umane

10 Mutageneza aleatorie a fost utilizată pentru a introduce substituții în domeniul CDR_{H2} al lanțului greu (pozițiile Kabat 53-58) și CDR_{H3} (pozițiile Kabat 95-100 și 100a-100f) ale hMAB-A (2.2). Mutanții au fost testați pentru a identifica clonele care au o legare îmbunătățită la ADAM9 de primate non-umane (de exemplu cynoADAM9) și care au păstrat legarea cu afinitate crescută la huADAM9. 48 de clone au fost selectate din două testări independente ale mutațiilor din CDR_{H3} (pozițiile Kabat 100a-100f). **Tabelul 4** furnizează o aliniere a secvenței de aminoacizi a resturilor 100a-f ale CDR_{H3} Kabat din clonele hMAB-A (2.2) selectate pentru legarea îmbunătățită la cynoADAM9 din două testări independente. Aliniamentele suplimentare ale clonelor sunt furnizate în **Tabelul 5**. Astfel cum este indicat în astfel de Tabele, clone similare au apărut în fiecare experiment, care au căzut în modele de substituție discrete.

Tabelul 4 Substituții în cadrul subdomeniului lanțului greu CDR_{H3} al MAB-A (pozițiile Kabat 100a-100f)

Testare 1				Testare 2			
ID clonă	SEQ NO	ID	Secvența subdomeniului CDR _{H3}	Clone ID	SEQ NO	ID	Secvența subdomeniului CDR _{H3}
MAB-A	81		GSRDYF	MAB-A	81		GSRDYF
1	82		DGEGVM	1	112		DGKAVL
2	82		DGEGVM	2	113		FNKAVL
3	83		FHSGLL	3	84		FNSATL
4	84		FNSATL	4	114		FNSGTW
5	85		FNSGTL	5	115		FNTGVF
6	86		FNSSTL	6	116		GKSRFH
7	87		GKSKWL	7	91		IGKGVF
8	88		GMGGTL	8	92		IGKGVL
9	89		HAKGGM	9	117		IGKNVY
10	90		IGEAVL	10	118		MGKGVM
11	91		IGKGVF	11	119		NGESVF
12	91		IGKGVF	12	120		PDFGWM
13	92		IGKGVL	13	121		PGSGVM
14	93		KHDSVL	14	122		PKDAWL
15	94		LNTAVM	15	99		PKFGWK
16	95		NGEGTL	16	99		PKFGWK
17	96		NGKNTL	17	123		PKFGWL
18	97		NSAGIL	18	124		PKIGWH
19	98		PKEGWM	19	124		PKIGWH
20	99		PKFGWK	20	124		PKIGWH
21	100		PKMGWV	21	125		PKMGWA
22	101		PRLGHL	22	126		PKMGWM
23	102		PSFGWA	23	126		PKMGWM
24	103		QAKGTM	24	126		PKMGWM
25	104		RGMGVM	25	126		PKMGWM
26	105		RKEGWM	26	127		PQMGWL
27	106		TGKGVL	27	128		PRFGWL
28	107		TGMGTL	28	128		PRFGWL

Tabelul 4 Substituții în cadrul subdomeniului lanțului greu CDRH3 al MAB-A (pozițiile Kabat 100a-100f)

Testare 1			Testare 2		
ID clonă	SEQ NO	ID Secvența subdomeniului CDR _{H3}	Clone ID	SEQ NO	ID Secvența subdomeniului CDR _{H3}
29	108	TGNGVM	29	128	PRFGWL
30	108	TGNGVM	30	129	PRMGFL
31	109	WNAGTF	31	130	PRMGFM
32	110	YHHTPL	32	131	PSFGWM
33	110	YHHTPL	33	132	RREGWM
34	111	YQSATL	34	133	SGEGVL
			35	134	SGNGVM
			36	135	VGKAVL

Tabelul 5 Substituții în cadrul subdomeniului lanțului greu CDRH3 al MAB-A (pozițiile Kabat 100a-100f)

ID Clonă	SEQ ID NO	Secvența subdomeniului CDR _{H3}
MAB-A VH (2A)	85	FNSGTL
MAB-A VH (2B)	92	IGKGVV
MAB-A VH (2C)	128	PRFGWL
MAB-A VH (2D)	106	TGKGVV
MAB-A VH (2E)	136	DSNAVL
MAB-A VH (2F)	137	FHSGTL
MAB-A VH (2G)	113	FNKAVL
MAB-A VH (2H)	138	GGSGVL
MAB-A VH (2I)	139	PRQGFL
MAB-A VH (2J)	140	YNSGTL

Pentru toate clonele examinate, Gly și Ala sunt resturile de aminoacizi preferate în poziția 4 (P4) și Leu, Met și Phe sunt resturile de aminoacizi preferate în poziția 6 (P6). Resturile de aminoacizi preferate din alte poziții (*de exemplu* poziția 2 (P2), poziția 3 (P3) și poziția 5 (P5)) depind de restul de aminoacid găsit la P1. Pentru clonele care au un rest de Pro la poziția 1 (P1), Lys și Arg au fost preferate la P2, Phe și Met la P3, Gly la P4 și Trp sau Phe la P5. Pentru clonele care au Phe, Tyr sau Trp la P1, Asn și His au fost preferate la P2, Ser și His la P3 și Leu la P6. Pentru clonele care au Ile, Leu sau Val la P1, Gly a fost preferat la P2, Lys la P3, Val la P5 și hidrofob la P6. În plus, astfel cum se poate observa în **Tabelul 4**, pentru clonele care au un rest de Thr la P1, Gly a fost preferat la P2, Lys, Met și Asn au fost preferate la P3, Gly a fost preferat la P4, Val sau Thr au fost preferate la P5 iar Leu și Met la P6. Clonele suplimentare care au un rest de Asp, Gly, Arg, His sau Ser la P1 au fost de asemenea identificate la frecvențe inferioare (a se vedea **Tabelul 4** și **Tabelul 5**).

Domeniul VH al celor zece clone ilustrate în **Tabelul 5** a fost utilizat pentru a genera variante optimizate suplimentare ale hMAB-A (2.2) denumite hMAB-A (2A.2)-(2J.2). Legarea clonelor selectate a fost examinată prin testul ELISA. Pe scurt, anticorpii care se leagă la peptidele care conțin histidină și care au fost acoperiți pe plăci de microtitrare au fost utilizați pentru a captura cynoADAM9 solubil marcat cu peptida His ("cynoADAM9-His") (1 μg/mL) sau huADAM9 solubil marcat cu peptida His (1 μg/mL) și a fost examinată legarea diluțiilor în serie ale hMAB-A parental (2.2) și cele zece variante de CDR_{H3} hMAB-A (2A.2). Curbele de legare la cynoADAM9 și huADAM9 sunt ilustrate în **FIG. 4A** și, respectiv, **FIG. 4B**. Variantele hMAB-A (2A.2) care cuprind fiecare dintre domeniile VH selectate au prezentat o legare îmbunătățită la cynoADAM9 cu MAB-A VH(2B), MAB-A VH(2C), MAB-A VH(2D) și MAB-A VH(2I), prezentând cea mai mare îmbunătățire a legării la cynoADAM9, menținând în același timp o legare similară la huADAM9 ca și anticorpii parental hMAB-A (2.2).

Afinitatea de legare relativă a anticorpilor umanizați/optimizați suplimentar MAB-A VH(2B.2), MAB-A VH(2C.2), MAB-A VH(2D.2) și MAB-A VH(2I.2) și hMAB-A parental (2.2), la huADAM9-His și cynoADAM9-His a fost investigată utilizând analiza BIACORE® în esență astfel cum este descris anterior. k_a , k_d și K_D calculate din aceste studii sunt prezentate în **Tabelul 6**.

Tabelul 6						
Anticorp	huADAM9			cynoADAM9		
	k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$) ¹⁾	k_d ($\times 10^{-4}$) (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-4}$) (s^{-1})	K_D (nM)
hMAB-A (2.2)	9,0	5,5	0,6	2,0	220	110
hMAB-A (2B.2)	6,1	3,9	0,6	3,4	0,66	0,2
hMAB-A (2C.2)	5,9	8,1	1,4	3,5	<0,1	<0,3
hMAB-A (2D.2)	6,9	5,8	0,8	4,2	3,0	0,7
hMAB-A (2I.2)	6,6	2,3	0,4	4,0	0,85	0,2

Studiile de legare demonstrează faptul că cele patru clone de top au prezentat o îmbunătățire între 150-550 de ori în afinitatea de legare la cynoADAM9, menținând în același timp aceeași legare de mare afinitate la huADAM9 ca și anticorpul parental. hMAB-A (2C.2) și hMAB-A (2I.2) au fost selectate pentru studii suplimentare.

Exemplul 5.

Studiul imunohistochimic al anticorpului hMAB-A (2I.2)

Specificitatea celulară a hMAB-A (2I.2) a fost investigată prin IHC. Celulele martor pozitive și negative și țesuturile normale umane și de maimuță cynomolgus au fost puse în contact cu hMAB-A (2I.2) (2,5 μ g/mL) sau un martor izotip (2,5 μ g/mL) iar gradul de colorare a fost vizualizat. Rezultatele studiului sunt rezumate în **Tabelul 7**.

Tabelul 7		
Celulă/Țesut	hMAB-A (2I.2) (2,5 μ g/ml)	Martor negativ IgG1 (2,5 μ g/ml)
Celulele parentale Cho-K	-	-
Expresie medie Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) rar până la ocazional și 1+ (gr c > m) ocazional	-
Expresie crescută Cho-K/huADAM9	2-4+ (gr c > m) frecvent	-
Clona Cho-K/cynoADAM9 2	2-4+ (gr c > m) frecvent	-
Clona Cho-K/cynoADAM9 #16	2-4+ (gr c > m) frecvent	-
Celule A498	2-4+ (gr c > m) rar până la ocazional și 1+ (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Colon MG06-CHTN-96 B	-	numeroase 2-4+ (gr c) celule compatibile cu macrofage
Plămân MG06-CHTN-162B1 A	-	ocaional 2-4+ (gr c) celule compatibile cu macrofage
Ficat ILS11103 B	-	hepatocite 1+ (gr c) rar până la ocazional
Pancreas ILS10266	-	-
Moștenirea vieții cardiace 0910035D	-	celule musculare cardiace cu numeroase 1-3+ focare mici de (gr c) compatibile cu pigmentul de lipofuscină
Rinichi ILS10241 B	-	epl tubul 1+ (gr c) rar
Vezica urinară	-	ocaional 2-4+ (gr c) celule compatibile cu

Tabelul 7		
Celulă/Țesut	hMAB-A (2I.2) (2,5µg/ml)	Martor negativ IgG1 (2,5 µg/ml)
ILSD8011 J		macrofage
Colon Cyno #1	-	epi mucoasă (luminal m) 2-4+ rar până la ocazional și 1+ rar până la ocazional; numeroase 2-3+ (gr c) celule compatibile cu macrofagele predominant în LP
Plămân Cyno #1	-	foarte rar 2-4+ (gr c) celule compatibile cu macrofage
Ficat Cyno #1	-	-
Pancreas Cyno #1	-	-
Cord Cyno #1	-	-
Rinichi Cyno #070368M	-	epi tubul 2+ (gr c) rar și 1+ (gr c) rar până la ocazional
Vezica Urinară Cyno #1	epi celule tranziționale ± (gr c) rar	rar 1-4+ (gr c) celule compatibile cu macrofage
Plămân CA ILS10108	Scorul H 150	tu -
Plămân CA ILS7223	Scorul H 180	tu -
Plămân CA ILS2156 A	Scorul H 80	tu -
Plămân CA ILS7295 A	Scorul H 60	tu -

Studiile IHC au fost, de asemenea, efectuate pentru a evalua legarea hMAB-A (2I.2) umanizat/optimizat la o concentrație de 12,5 µg/mL (5x concentrația optimă de colorare). În acest studiu au fost utilizate celule martor pozitive și negative și țesuturi normale umane și de maimuță cynomolgus. Rezultatele studiului sunt rezumate în **Tabelul 8**.

5

Tabelul 8		
Cell/Tissue	hMAB-A (2I.2) (12,5 µg/ml)	Martor negativ IgG1 (12,5 µg/ml)
Celule parentale Cho-K	-	-
Expresie medie Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Expresie crescută Cho-K/huADAM9	3-4+ (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Clonă Cho-K/cynoADAM9 2	3-4+ (gr c > m) frecvent	-
Clonă Cho-K/cynoADAM9 #16	3-4+ (gr c > m) frecvent	-
Celule A498	2-4+ (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Colon MG06-CHTN-96 B	epi ± - 1+ rar până la ocazional	numeroase 2-4+ (gr c) celule compatibile cu macrofage predominant în LP în articolul de testat și martorul negativ
Plămân MG06-CHTN-162B1 A	celule alveolare (favorizează pneumocitele) 2-3+ (gr c > m) rar, 1+ (gr c > m) rar până la ocazional; EC 2-4+ (c,m) rar, 1+ (c,m) rar	ocațional celule risipite 2-4+ (gr c) compatibile cu macrofage în articolul de testat și martorul negativ
Ficat ILS11103 B	-	ocațional celule risipite 2-4+ (gr c) compatibile cu macrofage în articolul de testat și martorul negativ
Pancreas ILS10266	epi ductal 1+ (gr c > m) foarte rar	celule (favorizează celulele acinare) 1+ (gr c) foarte rar; ocațional celule risipite 2-4+

Tabelul 8		
Cell/Tissue	hMAB-A (2I.2) (12,5 µg/ml)	Martor negativ IgG1 (12,5 µg/ml)
		(gr c) compatibile cu macrofage în articolul de testat și martorul negativ
Moștenirea vieții cardiace 0910035D	-	numeroase focare mici 1-3+ colorare granulară cu celule musculare cardiace compatibile cu pigmentul de lipofuscină compatibile cu artefactul în articolul de testat și martorul negativ
Rinichi ILS10241 B	epi tubul 1+ (gr c) rar până la ocazional	epi tubul ± (gr c) rar
Vezica urinară ILSD8011 J	epi celule tranziționale 1+ (gr c) rar	rar 2-4+ (gr c) celule copatibile cu macrofage în articolul de testat și martorul negativ
Colon Cyno #1	-	epi mucoasă (luminal m) 2-4+ ocazional și 1+ rar până la ocazional
Plămân Cyno #1	epi bronșic 1+ (gr c > m) rar până la ocazional și ± (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Ficat Cyno #1	-	-
Pancreas Cyno #1	-	-
Cord Cyno #1	-	-
Rinichi Cyno #070368M	-	epi tubul 1+ (gr c) rar și ± (gr c) rar
Vezica urinară #1	epi celule tranziționale 2+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) rar până la ocazional	-
Plămân CA ILS10108	Scorul H 180	tu -
Plămân CA ILS7223	Scorul H 180	tu -
Plămân CA ILS2156 A	Scorul H 115	tu -
Plămân CA ILS7295 A	Scorul H 115	tu -

A fost efectuat un studiu IHC comparativ pentru a evalua diferențele în legarea hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2) și hMAB-A (2I.2) la 2,5 µg/mL sau 5 µg/mL. În acest studiu au fost utilizate celule martor pozitive și negative și țesuturi normale umane și de maimuță cynomolgus. Rezultatele studiului sunt rezumate în **Tabelul 9**.

Tabelul 9					
Țesut	hMAB-A (2,3) 5µg/mL	hMAB-A (2,2) 2,5µg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 µg/mL	hMAB-A (2I.2) 2,5 µg/mL	Martor izotip 5 µg/mL
Cho-K parental P:3	-	-	-	-	-
Expresie medie Cho-K/hu ADAM9.2 P:1	1+ (c) ocazional	2-4+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) rar până la ocazional	2-4+ (gr c > m) rar până la ocazional și 1+ (gr c > m) rar până la ocazional	2-4+ (gr c > m) rar până la ocazional și 1+ (gr c > m) ocazional	-
Expresie crescută Cho-K/hu ADAM9.18 P:1	3+ (m,c) frecvent	2-4+ (gr c > m) ocazional până la frecvent și 1+ (gr c	2-4+ (gr c > m) ocazional până la frecvent și 1+ (gr c	2-4+ (gr c > m) frecvent	-

Tabelul 9						
Țesut	hMAB-A (2,3) 5μg/mL	hMAB-A (2,2) 2,5μg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 μg/mL	hMAB-A (2I.2) 2,5 μg/mL	Martor izotip 5 μg/mL	
		c > m) ocazional	> m) ocazional			
Cho-K Cyno #2	1+(c) ocaional	-	3-4+ (gr c > m) frecvent	2-4+ (gr c > m) frecvent	-	
Cho-K Cyno #16	2+ (c,m) ocaional până la frecvent	2-4+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) rar până la ocaional	3-4+ (gr c > m) frecvent	2-4+ (gr c > m) frecvent	-	
A498 072210	3-4+ (c,m) frecvent	2-4+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) ocaional până la frecvent	2-4+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) ocaional	2-4+ (gr c > m) rar până la ocaional și 1+ (gr c > m) ocaional până la frecvent	-	
Plămân CA ILS10108	Scorul IHC 3	Scorul H 55	Scorul H 17	Scorul H 150	-	
Plămân CA ILS7223	Scorul IHC 3	Scorul H 205	Scorul H 160	Scorul H 180	-	
Plămân CA ILS2156 A	Scorul IHC 1	Scorul H 5	Scorul H 0	Scorul H 80	-	
Plămân CA ILS7295 A	Scorul IHC 1	Scorul H 1	Scorul H 0	Scorul H 60	-	

A fost efectuat un studiu IHC comparativ pentru a evalua diferențele în legarea hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2) și hMAB-A (2I.2) și MAB-A murinic la 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL sau 12,5 μ g/mL. În acest studiu au fost utilizate celule martor pozitive și negative și țesuturi normale umane și de maimuță cynomolgus. Rezultatele studiului sunt rezumate în **Tabelul 10**.

Tabelul 10.						
Țesut	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 μg/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 μg/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 μg/ml	MAB-A 5 μg/mL	
Colon MG06- CHTN-96 B	epi 1+ (c,m) rar; sm negativ	-	-	epi $\pm$ - 1+ rar până la ocaional	Epiteliu 1-3+ [m, c] (ocaional până la frecvent); Altele (Neg)	
Plămân MG06- CHtN-162B1 A	pneumocite/macrofage 2+ (c,m) ocaional	-	-	celule alveolare (favorizează pneumocitele) 2-3+ (gr c > m) rar, 1+ (gr c > m) rar până la ocaional; EC 2-4+ (c,m) rar, 1+ (c,m) rar	Monocite 1+ [c] (rar până la ocaional); Altele (Neg)	
Ficat ILS11103 B	hepatocite 1+ (c) rar până la ocaional	hepatocite 1+ (gr c) frecvent	hepatocite 2+ (gr c) rar și 1+ (gr c) frecvent	-	celule Kupffer 3+ [c] (ocaional); Altele (Neg)	
Pancreas ILS 10266	epi 1+ (c) rar; celule	-	-	epi ductal 1+	Epiteliul	

Tabelul 10.					
Țesut	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 ug/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 ug/mL	hMAB-A (2I.2) 12,5 ug/ml	MAB-A 5 ug/mL
	insulare 1+ (c) foarte rar			(gr c > m) foarte rar	ductal 1-2+ [c, m] (rar până la ocazional); Fibrilă 2+ (rar); Altele (Neg)
Moștenirea vieții cardiace0910035D	±	-	-	-	Neg
Rinichi ILS10241 B	epi 2-3+ (c,m) frecvent	epi tubul 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) ocazional până la frecvent	epi tubul 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) ocazional până la frecvent	epi tubul 1+ (gr c) rar până la ocazional	Epiteliu 1+ [c] (rar); Altele (Neg)
Vezica urinară ILSD8011 J	epi tranzițional 1+ (c) rar până la ocazional	-	-	epi celular tranzițional 1+ (gr c) rar	Epiteliu tranzițional 2+ [c, m] (ocazional până la frecvent); Celule stromale 3+ [c] (rar); Altele (Neg)
Colon Cyno #1	epi 1+ (c,m) rar	-	-	-	
Plămân Cyno #1	Macrofage și pneumocite 1+ (c) foarte rar	-	epi bronșic 3-4+ (gr c) rar, 2+ (gr c) ocazional și 1+ (gr c) ocazional	epi bronșic 1+ (gr c > m) rar până la ocazional și ± (gr c > m) ocazional până la frecvent	-
Ficat Cyno #1	hepatocite 1+ (c) frecvent	hepatocite 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) rar până la ocazional	hepatocite 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) ocazional; epi ductal 1+ (gr c) ocazional	-	-
Pancreas Cyno #1	epi și celule insulare 1+ (c) foarte rar	-	celule insulare ± (gr c) frecvent; epi ductal 1+ (gr c) rar până la ocazional	-	pozitiv

Tabelul 10.					
Țesut	hMAB-A (2.3) 5 ug/mL	hMAB-A (2.2) 2,5 ug/mL	hMAB-A (2C.2) 2,5 ug/mL	hMAB-A (21.2) 12,5 ug/ml	MAB-A 5 ug/mL
Cord Cyno #1	miocard 1+ (c) frecvent	-	-	-	-
Rinichi Cyno #070368M	epi 2+ (c) frecvent	epi tubul 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) rar până la ocazional	epi tubul 2+ (gr c) rar până la ocazional și 1+ (gr c) ocazional până la frecvent	-	pozitiv
Vezica urinară Cyno #1	epi tranzițional ± (c); macrofage foarte rar	-	epi celular tranzițional 2-3+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) ocazional	epi celular tranzițional 2+ (gr c > m) rar și 1+ (gr c > m) rar până la ocazional	

Rezultatele demonstrează astfel că hMAB-A (2.2) a prezentat o colorare globală redusă a hepatocitelor umane și a tubulilor renali la concentrație optimă, cu o intensitate/frecvență de colorare mai redusă a reactivității în hepatocite și tubulii renali observate la martorul negativ. hMAB-A (2.2) a prezentat o colorare similară la nivel scăzut a hepatocitelor de cyno și a tubulilor renali la concentrație optimă, cu o intensitate/frecvență de colorare mai redusă a reactivității în tubulii renali observate la martorul negativ.

Rezultatele demonstrează, de asemenea, faptul că hMAB-A (2C.2) a prezentat o colorare generală redusă a hepatocitelor umane și a tubulilor renali la concentrație optimă, cu o intensitate/frecvență de colorare mai redusă a reactivității în hepatocite și tubulii renali observate la martorul negativ. hMAB-A (2C.2) a prezentat o colorare similară la nivel scăzut în hepatocitele de cyno și tubulii renali la concentrație optimă. Constatări minime suplimentare în epiteliul pulmonar, celulele insulare pancreatice/epiteliul și epiteliul vezicii urinare de cyno pentru hMAB-A (2C.2) nu au fost observate în țesutul uman corespunzător; o intensitate/frecvență de colorare mai redusă a reactivității a fost observată în epiteliul pulmonar, tubulii renali, epiteliul vezicii urinare la martorul negativ. Rezultatele demonstrează, de asemenea, faptul că hMAB-A (21.2) nu a prezentat nicio colorare a țesuturilor umane sau de cyno la concentrație optimă, cu o colorare rară +/- a epiteliului celular tranzițional al vezicii urinare. hMAB-A (21.2) a prezentat, de asemenea, o colorare generală la nivel și la frecvență scăzute a celulelor alveolare pulmonare umane, a epiteliului ductal pancreatic, a tubului renal, a epiteliului celular tranzițional al vezicii urinare la de 5x concentrația optimă și o colorare generală la nivel scăzut a epiteliului bronșic de cyno și a epiteliului celular tranzițional al vezicii urinare la de 5x concentrația optimă. hMAB-A (21.2) prezintă un profil IHC general favorabil pe țesuturile umane normale testate și un profil similar pe țesuturile corespunzătoare de maimuță cynomolgus.

Exemplul 6

Variante de regiuni Fc care cuprind hMAB-A (21.2)

hMAB-A (21.2) cuprinde un lanț ușor (SEQ ID NO:68) care are o regiune constantă a lanțului ușor kappa și un lanț greu (SEQ ID NO:52) care are regiuni constante ale lanțului greu de IgG de tip sălbatic. Variantele Fc au fost generate prin introducerea următoarelor substituții în regiunea Fc: L234A/L235A (a se vedea, *de exemplu*, SEQ ID NO: 78) desemnat hMAB-A (21.2)(AA); S442C (a se vedea, *de exemplu*, SEQ ID NO: 79) desemnat hMAB-A (21.2)(C); și L234A/L235A/S442C (a se vedea, *de exemplu*, SEQ ID NO: 80) desemnat hMAB-A (21.2)(AA/C). Legarea fiecărei variante de Fc la huADAM9-His și cynoADAM9-His a fost examinată prin testul ELISA. Pe scurt, anticorpii care se leagă la peptidele care conțin histidină și care au fost acoperiți pe plăci de microtitrare au fost utilizați pentru a captura cynoADAM9 solubil marcat cu peptida His sau huADAM9 solubil marcat cu peptida His (0,5 ug/mL) și a fost examinată legarea diluțiilor în serie ale hMAB-A parental (2.2) și a variantelor de Fc. Curbele de legare huADAM9 și cynoADAM9 sunt ilustrate în FIG. 5A și, respectiv, FIG. 5B, și ilustrează faptul că fiecare dintre variantele de Fc a reținut afinitatea de legare a hMAB-A (21.2) care are o regiune Fc de tip sălbatic.

Exemplul 7.**Analiza expresiei țintă**

Pentru a evalua expresia ADAM9 în diverse indicații, o micromatrice de țesut (TMA) cu 20 de tipuri diferite de tumori a fost evaluată mai întâi utilizând un test ADAM9 IHC dezvoltat la ImmunoGen pentru utilizare în cercetarea preliminară.

Toate probele analizate au fost probe FFPE (fixate pe formol și încorporate în parafină). TMA cu 500 de nuclee 20 de carcinom a fost achiziționat de la Folio Biosciences (Cat# ARY-HH0212). NSCLC TMA cu 80 de nuclee pentru adenocarcinom și 80 de nuclee pentru carcinom cu celule scuamoase a fost achiziționat de la US Biomax (Cat# LC1921A). TMA pentru cancer colorectal cu 80 de nuclee pentru adenocarcinom a fost achiziționat de la Pantomics Inc. (Cat# COC1261). Probele de cancer gastric au fost achiziționate de la Avaden Biosciences.

Colorarea imunohistochimică pentru ADAM9 a fost efectuată utilizând autostainerul Ventana Discovery Ultra. Anticorpul primar pentru ADAM9 a fost un anticorp monoclonal de iepure disponibil pe piață. Toate probele au fost evaluate și punctate de un patolog certificat de consiliu, instruit în algoritmul de punctare. Prezența a cel puțin 100 de celule tumorale viabile a fost necesară pentru punctare. Intensitatea colorării a fost punctată pe o scară semi-cantitativă între 0 și 3, cu 0 reprezentând nicio colorare, 1 reprezentând colorare slabă, 2 reprezentând colorare moderată și 3 reprezentând colorare puternică. S-a înregistrat procentul de celule colorate pozitiv la fiecare nivel de intensitate. Punctarea s-a bazat pe localizarea Adam9 doar pe membrana celulară, precum și pe evaluarea localizării atât la citoplasmă, cât și la membrană. Rezultatele colorării au fost analizate prin punctajul H, care combină componentele intensității colorării cu procentul de celule pozitive. Acesta are o valoare între 0 și 300 și este definit astfel:

1* (procentaj de colorare celulară la intensitate 1+)
 + 2* (procentaj de colorare celulară la intensitate 2+)
 + 3* (procentaj de colorare celulară la intensitate 3+)
 = Scorul H

TMA cu 500 de nuclee 20 de carcinom cu 5 martori tisulari normali pentru fiecare tip de tumoare a fost colorat și punctat în două moduri diferite: (1) pe baza colorării membranei singure sau (2) pe baza colorării membranei și citoplasmei. Tabelul 11 de mai jos și FIG. 6A rezumă prevalența ADAM9 pe baza colorării membranei pentru toate cele douăzeci de indicații și Tabelul 12 și FIG. 6B rezumă rezultatele colorării membranei și citoplasmei pentru opt indicații selectate.

Pe baza rezultatelor din TMA multicarcinom, au fost alese trei indicații pentru o analiză extinsă a prevalenței: cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), cancer colorectal (CRC) și cancer gastric. Pentru NSCLC, un TMA cu 80 de nuclee pentru adenocarcinom și 80 de nuclee pentru carcinom cu celule scuamoase a fost colorat și evaluat. Pentru CRC, a fost analizat un TMA cu 80 de nuclee pentru adenocarcinom, dintre care 78 au fost evaluabile. Pentru cancer gastric, au fost analizate 15 secțiuni tisulare integrale de adenocarcinom. Toate aceste probe au fost punctate pentru colorarea membranei și citoplasmei, iar rezultatele sunt rezumate în Tabelul 13. Rezultatele acestor studii preliminare arată faptul că ADAM9 este exprimat într-o gamă largă de cancere solide și sprijină utilizarea conjugatilor medicamentoși anti-ADAM9 în multe tumori solide care exprimă ADAM9.

Tabelul 11: Prevalența ADAM9 în 20 de indicații diferite bazate pe colorarea membranei

Tip de tumoare	% Pozitiv (scorul H ≥1)	Scorul H: 1-100	Scorul H: 101-200
Pancreas (n=17)	95%	24%	71%
Uter (n=18)	89%	67%	22%
Glanda tiroidă (n=17)	88%	88%	0%
Rinichi (n=17)	88%	59%	29%
Testicul (n=17)	83%	65%	18%
Prostată (n=20)	80%	45%	35%
Colon (n=16)	76%	38%	38%
Vezica urinară (n=16)	76%	63%	13%
Sân (n=20)	75%	65%	10%
Creier (n=19)	68%	63%	5%

Tip de tumoare	% Pozitiv (scorul H ≥ 1)	Scorul H: 1-100	Scorul H: 101-200
Stomac (n=17)	59%	24%	35%
Plămân (n=19)	58%	58%	0%
Esofag (n=19)	43%	32%	11%
Col uterin (n=20)	40%	40%	0%
Ovar (n=18)	39%	33%	6%
Cap și gât (n=20)	35%	30%	2%
Ficat (n=19)	32%	32%	0%
Piele (n=20)	10%	10%	0%
Țesut moale (n=20)	0%	0%	0%
Limfom (n=20)	0%	0%	0%

Tabelul 12: Prevalența ADAM9 în 8 indicații selectate pe baza colorării membranei și citoplasmei

Tip de tumoare	% Pozitiv (Scorul H ≥ 1)	Scorul H: 1-100	Scorul H: 101-200	Scorul H: 201-300
Colon	100%	31%	63%	6%
Plămân	100%	58%	42%	0%
Pancreas	100%	18%	76%	6%
Prostată	95%	25%	55%	15%
Esofag	95%	58%	37%	0%
Stomac	94%	18%	71%	6%
Sân	70%	50%	20%	0%
Ovar	61%	44%	17%	0%

Tabelul 13: Prevalența ADAM9 în probe suplimentare pentru NSCLC, CRC și cancer gastric pe baza colorării membranei și citoplasmei

Tip de tumoare	Număr de probe	% pozitiv (Scorul H ≥ 1)	Distribuția scorului H		
			1-100	101-200	201-300
Adenocarcinom NSCLC	80	90%	46%	39%	5%
NSCLC scuamos	80	81%	65%	13%	3%
Adenocarcinom CRC	78	91%	51%	41%	0%
Adenocarcinom gastric	15	100%	27%	53%	20%

Exemplul 8**Studii de internalizare a anticorpilor anti-ADAM9**

Pentru a evalua internalizarea anticorpilor anti-ADAM9 conform invenției, au fost efectuate experimente de internalizare bazate pe citometrie de flux pe anticorpi hMAB-A(2.2), hMAB-A(21.2) și hMAB-A(21.2)-S442C conjugați către Alexa Fluor 488.

Conjugații de anticorpi anti-ADAM9 Alexa488 pentru hMAB-A(2.2), hMAB-A(21.2), hMAB-A(21.2)-S442C au fost generați utilizând esterul tetrafluorfenilic Alexa Fluor 488 conform instrucțiunilor producătorului (ThermoFisher). Conjugații au fost eluați în PBS fără azidă de sodiu, pH 7,2 pentru a permite testele de internalizare. Concentrația și gradul de marcarea au fost calculate din măsurătorile de absorbție la 280 nm și 494 nm. Au fost efectuate teste de legare FACS pentru a se asigura faptul că marcarea Alexa488 nu a afectat negativ legarea țintei.

Internalizarea conjugaților anti-ADAM9-Alexa488 a fost determinată atât în urma expunerii continue cât și cu impulsuri la conjugații fluorescenți. Pentru experimente continue, celulele NCI-H1703 au fost tratate cu o concentrație saturată de anticorp indicat marcat Alexa488 pe gheață sau la 37 °C pentru tot timpul indicat. În timp ce pentru experimentele cu impulsuri, conjugații anti-ADAM9-Alexa488 au fost legați în prealabil la celule pe gheață, iar excesul de conjugat a fost spălat înainte de a

trece la 37 °C și de a monitoriza internalizarea. La momentele indicate, după expunerea fie continuă, fie cu impulsuri, celulele au fost crescute cu versene (ThermoFisher) și au fost spălate cu PBS cu gheață de două ori, iar godeurile replicate au fost resuspendate în PBS cu gheață fără (probe nestinse) sau cu 300 nM anticorp anti-A488 (probe stinse). Toate probele au fost incubate timp de 30 de minute pe gheață. Celulele au fost apoi peletizate, au fost fixate în 1% paraformaldehidă și au fost analizate prin citometrie în flux. Fluorescența celulelor incubate pe gheață timp de 30 de minute și apoi incubate cu anticorp anti-Alexa488 reprezintă fracția fluorescentă nestinsă și a fost scăzută din toate celelalte probe înainte de calcularea internalizării. Procentul de internalizare a fost calculat ca fluorescență a probelor stinse corectate pentru stingerea incompletă de suprafață (fluorescență intracelulară) împărțită la cea a celulelor nestinse (fluorescență totală). Internalizarea conjugatilor de anticorpi anti-ADAM9 a fost reprezentată grafic și datele au fost ajustate utilizând o ecuație de dezintegrare exponențială cu o singură fază (GraphPad Prism, ver. 5.01).

Internalizarea anticorpilor anti-ADAM9 marcați cu Alexa488 legați la suprafața a fost evaluată atât după tratamentul cu impulsuri, cât și după tratamentul continuu în celulele NCI-HI703. Toți cei trei conjugati anti-ADAM9-Alexa488 testați au arătat o internalizare rapidă, cu ~39% dintre conjugati internalizați în primele 15 minute și un total de ~77% internalizați după 6 ore (FIG. 7A). Interesant, după expunere continuă timp de 24 de ore, semnalul fluorescent internalizat a fost de ~7 ori mai mare decât semnalul fluorescent inițial total legat la suprafața celulară după 30 de minute (FIG. 7B). Prin urmare, ADAM9 este probabil alimentat la suprafața celulară într-un bazin intracelular în timpul incubărilor la 37 °C, permițând mai multe runde de internalizare a conjugatului de anticorp anti-ADAM9. Eficacitatea imunoconjugatilor anti-ADAM9 se bazează pe internalizarea, traficul intracelular și degradarea imunoconjugatilor. Potența imunoconjugatilor anti-ADAM9 poate fi explicată parțial prin internalizarea crescută a imunoconjugatilor anti-ADAM9, care conduce probabil la generarea de cantități mari de cataboliți citotoxici.

Exemplul 9

Studii de procesare celulară cu anticorpi anti-ADAM9

Pentru a evalua legarea țintă pe celulă, absorbția și degradarea lizozomală a chMAB-A, a fost utilizat un procedeu de procesare a anticorpilor marcați cu ³H-propionamidă descris anterior (Lai și colab., Pharm Res. 2015 Nov; 32(11):3593-603). Utilizând acest procedeu, anticorpul chMAB-A care țintește ADAM9 a fost marcat în urmă cu propionat tritiat prin resturi de lizină. S-a demonstrat anterior faptul că la legarea celulară, absorbția și traficul la lizozom, Ab marcat cu [³H]propionat (³H-Ab) este degradat și lizina-³H]propionamida este eliberată în mediul de creștere celulară. Adăugarea de solvent organic precipită anticorpul intact, marcat și lasă lizina-³H]propionamida în soluție, permițând măsurarea convenabilă și precisă a gradului de procesare a anticorpilor.

chMAB-A a fost marcat cu [³H]-propionat astfel cum a fost descris anterior. Linia NSCLC, NCI-HI703, și linia CRC, DLD-1, au fost tratate cu 10 nM anticorpi ³H-chMAB-A după determinarea saturației cu antigen prin curba de legare. Unele probe celulare au fost tratate cu anticorpul martor izotip tritiat, fără țintire, ³H-chKTI, în timp ce altele au fost netratate. Celulele au fost placate și cultivate peste noapte în plăci cu 6 godeuri și apoi tratate cu impulsuri cu reactiv(i) astfel cum s-a descris anterior. Pe scurt, celulele au fost incubate fie cu anticorp ³H-chMAB-A, fie cu ³H-chKTI timp de 20 de minute înainte de spălare de 3 ori în mediu proaspăt. Celulele au fost incubate peste noapte la 37 °C cu 5% CO₂. După o incubare de 20-24 ore, celulele au fost recoltate și proteinele au fost precipitate cu 4:3 volum acetonă: medie/amestec celular. Probele au fost congelate la -80 °C timp de minim 1 oră înainte de decongelare și separare prin centrifugare. Peletele au fost tratate pentru a solubiliza proteina înainte de numărare timp de 5 minute într-un contor de scintilație lichidă Tri-Carb (LSC). Conform protocolului producătorului, 1 mL de SOLVABLE (Perkin Elmer) a fost adăugat la fiecare probă de pelete și s-a incubat într-o baie de apă la 50 °C peste noapte. Probele au fost îndepărtate din baia de apă, au fost transferate în flacoane de sticlă cu scintilație de 20 mL și EDTA și H₂O₂ au fost adăugate la probe urmate de o incubare suplimentară de 1 oră la 50 °C. Probele au fost stinse cu HCl, s-au adăugat 15 mL de fluid de scintilație lichid Optima Gold (Perkin Elmer) și probele au fost agitate bine în vortex. Probele au fost ținute la întuneric timp de minim 4 ore înainte de numărare prin LSC. Probele de extract de acetonă fără proteine au fost uscate până la volume < 1 mL în vid și au fost procesate utilizând Solvable astfel cum s-a descris anterior înainte de LSC. Cantitatea de anticorp marcat legat, degradat și intact a fost calculată din valorile CPM ale probei rezultate.

Nivelul de procesare a anticorpului ³H-chMAB-A a fost determinat după tratamentul cu impulsuri și incubarea peste noapte la 37 °C. Celulele NCI-HI703 au prezentat 93% din ³H-chMAB-A procesat în 24 de ore, iar celulele DLD-1 au prezentat 92% din ³H-chMAB-A procesat în aceeași perioadă

de timp. Legarea și procesarea ^3H -chKTI a fost neglijabilă (>100 de ori CPM total mai mic decât pentru anticorpii țintiti). Valorile de procesare pentru aceste linii celulare sunt crescute, în special în comparație cu valorile de procesare cu impulsuri în 24 de ore raportate anterior pentru alte ținte ADC/anticorpi, susținând anticorpii anti-ADAM9 descriși în prezenta invenție în calitate de conjugați medicamentoși eficienți.

Exemplul 10

Studii de afinitate de legare a anticorpilor anti-ADAM9 umanizați/optimizați și conjugați medicamentoși

Pentru a evalua consecințele conjugării asupra legării antigenului, afinitatea de legare relativă a fiecărui imunoconjugat anti-ADAM9 și respectivul anticorp neconjugat la ADAM9 a fost determinată prin analiza FACS pe 300-19 celule care exprimă ectopic fie ADAM9 umană, fie ADAM9 de cynomolgus. Pe scurt, celulele 300-19 care exprimă ADAM9 au fost incubate cu serii de diluții de anticorpi anti-ADAM9 sau imunoconjugați timp de 30 de minute @ 4°C în tampon FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Probele au fost apoi spălate și incubate cu anticorp secundar marcat fluorescent timp de 30 de minute la 4°C . Media normalizată a intensității fluorescenței la fiecare concentrație a fost reprezentată grafic și EC_{50} de legare a fost calculată utilizând o analiză de regresie neliniară (GraphPad Prims 4.0). Rezultatele acestui studiu sunt rezumate în Tabelul 14.

Toți anticorpii și imunoconjugații anti-ADAM9 testați s-au legat cu afinitate similară la ADAM9 umană cu o EC_{50} de aproximativ 1,4 nM măsurată prin citometrie în flux, indicând faptul că conjugarea nu a modificat în mod apreciabil afinitatea de legare a anticorpilor (a se vedea,

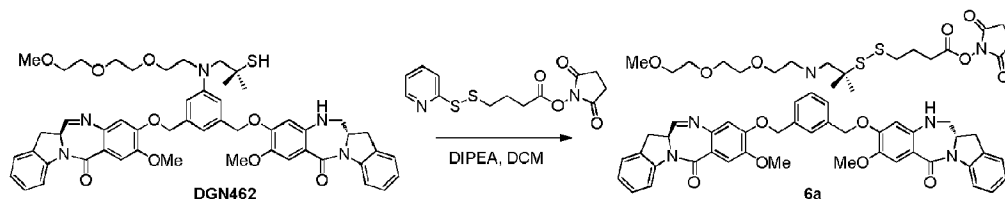
FIG. 8A-8D). În timp ce umanizarea a îmbunătățit legarea la ADAM9 de cynomolgus în raport cu anticorpii himerici (chMAB-A), variantele optimizate în plus (hMAB-A(2C.2), hMAB-A(2I.2) și hMAB-A(2I.2) S442C) și imunoconjugații acestora au prezentat o legare în mod semnificativ îmbunătățită la ADAM9 de cynomolgus. Îmbunătățirea semnificativă a legării la ADAM9 de cynomolgus facilitează studiile de toxicologie și siguranță pentru a valida utilizarea imunoconjugaților ADAM9 ca terapii medicamentoase.

Tabelul 14

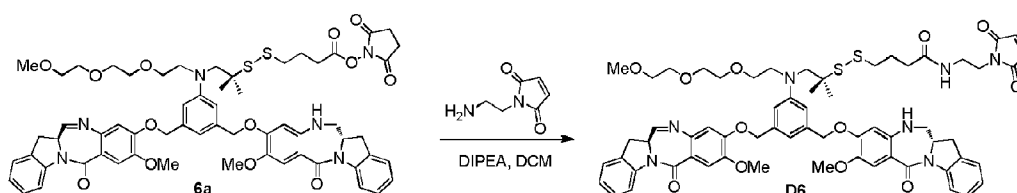
Anti-ADAM9 anticorp/imunoconjugat	EC ₅₀ (nM) prin FACS		
	300-19: huADAM9	300-19: cynoADAM9	cyno/ uman
chMAB-A	0.41	112.2	273
chMAB-A-sSPDB-DM4	0.95	275.3	290
chMAB-A-DGN-549	1.24	153.2	123
hMAB-A(2.2)	0.69	32.7	47
hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	1.11	13.3	12
hMAB-A(2.2)-DGN549	1.55	22.3	14
hMAB-A(2C.2)	1.22	3.8	3
hMAB-A(2C.2)-sSPDB-DM4	1.50	4.4	3
hMAB-A(2C.2)-DGN549	1.99	5.6	3
hMAB-A(2I.2)	1.49	4.1	3
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	1.55	4.9	3
hMAB-A(2I.2)-DGN549	2.25	6.6	3
hMAB-A(2I.2) S442C	1.33	3.8	3
hMAB-A(2I.2) S442C-DGN549	2.49	6.2	2

Exemplul 11

Sinteza N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-11-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-13,13-dimetil-2,5,8-trioxa-14,15-ditia-11-azanonadecan-19-amidei, Compusul D6



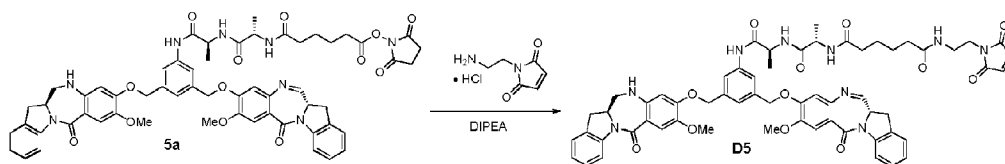
Etapa 1: La o soluție de tiol liber DGN462 (40 mg, 0,042 mmoli) și 4-(2-piridilditio)butanat de NHS (35 mg, 80% puritate, 0,085 mmoli) în diclorometan anhidru (0,5 mL) s-a adăugat diizopropiletilamină anhidră (0,015 mL, 0,085 mmoli) și s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Amestecul de reacție s-a stins cu clorură de amoniu saturată și s-a diluat cu diclorometan. Amestecul obținut s-a separat într-o pâlnie de separare. Stratul organic s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat și s-a stripat sub presiune redusă. Restul s-a purificat prin HPLC semi-preparativă cu fază inversă (coloană C18, CH₃CN/H₂O). Frațiile care au conținut produsul pur s-au combinat, congelat și liofilizat pentru a rezulta esterul de NHS dorit, compusul 6a (29,7 mg, randament 60%). CLSM = 9,1 minute (procedul de 15 minute) SM (m/z): 1157,3 (M + 1)⁺



Etapa 2: La o soluție de ester de NHS, compusul 6a (12,3 mg, 0,011 mmoli) și clorhidrat de N-(2-aminoetil)maleimidă (2,0 mg, 0,011 mmoli) în diclorometan anhidru (0,3 mL) s-a adăugat DIPEA (0,0022 mL, 0,013 mmoli). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 ore apoi s-a stripat sub presiune redusă. Restul s-a purificat prin HPLC semi-preparativă cu fază inversă (coloană C18, CH₃CN/H₂O). Frațiile care au conținut produsul pur s-au combinat, congelat și liofilizat pentru a rezulta maleimida dorită, compusul D6 (10 mg, randament 80%). CLSM = 8,3 minute (procedul de 15 minute) SM (m/z): 1181,8 (M + 1)⁺

Exemplul 12

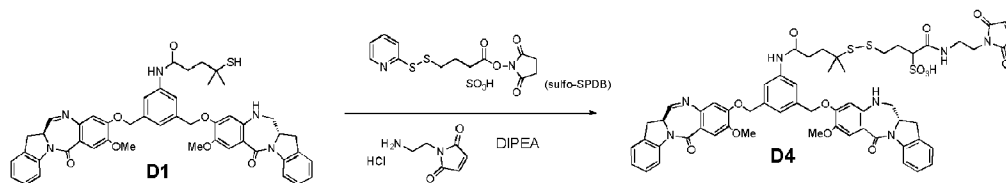
Sinteza N1-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-N6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)adipamidei, compusul D5



Ester de NHS, compusul 5a (8,2 mg, 7,6 μmoli) și clorhidrat de 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (2,2 mg, 0,011 mmoli) s-au dizolvat, la temperatura camerei, în diclorometan anhidru (305 μL). S-a adăugat DIPEA (2,66 μL, 0,015 mmoli) și reacția și s-a agitat timp de 3,5 ore. Produsul brut s-a concentrat și s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, CH₃CN/H₂O, gradient, 35% până la 55%). Frațiile de produs dorit s-au înghețat și s-au liofilizat pentru a rezulta maleimida, compusul D5 sub formă de pulbere albă solidă (5,3 mg, randament 58%). CLSM = 5,11 minute (procedul de 8 minute) SM (m/z): 1100,6 (M + 1)⁺

Exemplul 13

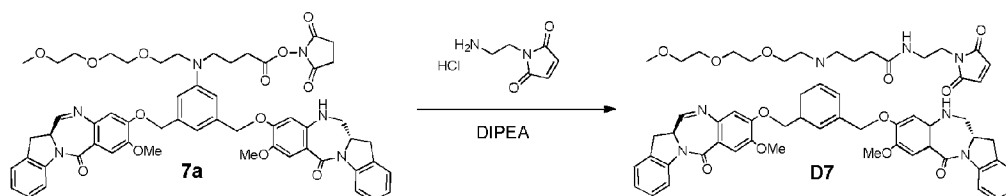
Sinteza acidului 1-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)amino)-4-((5-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-metil-5-oxopentan-2-il)disulfanil)-1-oxobutan-2-sulfonic, compusul D4



La o suspensie de tiol liber, D1 (88 mg, 0,105 mmoli) și acid 1-((2,5-dioxopirolidin-1-il)oxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfonic (sulfo-SPDB) (64,0 mg, 0,158 mmoli) în diclorometan anhidru (2,10 mL) s-a adăugat DIPEA (55,0 μ L, 0,315 mmoli) la temperatura camerei sub azot. Amestecul s-a agitat timp de 16 ore și apoi s-au adăugat clorhidrat 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (55,6 mg, 0,315 mmoli), diclorometan anhidru (1,0 mL) și DIPEA (0,055 mL, 0,315 mmoli). Amestecul s-a agitat timp de încă 5 ore la temperatura camerei după care reacția s-a concentrat *in vid*. Restul rezultat s-a purificat prin RP-HPLC (C18, CH₃CN/H₂O). Frațiile care au conținut produsul dorit s-au congelat și s-au liofilizat pentru a rezulta maleimida, D4 (20 mg, randament 16%) sub forma unui solid alb. CLSM = 4,92 minute (procedeul de 8 minute) SM (m/z): 1158,6 (M + 1)⁺

Exemplul 14

Sinteza N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-11-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-2,5,8-trioxa-11-azapentadecan-15-amidei, compusul D7



La o soluție de ester de NHS, 7a (5 mg, 4,82 μ moli) și clorhidrat de 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (1,7 mg, 9,64 μ moli) în diclorometan anhidru (200 μ L) s-a adăugat, sub azot, DIPEA (1,512 μ L, 8,68 μ moli). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 4 ore și apoi s-a concentrat *in vid*. Restul rezultat s-a purificat prin RP-HPLC (C18, CH₃CN / H₂O). Frațiile care au conținut produsul dorit s-au congelat și s-au liofilizat pentru a rezulta maleimida, compusul D7 (3,5 mg, randament 68%). CLSM = 4,61 minute (procedeul de 15 minute) SM (m/z): 1062,8 (M + 1)⁺

Exemplul 15

Prepararea conjugatului specific situsului de cisteină al anticorpului anti-ADAM9 hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549

hMAB-A(2I.2)-S442C este un anticorp umanizat/optimizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 (care cuprinde o secvență VL a SEQ ID NO:55) și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:142 (care cuprinde o secvență VH a SEQ ID NO:28), care include o Cys modificată care corespunde celui de-al 6^{lea} până la ultimul rest al SEQ ID NO:142, atunci când X este o lizină, sau care corespunde celui de-al 5^{lea} până la ultimul rest al SEQ ID NO: 142, atunci când X este absent.

Cele două resturi de cisteină nepereche din anticorpul hMAB-A(2I.2)-S442C au fost reduse utilizând proceduri standard. La o soluție de acest intermediar în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), 5 mM acid N,N,N',N'-etilendiaminetetracetic (EDTA) pH 6,0 s-a adăugat N,N-dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol și 10 echivalenți molari de DGN549-C (compusul D5) ca o soluție în stoc în DMA pentru a rezulta un amestec de reacție cu o compoziție finală a solventului de 2% v/v DMA și 38% v/v propilenglicol în PBS 5 mM EDTA pH 6,0 și reacția a fost lăsată să se desfășoare peste noapte la 25 °C.

Conjugatul s-a purificat în 20 mM succinat, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μ M bisulfid de sodiu, pH 4,2 utilizând un sistem de cromatografie lichidă rapidă a proteinelor (FPLC) echipat cu coloane de desalinizare Sephadex G-25 Fine cu rata de flux stabilită la 5 mL/min. Conjugatul a fost apoi filtrat printr-un filtru de seringă de 0,22 μ m. S-a descoperit faptul că conjugatul are o medie de 1,9 moli DGN549/mol anticorp prin UV-vis, 97,6% monomer prin SEC și 0,8% DGN549 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Exemplul 16.**Prepararea conjugatilor IGN legați la lizină ai anticorpilor anti-ADAM9****a. Prepararea hMAB-A(2I.2)-DGN549**

hMAB-A(2I.2) este un anticorp umanizat/optimizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:52. La o soluție care conține anticorpul hMAB-A(2I.2) tamponat la pH 8,5 cu 15 mM acid 2-[4-(hidroxietil)piperzin-1-il]etansulfonic (HEPES), s-a adăugat N,N-dimetilacetamidă (DMA) împreună cu 4,8 echivalenți de DGN549-L (compusul D2) ca soluție în stoc în DMA, astfel încât compoziția finală de solvent a fost de 10% (v/v) DMA și 90% (v/v) tampon apos. Reacția a fost lăsată să se desfășoare timp de 4 de ore la 25 °C.

Conjugatul s-a purificat în 20 mM succinat, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu, pH 5,2 pe coloane de desalinizare Sephadex G-25, s-a dializat față de acest tampon utilizând o membrană cu o limită de greutate moleculară de 10 kDa și s-a filtrat printr-un filtru de seringă de 0,22 μm.

Conjugatul a avut o medie de 2,8 moli DGN549/mol anticorp prin UV-vis, 98,6% monomer prin SEC și < 0,5% DGN549 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

b. Prepararea hMAB-A(2.2)-DGN549

hMAB-A(2.2) este un anticorp umanizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:50. Anticorpul hMAB-A(2.2) a fost conjugat la DGN549 utilizând aceleași condiții ca cele descrise pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că s-au adăugat la reacție 4,4 echivalenți de DGN549-L (compusul D2). hMAB-A(2.2)-DGN549 a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549.

hMAB-A(2.2)-DGN549 purificat a avut o medie de 2,7 moli DGN549/mol anticorp prin UV-vis, 95,6% monomer prin SEC și 0,6% DGN549 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

c. Prepararea hMAB-A(2C.2)-DGN549

hMAB-A(2C.2) este un anticorp umanizat/optimizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:51.

Anticorpul hMAB-A(2C.2) a fost conjugat la DGN549 utilizând aceleași condiții ca cele descrise pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că s-au adăugat la reacție 4,9 echivalenți de DGN549-L (compusul D2). hMAB-A(2C.2)-DGN549 a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549.

hMAB-A(2C.2)-DGN549 purificat a avut o medie de 2,8 moli DGN549/mol anticorp prin UV-vis, 98,6% monomer prin SEC și < 0,6% DGN549 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

d. Prepararea chMAB-A-DGN549, chMAB-A-sSPDB-IGN137, chMAB-A-IGN23 și chMAB-A-sSPDB-DGN462

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu DGN549 utilizând aceleași condiții ca cele descrise pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că s-au adăugat la reacție 3,4 echivalenți de DGN549-L (compusul D2). chMAB-A-DGN549 a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că conjugatul a fost purificat în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu, pH 6,2. chMAB-A-DGN549 purificat a avut o medie de 2,7 moli DGN549/mol anticorp prin UV-vis, 94,4% monomer prin SEC și < 0,4% DGN549 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu IGN137 (compusul D1) prin intermediul linker-ului sulfo-SPDB astfel cum s-a descris anterior în Brevetul SUA nr. 9,381,256. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că conjugatul a fost purificat în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu, pH 6,2. Conjugatul a avut o medie de 2,9 moli IGN137/mol anticorp prin UV-vis, 88,4% monomer prin SEC și ≤ 0,4% IGN137 neconjugat prin SEC/RP-UPLC în tandem. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu IGN23 (compusul D3) astfel cum s-a descris anterior în Brevetul SUA nr. 8,426,402. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că conjugatul a fost purificat în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu, pH 6,2 și nu s-a efectuat dializă. Conjugatul a avut o medie de 3,2 moli IGN23/mol anticorp prin UV-vis, 97,9% monomer prin SEC și 1,2% IGN23 neconjugat prin analiza HPLC în fază inversă. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu DGN462 prin sulfo-SPDB astfel cum s-a descris anterior în Brevetul SUA nr. 8765740. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-DGN549, cu excepția faptului că conjugatul a fost purificat în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% sucroză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu, pH 6,2 și nu s-a efectuat dializă. Conjugatul a avut o medie de 2,8 moli DGN462/mol anticorp prin UV-vis, 95,6% monomer prin SEC și 0,5% DGN462 neconjugat prin analiză HPLC în fază inversă. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Exemplul 17.

Prepararea conjugatilor DM legați la lizină ai anticorpilor anti-ADAM9

a. Prepararea hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4

hMAB-A(2I.2) este un anticorp umanizat/optimizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:52.

Pentru a prepara conjugatul hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, s-au efectuat adaosuri de sulfo-SPDB (sSPDB) și DM4 într-un mod treptat. Mai întâi, o soluție care conține anticorp hMAB-A(2I.2) tamponat la pH 8,1 cu 50 mM acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropan-sulfonic (EPPS), 50 mM clorură de sodiu a fost amestecată cu DMA și 11,5 echivalenți de sSPDB dintr-o soluție de stoc de DMA astfel încât compoziția finală de solvent să fie de 10% (v/v) DMA și 90% (v/v) tampon apos. După ce prima etapă de reacție s-a desfășurat timp de 4 ore la 25 °C, 17,3 echivalenți de DM4 dintr-o soluție de stoc de DMA, DMA și 500 mM EPPS/500 mM tampon de clorură de sodiu pH 8,1 s-au adăugat la amestecul de reacție astfel încât compoziția finală de solvent de 10% (v/v) DMA și 90% (v/v) tampon apos să fie menținută din prima etapă de reacție. Cea de-a doua etapă de reacție a fost lăsată să se desfășoare peste noapte la 25°C.

Conjugatul s-a purificat în 10 mM succinat, 250 mM glicină, 0,5% sucroză, 0,01% Tween-20, pH 5,5 pe coloane de desalinizare Sephadex G-25, s-a dializat față de acest tampon utilizând o membrană cu o limită de greutate moleculară de 10 kDa și s-a filtrat printr-un filtru de seringă de 0,22 μm.

Conjugatul a avut o medie de 3,5 moli DM4/mol anticorp prin UV-vis, 99,2% monomer prin SEC și ≤ 1,7% DM4 neconjugat prin HPLC în mod mixt. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

b. Prepararea hMAB-A(2C.2)-sSPDB-DM4

hMAB-A(2C.2) este un anticorp umanizat/optimizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:51.

Anticorpul hMAB-A(2C.2) a fost conjugat cu DM4 prin linkerul sSPDB utilizând același procedeu ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4.

Conjugatul a avut o medie de 3,2 moli DM4/mol anticorp prin UV-vis, 98,9% monomer prin SEC și 2,6% DM4 neconjugat prin HPLC în mod mixt. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

c. Prepararea hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4

hMAB-A(2.2) este un anticorp umanizat cu o secvență de lanț ușor a SEQ ID NO:68 și o secvență de lanț greu a SEQ ID NO:50.

Anticorpul hMAB-A(2.2) a fost conjugat cu DM4 prin linkerul sSPDB utilizând același procedeu ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4. Conjugatul s-a purificat în 10 mM succinat, 250 mM glicină, 0,5% sucroză, 0,01% Tween-20, pH 5,5 utilizând un sistem de cromatografie lichidă

rapidă a proteinelor (FPLC) echipat cu coloane de desalinizare Sephadex G-25 Fine și apoi s-a filtrat printr-un filtru de seringă de 0,22 μ m

Conjugatul a avut o medie de 3,2 moli DM4/mol anticorp prin UV-vis, 97,4% monomer prin SEC și $\leq 1,1\%$ DM4 neconjugat prin HPLC în mod mixt. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

d. Prepararea chMAB-A-sSPDB-DM4 și chMAB-A-SMCC-DM1

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu DM4 prin linkerul sulfo-SPDB utilizând același procedeu ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, cu excepția faptului că 6,4 echivalenți de sSPDB și 9,6 echivalenți de DM4 s-au utilizat în respectivele etape de reacție. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, cu excepția faptului că nu s-a efectuat dializă. Conjugatul a avut o medie de 3,4 moli DM4/mol anticorp prin UV-vis, 97,0% monomer prin SEC și 4,7% DM4 neconjugat prin HPLC în mod mixt. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Anticorpul chMAB-A a fost conjugat cu DM1 prin linkerul SMCC utilizând procedee descrise anterior în Brevetul SUA nr. 8624003. Conjugatul a fost purificat în același mod ca cel descris pentru hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, cu excepția faptului că nu s-a efectuat dializă. Conjugatul a avut o medie de 3,9 moli DM1/mol anticorp prin UV-vis, 99,7% monomer prin SEC și 4,9% DM1 neconjugat prin HPLC în mod mixt. CL-SM a conjugatului deglicozilat nu este ilustrată.

Exemplul 18

Citotoxicitatea *in vitro* a conjugatilor medicamentoși cu anticorpi anti-ADAM9

Citotoxicitatea *in vitro* a diversilor imunoconjugati de anticorpi anti-ADAM9 împotriva unui panou de linii celulare care exprimă ADAM9 a fost comparată cu conjugatii IgG1 fără țintire. Mai precis, de la 500 până la 2000 celule/godeu au fost placcate în plăci cu 96 de godeuri cu 24 de ore înainte de tratament. Conjugatii s-au diluat în mediul de cultură utilizând serii de diluție de 3 ori și s-au adăugat 100 μ L per godeu. În fiecare placă de testare s-au inclus godeuri martor care conțin celule, dar care nu conțin conjugati, precum și godeuri care conțin doar mediu. Analizele au fost efectuate în triplicat pentru fiecare punct de date. Plăcile s-au incubat la 37 °C într-un incubator umidificat 5% cu CO₂ timp de 4 până la 5 zile. Apoi, s-a determinat numărul relativ de celule viabile din fiecare godeu utilizând kit-8 de contorizare celulară bazat pe WST-8 (Dojindo Molecular Technologies). S-a calculat fracțiunea aparent supraviețuitoare a celulelor din fiecare godeu mai întâi prin corectarea pentru absorbanta medie a fundalului și apoi prin împărțirea fiecărei valori la media valorilor din godeurile martor (celule netratate). Procentul de celule supraviețuitoare a fost reprezentat grafic în funcție de concentrația de conjugat și EC50 a activității a fost calculată utilizând o analiză de regresie neliniară (GraphPad Prims 4.0).

Aceste rezultate arată faptul că imunoconjugatii anti-ADAM9 pot distruge un panou larg de linii de celule tumorale pozitive la ADAM9 care includ linii de celule tumorale pulmonare, pancreatice, renale, de prostată și de colon (a se vedea FIG. 9A-9H). În fiecare caz testat, se observă o fereastră de specificitate bună, ceea ce sugerează faptul că citotoxicitatea este rezultatul legării anticorpului specific anti-ADAM9 la celulele țintă. În special, conjugatii anti-ADAM9-DGN549 (hMAB-A(2.2)-DGN549 și hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549) au fost extrem de puternici, cu valori ale IC50 cuprinse între 1 și 115 pM și au fost de ~3 ori mai active decât un conjugat IgG1 fără țintire (a se vedea Tabelul 15).

Tabelul 15

Linie celulară	Tip boală	anti-ADAM9 ADC	Citotoxicitate in vitro (IC ₅₀ nM)	Specificitate multiplicativă (marcator IC ₅₀ ADC/IC ₅₀ anti-ADAM9 ADC)
NCI-H1703	NSCLC - Celule scuamoase	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.024	152
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.028	132
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.002	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.004	>1000
HFD-1	Adenocarcinom colorectal	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	2.729	9
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.385	63
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.010	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.045	>1000
A498	Carcinom renal	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.119	27
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.108	50
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.001	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.004	>1000
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.570	25
DU145	Carcinom de prostată	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.439	32
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.002	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.004	>1000
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.622	9
HPAF2	Adenocarcinom pancreatic	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.422	13
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.043	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.115	>1000
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	4.078	3
IGROV1	Adenocarcinom ovarian	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	1.411	8
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.001	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.003	>1000
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	1.154	5
KATO III	Carcinom gastric	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.480	11
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.031	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.065	>1000
		hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.119	16
H5578T	Carcinom la sân	hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4	0.094	20
		hMAB-A(2.2)-DGN549	0.009	>1000
		hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549	0.017	646

Exemplul 19

5 Activitatea antitumorală a conjugatilor medicamentoși cu anticorpi anti-ADAM9 la șoareci SCID purtători de xenogrefe de adenocarcinom pulmonar uman cu celule non-mici Calu3

Activitatea antitumorală a diverselor doze de hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 și o doză unică de conjugat hMAB-A-DGN549 a fost evaluată la șoareci SCID femele purtătoare de celule Calu3, un model de xenogrefă subcutanată de adenocarcinom pulmonar uman.

10 Celulele Calu3 au fost recoltate pentru inoculare, cu o viabilitate de 99% determinată prin excluderea albastrului tripan. Șoarecilor le-au fost inoculate 5×10^6 celule Calu3 în 0,2 ml mediu liber 50% matrigel/50% ser prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept. Optzeci și patru de șoareci SCID femele (în vârstă de 6 săptămâni) au fost achiziționate de la Charles River Laboratories. La primire, animalele au fost observate timp de 9 zile înainte de începerea studiului. Animalele nu au

15 prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire sau înainte de tratament.

Optzeci și patru de șoareci au fost randomizați în 8 grupuri (8 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a variat de la 74,09 până la 150,21 ($106,41 \pm 18,69$, medie $\pm$ SD) mm³. Șoarecii au fost măsurați și randomizați pe baza volumului tumoral în ziua 6 post implantare.

Șoarecii au fost dozați în ziua 7 post implantare. Greutatea corporală a șoarecilor a variat de la 16,05 până la 21,72 ($18,64 \pm 1,03$, medie $\pm$ SD) grame. Șoarecii din fiecare grup au fost identificați prin metoda pumnului. Administrarea agenților de testat și a vehiculului s-a efectuat intravenos utilizând o seringă de 1,0 ml prevăzută cu un ac de $\frac{1}{2}$ inch de calibrul 27. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehicul (PBS), chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1, hMAB-A(2,2)-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg (în funcție de anticorp), qdx1, hMAB-A(2,2)-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg (în funcție de anticorp), qdx1, hMAB-A(2,2)-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg (în funcție de anticorp), qdx1 și chMAB-A-DGN549 la 10 μ g/kg (în funcție de sarcină utilă; 0,6 mg/kg în funcție de anticorp), qdx1.

Dimensiunea tumorală a fost măsurată de două ori pe săptămână în trei dimensiuni utilizând un etrier. Volumul tumoral a fost exprimat în mm^3 utilizând formula $V = \text{Lungime} \times \text{Lățime} \times \text{Înălțime} \times \frac{1}{2}$. Un șoarece a fost considerat a avea o regresie parțială (PR) atunci când volumul tumoral a fost redus cu 50% sau mai mult, regresie tumorală completă (CR) atunci când nu a putut fi detectată nicio tumoare palpabilă, iar supraviețuitorii fără tumori (TFS) reprezintă mulțimea de șoareci fără tumori la finalul studiului. Volumul tumoral și greutatea corporală au fost determinate cu software-ul StudyLog. Log_{10} distrugerea celulelor (LCK) a fost calculată cu formula $\text{LCK} = (T - C) / T_d \times 3,32$, unde $(T - C)$ sau întârzierea creșterii tumorale (TGD), este timpul mediu (în zile) pentru ca tumorile grupului de tratament și grupului martor să atingă o dimensiune predeterminată de 815 mm^3 (supraviețuitorii fără tumori sunt excluși) ¹, T_d este timpul de dublare a tumorii la șoareci (estimat din potrivirea curbei exponențiale neliniare a mediei zilnice a creșterii tumorale martor) și x este numărul de dublări celulare per log de creștere celulară. %T/C (inhibarea creșterii tumorale) este raportul dintre volumul tumoral (TV) mediu al grupului de tratament la un moment predeterminat (adică momentul în care TV mediu pentru tumorile martor atinge volumul tumoral maxim, adică $\text{TV}@ \sim 1000 \text{mm}^3$ sau atunci când tumorile au devenit necrotice, astfel că acesta este momentul în care toți șoarecii din grupul martor au ieșit din studiu) și TV mediu al martorilor la punctul final pentru martori.

Greutatea corporală a tuturor șoarecilor a fost măsurată de două ori pe săptămână ca indice aproximativ al toxicității medicamentului. Greutățile corporale (BW) ale șoarecilor au fost exprimate ca modificare procentuală a greutății corporale față de greutatea corporală anterioară tratamentului, după cum urmează: % modificare BW = $[(\text{BW post} / \text{BW pre}) - 1] \times 100$, unde BW post reprezintă greutatea după tratament și BW pre reprezintă greutatea corporală inițială înainte de tratament. Pierdere procentuală în greutate corporală (BWL) a fost exprimată ca modificarea medie a greutății corporale după tratament. Animalele au fost sacrificate atunci când volumul tumoral a fost mai mare de 1000 mm^3 sau necrozat, sau dacă greutatea corporală a scăzut cu 20% mai mult în orice moment al studiului.

Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 10. Conjugatul hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost activ la toate dozele testate. Conjugatul hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a avut o valoare a inhibării creșterii tumorale (T/C) de 39%, o valoare T-C de 17 și o valoare LCK de 0,5 la o doză de 1,25mg/kg (cu 3 regresii parțiale din 8 șoareci și regresii complete); o valoare T/C de 25%, o valoare T-C de 22 și o valoare LCK de 0,7 la 2,5mg/kg (cu 3 regresii parțiale din 8 șoareci și fără regresii complete) și o valoare T/C de 14%, o valoare T-C de 36 și o valoare LCK de 1,1 la o doză de 5mg/kg (cu 4 regresii parțiale din 8 șoareci și 1 regresie completă din 8 șoareci). chMAB-A-DGN549 a fost foarte activ la 10 μ g/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,6 mg/kg în funcție de anticorp) cu 8 regresii complete din 8 șoareci. Nu s-a observat nicio pierdere semnificativă în greutate corporală nici cu hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4, nici cu chMAB-DGN549 sau cu conjugății chKTI-sSPDB-DM4 la dozele indicate și, prin urmare, toți cei trei conjugăți au fost bine tolerați la șoareci la dozele indicate în prezentul studiu. Rezultatele arată faptul că conjugatul hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 este activ la doze diferite la acest model. Rezultatele arată, de asemenea, faptul că chMAB-A-DGN549 este puternic activ la 10 μ g/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,6 mg/kg în funcție de anticorp).

Activitatea antitumorală a diverselor doze de hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549 ca doză unică iv a fost, de asemenea, evaluată la șoareci SCID femele purtătoare de xenogrefe tumorale Calu-3, un model NSCLC. La șase zile post inoculare, șoarecii au fost randomizați în 8 grupuri ($n=8$ per grup) în funcție de volumul tumoral. Grupurile de tratament au inclus un grup martor dozat cu vehicul (PBS), conjugat hMAB-A(2.2)-S442C-DGN549 dozat la 0,5 (în funcție de sarcina utilă; 0,04 mg/kg în funcție de anticorp), 1 (în funcție de sarcina utilă; 0,08 mg/kg în funcție de anticorp), 3 (în funcție de sarcina utilă; 0,25 mg/kg în funcție de anticorp) și 10 μ g/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,8 mg/kg în funcție de anticorp) ca o doză unică iv, precum și martor fără țintire al conjugatului huKTI-S442C-DGN549 dozat la 1 (în funcție de sarcina utilă; 0,08 mg/kg în funcție de anticorp), 3 (în funcție de sarcina utilă; 0,25 mg/kg în funcție de anticorp) și 10 μ g/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,8 mg/kg în funcție de anticorp) ca o doză unică iv.

Volumele tumorale și greutatea corporală au fost măsurate astfel cum este descris anterior și rezultatele sunt ilustrate în FIG. 11. Pe scurt, hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a fost puternic activ chiar și la cea mai mică doză de 0,5μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,04 mg/kg în funcție de anticorp) și activitate puternică a fost observată la doze de 1 (în funcție de sarcina utilă; 0,08 mg/kg în funcție de anticorp), 3 (în funcție de sarcina utilă; 0,25 mg/kg în funcție de anticorp), 10μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,8 mg/kg în funcție de anticorp). Martor fără țintire, huKTI-S442C-DGN549 a fost inactiv la acest model la toate cele trei doze testate, adică 1 (în funcție de sarcina utilă; 0,08 mg/kg în funcție de anticorp), 3 (în funcție de sarcina utilă; 0,25 mg/kg în funcție de anticorp) și 10μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,8 mg/kg în funcție de anticorp). hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 0,5μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,04 mg/kg în funcție de anticorp) a avut o T/C din 7 %, cu 7/8 PR și 0/8 CR la punctul final al studiului. hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 1μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,08 mg/kg în funcție de anticorp) a avut o T/C din 2 %, cu 8/8 PR și 2/8 CR la punctul final al studiului. hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 3μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,25 mg/kg în funcție de anticorp) a avut o T/C de 0 %, cu 8/8 PR și 8/8 CR la punctul final al studiului și hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 10μg/kg (în funcție de sarcina utilă; 0,8 mg/kg în funcție de anticorp) a avut o T/C de 0 %, cu 8/8 PR și 8/8 CR la punctul final al studiului.

Atât hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 (la 0,5, 1, 3, 10μg/kg, în funcție de sarcina utilă) cât și huKTI-S442C-DGN549 (la 1, 3, 10μg/kg, în funcție de sarcina utilă) au fost bine tolerate la șoareci la toate dozele indicate în prezentul studiu. Nu s-a observat nicio pierdere semnificativă în greutate corporală cu niciunul dintre cei doi conjugați la dozele indicate. Rezultatele prezentului studiu sugerează faptul că conjugatul hMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a demonstrat o activitate antitumorală convingătoare și este foarte eficient la modelul de xenogrefă tumorală canceroasă pulmonară cu celule non-mici Calu-3.

Exemplul 20

Activitatea antitumorală a conjugatelor medicamentoase cu anticorpi anti-ADAM9 la șoareci SCID purtători de xenogrefe de carcinom pulmonar cu celule scuamoase cu celule non-mici H1703

Activitatea antitumorală a diverselor doze de conjugat hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost evaluată la șoareci SCID femele purtătoare de celule H1703, un model de xenogrefă de carcinom cu celule scuamoase NSCLC.

Celulele H1703 au fost recoltate pentru inoculare, cu o viabilitate de 100% determinată prin excluderea albastrului tripan. Șoarecilor le-au fost inoculate 5×10^6 celule H1703 în 0,2 ml mediu liber 50% matrigel/50% ser prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept. Șaptezeci și doi de șoareci nuzi femele (în vârstă de 6 săptămâni) au fost achiziționate de la Charles River Laboratories 3/24/16. La primire, animalele au fost observate timp de 8 zile înainte de începerea studiului. Animalele nu au prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire sau înainte de tratament. Optzeci și patru de șoareci au fost randomizați în 8 grupuri (6 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a variat de la 76,18 până la 159,00 ($115,19 \pm 22,08$, medie $\pm$ SD) mm³. Șoarecii au fost măsurați și randomizați pe baza volumului tumoral în ziua 19 post implantare. Șoarecii au fost dozați în ziua 20 post implantare (4/21/16). Greutatea corporală a șoarecilor a variat de la 20,20 până la 29,15 ($23,88 \pm 1,95$, medie $\pm$ SD) grame. Șoarecii din fiecare grup au fost identificați prin metoda pumnului. Administrarea agenților de testat și a vehiculului s-a efectuat intravenos utilizând o seringă de 1,0 ml prevăzută cu un ac de ½ inch de calibrul 27. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehiculul (PBS) la 150μL/șoarece, qdx1, chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1, hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg, qdx1, hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg, qdx1 și hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1.

Măsurătorile dimensiunii tumorale și ale greutății corporale au fost determinate astfel cum este descris în Exemplul 19. Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 12. hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost puternic activ la o doză mică de 2,5 mg/kg cu T/C de 6%, T-C de 28 și LCK de 1,4 (cu 3 regresii parțiale din 6 șoareci și fără regresii complete) și puternic activ la doze de 5mg/kg cu un T/C de 1%, T-C de 63 și LCK de 3,2 (cu 6 regresii parțiale din 6 șoareci, 3 regresii complete din 6 șoareci și 1 supraviețuitor fără tumoare). Conjugatul hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost inactiv la o doză de 1,25mg/kg și a avut o inhibare a creșterii tumorale (T/C) de 79%, T-C de 4 și LCK de 0,2 (cu 1 regresie parțială din 6 șoareci și fără regresii complete). Nu s-a observat nicio pierdere semnificativă în greutate corporală nici cu hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4, nici cu conjugații chKTI-sSPDB-DM4 la dozele indicate și, prin urmare, ambii conjugați au fost bine tolerați la șoareci la dozele indicate în prezentul studiu. Rezultatele arată faptul că conjugatul hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 este puternic activ la doze mici de 2,5 mg/kg la acest model.

Exemplul 21**Activitatea antitumorală a conjugatilor medicamentoși cu anticorpi anti-ADAM9 la șoarecii SCID purtători de carcinom cu celule scuamoase Detroit562 al xenogrefelor de cap și gât**

Activitatea antitumorală a diverselor doze de conjugati chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost evaluată la șoarecii femele cu imunodeficiență CD-1 purtătoare de celule Detroit562, un model de xenogrefă de carcinom faringian.

Șoarecii (în vârstă de 6 săptămâni) au fost achiziționați de la Charles River Laboratories 7/1/14. La primire, animalele au fost observate timp de 15 zile înainte de începerea studiului. Animalele nu au prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire sau înainte de începerea studiului. Celulele Detroit562 au fost recoltate pentru inoculare, cu o viabilitate mai mare de 90% determinată prin excluderea albastrului tripan. Șoarecilor le-au fost inoculate 5×10^6 celule Detroit562 în 0,2 ml mediu liber 50% matrigel/50% ser prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept.

Patruzeci și doi de șoareci au fost randomizați în 6 grupuri (7 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a variat de la 95,76 până la 450,83 mm³. Șoarecii au fost măsurați și randomizați pe baza volumului tumoral în ziua 26 post implantare. Administrarea agenților de testat și a vehiculului s-a efectuat în ziua următoare randomizării (Zi de studiu 0) prin injecție intraperitoneală utilizând o seringă de 1,0 ml prevăzută cu un ac de ½ inch de calibrul 27. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehicul (PBS), chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1, chKTI-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg, qdx1, chMAB-A-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1, chMAB-A-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg, qdx1, chMAB-A-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg, qdx1.

Măsurătorile dimensiunii tumorale și ale greutatei corporale au fost determinate astfel cum este descris în Exemplul 19. Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 13. Pe scurt, chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost activ la toate cele 3 niveluri de doză testate (5, 2,5 și 1,25 mg/kg) pe parcursul studiului. chMAB-A-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg a avut o T/C de 32%, și 6/7 PR și 1/7 CR la punctul final al studiului. chMAB-A-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg a avut o T/C de 27%, și 6/7 PR și 2/7 CR la punctul final al studiului. chMAB-A-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg a avut o T/C de 37% și 5/7 PR și 0/7 CR la punctul final al studiului. chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg a avut o T/C de 89% și 3/7 PR și 0/7 CR la punctul final al studiului. chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg a avut o T/C de 80% și 3/7 PR și 1/7 CR la punctul final al studiului.

chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost bine tolerat la șoareci la toate dozele examinate în prezentul studiu. Nu s-a observat o pierdere semnificativă în greutate corporală la dozele indicate. Rezultatele prezentului studiu sugerează faptul că conjugatul chMAB-A-sSPDB-DM4 demonstrează activitate antitumorală și este eficient la modelul de xenogrefă tumorală de carcinom faringian Detroit562.

Într-un al doilea studiu, activitatea antitumorală a diverselor doze de conjugati chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost evaluată la șoarecii femele cu imunodeficiență CD-1 purtătoare de xenogrefe tumorale Detroit562 de volum mai mare.

Șoarecii (în vârstă de 5 săptămâni) au fost achiziționați de la Charles River Laboratories 9/17/14. La primire, animalele au fost observate timp de 7 zile înainte de începerea studiului. Animalele nu au prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire sau înainte de începerea studiului. Celulele Detroit562 au fost recoltate pentru inoculare, cu o viabilitate mai mare de 90% determinată prin excluderea albastrului tripan. Șoarecilor le-au fost inoculate 5×10^6 celule Detroit562 în 0,2 ml mediu liber 50% matrigel/50% ser prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept.

Optsprezece șoareci au fost randomizați în 3 grupuri (6 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a fost cuprins între 277,51 și 503,49 mm³. Șoarecii au fost măsurați și randomizați pe baza volumului tumoral în ziua 35 post implantare. Administrarea agenților de testat și a vehiculului s-a efectuat în ziua următoare randomizării (Zi de studiu 1) prin injecție intraperitoneală utilizând o seringă de 1,0 ml prevăzută cu un ac de ½ inch de calibrul 27. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehicul (PBS), chMAB-A-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, qdx1 și chMAB-A-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg, qdx1.

Măsurătorile dimensiunii tumorale și ale greutatei corporale au fost determinate astfel cum este descris în Exemplul 19. Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 14. Pe scurt, chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost activ la cele 2 niveluri de doză testate (5 și 1,25 mg/kg) pe parcursul studiului. chMAB-A-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg a avut o T/C de 3%, și 6/6 PR și 1/7 CR la punctul final al studiului. chMAB-A-sSPDB-DM4 la 1,25 mg/kg a avut o T/C de 14%, și 6/6 PR și 0/7 CR la punctul final al studiului.

chMAB-A-sSPDB-DM4 a fost bine tolerat de șoareci la ambele doze examinate în prezentul studiu. Nu s-a observat o pierdere semnificativă în greutate corporală la dozele indicate. Rezultatele prezentului studiu sugerează faptul că conjugatul chMAB-A-sSPDB-DM4 demonstrează activitate antitumorală și este eficient la modelul de xenogrefă tumorală de carcinom faringian Detroit562 cu volum mai mare.

Exemplul 22

Activitatea antitumorală a conjugatilor medicamentoși cu anticorpi anti-ADAM9 la șoareci nuzi purtători de xenogrefe de carcinom gastric SNU-5

Activitatea antitumorală a diverselor doze de huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 și o doză unică de conjugat huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a fost evaluată la șoareci femele nude purtătoare de celule Snu-5, un model de xenogrefă de carcinom gastric uman.

Celulele Snu-5 au fost recoltate pentru inoculare, cu o viabilitate de 100% determinată prin excluderea albastrului tripan. Șoarecilor le-au fost inoculate 5×10^6 celule Snu-5 în 0,1 ml mediu liber 50% matrigel/50% ser prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept. Cincizeci și șase de șoareci nude femele (în vârstă de 6 săptămâni) au fost achiziționate de la Charles River Laboratories 1/25/17. La primire, animalele au fost observate timp de 8 zile înainte de începerea studiului. Animalele nu au prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire sau înainte de tratament.

Cincizeci și șase de șoareci au fost randomizați în 7 grupuri (8 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a variat de la 76,29 până la 129,12 ($130,58 \pm 13,28$, medie $\pm$ SD) mm^3 . Șoarecii au fost măsurați și randomizați pe baza volumului tumoral în ziua 13 post implantare. Șoarecii au fost dozați în ziua 14 post implantare (2/17/17). Greutatea corporală a șoarecilor a variat de la 19,50 până la 26,35 ($22,69 \pm 1,40$, medie $\pm$ SD) grame. Șoarecii din fiecare grup au fost identificați prin metoda pumnului. Administrarea agenților de testat și a vehiculului s-a efectuat intravenos utilizând o seringă de 1,0 ml prevăzută cu un ac de $\frac{1}{2}$ inch de calibrul 27. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehicul (PBS), chKTI-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 2,5 mg/kg, huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, huKTI-S442C-DGN549 la 10 $\mu\text{g/kg}$, huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 3 $\mu\text{g/kg}$ și huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 10 $\mu\text{g/kg}$.

Dimensiunea tumorală a fost măsurată de două ori pe săptămână în trei dimensiuni utilizând un etrier. Volumul tumoral a fost exprimat în mm^3 utilizând formula $V = \text{Lungime} \times \text{Lățime} \times \text{Înălțime} \times \frac{1}{2}$. Un șoarece a fost considerat a avea o regresie parțială (PR) atunci când volumul tumoral a fost redus cu 50% sau mai mult, regresie tumorală completă (CR) atunci când nu a putut fi detectată nicio tumoare palpabilă, iar supraviețuitorii fără tumori (TFS) reprezintă mulțimea de șoareci fără tumori la finalul studiului. Volumul tumoral și greutatea corporală au fost determinate cu software-ul StudyLog. Log_{10} distrugerea celulelor (LCK) a fost calculată cu formula $\text{LCK} = (T - C) / T_d \times 3,32$, unde $(T - C)$ sau întârzierea creșterii tumorale (TGD), este timpul mediu (în zile) pentru ca tumorile grupului de tratament și grupului martor să atingă o dimensiune predeterminată de 798 mm^3 (supraviețuitorii fără tumori sunt excluși) ¹, T_d este timpul de dublare a tumorii la șoareci (estimat din potrivirea curbei exponențiale neliniare a mediei zilnice a creșterii tumorale martor) și x este numărul de dublări celulare per log de creștere celulară. %T/C (inhibarea creșterii tumorale) este raportul dintre volumul tumoral (TV) mediu al grupului de tratament la un moment predeterminat (adică momentul în care TV mediu pentru tumorile martor atinge volumul tumoral maxim, adică $\text{TV}@ \sim 1000 \text{ mm}^3$ sau atunci când tumorile au devenit necrotice, astfel că acesta este momentul în care toți șoarecii din grupul martor au ieșit din studiu) și TV mediu al martorilor la punctul final pentru martori.

Greutatea corporală a tuturor șoarecilor a fost măsurată de două ori pe săptămână ca indice aproximativ al toxicității medicamentului. Greutățile corporale (BW) ale șoarecilor au fost exprimate ca modificare procentuală a greutății corporale față de greutatea corporală anterioară tratamentului, după cum urmează: % modificare BW = $[(\text{BW post} / \text{BW pre}) - 1] \times 100$, unde BW post reprezintă greutatea după tratament și BW pre reprezintă greutatea corporală inițială înainte de tratament. Pierdere procentuală în greutate corporală (BWL) a fost exprimată ca modificarea medie a greutății corporale după tratament. Animalele au fost sacrificate atunci când volumul tumoral a fost mai mare de 1000 mm^3 sau necrozat, sau dacă greutatea corporală a scăzut cu 20% mai mult în orice moment al studiului.

Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 15 și FIG. 16. Conjugatul huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost puternic activ la ambele doze testate. Conjugatul huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a avut o valoare a inhibării creșterii tumorale (T/C) de 5%, la doza de 2,5 mg/kg (cu 8 regresii parțiale din 8 șoareci și 2 regresii complete); o valoare T/C de 1%, 5 mg/kg (cu 8 regresii parțiale din 8 șoareci și 6

regresii complete). huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a fost puternic activ la ambele doze testate. Conjugatul huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a avut o valoare (T/C) de 7%, la o doză de 3 µg/kg (cu 8 regresii parțiale din 8 șoareci și 4 regresii complete); o valoare T/C de 4%, 5 mg/kg (cu 8 regresii parțiale din 8 șoareci și 5 regresii complete). Nu s-a observat nicio pierdere semnificativă în greutate corporală nici cu huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4, nici cu huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 sau cu conjugatii chKTI-sSPDB-DM4 sau huKTI-S442C-DGN549 la dozele indicate și, prin urmare, toți conjugatii au fost bine tolerați la șoareci la dozele indicate în prezentul studiu.

Exemplul 23

Activitatea antitumorală a conjugatilor medicamentoși cu anticorpi anti-ADAM9 la șoareci purtători de xenogrefe de linie celulară de cancer colorectal SW48

Activitatea antitumorală a diverselor doze de conjugatii hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 și huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN649 a fost evaluată la șoareci femele nude purtătoare de celule SW48, un model de xenogrefă de linie celulară de cancer colorectal.

Celulele SW48 au fost recoltate pentru inoculare. Șoarecii au fost inoculați cu celule SW48 prin injectare subcutanată în zona flancului posterior drept. Animalele nu au prezentat semne de boală sau îmbolnăvire la sosire din laboratoare sau înainte de tratament.

Patruzeci și doi de șoareci au fost randomizați în 7 grupuri (6 șoareci per grup) în funcție de volumul tumoral. Volumul tumoral a variat de la 89 până la 169 mm³. Șoarecii au fost măsurați, randomizați și dozați pe baza volumului tumoral în ziua 17 post implantare. Șoarecii din fiecare grup au fost identificați prin crotalii. Administrarea agenților de testat și a vehiculului a fost efectuată intravenos. Grupurile au inclus: un grup martor dozat cu vehicul (PBS), chKTI-sSPDB-DM4 la 10 mg/kg, huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 5 mg/kg, huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 la 10 mg/kg, huKTI-S442C-DGN549 la 5µg/kg, huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 2,5 µg/kg și huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 la 5µg/kg.

Măsurătorile dimensiunii tumorale și ale greutății corporale au fost determinate astfel cum este descris în Exemplul 22. Rezultatele studiului sunt ilustrate în FIG. 17 și FIG. 18. Conjugatul huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a fost activ la ambele doze testate. Conjugatul huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 a avut o valoare a inhibării creșterii tumorale (T/C) de 13%, la o doză de 5mg/kg (fără regresii parțiale sau complete); o valoare a T/C de 5%, 10mg/kg (cu 6 regresii parțiale din 6 șoareci). huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a fost activ la o doză de 5µg/kg și inactiv la o doză de 2,5µg/kg testată. Conjugatul huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 a avut o valoare a (T/C) de 92%, la o doză de 2,5µg/kg; o valoare a T/C de 41%, 5µg/kg (cu 2 regresii parțiale din 6 șoareci). Nu s-a observat nicio pierdere semnificativă în greutate corporală nici cu huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4, nici cu huMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549 sau cu conjugatii chKTI-sSPDB-DM4 sau huKTI-S442C-DGN549 la dozele indicate și, prin urmare, toți conjugatii au fost bine tolerați la șoareci la dozele indicate în prezentul studiu (necesită confirmare cu MGNX).

Exemplul 24

Extinderea expunerii conjugatilor maitansinoizi cu anticorpi anti-ADAM9 prin îmbunătățirea legării FcRn

Pentru a maximiza potențialul conjugatilor maitansinoizi cu anticorpi anti-ADAM9 de a determina eficacitatea, au fost introduse substituții M252Y, S254T și T256E ("mutația YTE") în regiunea Fc a anticorpilor anti-ADAM9, hMAB-A(2I.2) și hMAB-A(2I.2)-S442C, pentru a extinde expunerea conjugatilor medicamentoși cu anticorpi prin îmbunătățirea legării FcRn. FcRn joacă un rol major în menținerea nivelurilor serice de IgG. IgG care sunt endocitate nespecific se leagă la FcRn în endozom datorită unei interacțiuni dependente de pH. IgG legată la FcRn este apoi sortată în endozomi de reciclare și transportată înapoi la suprafața celulară unde IgG este eliberată datorită pH-ului neutru. Îmbunătățirea legării FcRn poate îmbunătăți sortarea și farmacocinetica.

Conjugatul hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 a fost preparat astfel cum este detaliat în Exemplul 17a. Conjugatul hMAB-A(2I.2)-S442C-YTE-sSPDB-DM4 a fost preparat astfel cum s-a descris anterior în Publicația PCT nr. WO2017/004025. Astfel cum se observă în Figurile 19A și 19B, mutația YTE a crescut afinitatea de legare și aviditatea anticorpului hMAB-A(2I.2) la FcRn uman și de cyno. În plus, conjugatul hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 a prezentat activitate similară in vitro și in vivo în NCI-H1703, SNU5 și Calu3 ca și în conjugatul parental hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4.

PK de cynomolgus și studii de tolerabilitate au fost efectuate pentru a caracteriza tolerabilitatea și profilul farmacocinetic al conjugatului hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 în comparație cu conjugatul parental hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4. Ambii conjugatii au fost administrați sub formă de perfuzii IV de

10 minute la masculi de maimuță cynomolgus în doze de 4 și 12 mg/kg (doză de anticorpi) pentru a evalua atât profilul PK, cât și tolerabilitatea acută. În plus, anticorpii nuzi, hMAB-A(2I.2) și hMAB-A(2I.2)-YTE, au fost administrați masculilor de maimuțe cynomolgus în doză de 4 mg/kg pentru a aborda efectele potențiale ale conjugării asupra parametrilor PK. Sângele a fost recoltat pe parcursul a 28 de zile pentru a permite măsurarea concentrațiilor ADC, a anticorpilor totali și a încărcăturii libere. Tolerabilitatea a fost determinată pe baza supraviețuirii, observațiilor clinice, greutateii corporale și patologiei clinice.

Astfel cum se observă în Figurile 20, datele PK de cynomolgus ale conjugatului hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 în comparație cu conjugatul parental au arătat faptul că mutația YTE a crescut expunerea în comparație cu conjugatul parental. În plus, datele PK de cynomolgus ale anticorpului nud hMAB-A(2I.2) și anticorpului hMAB-A(2I.2)-YTE au arătat faptul că conjugarea are un efect minim asupra parametrilor PK și că mutația YTE îmbunătățește atât anticorpul nud, cât și parametrii PK ai conjugatului. În plus, conjugatii hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 și hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4 au fost bine tolerați până la o doză de 12 mg/kg cu observații clinice cutanate minime și efecte dependente de doză asupra parametrilor hematologici.

Deși invenția a fost descrisă în legătură cu variante specifice de realizare a acesteia, se va înțelege faptul că aceasta poate suporta modificări suplimentare care se încadrează în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> IMMUNOGEN, INC. MACROGENICS, INC.
 <120> IMUNOCONJUGAȚI CARE ȚINTESC ADAM9 ȘI PROCEDEE DE UTILIZARE A ACESTORA
 <130> 121162-03920
 <140>
 <141>
 <150> 62/480.201 <151> 2017-03-31
 <150> 62/438.488 <151> 2016-12-23
 <160> 154
 <170> PatentIn versiune 3.5
 <210> 1
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> VARIANTĂĂ
 <222> (217)..(217)
 <223> /înlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

5

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10

<221> VARIANTĂĂ

<222> (216)..(216)

<223> /înlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

15

<222> (1)..(216)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

5

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10

<221> VARIANTĂĂ

<222> (217)..(217)

<223> /inlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

15

<222> (1)..(217)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
variantele de poziții"

<400> 3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 4

<211> 217

5 <212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTĂĂ

<222> (217)..(217)

10 <223> /inlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

15 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 4

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195

200

205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

5

<210> 5

<211> 819

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Ser Gly Ala Arg Phe Pro Ser Gly Thr Leu Arg Val Arg Trp
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Gly Pro Val Leu Gly Ala Ala Arg Pro
 20 25 30

Gly Phe Gln Gln Thr Ser His Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Ile Thr Pro
 35 40 45

Trp Arg Leu Thr Arg Glu Arg Arg Glu Ala Pro Arg Pro Tyr Ser Lys
 50 55 60

Gln Val Ser Tyr Val Ile Gln Ala Glu Gly Lys Glu His Ile Ile His
 65 70 75 80

Leu Glu Arg Asn Lys Asp Leu Leu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Thr
 85 90 95

Tyr Asn Lys Glu Gly Thr Leu Ile Thr Asp His Pro Asn Ile Gln Asn
 100 105 110

His Cys His Tyr Arg Gly Tyr Val Glu Gly Val His Asn Ser Ser Ile
 115 120 125

Ala Leu Ser Asp Cys Phe Gly Leu Arg Gly Leu Leu His Leu Glu Asn
 130 135 140

Ala Ser Tyr Gly Ile Glu Pro Leu Gln Asn Ser Ser His Phe Glu His
 145 150 155 160

Ile Ile Tyr Arg Met Asp Asp Val Tyr Lys Glu Pro Leu Lys Cys Gly
 165 170 175

Val Ser Asn Lys Asp Ile Glu Lys Glu Thr Ala Lys Asp Glu Glu Glu
 180 185 190

Glu Pro Pro Ser Met Thr Gln Leu Leu Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu
 195 200 205

```

Pro Gln Thr Arg Tyr Val Glu Leu Phe Ile Val Val Asp Lys Glu Arg
210                215                220

Tyr Asp Met Met Gly Arg Asn Gln Thr Ala Val Arg Glu Glu Met Ile
225                230                235                240

Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Ser Met Tyr Ile Met Leu Asn Ile Arg
                245                250                255

Ile Val Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Thr Asn Gly Asn Leu Ile Asn
                260                265                270

Ile Val Gly Gly Ala Gly Asp Val Leu Gly Asn Phe Val Gln Trp Arg
                275                280                285

Glu Lys Phe Leu Ile Thr Arg Arg Arg His Asp Ser Ala Gln Leu Val
290                295                300

Leu Lys Lys Gly Phe Gly Gly Thr Ala Gly Met Ala Phe Val Gly Thr
305                310                315                320

Val Cys Ser Arg Ser His Ala Gly Gly Ile Asn Val Phe Gly Gln Ile
                325                330                335

Thr Val Glu Thr Phe Ala Ser Ile Val Ala His Glu Leu Gly His Asn
                340                345                350

Leu Gly Met Asn His Asp Asp Gly Arg Asp Cys Ser Cys Gly Ala Lys
355                360                365

Ser Cys Ile Met Asn Ser Gly Ala Ser Gly Ser Arg Asn Phe Ser Ser
370                375                380

Cys Ser Ala Glu Asp Phe Glu Lys Leu Thr Leu Asn Lys Gly Gly Asn
385                390                395                400

Cys Leu Leu Asn Ile Pro Lys Pro Asp Glu Ala Tyr Ser Ala Pro Ser
                405                410                415

Cys Gly Asn Lys Leu Val Asp Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Thr
                420                425                430

Pro Lys Glu Cys Glu Leu Asp Pro Cys Cys Glu Gly Ser Thr Cys Lys
435                440                445

Leu Lys Ser Phe Ala Glu Cys Ala Tyr Gly Asp Cys Cys Lys Asp Cys

```

450					455					460						
Arg	Phe	Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Cys	
465					470					475					480	
Asp	Val	Pro	Glu	Tyr	Cys	Asn	Gly	Ser	Ser	Gln	Phe	Cys	Gln	Pro	Asp	
				485					490					495		
Val	Phe	Ile	Gln	Asn	Gly	Tyr	Pro	Cys	Gln	Asn	Asn	Lys	Ala	Tyr	Cys	
			500					505					510			
Tyr	Asn	Gly	Met	Cys	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Gln	Cys	Gln	Val	Ile	Phe	
		515					520					525				
Gly	Ser	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Cys	Phe	Ile	Glu	Val	Asn	
	530						535				540					
Ser	Lys	Gly	Asp	Arg	Phe	Gly	Asn	Cys	Gly	Phe	Ser	Gly	Asn	Glu	Tyr	
545					550					555					560	
Lys	Lys	Cys	Ala	Thr	Gly	Asn	Ala	Leu	Cys	Gly	Lys	Leu	Gln	Cys	Glu	
				565					570					575		
Asn	Val	Gln	Glu	Ile	Pro	Val	Phe	Gly	Ile	Val	Pro	Ala	Ile	Ile	Gln	
			580					585					590			
Thr	Pro	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Cys	Trp	Gly	Val	Asp	Phe	Gln	Leu	Gly	
		595					600					605				
Ser	Asp	Val	Pro	Asp	Pro	Gly	Met	Val	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Cys	Gly	
	610					615					620					
Ala	Gly	Lys	Ile	Cys	Arg	Asn	Phe	Gln	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Val	Leu	
625					630					635					640	
Asn	Tyr	Asp	Cys	Asp	Val	Gln	Lys	Lys	Cys	His	Gly	His	Gly	Val	Cys	
			645						650					655		
Asn	Ser	Asn	Lys	Asn	Cys	His	Cys	Glu	Asn	Gly	Trp	Ala	Pro	Pro	Asn	
			660					665					670			
Cys	Glu	Thr	Lys	Gly	Tyr	Gly	Gly	Ser	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	
		675					680					685				
Asn	Glu	Met	Asn	Thr	Ala	Leu	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Val	Phe	Phe	Phe	
	690					695					700					

Leu Ile Val Pro Leu Ile Val Cys Ala Ile Phe Ile Phe Ile Lys Arg
705 710 715 720

Asp Gln Leu Trp Arg Ser Tyr Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Thr Tyr
725 730 735

Glu Ser Asp Gly Lys Asn Gln Ala Asn Pro Ser Arg Gln Pro Gly Ser
740 745 750

Val Pro Arg His Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Arg Glu Val Pro Ile
755 760 765

Tyr Ala Asn Arg Phe Ala Val Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Gln Pro Gln
770 775 780

Gln Phe Pro Ser Arg Pro Pro Pro Pro Gln Pro Lys Val Ser Ser Gln
785 790 795 800

Gly Asn Leu Ile Pro Ala Arg Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Tyr Ser
805 810 815

Ser Leu Thr

<210> 6

<211> 819

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 6

Met Gly Ser Gly Val Gly Ser Pro Ser Gly Thr Leu Arg Val Arg Trp
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Gly Pro Val Leu Gly Ala Ala Arg Pro
20 25 30

Gly Phe Gln Gln Thr Ser His Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Ile Thr Pro
35 40 45

Trp Arg Leu Thr Arg Glu Arg Arg Glu Ala Pro Arg Pro Tyr Ser Lys
50 55 60

Gln Val Ser Tyr Leu Ile Gln Ala Glu Gly Lys Glu His Ile Ile His
65 70 75 80

Leu Glu Arg Asn Lys Asp Leu Leu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Thr
85 90 95

Tyr Asn Lys Glu Gly Thr Val Ile Thr Asp His Pro Asn Ile Gln Asn

MD/EP 3558391 T2 2022.05.31

130

100					105					110					
His	Cys	His	Phe	Arg	Gly	Tyr	Val	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val
	115						120					125			
Ala	Leu	Ser	Asn	Cys	Phe	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	His	Leu	Glu	Asn
	130					135					140				
Ala	Ser	Tyr	Gly	Ile	Glu	Pro	Leu	Gln	Asn	Ser	Ser	His	Phe	Glu	His
145					150					155					160
Ile	Ile	Tyr	Arg	Met	Asp	Asp	Val	His	Lys	Glu	Pro	Leu	Lys	Cys	Gly
				165					170					175	
Val	Ser	Asn	Lys	Asp	Ile	Glu	Lys	Glu	Thr	Thr	Lys	Asp	Glu	Glu	Glu
			180					185					190		
Glu	Pro	Pro	Ser	Met	Thr	Gln	Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Val	Leu
		195					200						205		
Pro	Gln	Thr	Arg	Tyr	Val	Glu	Leu	Phe	Ile	Val	Val	Asp	Lys	Glu	Arg
	210					215					220				
Tyr	Asp	Met	Met	Gly	Arg	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Glu	Glu	Met	Ile
225					230				235						240
Leu	Leu	Ala	Asn	Tyr	Leu	Asp	Ser	Met	Tyr	Ile	Met	Leu	Asn	Ile	Arg
			245						250					255	
Ile	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Glu	Ile	Trp	Thr	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Asn
			260					265					270		
Ile	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Gly	Asn	Phe	Val	Gln	Trp	Arg
	275						280					285			
Glu	Lys	Phe	Leu	Ile	Thr	Arg	Arg	Arg	His	Asp	Ser	Ala	Gln	Leu	Val
	290					295					300				
Leu	Lys	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	Phe	Val	Gly	Thr
305					310					315					320
Val	Cys	Ser	Arg	Ser	His	Ala	Gly	Gly	Ile	Asn	Val	Phe	Gly	His	Ile
				325					330					335	
Thr	Val	Glu	Thr	Phe	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	His	Glu	Leu	Gly	His	Asn
			340					345					350		

Leu Gly Met Asn His Asp Asp Gly Arg Asp Cys Ser Cys Gly Ala Lys
 355 360 365
 Ser Cys Ile Met Asn Ser Gly Ala Ser Gly Ser Arg Asn Phe Ser Ser
 370 375 380
 Cys Ser Ala Glu Asp Phe Glu Lys Leu Thr Leu Asn Lys Gly Gly Asn
 385 390 395 400
 Cys Leu Leu Asn Ile Pro Lys Pro Asp Glu Ala Tyr Ser Ala Pro Ser
 405 410 415
 Cys Gly Asn Lys Leu Val Asp Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Thr
 420 425 430
 Pro Lys Glu Cys Glu Leu Asp Pro Cys Cys Glu Gly Ser Thr Cys Lys
 435 440 445
 Leu Lys Ser Phe Ala Glu Cys Ala Tyr Gly Asp Cys Cys Lys Asp Cys
 450 455 460
 Arg Phe Leu Pro Gly Gly Thr Leu Cys Arg Gly Lys Thr Ser Glu Cys
 465 470 475 480
 Asp Val Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Gln Phe Cys Gln Pro Asp
 485 490 495
 Val Phe Ile Gln Asn Gly Tyr Pro Cys Gln Asn Asn Lys Ala Tyr Cys
 500 505 510
 Tyr Asn Gly Met Cys Gln Tyr Tyr Asp Ala Gln Cys Gln Val Ile Phe
 515 520 525
 Gly Ser Lys Ala Lys Ala Ala Pro Lys Asp Cys Phe Ile Glu Val Asn
 530 535 540
 Ser Lys Gly Asp Arg Phe Gly Asn Cys Gly Phe Ser Gly Asn Glu Tyr
 545 550 555 560
 Lys Lys Cys Ala Thr Gly Asn Ala Leu Cys Gly Lys Leu Gln Cys Glu
 565 570 575
 Asn Val Gln Glu Ile Pro Val Phe Gly Ile Val Pro Ala Ile Ile Gln
 580 585 590
 Thr Pro Ser Arg Gly Thr Lys Cys Trp Gly Val Asp Phe Gln Leu Gly
 595 600 605

Ser Asp Val Pro Asp Pro Gly Met Val Asn Glu Gly Thr Lys Cys Gly
610 615 620

Ala Asp Lys Ile Cys Arg Asn Phe Gln Cys Val Asp Ala Ser Val Leu
625 630 635 640

Asn Tyr Asp Cys Asp Ile Gln Lys Lys Cys His Gly His Gly Val Cys
645 650 655

Asn Ser Asn Lys Asn Cys His Cys Glu Asn Gly Trp Ala Pro Pro Asn
660 665 670

Cys Glu Thr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Thr Tyr
675 680 685

Asn Glu Met Asn Thr Ala Leu Arg Asp Gly Leu Leu Val Phe Phe Phe
690 695 700

Leu Ile Val Pro Leu Ile Val Cys Ala Ile Phe Ile Phe Ile Lys Arg
705 710 715 720

Asp Gln Leu Trp Arg Arg Tyr Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Thr Tyr
725 730 735

Glu Ser Asp Gly Lys Asn Gln Ala Asn Pro Ser Arg Gln Pro Val Ser
740 745 750

Val Pro Arg His Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Arg Glu Val Pro Ile
755 760 765

Tyr Ala Asn Arg Phe Pro Val Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Gln Pro Gln
770 775 780

Gln Phe Pro Ser Arg Pro Pro Pro Pro Gln Pro Lys Val Ser Ser Gln
785 790 795 800

Gly Asn Leu Ile Pro Ala Arg Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Tyr Ser
805 810 815

Ser Leu Thr

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

10 <400> 8

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 9

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

20 <400> 9

Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 10

30 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 111

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Poli-peptidă sintetică"
 <400> 11
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 12
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 12
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 25 <400> 13
 Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 14
 Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 123

```

<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
<220>
<221> VARIANTĂ
<222> (34)..(34)
<223> /înlocuire="Ile"
10 <220>
<221> VARIANTĂ
<222> (55)..(55)
<223> /înlocuire="Phe"
<220>
15 <221> VARIANTĂ
<222> (63)..(63)
<223> /înlocuire="Arg"
<220>
<221> VARIANTĂ
20 <222> (65)..(65)
<223> /înlocuire="Gln"
<220>
<221> VARIANTĂ
<222> (66)..(66)
25 <223> /înlocuire="Gly"
<220>
<221> VARIANTĂ
<222> (105)..(105)
<223> /înlocuire="Phe" sau "Tyr" sau "Trp" sau "Ile" sau "Leu" "Val" sau "Thr" sau "Gly" sau "Asp"
30 <220>
<221> VARIANTĂ
<222> (106)..(106)
<223> /înlocuire="Arg" sau "Asn" sau "His" sau "Gly" sau "Ser"
<220>
35 <221> VARIANTĂ
<222> (107)..(107)
<223> /înlocuire="Met" sau "Ser" sau "Lys" sau "Asn"
<220>
<221> VARIANTĂ
40 <222> (108)..(108)
<223> /înlocuire="Ala"
<220>
<221> VARIANTĂ
<222> (109)..(109)
45 <223> /înlocuire="Phe" sau "Thr" sau "Val"
<220>
<221> VARIANTĂ
<222> (110)..(110)
<223> /înlocuire="Leu" sau "Lys"
50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(123)
<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
variantele de poziții"
55 <220>
<221> sursă
<223> /notă="A se vedea specificația astfel cum este depusă pentru descrierea detaliată a substituțiilor și
a variantelor de realizare preferate"
<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
60 1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Lys Phe Gly Trp Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 17

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Met	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
			100					105						110	

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120			

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

15 <211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 20

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	

Leu	Gln	Met	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Ser	Gly	Thr	Leu	Asp	Tyr
			100					105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120			

<210> 21

<211> 123

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ile Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

15 <211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 23

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Met	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Lys	Gly	Val	Leu	Asp	Tyr
			100						105				110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120			

<210> 24

<211> 123

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Asn Ala Val Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe His Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

5

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Lys Ala Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 27
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

15

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Val Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 123

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 30
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 31
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 25 1 5 10

 <210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 32
 Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 33
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 33
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 34
 20 Ser Tyr Trp Ile His
 1 5

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 35
 Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

30 Ser
 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 36
 Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 40 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 45 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 37
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 38
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ile Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
 1 5 10
 10 <210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 39
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr
 1 5 10
 20 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 40
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Thr Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
 1 5 10
 30 <210> 41
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 41
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Asn Ala Val Leu Asp Tyr
 1 5 10
 40 <210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 42
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe His Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 45 1 5 10
 <210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 43
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Lys Ala Val Leu Asp Tyr
 1 5 10
 55 <210> 44
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 44
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Val Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 45
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 46
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 25 1 5 10
 <210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 35 <222> (4)..(4)
 <223> /înlocuire="Ile"
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 40 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 47
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 45 <210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 50 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (6)..(6)
 55 <223> /înlocuire="Phe"
 <220>
 <221> VARIANTĂ

<222> (14)..(14)
 <223> /inlocuire="Arg"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 5 <222> (16)..(16)
 <223> /inlocuire="Gln"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 10 <222> (17)..(17)
 <223> /inlocuire="Gly"
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 15 variantele de poziții"
 <400> 48
 Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 49
 20 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (7)..(7)
 <223> /inlocuire="Phe" sau "Tyr" sau "Trp" sau "Ile" sau "Leu" "Val" sau "Thr" sau "Gly" sau "Asp"
 30 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (8)..(8)
 <223> /inlocuire="Arg" sau "Asn" sau "His" sau "Gly" sau "Ser"
 <220>
 35 <221> VARIANTĂ
 <222> (9)..(9)
 <223> /inlocuire="Met" sau "Ser" sau "Lys" sau Asn"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 40 <222> (10)..(10)
 <223> /inlocuire="Ala"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (11)..(11)
 45 <223> /inlocuire="Phe" sau "Thr" sau "Val"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (12)..(12)
 <223> /inlocuire="Leu" sau "Lys"
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 55 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="A se vedea specificația astfel cum este depusă pentru descrierea detaliată a substituțiilor și
 a variantelor de realizare preferate"

<400> 49
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Lys Phe Gly Trp Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 453
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 10 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (453)..(453)
 <223> /înlocuire=" "
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(453)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 20

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290

295

300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 51

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

10 <221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /înlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 52

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <220>

<221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /inlocuire="

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val 195 200 205		
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys 210 215 220		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 225 230 235 240		
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245 250 255		
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val 260 265 270		
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 275 280 285		
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 290 295 300		
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310 315 320		
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala 325 330 335		
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340 345 350		
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln 355 360 365		
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370 375 380		
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390 395 400		
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405 410 415		
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420 425 430		
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 435 440 445		
Leu Ser Pro Gly Lys 450		

<210> 53
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 5 <221> VARIANTĂ
 <222> (24)..(24)
 <223> /înlocuire="Arg"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 10 <222> (32)..(32)
 <223> /înlocuire="Ser"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (37)..(37)
 15 <223> /înlocuire="Leu"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (96)..(96)
 <223> /înlocuire="Tyr"
 20 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (97)..(97)
 <223> /înlocuire="Ser"
 <220>
 25 <221> VARIANTĂ
 <222> (98)..(98)
 <223> /înlocuire="Thr"
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (1)..(111)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 53
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 35 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 54
 <211> 111
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 55

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 56

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 85 90 95

Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

20

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 59

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

10 <400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

25 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

30 <210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

35 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 62

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 63

40 <211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 64
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 65
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 65
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 66
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 25 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (1)..(1)
 <223> /inlocuire="Arg"
 <220>
 30 <221> VARIANTĂ
 <222> (9)..(9)
 <223> /inlocuire="Ser"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 35 <222> (14)..(14)
 <223> /inlocuire="Leu"
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(15)
 40 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 66
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15
 <210> 67
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (4)..(4)
 <223> /inlocuire="Tyr"
 55 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (5)..(5)
 <223> /inlocuire="Ser"

<220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (6)..(6)
 <223> /înlocuire="Thr"
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 10 variantele de poziții"
 <400> 67
 Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 68
 <211> 218
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 68
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser
 20 25 30

 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 70

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 71

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 72

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 73

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 77
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10
 10 <210> 78
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (217)..(217)
 20 <223> /inlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 25 variantele de poziții"
 <400> 78
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20

25

30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 79

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <220>

<221> VARIANTĂ

<222> (217)..(217)

<223> /înlocuire=" "

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 79

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

5 <210> 80

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

<221> VARIANTĂ

<222> (217)..(217)

15 <223> /înlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 80

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 81
 Gly Ser Arg Asp Tyr Phe
 1 5
 <210> 82
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 82
 Asp Gly Glu Gly Val Met
 1 5
 <210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 83
 Phe His Ser Gly Leu Leu
 1 5
 <210> 84
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 84
 Phe Asn Ser Ala Thr Leu
 1 5
 <210> 85
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 85
 Phe Asn Ser Gly Thr Leu
 1 5
 <210> 86
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 86
 Phe Asn Ser Ser Thr Leu
 1 5
 <210> 87
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 87
Gly Lys Ser Lys Trp Leu
 1 5
 <210> 88
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 88
Gly Met Gly Gly Thr Leu
 1 5
 <210> 89
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 89
His Ala Lys Gly Gly Met
 20 1 5
 <210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 90
Ile Gly Glu Ala Val Leu
 30 1 5
 <210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 91
Ile Gly Lys Gly Val Phe
 1 5
 <210> 92
 40 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 92
Ile Gly Lys Gly Val Leu
 1 5
 <210> 93
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 55 <400> 93
Lys His Asp Ser Val Leu
 1 5

<210> 94
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 94
Leu Asn Thr Ala Val Met
1 5
 10 <210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 95
Asn Gly Glu Gly Thr Leu
1 5
 20 <210> 96
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 96
Asn Gly Lys Asn Thr Leu
1 5
 30 <210> 97
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 97
Asn Ser Ala Gly Ile Leu
1 5
 40 <210> 98
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 98
Pro Lys Glu Gly Trp Met
 45 **1 5**
 <210> 99
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 99
Pro Lys Phe Gly Trp Lys
1 5
 55 <210> 100
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 100
Pro Lys Met Gly Trp Val
 1 5
 <210> 101
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 101
Pro Arg Leu Gly His Leu
 1 5
 <210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 102
Pro Ser Phe Gly Trp Ala
 25 1 5
 <210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 103
Gln Ala Lys Gly Thr Met
 1 5
 35 <210> 104
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 104
Arg Gly Met Gly Val Met
 1 5
 45 <210> 105
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 105
Arg Lys Glu Gly Trp Met
 1 5
 <210> 106
 <211> 6
 55 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 106
Thr Gly Lys Gly Val Leu
 1 5
 <210> 107
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 107
Thr Gly Met Gly Thr Leu
 1 5
 15 <210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 108
Thr Gly Asn Gly Val Met
 1 5
 25 <210> 109
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 109
Trp Asn Ala Gly Thr Phe
 1 5
 35 <210> 110
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 110
Tyr His His Thr Pro Leu
 1 5
 <210> 111
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 111
Tyr Gln Ser Ala Thr Leu
 50 1 5
 <210> 112
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 112
Asp Gly Lys Ala Val Leu
 1 5
 <210> 113
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 113
Phe Asn Lys Ala Val Leu
 1 5
 15 <210> 114
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 114
Phe Asn Ser Gly Thr Trp
 1 5
 <210> 115
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 115
Phe Asn Thr Gly Val Phe
 1 5
 <210> 116
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 116
Gly Lys Ser Arg Phe His
 1 5
 <210> 117
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 117
Ile Gly Lys Asn Val Tyr
 50 1 5
 <210> 118
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 118
Met Gly Lys Gly Val Met
 1 5
 <210> 119
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 119
Asn Gly Glu Ser Val Phe
 1 5
 15 <210> 120
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 120
Pro Asp Phe Gly Trp Met
 1 5
 <210> 121
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 121
Pro Gly Ser Gly Val Met
 1 5
 <210> 122
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 122
Pro Lys Asp Ala Trp Leu
 1 5
 <210> 123
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 123
Pro Lys Phe Gly Trp Leu
 50 1 5
 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 124
 5 **Pro Lys Ile Gly Trp His**
 1 5
 <210> 125
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 125
 Pro Lys Met Gly Trp Ala
 1 5
 15 <210> 126
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 126
 Pro Lys Met Gly Trp Met
 1 5
 <210> 127
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 127
 Pro Gln Met Gly Trp Leu
 1 5
 <210> 128
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 128
 Pro Arg Phe Gly Trp Leu
 1 5
 <210> 129
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 129
 Pro Arg Met Gly Phe Leu
 50 1 5
 <210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 130
 5 **Pro Arg Met Gly Phe Met**
 1 5
 <210> 131
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 131
 Pro Ser Phe Gly Trp Met
 1 5
 15 <210> 132
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 132
 Arg Arg Glu Gly Trp Met
 1 5
 <210> 133
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 133
 Ser Gly Glu Gly Val Leu
 1 5
 <210> 134
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 134
 Ser Gly Asn Gly Val Met
 1 5
 <210> 135
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 135
 Val Gly Lys Ala Val Leu
 50 1 5
 <210> 136
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 136
Asp Ser Asn Ala Val Leu
 1 5
 <210> 137
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 137
Phe His Ser Gly Thr Leu
 1 5
 15 <210> 138
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 138
Gly Gly Ser Gly Val Leu
 1 5
 25 <210> 139
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 139
Pro Arg Gln Gly Phe Leu
 1 5
 35 <210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 140
Tyr Asn Ser Gly Thr Leu
 1 5
 <210> 141
 <211> 453
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <220>
 50 <221> VARIANTĂ
 <222> (453)..(453)
 <223> /înlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (1)..(453)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"

<400> 141

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 142

<211> 453

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

<221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /înlocuire=" "

5

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

5

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

183

165							170					175				
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
			180					185				190				
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
		195					200				205					
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	
210						215				220						
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
225						230				235			240			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245				250						255		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
			260					265			270					
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
		275					280			285						
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
290						295			300							
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
305						310			315			320				
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				325				330						335		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
			340					345			350					
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
		355					360			365						
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
370						375			380							
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
385						390			395			400				
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
				405				410						415		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
			420					425			430					
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	
		435					440			445						
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
450																

<210> 143
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 10 <222> (453)..(453)
 <223> /inlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(453)
 15 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 143
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115						120				125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
	130					135					140				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	195						200					205			
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
	210					215					220				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala
225					230					235					240
Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			260					265					270		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	275						280					285			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
	290					295					300				
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
305					310					315					320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				325					330					335	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
			340					345					350		
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
	355						360					365			

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 144

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 144

10 Ala Leu Ala Leu

1

<210> 145

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Beta-Ala

<400> 145

Ala Leu Ala Leu

25 1

<210> 146

<211> 4

<212> PRT

<213> Secvență artificială

30 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 146

Gly Phe Leu Gly

1

35 <210> 147

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

40 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (217)..(217)
 <223> /inlocuire=" "
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 10 variantele de poziții"
 <400> 147
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 148
 15 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 5 <221> VARIANTĂ
 <222> (217)..(217)
 <223> /înlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 148
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 15 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

 Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 149
 <211> 217
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 5 <221> VARIANTĂ
 <222> (217)..(217)
 <223> /înlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 149
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 15 <210> 150
 <211> 217

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polieptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 <222> (217)..(217)
 <223> /înlocuire=" "
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(217)
 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 15 <400> 150
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

 Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 151
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <220>
 <221> VARIANTĂ
 10 <222> (453)..(453)
 <223> /inlocuire=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(453)
 15 <223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru
 variantele de poziții"
 <400> 151
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 152

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

10 <221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /inlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 152

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

MD/EP 3558391 T2 2022.05.31

194

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Leu	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		130				135					140				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
		195					200					205			
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
	210					215					220				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
225					230					235					240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255	
Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			260					265					270		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val

275

280

285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 153

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

10 <221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /înlocuire=" "

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

<400> 153

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 154

<211> 453

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<220>

<221> VARIANTĂ

<222> (453)..(453)

<223> /inlocuire="

5

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(453)

<223> /notă="Variantele de resturi din secvență nu au preferință în raport cu cele din adnotările pentru variantele de poziții"

5

<400> 154

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
50						55					60				

Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Met	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Leu	Asp	Tyr
			100					105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
	130					135					140				

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155				160	

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

199

[illegible]

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- DE-A1- 10 337 368
- STUART W HICKS ET AL: "Abstract #37: Novel Antibody-Drug Conjugates Targeting ADAM9-expressing Solid Tumors Demonstrate Potent Preclinical Activity Introduction", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING 2017, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 April 2017 (2017-04-01), XP055464251, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-37 -& STUART W HICKS ET AL: "Abstract 37: Novel antibody-drug conjugates targeting ADAM9-expressing solid tumors demonstrate potent preclinical activity | Cancer Research", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING 2017, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 July 2017 (2017-07-01), XP055464261, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-37
- US-A1- 2009 285 840
- JUNIPER A. SCRIBNER ET AL: "Abstract 38: Target validation, antibody discovery and preclinical data supporting ADAM9 as an antibody-drug conjugate therapeutic target for solid tumors", CANCER RESEARCH, vol. 77, no. 13 Supplement, 1 April 2017 (2017-04-01), pages 38-38, XP055464265, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-38 -& STUART W HICKS ET AL: "Abstract 38: Target validation, antibody discovery and preclinical data supporting ADAM9 as an antibody-drug conjugate therapeutic target for solid tumors | Cancer Research", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING 2017, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 July 2017 (2017-07-01), XP055464262, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-38
- US-A1- 2016 095 938

(57) Revendicări:

1. Imunoconjugat care cuprinde un anticorp anti-ADAM9 umanizat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care se leagă în mod specific la ADAM9 umană și ADAM9 de cyno:

(I) în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia este conjugat cu un agent farmacologic; și

(II) în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) și un domeniu variabil al lanțului greu (VH), în care domeniul variabil al lanțului greu menționat cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și domeniul variabil al lanțului ușor menționat cuprinde un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3}, în care:

(A) domeniul CDR_{H1} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO:8** sau **SEQ ID NO:34**; și

(B) domeniul CDR_{H2} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO: 9**, **SEQ ID NO:35** sau **SEQ ID NO:36**; și

(C) domeniul CDR_{H3} menționat cuprinde secvența de aminoacizi a oricăreia **dintre SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45 sau SEQ ID NO:46**; și

în care:

(A) domeniul CDR_{L1} menționat are secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63** sau **SEQ ID NO:64**; și

(B) domeniul CDR_{L2} menționat are secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO:13**; și

(C) domeniul CDR_{L3} menționat are secvența de aminoacizi a **SEQ ID NO:14** sau **SEQ ID NO:65**.

2. Imunoconjugat conform revendicării 1, în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu CDR_{H1}, un domeniu CDR_{H2} și un domeniu CDR_{H3} și un domeniu CDR_{L1}, un domeniu CDR_{L2} și un domeniu CDR_{L3} care au secvențele selectate din grupul constând din:

(a) **SEQ ID NO: 8, 35 și 45** și, respectiv, **SEQ ID NO: 62, 13, 14**;

(b) **SEQ ID NO: 8, 35 și 38** și, respectiv, **SEQ ID NO: 62, 13, 14**;

- (c) SEQ ID NO: 8, 35 și 39 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (d) SEQ ID NO: 8, 35 și 40 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (e) SEQ ID NO: 8, 35 și 41 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (f) SEQ ID NO: 8, 35 și 42 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (g) SEQ ID NO: 8, 35 și 43 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (h) SEQ ID NO: 8, 35 și 44 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14;
- (i) SEQ ID NO: 8, 35 și 37 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14; și
- (j) SEQ ID NO: 8, 35 și 46 și, respectiv, SEQ ID NO: 62, 13, 14.

3. Imunoconjugat conform revendicării 1 sau 2, în care:

(A) domeniul VH menționat cuprinde **SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28** sau **SEQ ID NO:29**; și

(B) domeniul VL menționat cuprinde **SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56** sau **SEQ ID NO:57**.

4. Imunoconjugat conform revendicării 1, în care domeniul CDR_H1 menționat cuprinde secvența de aminoacizi SYWMH (SEQ ID NO:8), domeniul CDR_H2 menționat cuprinde secvența de aminoacizi EIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:35), domeniul CDR_H3 menționat cuprinde secvența de aminoacizi GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO:45), domeniul CDR_L1 menționat cuprinde secvența de aminoacizi KASQSVDYSGDSYMN (SEQ ID NO:62), domeniul CDR_L2 menționat cuprinde secvența de aminoacizi AASDLES (SEQ ID NO:13) și domeniul CDR_L3 menționat cuprinde secvența de aminoacizi QQSHEDPFT (SEQ ID NO:14).

5. Imunoconjugat conform revendicării 4, în care imunoconjugatul menționat cuprinde:

(A) domeniul variabil al lanțului greu (VH) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28); și/sau

(B) domeniul variabil al lanțului ușor (VL) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55); și/sau

(C) domeniul variabil al lanțului greu (VH) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:28) și domeniul variabil al lanțului ușor (VL) al hMAB-A (2I.2) (SEQ ID NO:55).

6. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care imunoconjugatul menționat cuprinde o regiune Fc, în mod opțional în care regiunea Fc menționată este o variantă de regiune Fc care cuprinde:

(a) una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea variantei de regiune Fc pentru un FcγR; și/sau

(b) una sau mai multe modificări de aminoacizi care introduc un rest de cisteină; și/sau

(c) una sau mai multe modificări de aminoacizi care prelungesc timpul de înjumătățire serică.

7. Imunoconjugat conform revendicării 6, în care

(I) una sau mai multe modificări de aminoacizi menționate care reduc afinitatea variantei de regiune Fc pentru un FcγR cuprind:

(A) L234A;

(B) L235A; sau

(C) L234A și L235A; și

(II) una sau mai multe modificări de aminoacizi menționate care introduc un rest de cisteină cuprind S442C; și

(III) una sau mai multe modificări de aminoacizi menționate care prelungesc timpul de înjumătățire serică cuprind:

(A) M252Y;

- (B) M252Y și S254T;
 (C) M252Y și T256E;
 (D) M252Y, S254T și T256E; sau
 (E) K288D și H435K; și

în care numerotarea menționată este cea din indicele UE Kabat.

8. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele selectate din grupul constând din:

- (a) SEQ ID NO:152 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (b) SEQ ID NO:141 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (c) SEQ ID NO:142 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (d) SEQ ID NO:143 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (e) SEQ ID NO:151 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (f) SEQ ID NO:52 și, respectiv, SEQ ID NO:68;
 (g) SEQ ID NO:153 și, respectiv, SEQ ID NO:68; și
 (h) SEQ ID NO:154 și, respectiv, SEQ ID NO:68.

9. Imunoconjugat conform revendicării 8, în care X din SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:153 sau SEQ ID NO:154 este absent.

10. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat cuprinde un lanț greu și un lanț ușor care au secvențele SEQ ID NO:152 și, respectiv, SEQ ID NO:68.

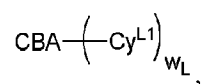
11. Imunoconjugat conform revendicării 1, în care anticorpul anti-ADAM9 umanizat menționat sau fragmentul de legare a ADAM9 al acestuia cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (VH) și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) care au secvențele SEQ ID NO:28 și, respectiv, SEQ ID NO:55.

12. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-11, în care agentul farmacologic menționat este un compus maitansinoidic, un compus pirolbenzodiazepinic sau un compus indolinbenzodiazepinic.

13. Imunoconjugat conform revendicării 12, în care agentul farmacologic menționat este un compus maitansinoidic.

14. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-13, în care imunoconjugatul este reprezentat de o formulă selectată din grupul constând din:

(I)

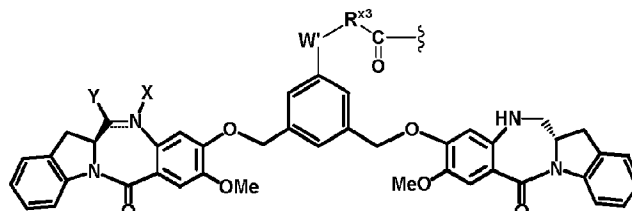
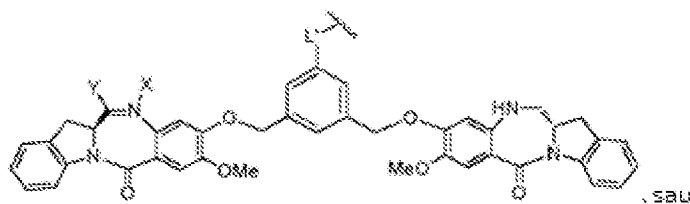


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{L1} printr-un rest de lizină;

WL este un număr întreg de la 1 până la 20; și

Cy^{L1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină, și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

W' este -NR^{e'},

R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un (C₁-C₆)alchil;

L' este reprezentat de următoarea formulă:

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)- (B1'); sau

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}- (B2');

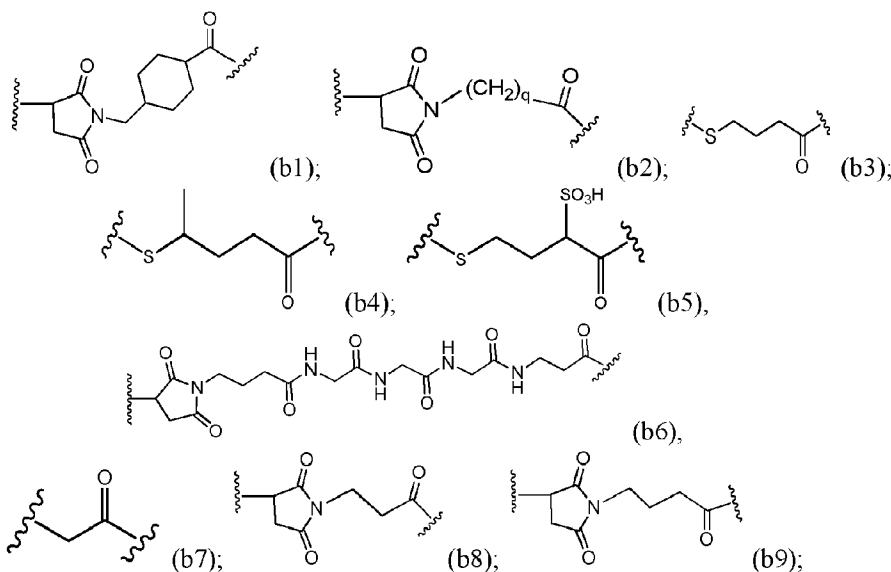
R₅ este -H sau un (C₁-C₃)alchil;

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține între 2 și 20 de resturi de aminoacizi;

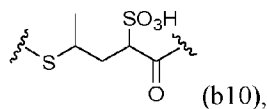
R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt fiecare în mod independent -H, (C₁-C₃)alchil sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

m este un număr întreg de la 1 până la 6; și

Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:

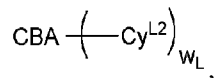


și



în care q este un număr întreg de la 1 până la 5 și, în mod opțional, în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu;

(II)

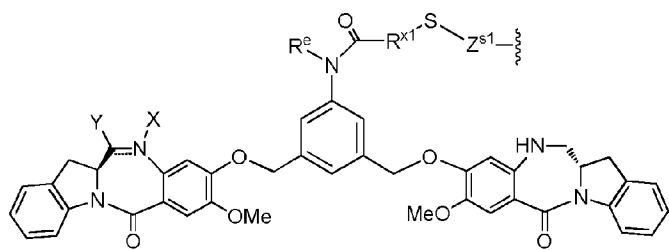


în care:

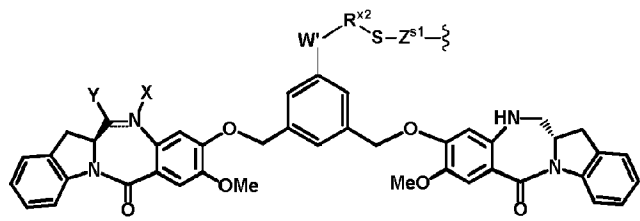
CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{L2} printr-un rest de lizină;

WL este un număr întreg de la 1 până la 20; și

Cy^{L2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină și Y să fie -OH sau $-\text{SO}_3\text{H}$;

R^{x1} și R^{x2} sunt în mod independent $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alchil;

R^{e} este -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alchil;

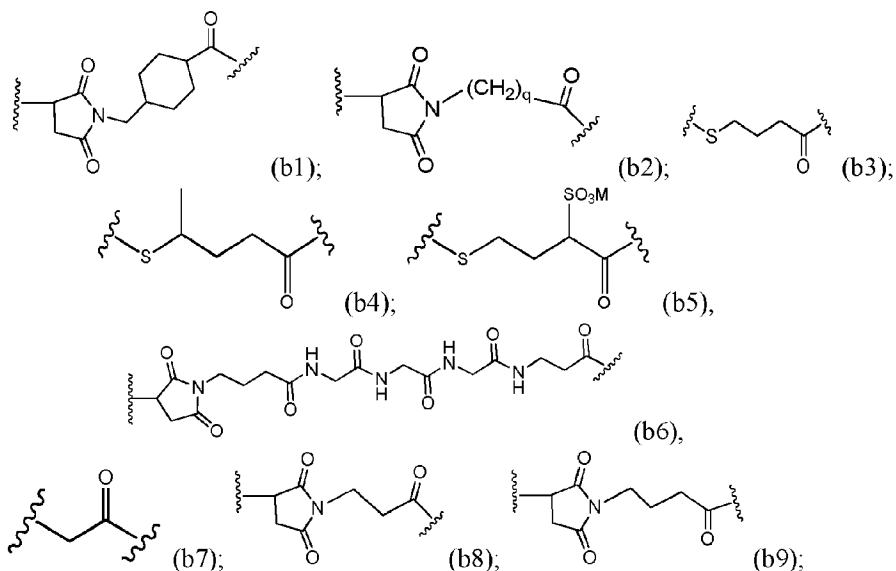
W' este $-\text{NR}^{\text{e}'}$,

R^{k} este $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^{\text{k}}$;

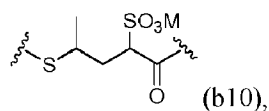
n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^{k} este -H sau -Me;

Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:

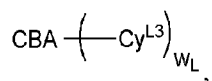


și



în care q este un număr întreg de la 1 până la 5 și, în mod opțional, în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu;

(III)

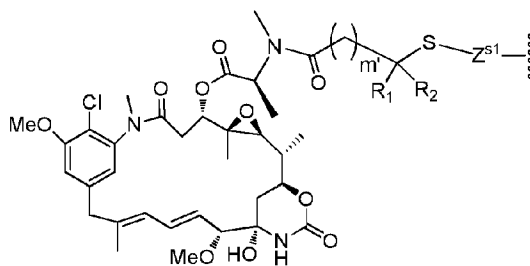


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{L3} printr-un rest de lizină;

W_L este un număr întreg de la 1 până la 20;

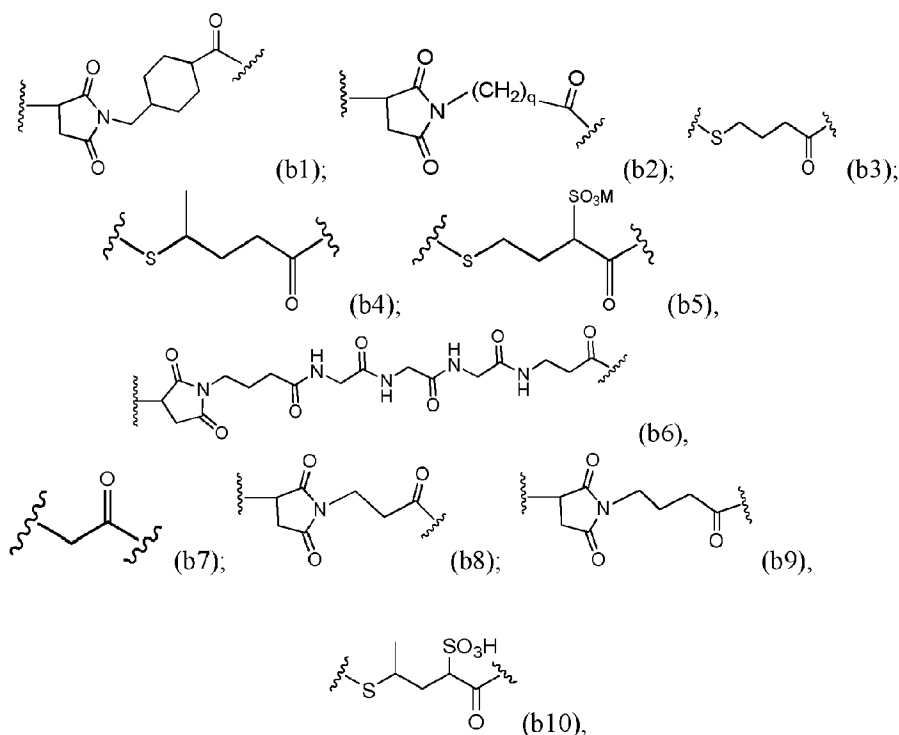
Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:



m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare în mod independent H sau un $(\text{C}_1\text{--}\text{C}_3)$ alchil; și

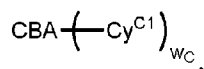
Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



și

în care q este un număr întreg de la 1 până la 5 și, în mod opțional, în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu;

(IV)

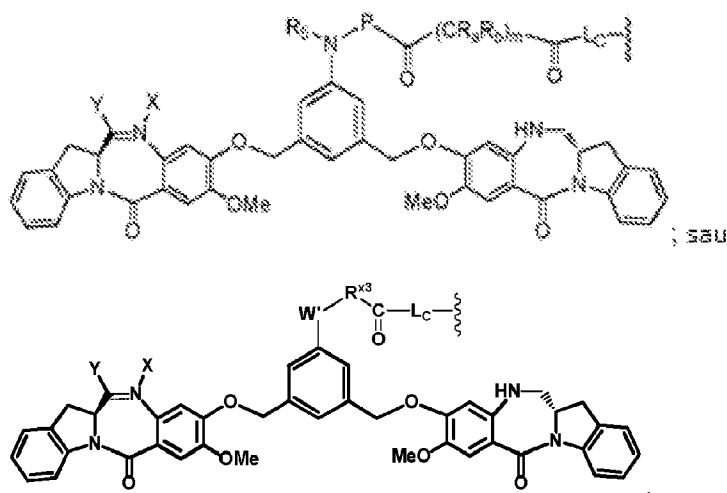


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{C1} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă ... dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină și Y să fie -OH sau $\text{-SO}_3\text{H}$ sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

R_5 este -H sau un (C_1-C_3) alchil;

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi;

R_a și R_b , la fiecare apariție, sunt în mod independent -H, (C_1-C_3) alchil sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

W' este $-NR^{e'}$,

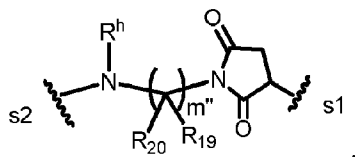
R^e este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un (C_1-C_6) alchil; și

L_C este reprezentat de



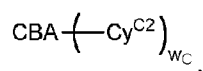
s1 este situsul legat covalent la CBA și s2 este situsul legat covalent la gruparea $-C(=O)-$ de pe Cy^{C1} ; în care:

R_{19} și R_{20} , la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C_1-C_3) alchil;

m'' este un număr întreg cuprins între 1 și 10; și

R^h este -H sau un (C_1-C_3) alchil și în mod opțional în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu;

(V)

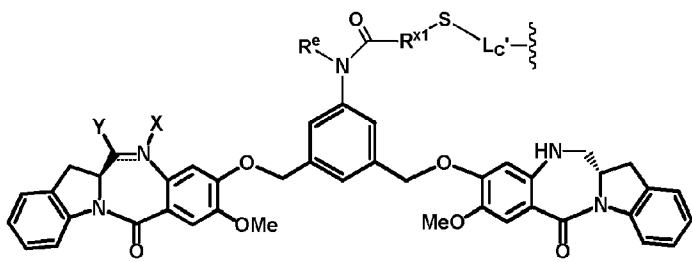


în care:

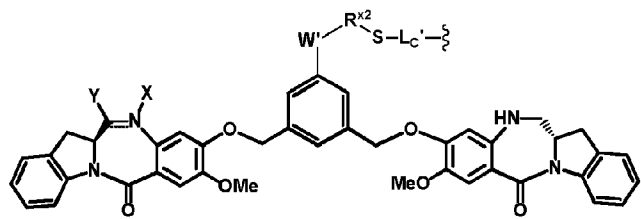
CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{C2} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X să fie absent și Y să fie -H sau un (C₁-C₄)alchil; și atunci când este o legătură simplă, X să fie -H sau o fracțiune protectoare pentru o amină și Y să fie -OH sau -SO₃H sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia;

R^{x1} este un (C₁-C₆)alchil;

R^e este -H sau un (C₁-C₆)alchil;

W' este -NR^{e'};

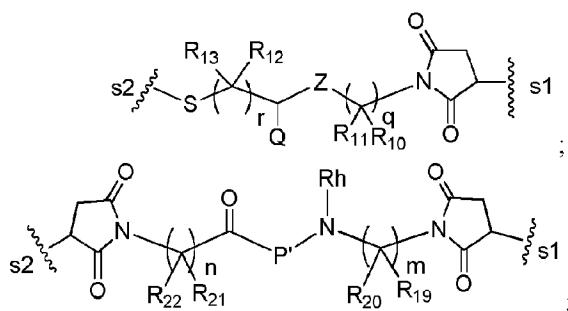
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 până la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un (C₁-C₆)alchil;

L_C' este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

s1 este locul legat covalent la CBA și s2 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{C2};

Z este -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

Q este -H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₉, R₂₀, R₂₁ and R₂₂, la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C₁-C₃)alchil;

q și r, la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

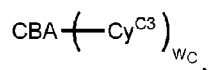
m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

R^h este -H sau un (C₁-C₃)alchil; și

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi și, în mod opțional, în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu;

și

(VI)

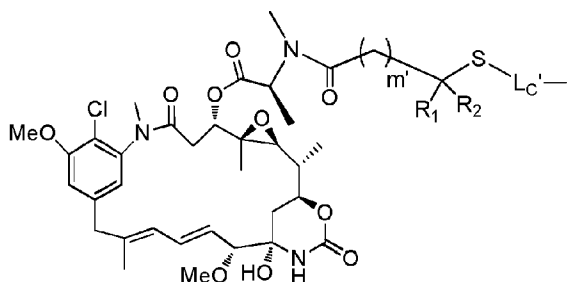


în care:

CBA este un anticorp anti-ADAM9 umanizat menționat sau un fragment de legare a ADAM9 al acestuia care este legat covalent la Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:

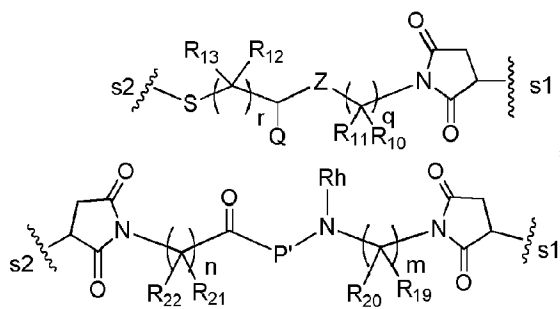


în care:

m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare în mod independent -H sau un (C_1-C_3) alchil;

$L_{C'}$ este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

$s1$ este locul legat covalent la CBA și $s2$ este locul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C3} ;

Z este $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;

Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{19} , R_{20} , R_{21} and R_{22} , la fiecare apariție, sunt în mod independent -H sau un (C_1-C_3) alchil;

q și r, la fiecare apariție, sunt în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

m și n sunt fiecare în mod independent un număr întreg cuprins între 0 și 10;

R^h este -H sau un (C_1-C_3) alchil;

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 până la 20 de resturi de aminoacizi și, în mod opțional, în care sarea acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este o sare de sodiu sau potasiu.

15. Compoziție farmaceutică ce cuprinde o cantitate eficientă de conjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-14 și un purtător, excipient sau diluant acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

16. Imunoconjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-14 sau compoziție farmaceutică conform revendicării 15 pentru utilizare în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu sau **caracterizate prin** expresia ADAM9.

17. Imunoconjugat sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 16, în care boala sau afecțiunea menționată asociată cu sau **caracterizată prin** expresia ADAM9 este cancer, în mod opțional în care cancerul menționat este selectat din grupul constând din cancer pulmonar cu celule non-mici, cancer colorectal, cancer de vezică urinară, cancer gastric, cancer pancreatic, carcinom celular renal, cancer de prostată, cancer esofagian, cancer mamar, cancer de cap și gât, cancer uterin, cancer ovarian, cancer hepatic, cancer de col uterin, cancer tiroidian, cancer testicular, cancer mieloid, melanom și cancer limfoid.

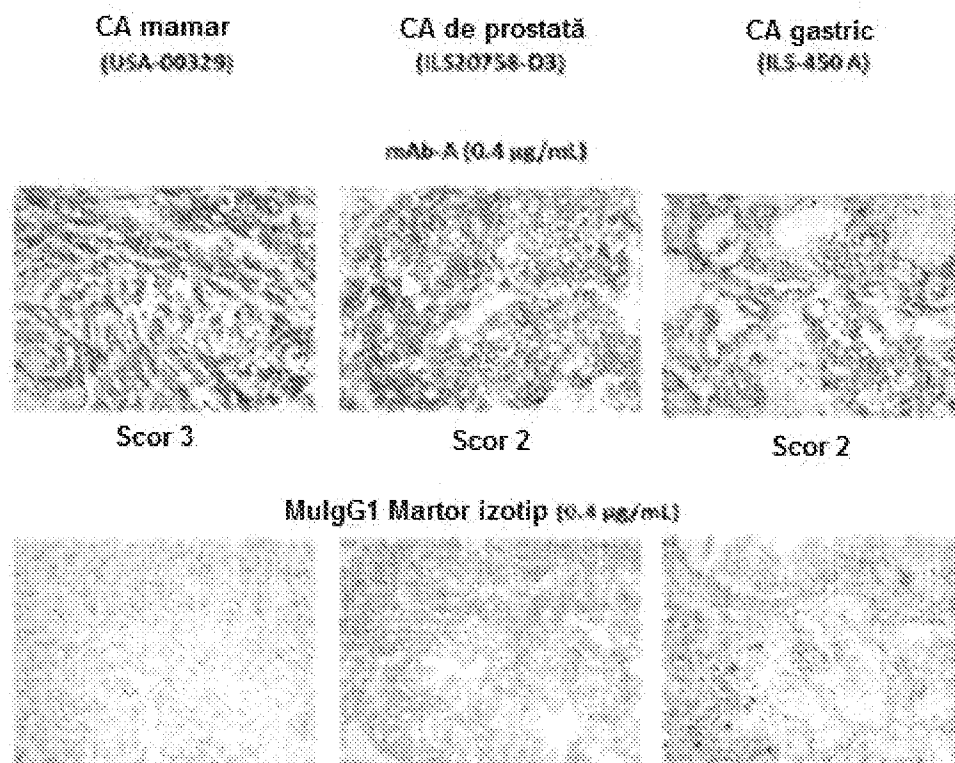


FIG. 1B

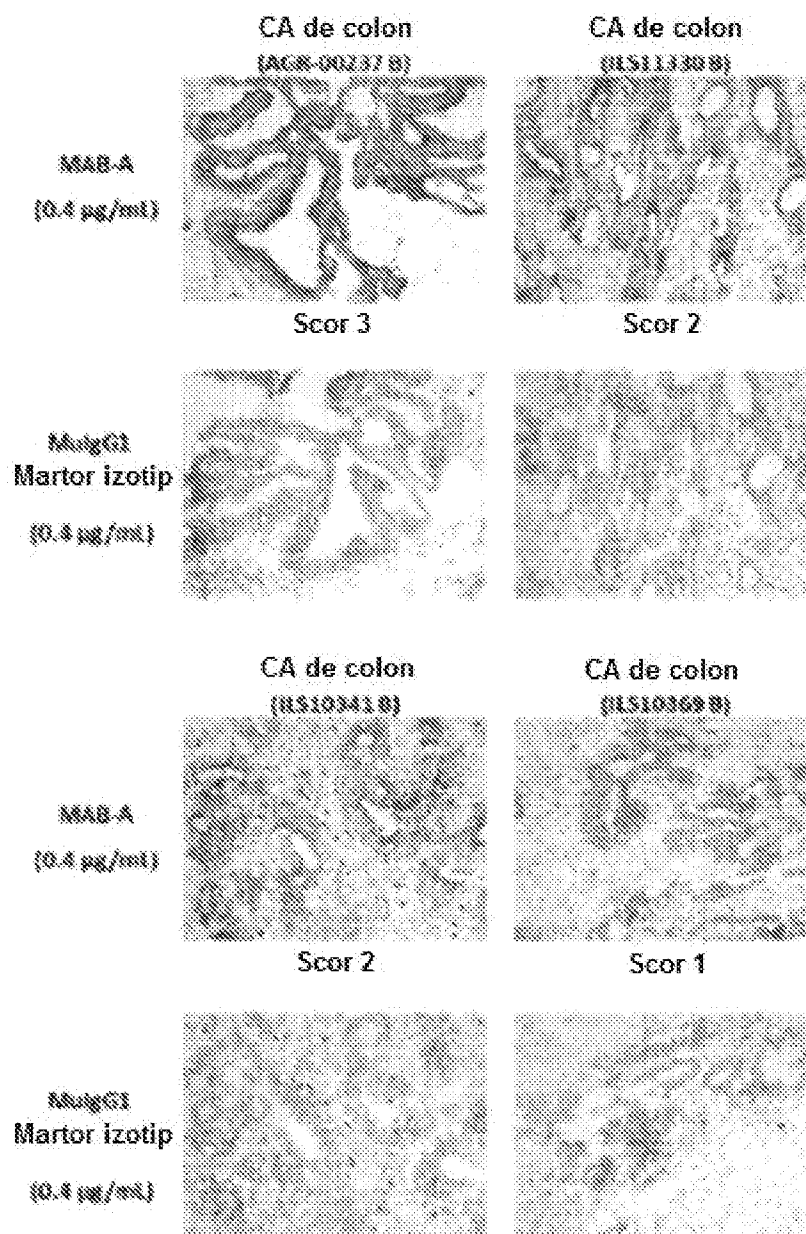


FIG. 1C

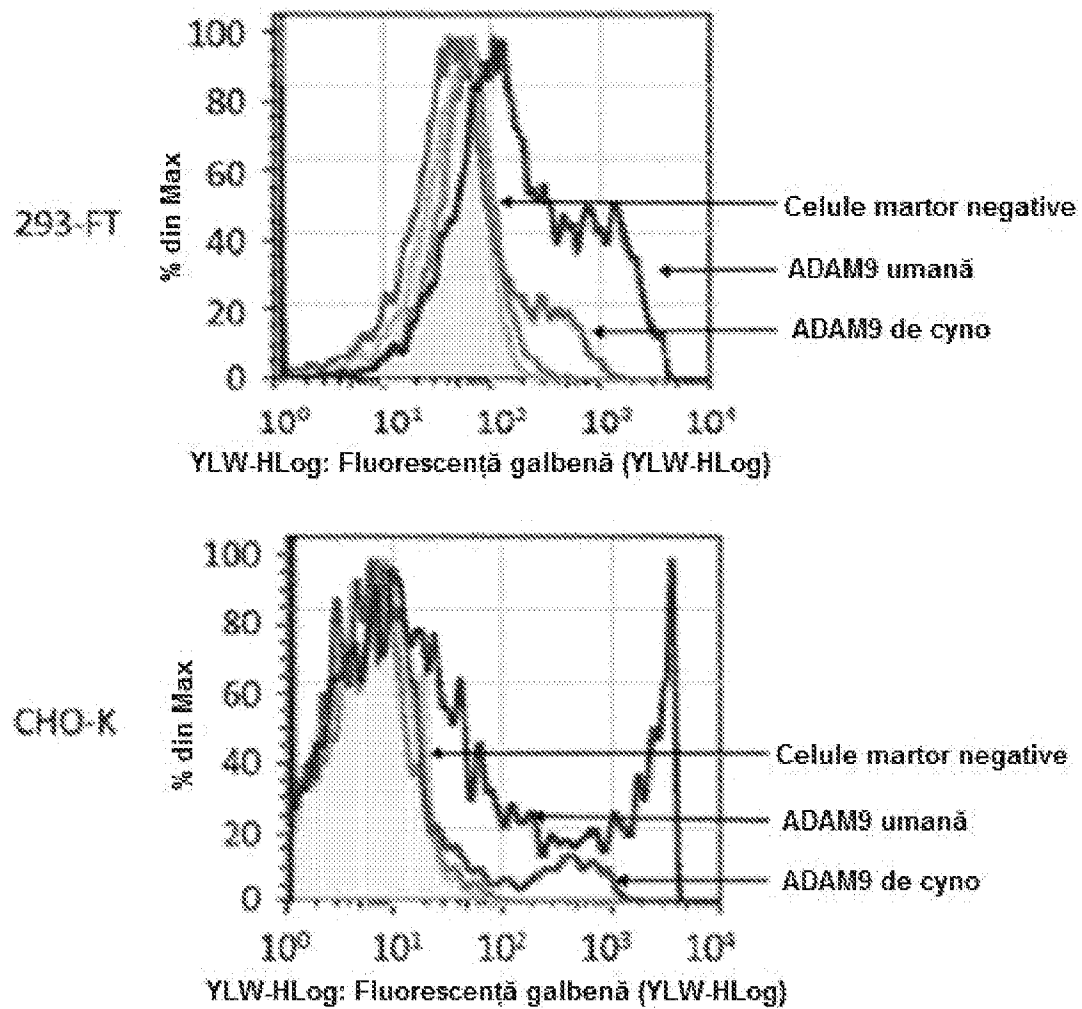


FIG. 2

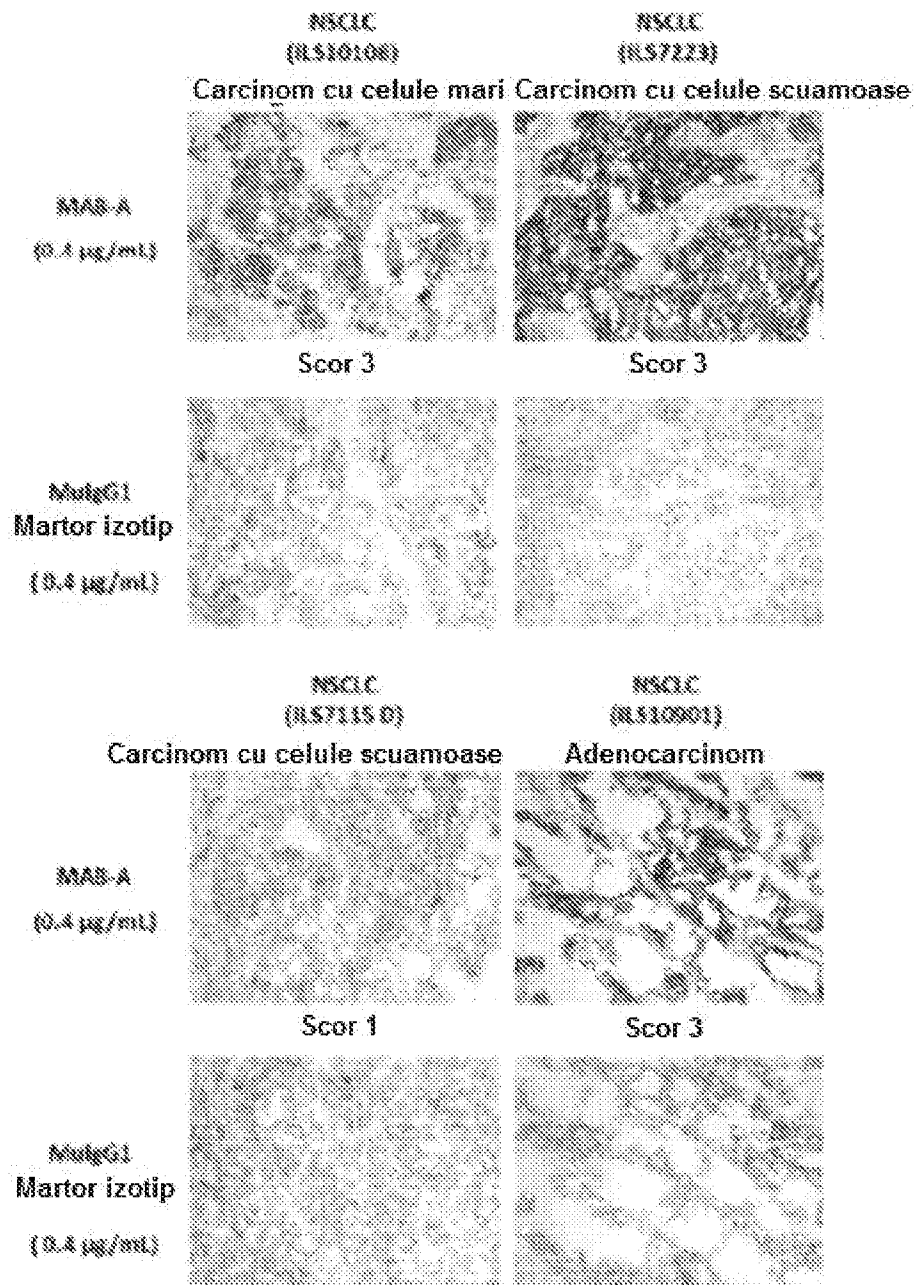


FIG. 1A

			FR1	CDR1
MAB-A VH murinic	SEQ ID NO:7		QVQLQPGAEIVKPKASVHLSCHASGYTFT	SYWNI
hMAB-A VH(1)	SEQ ID NO:16		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2)	SEQ ID NO:17		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(3)	SEQ ID NO:18		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(4)	SEQ ID NO:19		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	...I.
hMAB-A VH(28)	SEQ ID NO:21		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2C)	SEQ ID NO:22		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(7C)	SEQ ID NO:23		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(21)	SEQ ID NO:28		E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	

FR2	CDR2	FR3
WVKRIRGGGLEWIG	ELIDINCHTMYNEEFES	KATLFLEKSSSTAYHQLSSLADEUCAVYTCAR
..R.A..K....V.		RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....

CDR3	FR4
GSYYTGGTRDYFDY	WGQTILTVSE
.....V.....	
.....V.....	
.....V.....	
.....V.....	
.....IQQVVL.....	
.....FRQVNL.....	
.....TQQVNL.....	
.....FRQVNL.....	

FIG. 3A

			FR1	CDR1
MAB-A VL murinic	SEQ ID NO:11		CTVLTQSPASLAVSLQPAATFC	KASQGVVDYDQSTYH
hMAB-A VL(1)	SEQ ID NO:54		...N...D.....E.....	G.....
hMAB-A VL(2)	SEQ ID NO:55		...N...D.....E.....	G.....
hMAB-A VL(3)	SEQ ID NO:56		...N...D.....E.....	G.....
hMAB-A VL(4)	SEQ ID NO:57		...N...D.....E.....	G...L.

FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
WTQDINGQFWKLLIF	AAASLER	GIPARFSGGGSHITFTAINFVEEDATTTC	QQSHEDPFT	FOGQTKLEIK
...K.....		...I.SSL.P..F....		
...F.....		...T.SSL.P..F....		
...K.....		...I.SSL.P..F....		
...K.....		...I.SSL.P..F....	...YCT...	

FIG. 3B

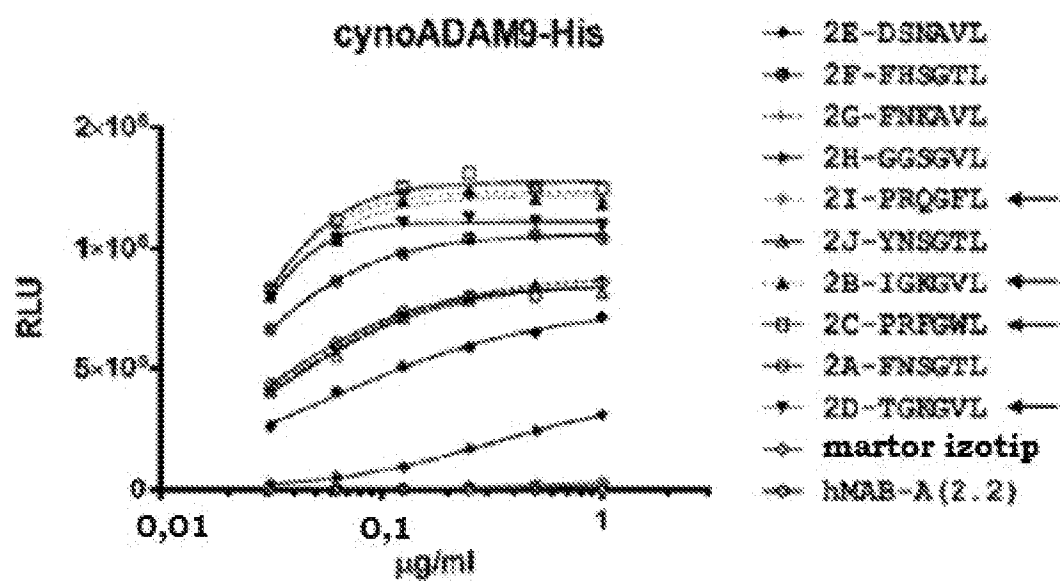


FIG. 4A

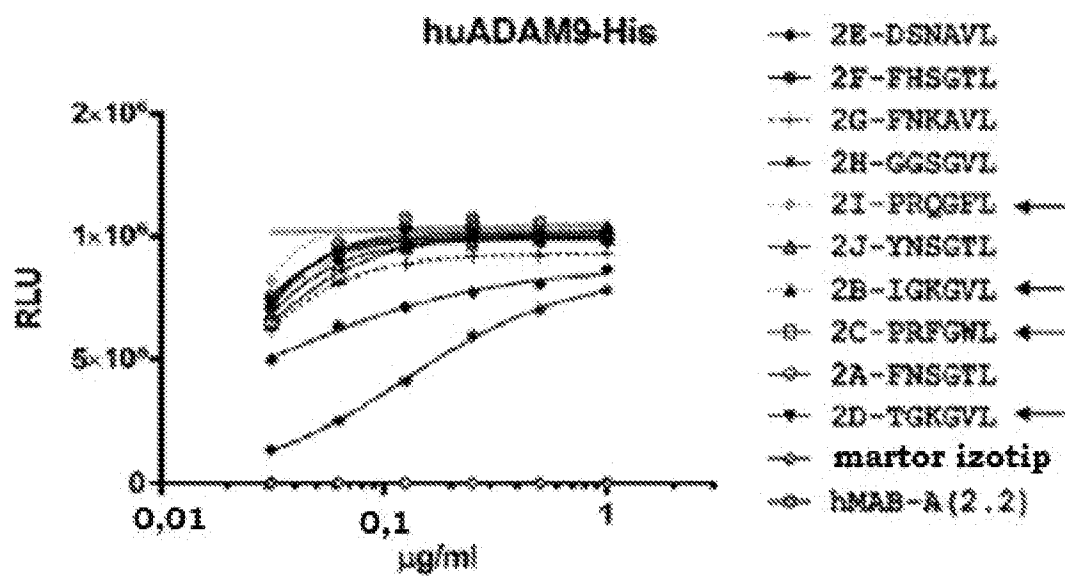


FIG. 4B

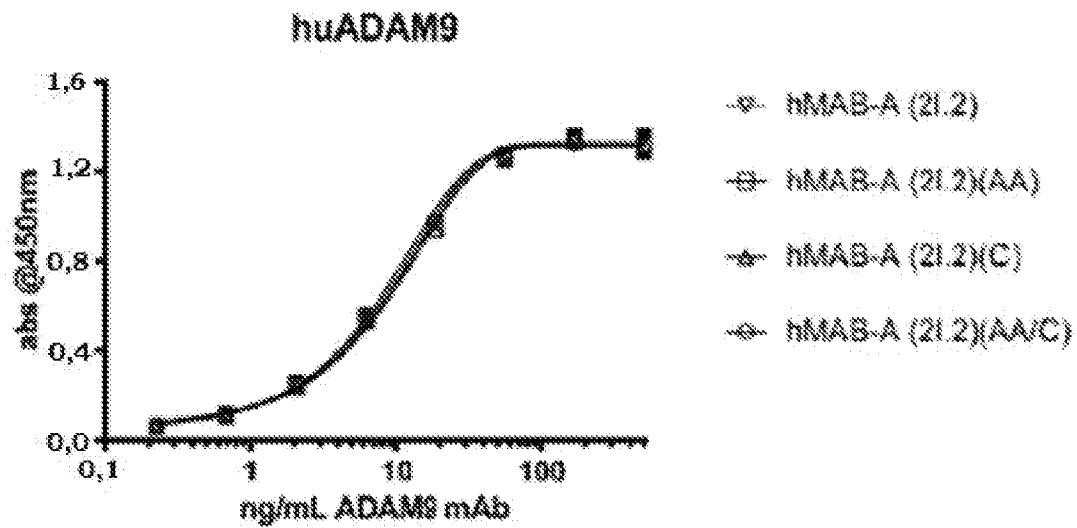


FIG. 5A

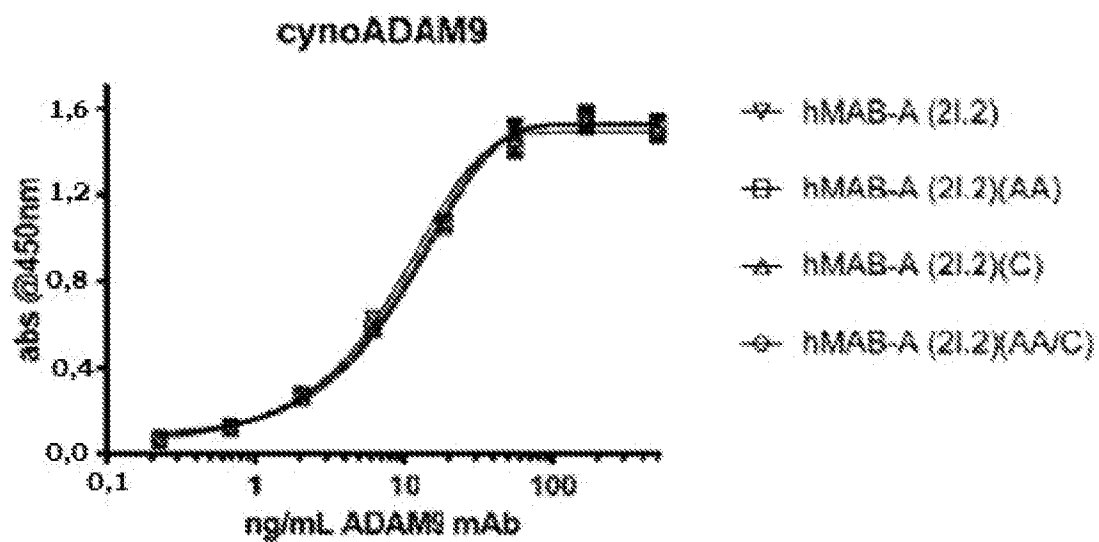
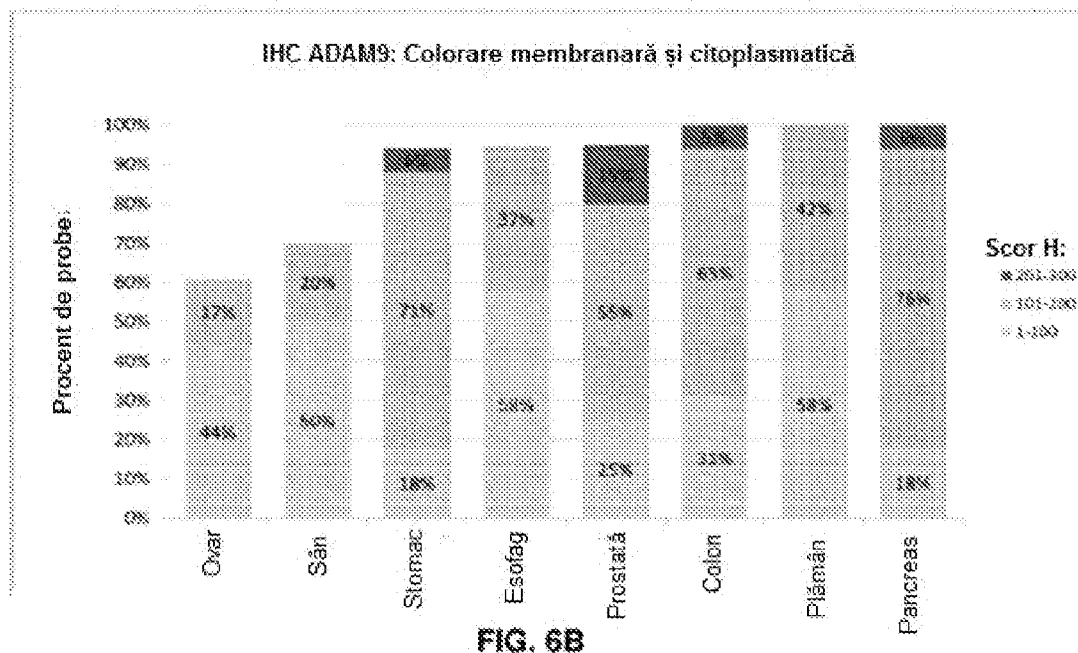
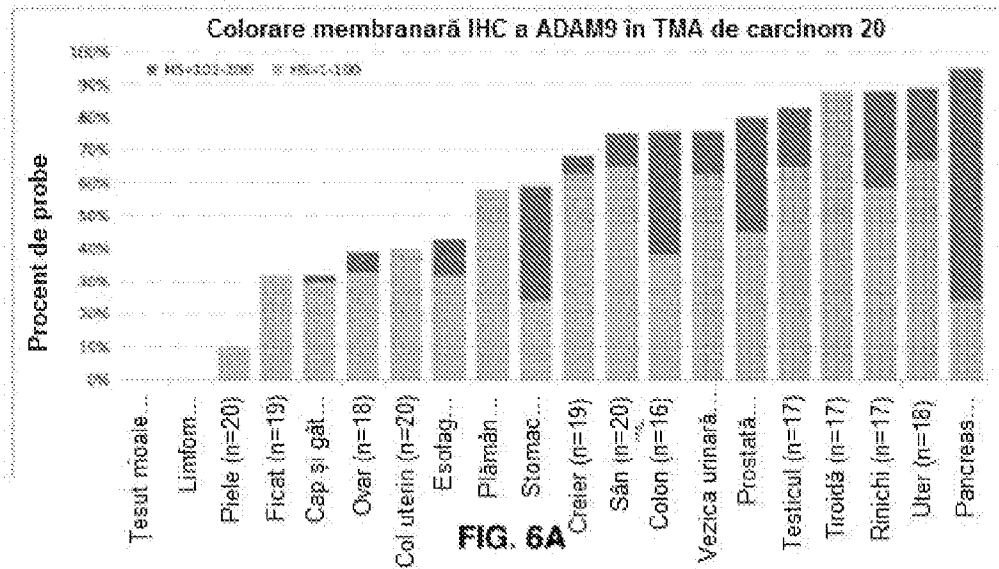


FIG. 5B



Internalizarea impulsului Ac anti-ADAM9

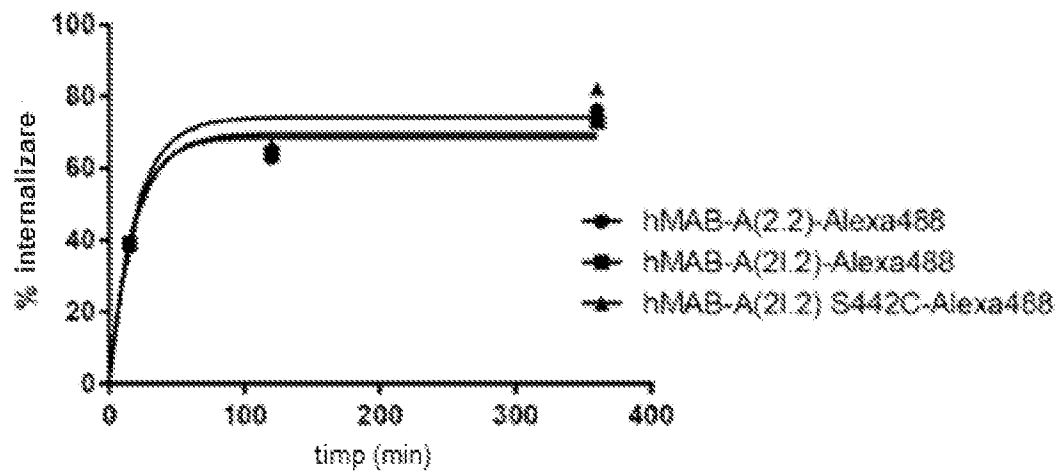


FIG. 7A

Internalizarea continuă a Ac anti-ADAM9

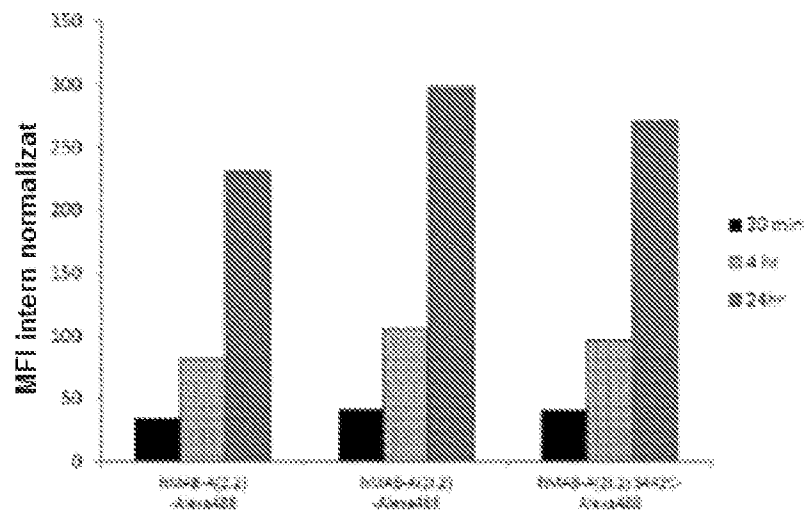


FIG. 7B

FIG. 8A FACS: 300-19: ADAM9 umană

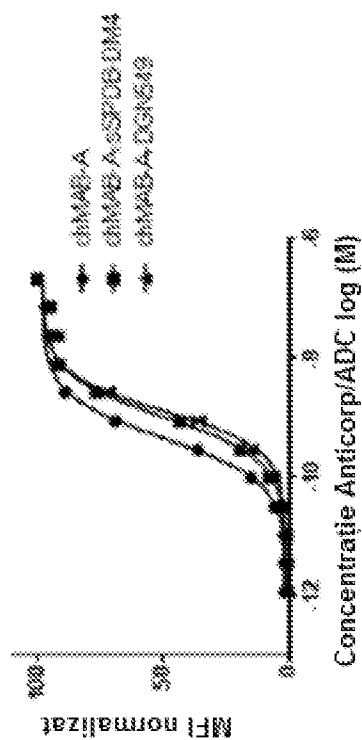


FIG. 8B FACS: 300-19: ADAM9 umană

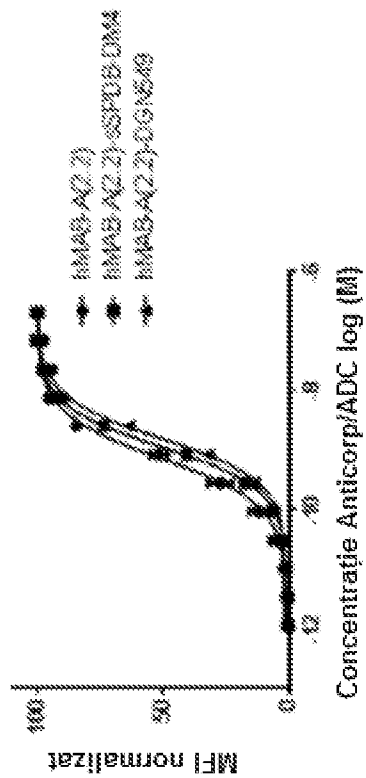


FIG. 8C FACS: 300-19: ADAM9 umană

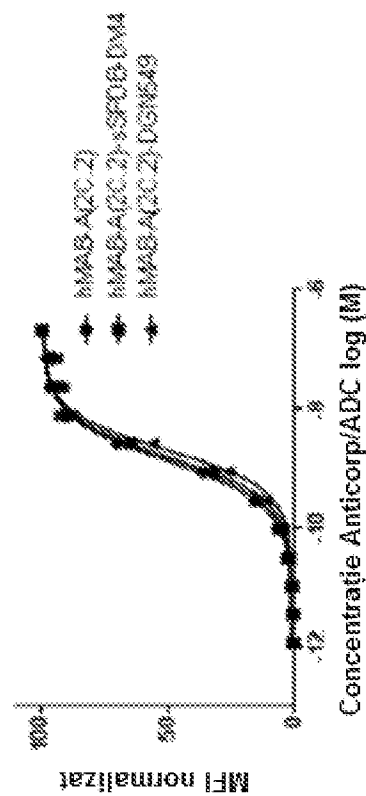
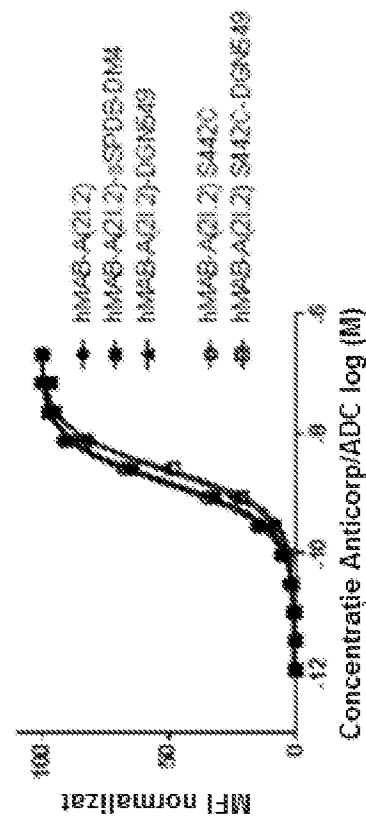
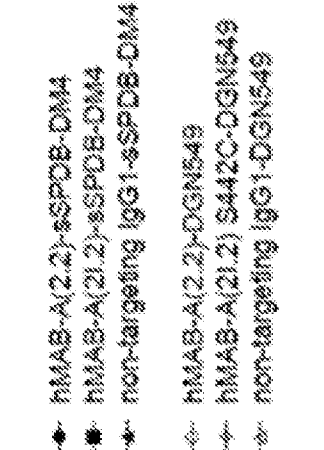
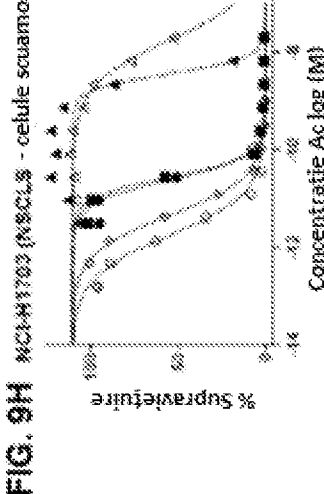
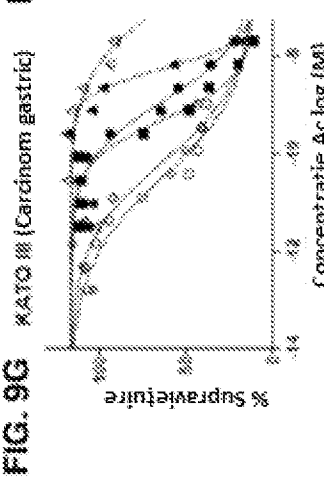
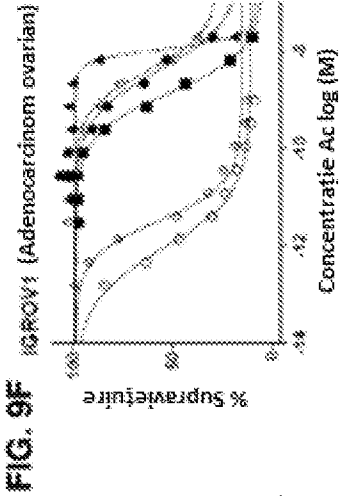
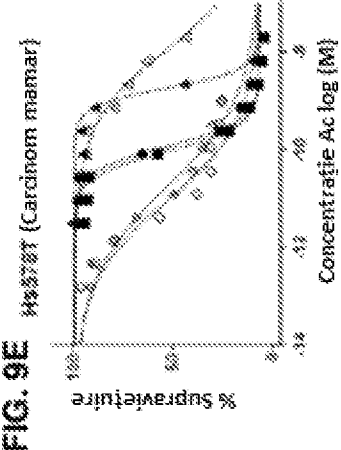
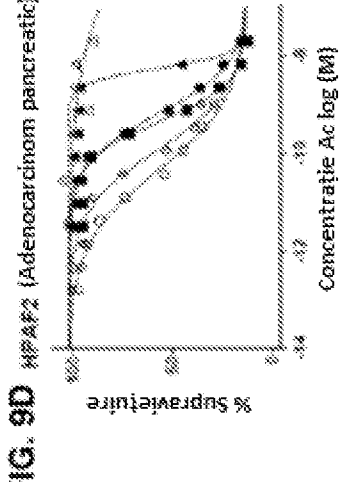
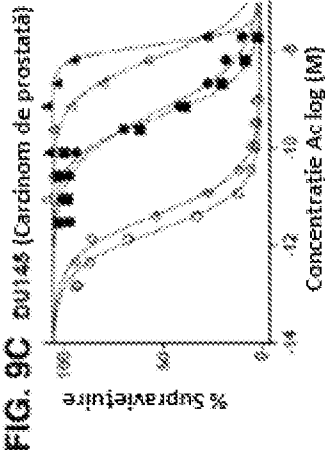
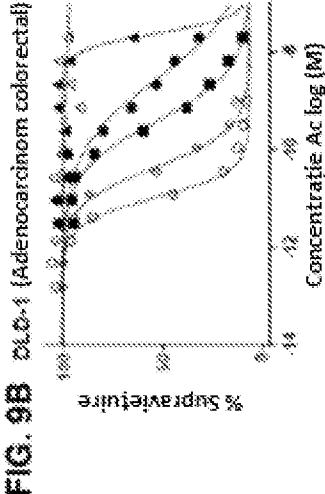
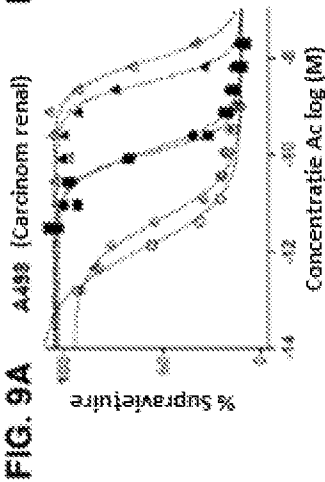
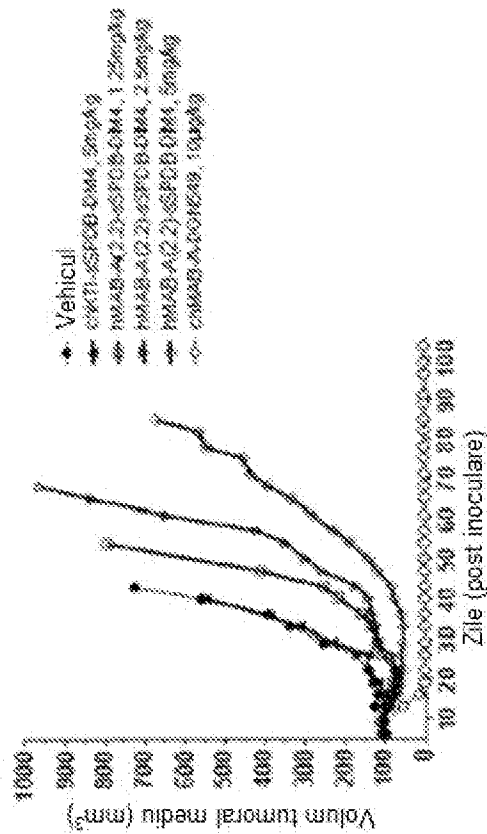


FIG. 8D FACS: 300-19: ADAM9 umană





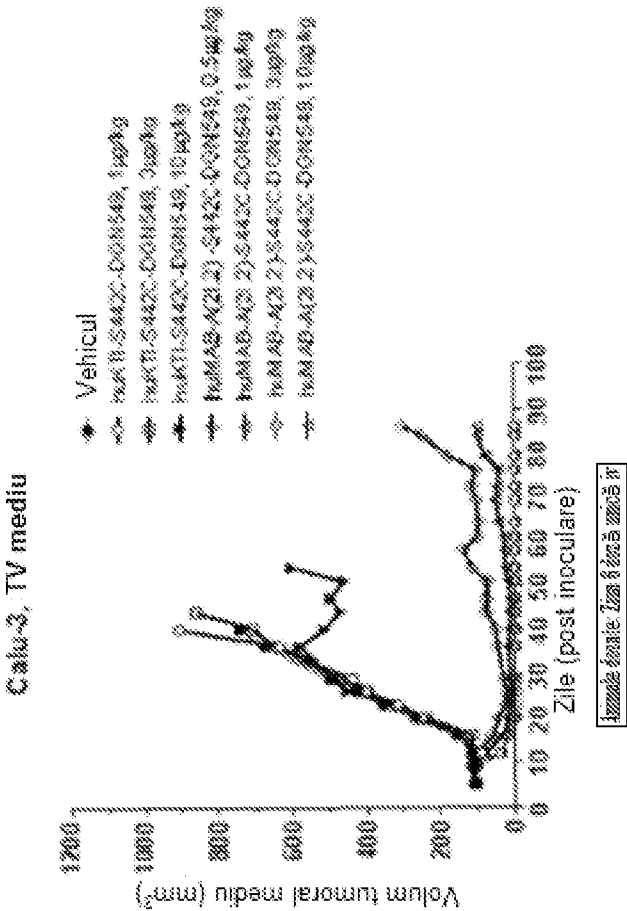
Cău-3, TV mediu (mm3)



bază de date: Urmărirea tumorii

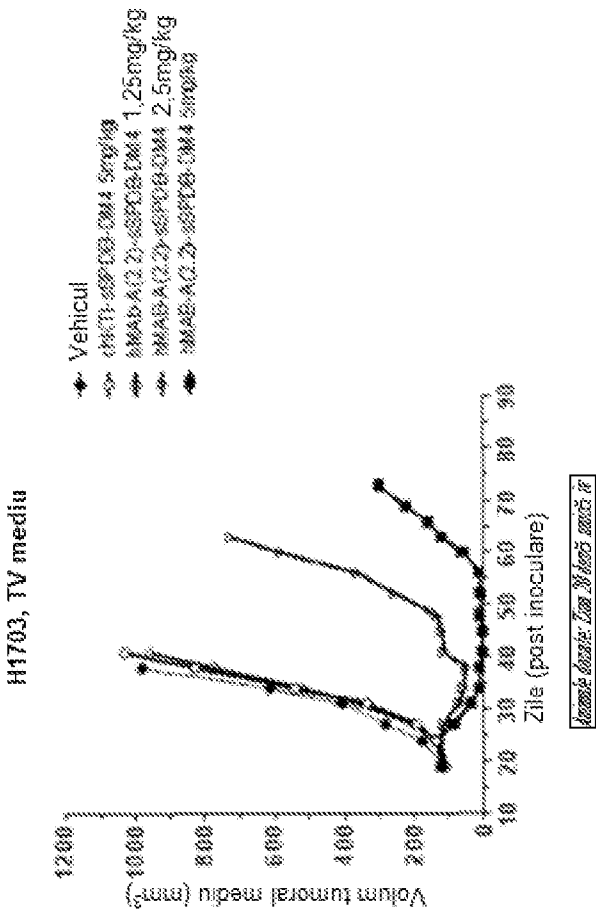
Grup	Agent	Doză (mg/kg)	Program de tratament	Interval de timp (zile)	Doză (mg/kg)	Interval de timp (zile)	Temperatura (°C)	Urmărirea tumorii	Urmărirea tumorii	Urmărirea tumorii
A	bază	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	CCK1+SPC8-DM4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
C	MMAB-A(2)-SPC8-DM4	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0
D	MMAB-A(2)-SPC8-DM4	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0
E	MMAB-A(2)-SPC8-DM4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
F	CCK1+SPC8-DM4	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Urmărirea tumorii (mm ³) =										

FIG. 10



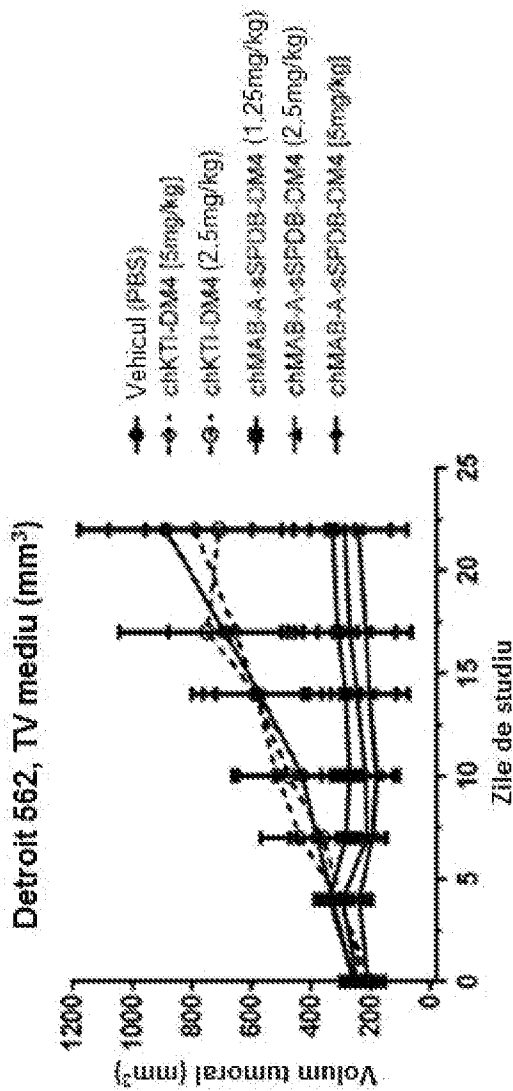
GRUP	MTC	Regresii		Rezultate
		PR	CR	
A	Vehicle	-	-	-
B	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 1µg/kg	0%	0%	Inactiv
C	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 3µg/kg	0%	0%	Inactiv
D	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 10µg/kg	0%	0%	Inactiv
E	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 0.5µg/kg	7%	0%	Puternic Activ
F	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 1µg/kg	2%	2%	Puternic Activ
G	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 3µg/kg	0%	0%	Puternic Activ
H	hMAB-A(2)2-SC442C-DON548, 10µg/kg	0%	0%	Puternic Activ

FIG. 11



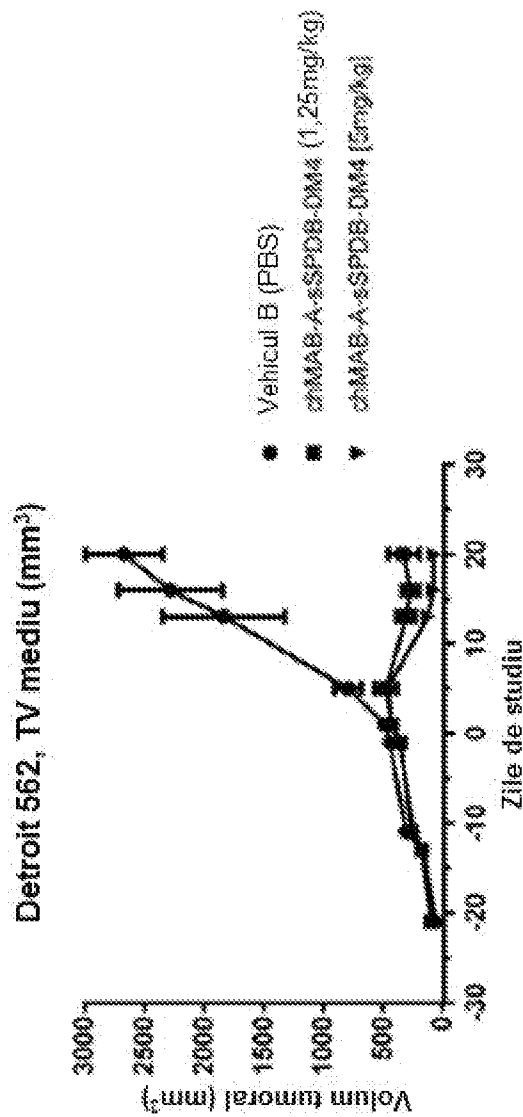
Grup	Agent	Culo	Doza per inoculare (mg/kg)	Inoculare dozara	Arta inoculare (mg/kg)	Timp la apare inoculare (zile)	T.C. (%)	T.C. (zile)	L.CK	Zile de regresie		Rezultat
A	Vehicle	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	MMAB-AQ2-32P08-DM4	6	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	MMAB-AQ2-32P08-DM4	6	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	MMAB-AQ2-32P08-DM4	6	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	MMAB-AQ2-32P08-DM4	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timp de dozare a tumorii (T) = 2.94 (varia exponențială în funcție de F = 0.0000)												

FIG. 12



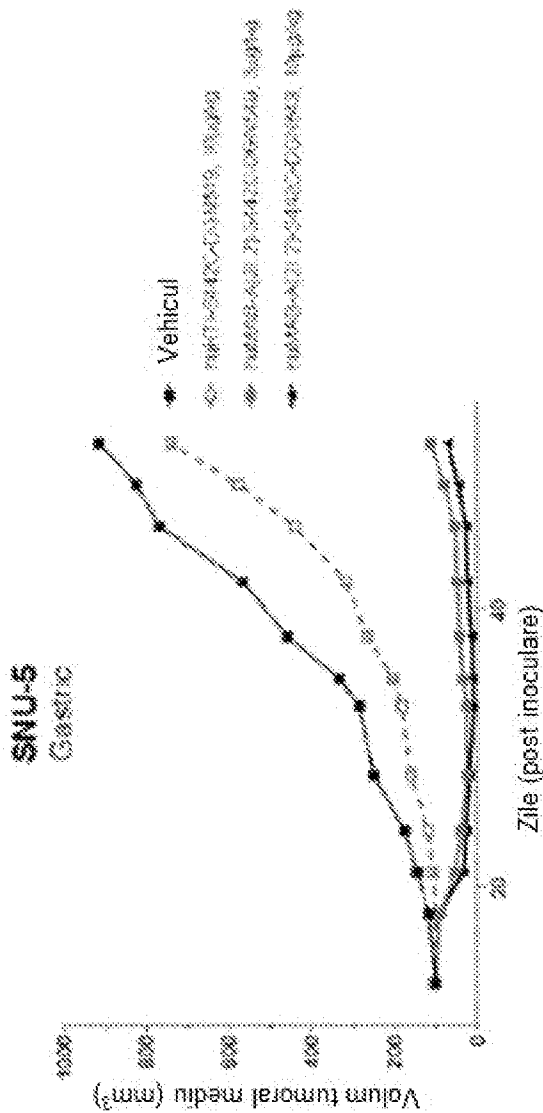
Grup	Agent	Cale	Doză per injecție (mg/kg)	Program dozare	ori/zi	Doză totală (mg/kg)	T/C (%)	Zile de regresie	
								Parțial	Complet
1	Vehicle	ip	-	qdx1	0	-	-	-	-
2	chKT1-sPDB-DM4	ip	5	qdx1	0	5	89	3/7	0/7
3	chKT1-sPDB-DM4	ip	2.5	qdx1	0	2.5	80	3/7	1/7
4	chMAB-A-sPDB-DM4	ip	5	qdx1	0	5	32	6/7	1/7
5	chMAB-A-sPDB-DM4	ip	2.5	qdx1	0	2.5	27	6/7	2/7
6	chMAB-A-sPDB-DM4	ip	1.25	qdx1	0	1.25	37	5/7	0/7

FIG. 13



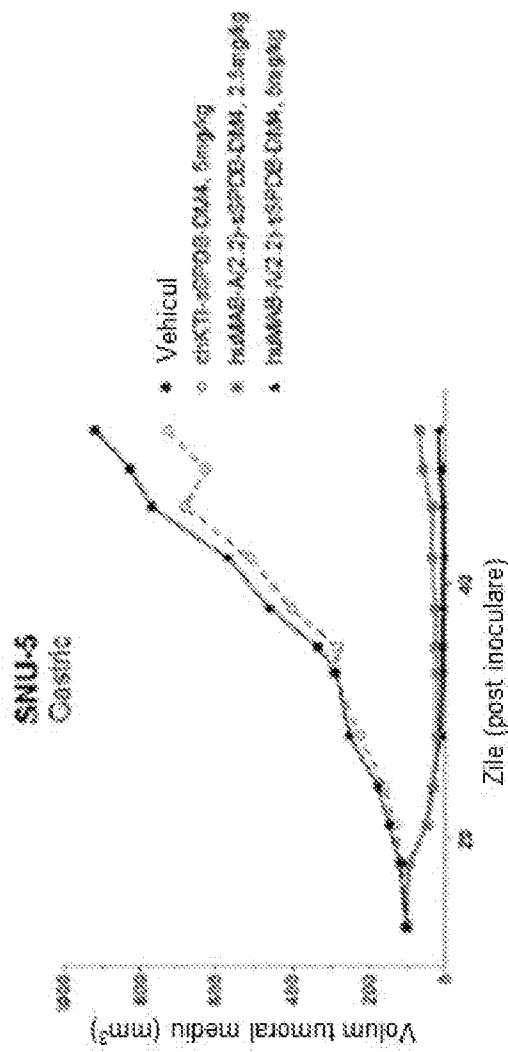
Grup	Agent	Cale	Doză per injectie (mg/kg)	Program dozare	ori/zi	Doză totală (mg/kg)	T/C (%)	Zile de regresie	
								Parțial	Complet
1	Vehicul	ip	-	qdx1	1	-	-	-	-
2	chMAB-A-sSPD8-DM4	ip	5	qdx1	1	5	3	6/6	1/7
3	chMAB-A-sSPD8-DM4	ip	1.25	qdx1	1	1.25	14	6/6	0/7

FIG. 14



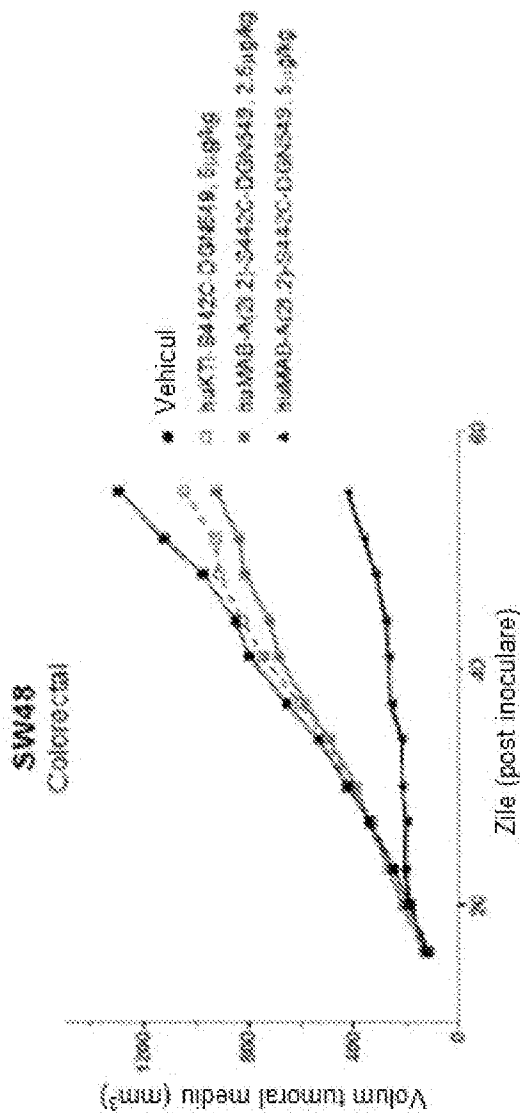
Tratament	%T/C (Ziua 46)	Regresii		Rezultate
		P%	CR	
huMAB-A(21.2)-S442C-OGN549, 10µg/kg	58%	0/8	0/8	Inactiv
huMAB-A(21.2)-S442C-OGN549, 3µg/kg	7%	8/8	4/8	Putemic Activ
huMAB-A(21.2)-S442C-OGN549, 10µg/kg	4%	8/8	5/8	Putemic Activ

FIG. 15



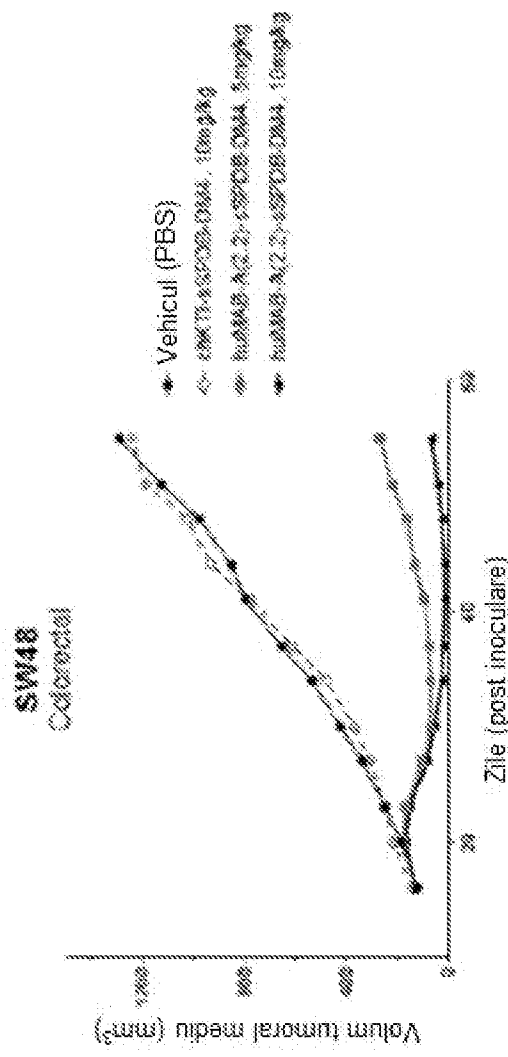
Tratament	%T/C (Ziua 46)	Regresii		Rezultate
		PR	CR	
cK17-SPDB-OMA, 5mg/kg	89%	0/8	0/8	Inactiv
hMMA8-A(2,2)-SPDB-OMA, 2.5mg/kg	5%	8/8	2/8	Putemic Activ
hMMA8-A(2,2)-SPDB-OMA, 5mg/kg	1%	8/8	6/8	Putemic Activ

FIG. 16



Tratament	%T/C (Ziua 34)	Regresii		Rezultate
		PR	CR	
huK11-S442C-DGN549, 5µg/kg	94%	0/6	0/6	Inactiv
huMA8-A(21.2)-S442C-DGN549, 2.5µg/kg	92%	0/6	0/6	Inactiv
huMA8-A(21.2)-S442C-DGN549, 5µg/kg	41%	2/6	0/6	Activ

FIG. 17



Tratament	%T/C (Ziua 34)	Regresii		Rezultate
		%	CR	
chK17+SPD8-DNA, 10mg/kg	90%	0/6	0/6	Inactiv
huMA8-A(2.2)+SPD8-DNA, 5mg/kg	13%	0/6	0/6	Activ
huMA8-A(2.2)+SPD8-DNA, 10mg/kg	5%	6/6	0/6	Putemic Activ

FIG. 18

FIG. 19A

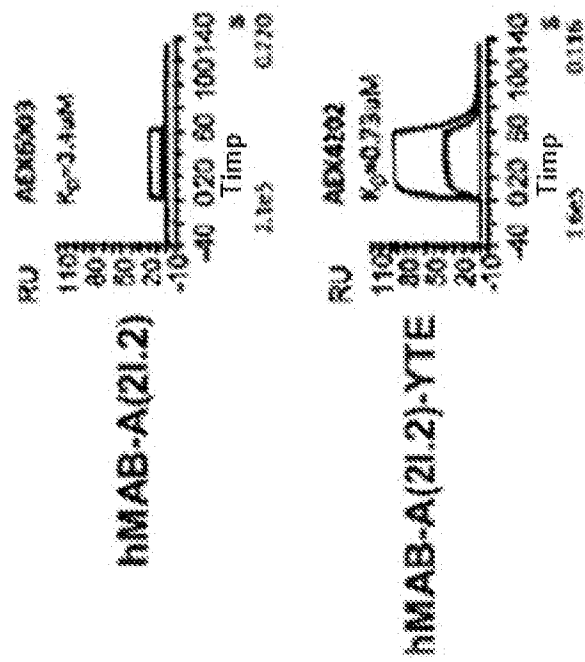
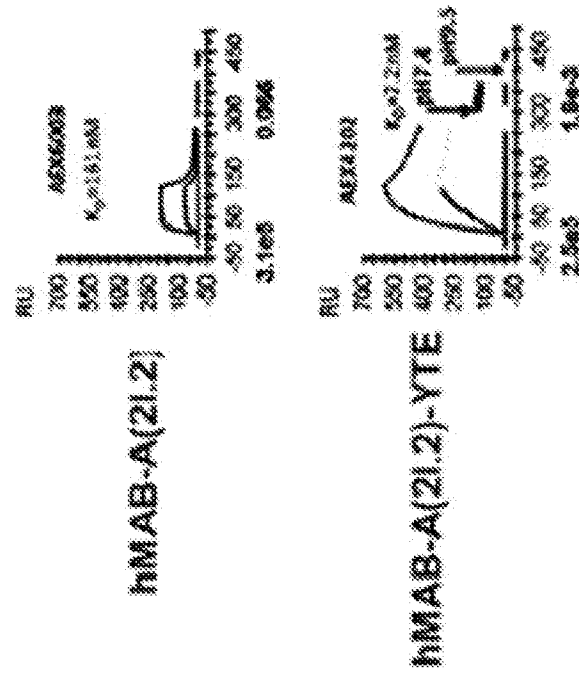


FIG. 19B



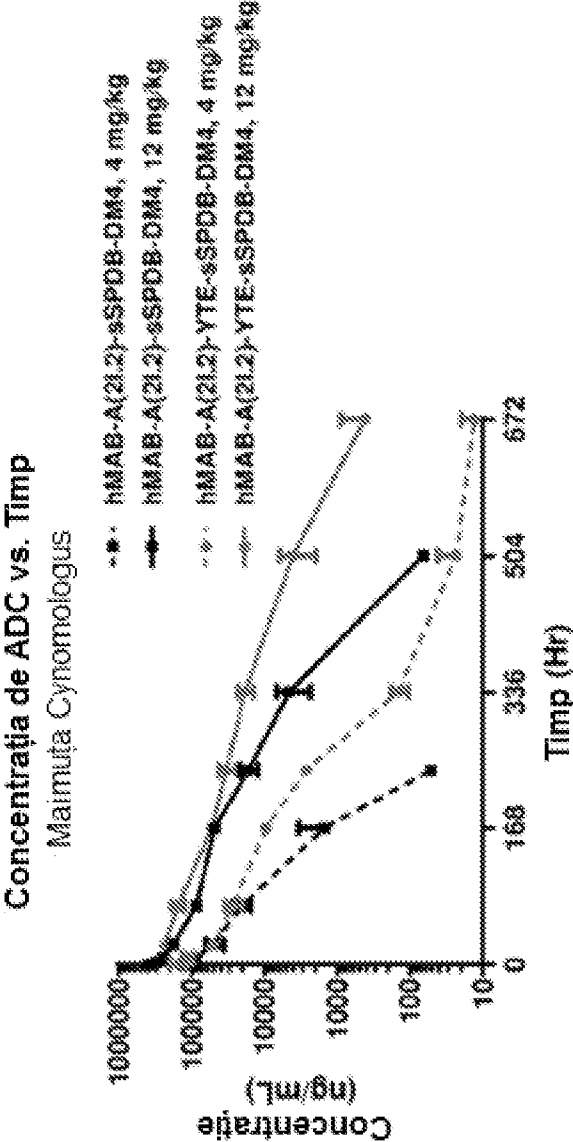


FIG. 20