



MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3691692 (13) T2

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

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0822 (22) Data de depozit: 2018.10.12 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18797311.0, 2018.10.12 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3691692, 2020.08.12 (31) Numărul cererii prioritare: 201762572467 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.10.14 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2021, 2021.05.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 53/2020, 2020.12.30 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 08/2020, 2020.08.31
(71) Solicitant: ABBVIE INC., US (72) Inventatori: SINGH Shweta, US; RICHARDSON Jennifer Hope, US; SERWER Laura Patterson, US; TERRETT Jonathan Alexander, US; MORGAN-LAPPE Susan E., US; HENRIQUES Tracy, US; RALSTON Sherry L., US; LEANNA Marvin Robert, US; BADAGNANI Ilaria, US; BOSE Sahana, US (73) Titular: ABBVIE INC., US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Conjuğați medicament anticorp activabili anti-CD71 și metode de utilizare a acestora

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă în general la anticorpi activabili conjuğați care leagă CD71 în forma lor activă și metode de crearea a acestora și utilizarea acestor anticorpi activabili conjuğați anti-CD71 într-o varietate de indicații terapeutice, de diagnostică și profilactice.

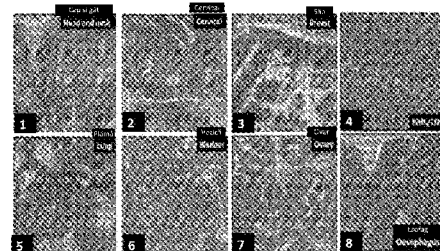
Secvențe: 208

Revendicări: 11

Figuri: 18

2

FIG. 1



MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

(54) Anti-CD71 activatable antibody drug conjugates and methods of use thereof

(57) Abstract:

1
The invention relates generally to conjugated activatable antibodies that bind CD71 in their active form and methods of making and using these anti-CD71 conjugated activatable antibodies in a variety of therapeutic, diagnostic and prophylactic

2
indications.
Sequences: 208
Claims: 11
Fig.: 18

Descriere:

(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

DOMENIUL INVENȚIEI

5

Prezenta dezvăluire se referă în general la conjugați medicament anticorp activabili (AADC) care leagă CD71 într-o stare activată și la metodele de fabricare și utilizare a acestor anticorpi activabili conjugați anti-CD71 într-o varietate de indicații terapeutice, de diagnostic și profilactice.

FUNDALUL INVENȚIEI

10

Terapiile bazate pe anticorpi s-au dovedit a fi tratamente eficiente pentru mai multe boli, dar în unele cazuri, toxicitățile datorate expresiei largi a țintei au limitat eficacitatea lor terapeutică. În plus, produsele terapeutice pe bază de anticorpi au prezentat alte limitări, cum ar fi eliminarea rapidă din circulație după administrare.

15

În domeniul terapiei cu micromolecule, au fost dezvoltate strategii pentru a furniza promedicamentele unei entități chimice active. Astfel de promedicamente se administrează într-o formă relativ inactivă (sau semnificativ mai puțin activă). Odată administrat, promedicamentul este metabolizat *in vivo* în compusul activ. Astfel de strategii de promedicament pot asigura o selectivitate crescută a medicamentului pentru ținta sa dorită și pentru o reducere a efectelor adverse.

20

În consecință, există o nevoie continuă în domeniul terapiei pe bază de anticorpi pentru anticorpi care imită caracteristicile dorite ale promedicamentului cu micromolecule.

WO 2016/179257 se referă în general la anticorpi care leagă CD71, anticorpi activabili care se leagă în mod specific la CD71 și la metode de fabricare și utilizare a acestora.

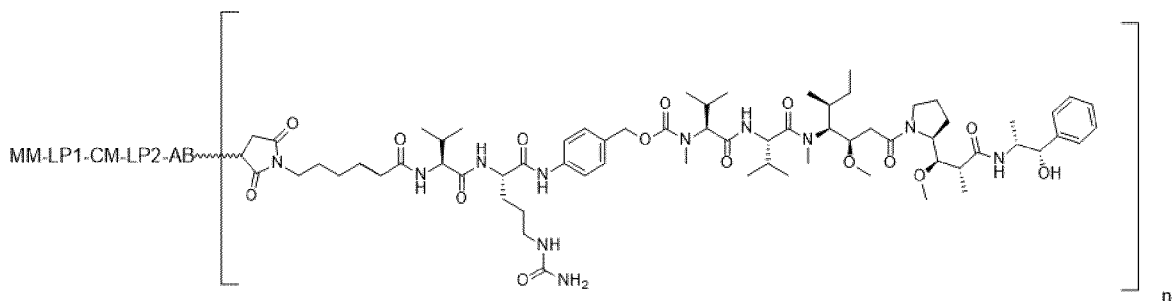
25

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție furnizează anticorpi activabili conjugați care se leagă în mod specific la CD71, cunoscută și ca proteina 1 a receptorului transferinei (TfR1), anticorpii activabili conjugați fiind definiți după cum urmează.

Prezenta invenție furnizează un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia:

30

**Formula (I)**

(a) în care (i) AB este un anticorp care se leagă în mod specific la CD71 uman și cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând o secvență CDRH1 cuprinzând SECV ID NR: 9, o secvență CDRH2 cuprinzând SECV ID NR: 10 și o secvență CDRH3 cuprinzând ID SECV NR: 11; și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență CDRL1 cuprinzând SECV ID NR: 12 sau SECV ID NR: 13, o secvență CDRL2 cuprinzând SECV ID NR: 14 și o secvență CDRL3 cuprinzând SECV ID NR: 15; (ii) MM este un radical de mascare care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18, în care MM inhibă legarea AB la CD71 uman atunci când anticorpul activabil conjugat este într-o stare neclivată; (iii) LP1 este un prim radical de legătură care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 207; (iv) CM este un radical clivabil care cuprinde secvența SECV ID NR: 156, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează; și (v) LP2 este un al doilea radical de legătură cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38; și (b) în care „n” este 2. În unele realizări, AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări, AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau fie pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

35

40

45

Intr-un aspect inrudit al invenției, este prezentat aici un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia în care (i) AB este un anticorp care se leagă în mod specific la CD71 uman și cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 5 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 7; (ii) MM este un radical de mascare care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18, în care MM inhibă legarea AB la CD71 uman atunci când anticorpul activabil conjugat este într-o stare neclivată; (iii) LP1 este un prim radical de legătură care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 207; (iv) CM este un radical clivabil care cuprinde secvența SECV ID NR: 156, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează; și (v) LP2 este un al doilea radical de legătură cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38; și (b) în care „n” este 2. În unele realizări, AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări, AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau fie pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

Intr-un aspect inrudit al invenției, este prezentat aici un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia în care (i) AB este un anticorp care se leagă în mod specific la CD71 uman și cuprinde un lanț greu care cuprinde o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 19; (ii) MM este un radical de mascare care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 18, în care MM inhibă legarea AB la CD71 uman atunci când anticorpul activabil conjugat este într-o stare neclivată; (iii) LP1 este un prim radical de legătură care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 207; (iv) CM este un radical clivabil care cuprinde secvența SECV ID NR: 156, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează; și (v) LP2 este un al doilea radical de legătură cuprinzând secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 38; și (b) în care „n” este 2. În unele realizări, AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări, AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau fie pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

Intr-un aspect inrudit al invenției, este prezentat aici un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia în care MM-LP1-CM-LP2-AB este un anticorp activabil, în care AB este un anticorp care se leagă specific la CD71 uman, în care anticorpul activabil cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 169 și în care „n” este 2. În unele realizări, AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări, AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau fie pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

Intr-un aspect inrudit al invenției, este prezentat aici un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia în care MM-LP1-CM-LP2-AB este un anticorp activabil, în care AB este un anticorp care se leagă specific la CD71 uman, în care anticorpul activabil cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 170 în care „n” este 2. În unele realizări, AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări, AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu, și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau fie pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

Intr-un alt aspect al dezvoltării care este parte a invenției revendicate, sunt furnizate aici metode de fabricare a unui anticorp activabil conjugat cum s-a revendicat, metoda cuprinzând (i) reducerea unui anticorp activabil cuprinzând MM-LP1-CM-LP2-AB cu un agent de reducere; și (ii) conjugarea a două vMMAE la anticorpul activabil redus.

Intr-un alt aspect al dezvoltării, sunt furnizate aici compoziții farmaceutice care cuprind anticorpul activabil conjugat conform revendicărilor. În unele realizări, compozițiile farmaceutice pot cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic.

Intr-un alt aspect al dezvoltării care nu este parte a invenției revendicate, sunt prezentate aici metode de tratare, ameliorare a unui simptom sau întârziere a evoluției unui cancer la un subiect, metoda cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic de anticorp activabil conjugat conform revendicărilor sau a unei compoziții farmaceutice cuprinzând anticorpul activabil conjugat conform revendicărilor și opțional, un purtător acceptabil farmaceutic, la un subiect care are nevoie de acesta pentru un cancer selectat din grupul format din: cancer gastric, cancer ovarian, cancer esofagian, cancer pulmonar nonmicrocelular, cancer mamar ER +, cancer

mamar triplu negativ, cancer colorectal, melanom, cancer de prostată, mielom multiplu, limfom difuz cu celule B mari, carcinom cu celule mici la cap și gât, cancer pancreatic, mezoteliom, limfom non-Hodgkin, carcinom hepatocelular și glioblastom.

5 Intr-un alt aspect al dezvoltării care este parte a invenției revendicate, este furnizat aici un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor, sau o compoziție farmaceutică cuprinzându-l pe acesta pentru utilizare ca un medicament.

10 Intr-un alt aspect al dezvoltării care nu este parte a invenției revendicate, este furnizat aici un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor, sau o compoziție farmaceutică cuprinzându-l pe acesta pentru utilizare în tratamentul cancerului, opțional în care cancerul este selectat din grupul format din: cancer gastric, cancer ovarian, cancer esofagian, cancer pulmonar nonmicrocelular, cancer mamar ER +, cancer mamar triplu negativ, cancer colorectal, melanom, cancer de prostată, mielom multiplu, limfom difuz cu celule B mari, carcinom cu celule mici la cap și gât, cancer pancreatic, mezoteliom, limfom non-Hodgkin, carcinom hepatocelular și glioblastom.

15 Intr-un alt aspect al dezvoltării, este prezentată aici o trusă care cuprinde cel puțin un anticorp activabil cum s-a revendicat. Trusa poate cuprinde în plus unul sau mai multe vcMMAE și/sau un agent de reducere.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

20 FIG. 1, așa cum s-a discutat în Exemplul 5, descrie teste imunohistochimice (IHC) exemplificative pentru a determina nivelurile de expresie CD71 în diferite tipuri de țesuturi canceroase primare și metastatice. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul au arătat că CD71 este exprimat la niveluri ridicate în tumorile primare ale unei varietăți de cancere umane.

25 FIG. 2, așa cum s-a discutat în Exemplul 5, descrie studii exemplificative ale nivelului de expresie al CD71 în mai multe mostre de cancer metastatic derivate de la pacienți. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul au arătat că CD71 este exprimat la niveluri ridicate în tumorile metastatice într-o varietate de tipuri de cancer uman.

30 FIG. 3A și 3B, așa cum s-a discutat în Exemplul 4, descriu un test exemplificativ *in vitro* al capacității anticorpilor activabili anti-CD71 neconjugați și conjugați ai dezvoltării de a lega CD71 recombinant uman sau de cinomolgus atunci când anticorpul activabil este intact sau activat proteolitic (denumit ca „ACT”). Rezultatele exemplificative prezentate în aceste figuri și exemple au arătat că anticorpul activabil conjugat anti-CD71 se leagă la CD71 la niveluri comparabile cu omologul său anticorp activabil anti-CD71 neconjugat și, de asemenea, ambii se leagă la CD71 cu o afinitate crescută echivalentă la activarea proteazei.

35 FIG. 3C și 3D, așa cum s-a discutat în Exemplul 4, descriu un test exemplificativ *in vitro* al capacității anticorpilor activabili anti-CD71 neconjugați și conjugați ai dezvoltării de a lega CD71 uman sau de cinomolgus pe o suprafață celulară atunci când anticorpul activabil este intact sau activat proteolitic (denumit ca „ACT”). Rezultatele exemplificative prezentate în aceste figuri și exemple au arătat că anticorpul activabil conjugat anti-CD71 se leagă la suprafața celulară CD71 la niveluri comparabile cu omologul său anticorp activabil anti-CD71 neconjugat și, de asemenea, ambii se leagă la suprafața celulară a CD71 cu o afinitate crescută echivalentă la activarea proteazei.

40 FIG. 4A, 4B și 4C, așa cum s-a discutat în exemplul 6, descriu studii de eficacitate exemplificative ale anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 (AADC) ai prezentei dezvoltării într-un model de xenogrefă pe șoarece (anti-CD71 TF01-3011-MMAE vs. anti-CD71 TF02.13-2011-MMAE). Aceste rezultate exemplificative prezentate în aceste figuri și exemple au arătat că un AADC cu radicalul de mascare cu afinitate mai mică (TF02.13) a demonstrat o eficacitate mai mare decât un AADC cu un radical de mascare cu afinitate mai mare (TF01).

50 FIG. 5, așa cum s-a discutat în Exemplul 7, descrie un studiu exemplificativ de eficacitate al anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 (AADC) ai prezentei dezvoltării într-un model de xenogrefă pe șoarece. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul demonstrează că eficacitatea AADC indicată (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE) cu un substrat mai puțin clivabil este substanțial aceeași cu cea a AADC (anti-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE) cu un substrat mai clivabil prezentate în FIG. 4B și 4C.

55 FIG. 6A, 6B, 6C și 6D, așa cum s-a discutat în exemplul 8, descriu studii de eficacitate exemplificative ale anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 (AADC-uri) cu DAR diferiți (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE cu un DAR ~ 3 vs. anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2 cu un DAR ~ 2) ai prezentei dezvoltării într-un model de xenogrefă pe șoarece. Rezultatele exemplificative prezentate în aceste figuri și exemplul demonstrează că eficacitatea AADC-urilor potrivite cu doza (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE) având DAR-uri diferite au arătat o eficacitate comparabilă.

FIG. 7A, 7B și 7C, așa cum s-a discutat în Exemplul 9, prezintă fluxuri de lucru schematice exemplificative pentru analiza produselor metabolice rezultate din administrarea anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 (AADC-uri) din prezenta dezvoltare.

FIG. 8A, 8B, 9A, 9B, 10 și 11, așa cum s-a discutat în Exemplele 11-14, descriu cursuri de timp exemplificative ale produselor metabolice secundare după administrarea anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 (AADC-uri) ai prezentei dezvoltării într-un model pe animal. Rezultatele exemplificative prezentate în aceste figuri și exemplul demonstrează că cantitatea de AADC totală și intactă a prezentei dezvoltării (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) este menținută la animale pe tot parcursul dozării într-o cantitate proporțională cu doza și cantitatea de MMAE care este conjugată la anticorpul activabil este substanțial mai mare decât cantitatea de MMAE neconjugat pe parcursul dozării și la toate nivelurile de dozare.

FIG. 12, așa cum s-a discutat în Exemplul 17, descrie titrarea exemplificativă a articolelor de test indicate la fragmentul de proteină iC3b, reprezentând capacitatea lor de a activa cascada complementului. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul demonstrează că AADC din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) a demonstrat o capacitate mai mică pentru activarea complementului în comparație cu anticorpul său activabil neconjugat.

FIG. 13, așa cum s-a discutat în Exemplul 19, ilustrează eficacitatea exemplificativă a AADC din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) într-un model de xenogrefă pe șoarece folosind linii celulare colorectale umane. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul demonstrează că AADC din prezenta dezvoltare a arătat o inhibare semnificativă a creșterii tumorii la toate dozele, cu regresia completă observată la dozele cele mai mari.

FIG. 14, așa cum s-a discutat în Exemplul 20, ilustrează eficacitatea exemplificativă a AADC din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) într-un model de xenogrefă pe șoarece folosind tumori derivate de la pacienți umani (DLBCL). Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul demonstrează că AADC din prezenta dezvoltare a arătat o inhibare semnificativă a creșterii tumorii după o singură administrare, cu răspunsuri complete observate în unele cazuri.

FIG. 15A, 15B și 15C, așa cum s-a discutat în Exemplul 21, ilustrează eficacitatea exemplificativă a AADC din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) la modelele de xenogrefă (PDX) derivate de la șoarece. Rezultatele exemplificative prezentate în aceste figuri și exemplul demonstrează că AADC din prezenta dezvoltare a demonstrat eficacitate, inclusiv răspunsuri complete în unele cazuri, în modelele PDX derivate dintr-o varietate de tipuri de cancer uman.

FIG. 16, așa cum s-a discutat în Exemplul 22, ilustrează eficacitatea exemplificativă a AADC din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) într-un model de xenogrefă derivat de la șoarece. Rezultatele exemplificative prezentate în această figură și exemplul demonstrează că AADC din prezenta dezvoltare a demonstrat eficacitate, inclusiv răspunsuri complete în unele cazuri, la modelul de cancer pancreatic PDX.

FIG. 17, așa cum s-a discutat în Exemplul 10, rezumă rezultatele care arată anticorpii activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC-uri) din prezenta dezvoltare (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) sunt bine tolerați și stabili la maimuțele cinomolgus, chiar și la doze relativ mai mari, comparativ cu conjugatul medicament anticorp anti-CD71 parental corespunzător (ADC), AADC având un substrat cu clivabilitate mai mare și AADC având un DAR mai mare

FIG. 18A, 18B și 18C, așa cum s-a discutat în Exemplul 27, arată profilul HIC separat al speciilor prezente în anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE nepurificat și anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 purificat, precum și viteza lor de eliminare la șoareci. Aceste cifre și exemple arată că anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 migrează ca o singură specie de conjugat și are o viteză de eliminare mai mică.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Prezenta dezvoltare furnizează anticorpi activabili conjugați anti-CD71 care leagă specific CD71 într-o stare activată. CD71 este, de asemenea, cunoscut sub numele de proteina 1 a receptorului transferinei (TfR1). În general, prezenta dezvoltare este direcționată către un anticorp activabil conjugat anti-CD71 care cuprinde un radical de mascare, un radical clivabil, un liant vc și o toxină MMAE. Radicalul de mascare (MM) reduce capacitatea situsului de legare al anticorpului de a se lega la antigenul său țintă CD71 atunci când anticorpul activabil este într-o stare neclivată; radicalul clivabil (CM) este un substrat activabil cu protează care este clivat în microambientul tumoral, rezultând îndepărtarea radicalului de mascare și activarea concomitentă a CDR-urilor care țintesc anti-CD71. În mod specific, prezenta dezvoltare descrie selecția unui anticorp monoclonal activabil conjugat anti-CD71 care are o eficacitate și tolerabilitate superioară față de alți anticorpi

monoclonali activabili conjugați anti-CD71, altfel cunoscuți în domeniu, datorită faptului că au combinația unică a unui radical de mascare cu afinitate mai mică, a unui substrat al radicalului mai puțin clivabil și o încărcare redusă de 2 a medicamentului, care are conduc împreună la îmbunătățirea eficacității și tolerabilității la modelele de tumori pe șoarece. În plus, anticorpului monoclonal activabil conjugat anti-CD71 îi lipsește, de asemenea, în mod surprinzător, capacitatea de a se lega la receptorul inhibitor FcγRIIb, spre deosebire de alți anticorpi care conțin un IgG1 Fc de tip sălbatic, ceea ce este important deoarece legarea la astfel de receptori este cunoscută că inhibă procesele dependente de calciu precum degranularea, fagocitoza, citotoxicitatea mediată de celule dependente de anticorpi (ADCC), eliberarea citokinelor și activarea proinflamatorie, din care toate ar fi de așteptat să conducă la o eficacitate scăzută dacă receptorul FcγRIIb ar fi activat.

CD71 este receptorul suprafeței celulare care este exprimat pe celulele care se divid, inclusiv pe celulele canceroase. Este exprimat la niveluri ridicate într-o mare varietate de tipuri de celule canceroase, iar CD71 este interiorizat, făcându-l astfel o țintă atractivă pentru terapia țintită a cancerului utilizând toxine conjugate direcționate către anticorp. Radicalii de mascare (MM) cu afinități mai mari și mai mici, ca și radicalii clivabili (CM) având clivabilitate mai mică sau mai mare, au fost identificați și utilizați pentru a construi o varietate de anticorpi activabili și apoi anticorpi conjugați vcMMAE (*adică* conjugați de medicament anticorp activabili sau AADC-uri). Studiile exemplificative de eficacitate ale acestor anticorpi activabili conjugați într-un model de xenogrefă pe șoarece au arătat că AADC-urile cu radicali de mascare cu afinitate mai mare (de exemplu, CD71-TF01-3011-vcMMAE) au demonstrat eficacitate mai mică decât cei cu măști de afinitate mai mică (de exemplu, CD71-TF02.13- 3011-vcMMAE). Mai mult, alte studii de eficacitate folosind AADC-uri care au aceeași mască de afinitate mai mică, dar cu substraturi de clivabilitate diferite, au arătat că, în timp ce eficacitatea a fost aceeași, la primatul neuman, AADC cu substratul mai puțin clivabil (CD71-TF02.13-2011-vcMMAE) a fost mai bine tolerat și cu niveluri mai scăzute de AADC circulant în formă activată în comparație cu AADC cu substratul mai clivabil (CD71-TF02.13-3011-vcMMAE), oferind astfel un indice terapeutic mai mare. Studiile ulterioare au arătat că AADC-urile care au un raport mai mic de medicamente la anticorpi activabili (de exemplu, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2, unde DAR este 2) au fost mai tolerate la doze mai mari comparativ cu același anticorp activabil conjugat, cu DAR mai mare (de exemplu DAR ~ 3). Mai mult, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 a arătat o eficacitate echivalentă cu dozașele potrivite cu doza la AADC cu DAR mai mare într-o varietate de modele CDX și PDX pe șoareci de cancer uman. În cele din urmă, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 a arătat o toleranță semnificativă față de omologul său nemascat, care nu a fost tolerat chiar și la doze mici.

În unele realizări, anticorpii monoclonali activabili conjugați sunt internalizați de celule care conțin CD71. Utilizarea termenului „CD71” este destinată să acopere orice variație a acestuia, cum ar fi, ca exemplu nelimitativ, CD-71 și/sau CD 71, și toate variațiile sunt utilizate aici interschimbabil.

CD71 este o glicoproteină transmembranară care leagă în principal transferina. CD71 este esențial pentru homeostazia celulară. CD71 este reciclat continuu prin endocitoză mediată de ligand, unde ligandul principal este transferina. CD71 este, de asemenea, cunoscut a fi exprimat omniprezent pe celulele care se divid.

Expresia și/sau activitatea aberantă a CD71 și a semnalizării legate de CD71 au fost implicate în patogeniza multor boli și tulburări, cum ar fi cancerul. CD71 este supraexprimat în multe cancere, incluzând atât cancerele solide, cât și pe cele hematologice. CD71 are o expresie largă a suprafeței celulare. CD71 în celulele maligne mediază o absorbție mai mare a fierului necesară diviziunii celulare. CD71 este de asemenea asociat cu prognoza slabă în leucemii. CD71 este ținta de dorit, deoarece este răspândită în mai multe afecțiuni de cancer.

Dezvăluirea furnizează anticorpi anti-CD71 activabili conjugați care sunt utili în metodele de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau atenuarea unui simptom al unei boli sau tulburări asociate cu exprimarea și/sau activitatea aberantă a CD71. De exemplu, anticorpii anti-CD71 activabili sunt utilizați în metode de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau atenuarea unui simptom al unui cancer sau al unei alte afecțiuni neoplazice.

Dezvăluirea furnizează anticorpi anti-CD71 activabili conjugați care sunt utili în metodele de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau atenuarea unui simptom al unei boli sau tulburări asociate cu celulele care exprimă CD71. În unele realizări, celulele sunt asociate cu expresia și/sau activitatea normală a CD71. De exemplu, anticorpii anti-CD71 activabili sunt utilizați în metode de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau atenuarea unui simptom al unui cancer sau al unei alte afecțiuni neoplazice.

Dezvăluirea furnizează anticorpi anti-CD71 activabili conjugați care sunt utili în metodele de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau atenuarea unui simptom al

unei boli sau tulburări în care celulele bolnave exprimă CD71. În unele realizări, celulele bolnave sunt asociate cu expresia și/sau activitatea aberantă a CD71. În unele realizări, celulele bolnave sunt asociate cu expresia și/sau activitatea normală a CD71. De exemplu, anticorpii anti-CD71 activabili sunt utilizați în metode de tratare, prevenire, întârziere a evoluției, ameliorarea și/sau

5 atenuarea unui simptom al unui cancer sau al unei alte afecțiuni neoplazice.

Anticorpii anti-CD71 activabili conjugați includ un anticorp care leagă specific CD71 cuplat la un radical de mascare (MM), astfel încât cuplarea MM reduce capacitatea anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia de a lega CD71. MM este cuplat printr-o secvență care include un substrat pentru o protează, de exemplu, o protează care este colocalizată

10 cu CD71 la un situs de tratament la un subiect.

Exemple de anticorpi anti-CD71 activabili conjugați ai invenției includ, de exemplu, anticorpi activabili care includ un lanț greu și un lanț ușor care sunt, sau sunt derivați din, secvențele variabile ale lanțului greu și ale lanțului ușor prezentate mai jos (secvențele CDR sunt prezentate cu caractere aldine și subliniate):

15

muM21 VH:

EVQLQESGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNSETGYNQNFKGKAKLTAV
TSASTAYMDLSSLTNEEDSAVYYCTREENWDPGFAFWGQGLITVSA (SECV ID NR: 1)

muM21 VL:

DIVMTQTPAIMSASPGEKVTITCSASSSVYYMYWFQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLT
ISRMEAEDAATYYCQQRNYPYTFGGGTKLEIKRA (SECV ID NR: 2)

lanț greu variabil hu2vHa

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNSETGYAQKFQGRVTMTRD
20 TSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREENWDPGFAFWGQGLVTVSS (SECV ID NR: 3)

lanț greu variabil hu2vHb

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTAD
TSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREENWDPGFAFWGQGLVTVSS (SECV ID NR: 4)

lanț greu variabil hu2vHc

25

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTAD
TSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREENWDPGFAFWGQGLITVSS (SECV ID NR: 5)

lanț ușor variabil hu21vKa

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYYMYWYQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SECV ID NR: 6)

lanț ușor variabil hu21vKb

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLIWYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SECV ID NR: 7)

lanț ușor variabil hu21vKc

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCCRASSSVYYMYWFQKPGKAPKLIWYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SECV ID NR: 8)

35 Exemple de anticorpi anti-CD71 activabili conjugați conform invenției includ anticorpi activabili care includ o combinație a unei secvențe variabile a regiunii 1 determinantă a complementarității lanțului greu (VH CDR1, denumită de asemenea aici ca CDRH1), o secvență variabilă a regiunii 2 determinantă a complementarității lanțului greu (VH CDR2, denumită de asemenea aici ca CDRH2), o secvență variabilă a regiunii 3 determinantă a complementarității lanțului greu (VH CDR3, denumită de asemenea aici ca CDRH3), o secvență variabilă a regiunii 1

determinantă a complementarității lanțului ușor (VL CDR1, denumită de asemenea aici ca CDRL1), o secvență variabilă a regiunii 2 determinantă a complementarității lanțului ușor (VL CDR2, denumită de asemenea aici ca CDRL2) și o secvență variabilă a regiunii 3 determinantă a complementarității lanțului ușor (VL CDR3, denumită de asemenea aici ca CDRL3).

5 În prezenta invenție, anticorpus anticorpusului activabil conjugat cuprinde o combinație dintr-o secvență VH CDR1, o secvență VH CDR2, o secvență VH CDR3, o secvență VL CDR1, o secvență VL CDR2 și o secvență VL CDR3, în care secvența VH CDR1 cuprinde secvența de aminoacizi GYTFTSYWMH (SECV ID NR: 9); secvența VH CDR2 cuprinde secvența de aminoacizi AIYPGNSETG (SECV ID NR: 10); secvența VH CDR3 cuprinde secvența de aminoacizi ENWDPGFAF (SECV ID NR: 11); secvența VL CDR1 cuprinde secvența de aminoacizi SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) sau CRASSSVYYMY (SECV ID NR: 13); secvența VL CDR2 cuprinde secvența de aminoacizi STSNLAS (SECV ID NR: 14); iar secvența VL CDR3 cuprinde secvența de aminoacizi QQRNYPYT (SECV ID NR: 15).

15 În prezenta invenție, anticorpus anticorpusului activabil conjugat leagă specific CD71. În unele realizări, anticorpus activabil conjugat include un anticorp monoclonal care leagă CD71. În unele realizări, un astfel de anticorp monoclonal care leagă CD71 este un anticorp monoclonal umanizat sau complet uman.

În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat conform prezentei dezvăluiri cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând SECV ID NR: 7. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat conform prezentei invenții cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând SECV ID NR: 5 și o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând SECV ID NR: 7.

25 În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu care este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% sau 99% identică cu o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor care este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% sau 99% identică cu o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu care este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% sau 99% identică cu o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 1 și 3-5 și o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor care este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7.

35 În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 5 și o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7.

40 În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7. În unele realizări, anticorpus anticorpusului activabil conjugat din prezenta dezvăluire este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 5 și o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7.

identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a lanțului ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi cuprinzând SECV ID NR: 7.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele pentru producerea unui anticorp activabil al unui anticorp activabil conjugat al dezvoltării prin cultivarea unei celule în condiții care conduc la exprimarea anticorpului activabil, în care celula cuprinde o moleculă de acid nucleic a divulgării sau un vector al divulgării.

Anticorpul anti-CD71 activabil conjugat furnizat aici, referit aici de asemenea interschimbabil ca anticorpi activabili conjugati anti-CD71 sau anticorpi activabili conjugati CD71, sunt stabili în circulație, activați la situsurile intenționate de terapie și/sau de diagnostic, dar nu în mod normal, de exemplu, la țesutul sănătos sau alt țesut care nu este țintit pentru tratament și/sau diagnostic și, atunci când sunt activați, prezintă legare la CD71 care este cel puțin comparabilă cu anticorpii nemodificați, corespunzător, referit aici ca anticorpi parental.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie metodele de tratare, prevenire și/sau întârziere a debutului sau evoluției, sau atenuare a unui simptom asociat cu expresia și/sau activitatea aberantă a CD71 la un subiect folosind anticorpii activabili conjugati din revendicări.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, prevenire și/sau întârziere a debutului sau evoluției, sau atenuare a unui simptom asociat cu prezența, creșterea, proliferarea, metastaza și/sau activitatea celulelor care exprimă CD71 sau exprimă aberant CD71 la un subiect folosind anticorpii activabili conjugati din revendicări.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, prevenire și/sau întârziere a debutului sau evoluției, sau atenuare a unui simptom asociat cu prezența, creșterea, proliferarea, metastaza și/sau activitatea celulelor care exprimă CD71 într-un subiect folosind anticorpii activabili conjugati din revendicări.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, prevenire și/sau întârziere a debutului sau evoluției, sau atenuare a unui simptom asociat cu prezența, creșterea, proliferarea, metastaza și/sau activitatea celulelor care exprimă aberant CD71 la un subiect folosind anticorpii activabili conjugati din revendicări.

Anticorpii activabili conjugati într-o stare activată leagă CD71 și includ (i) un anticorp (AB) care se leagă specific la CD71; (ii) un radical de mascare (MM) care, atunci când anticorpii activabili este într-o stare neclivată, inhibă legarea AB la CD71; și (c) un radical clivabil (CM) cuplat la AB, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca substrat pentru o protează.

În prezenta invenție, anticorpii activabili conjugati cuprinde o peptidă de legătură între MM și CM și o peptidă de legătură între CM și AB.

Astfel, în prezenta invenție, anticorpii activabili conjugati cuprinde o primă peptidă de legare (LP1) și o a doua peptidă de legare (LP2), în care anticorpii activabili conjugati în starea neclivată are aranjamentul structural de la N-terminal la C-terminal, după cum urmează: MM-LP1-CM-LP2-AB.

În prezenta invenție, LP1 cuprinde secvența de aminoacizi GGGSSGGS (SECV ID NR: 207).

În prezenta invenție, LP2 cuprinde secvența de aminoacizi GGGS (SECV ID NR: 38).

În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 100 nM sau mai puțin pentru legarea la CD71 de mamifere. În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 10 nM sau mai puțin pentru legarea la CD71 de mamifere. În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 5 nM sau mai puțin pentru legarea la CD71. În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 1 nM sau mai puțin pentru legarea la CD71. În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 0,5 nM sau mai mică pentru legarea la CD71. În unele realizări, AB are o constantă de disociere de aproximativ 0,1 nM sau mai puțin pentru legarea la CD71. În unele variante, AB are o constantă de disociere de 0,01 nM la 100 nM, 0,01 nM la 10 nM, 0,01 nM la 5 nM, 0,01 nM la 1 nM, 0,01 la 0,5 nM, 0,01 nm la 0,1 nM, 0,01 nm la 0,05 nM, 0,05 nM la 100 nM, 0,05 nM la 10 nM, 0,05 nM la 5 nM, 0,05 nM la 1 nM, 0,05 la 0,5 nM, 0,05 nm la 0,1 nM, 0,1 nM la 100 nM, 0,1 nM la 10 nM, 0,1 nM la 5 nM, 0,1 nM la 1 nM, 0,1 la 0,5 nM, 0,5 nM la 100 nM, 0,5 nM la 10 nM, 0,5 nM la 5 nM, 0,5 nM la 1 nM, 1 nM la 100 nM, 1 nM la 10 nM, 1 nM la 5 nM, 5 nM la 100 nM, 5 nM la 10 nM sau 10 nM la 100 nM, pentru legarea la CD71 de mamifere.

În unele realizări, anticorpii activabili conjugati într-o stare neclivată se leagă specific la CD71 de mamifer cu o constantă de disociere mai mică sau egală cu 1 nM, mai mică sau egală cu 5 nM, mai mică sau egală cu 10 nM, mai mică decât sau egală la 15 nM, mai mică sau egală cu 20 nM, mai mică sau egală cu 25 nM, mai mică sau egală cu 50 nM, mai mică sau egală cu 100 nM,

mai mică sau egală cu 150 nM, mai mică sau egală cu 250 nM, mai mică sau egală cu 500 nM, mai mică sau egală cu 750 nM, mai mică sau egală cu 1000 nM și/sau mai mică sau egală cu 2000 nM.

În unele realizări, anticorpus activabil conjugat într-o stare neclivată se leagă specific la CD71 de mamifer cu o constantă de disociere în intervalul de la 1 nM la 2000 nM, 1 nM la 1000 nM, 1 nM la 750 nM, 1 nM la 500 nM, 1 nM la 250 nM, 1 nM la 150 nM, 1 nM la 100 nM, 1 nM la 50 nM, 1 nM la 25 nM, 1 nM la 15 nM, 1 nM la 10 nM, 1 nM la 5 nM, 5 nM la 2000 nM, 5 nM la 1000 nM, 5 nM la 750 nM, 5 nM la 500 nM, 5 nM la 250 nM, 5 nM la 150 nM, 5 nM la 100 nM, 5 nM la 50 nM, 5 nM la 25 nM, 5 nM la 15 nM, 5 nM la 10 nM, 5 nM la 5 nM, 10 nM la 2000 nM, 10 nM la 1000 nM, 10 nM la 750 nM, 10 nM la 500 nM, 10 nM la 250 nM, 10 nM la 150 nM, 10 nM la 100 nM, 10 nM la 50 nM, 10 nM la 25 nM, 10 nM la 15 nM, 15 nM la 2000 nM, 15 nM la 1000 nM, 15 nM la 750 nM, 15 nM la 500 nM, 15 nM la 250 nM, 15 nM la 150 nM, 15 nM la 100 nM, 15 nM la 50 nM, 15 nM la 25 nM, 25 nM la 2000 nM, 25 nM la 1000 nM, 25 nM la 750 nM, 25 nM la 500 nM, 25 nM la 250 nM, 25 nM la 150 nM, 25 nM la 100 nM, 25 nM la 50 nM, 50 nM la 2000 nM, 50 nM la 1000 nM, 50 nM la 750 nM, 50 nM la 500 nM, 50 nM la 250 nM, 50 nM la 150 nM, 50 nM la 100 nM, 100 nM la 2000 nM, 100 nM la 1000 nM, 100 nM la 750 nM, 100 nM la 500 nM, 100 nM la 250 nM, 100 nM la 150 nM, 150 nM la 2000 nM, 150 nM la 1000 nM, 150 nM la 750 nM, 150 nM la 500 nM, 150 nM la 250 nM, 250 nM la 2000 nM, 250 nM la 1000 nM, 250 nM la 750 nM, 250 nM la 500 nM, 500 nM la 2000 nM, 500 nM la 1000 nM, 500 nM la 750 nM, 500 nM la 500 nM, 500 nM la 250 nM, 500 nM la 150 nM, 500 nM la 100 nM, 500 nM la 50 nM, 750 nM la 2000 nM, 750 nM la 1000 nM sau 1000 nM la 2000 nM.

În unele realizări, anticorpus activabil conjugat într-o stare activată se leagă specific la CD71 de mamifer cu o constantă de disociere care este mai mică sau egală cu 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM sau 10 nM.

În unele realizări, anticorpus activabil conjugat într-o stare activată se leagă specific la CD71 de mamifer cu o constantă de disociere în intervalul de la 0,01 nM la 100 nM, 0,01 nM la 10 nM, 0,01 nM la 5 nM, 0,01 nM la 1 nM, 0,01 la 0,5 nM, 0,01 nm la 0,1 nM, 0,01 nm la 0,05 nM, 0,05 nM la 100 nM, 0,05 nM la 10 nM, 0,05 nM la 5 nM, 0,05 nM la 1 nM, 0,05 la 0,5 nM, 0,05 nm la 0,1 nM, 0,1 nM la 100 nM, 0,1 nM la 10 nM, 0,1 nM la 5 nM, 0,1 nM la 1 nM, 0,1 la 0,5 nM, 0,5 nM la 100 nM, 0,5 nM la 10 nM, 0,5 nM la 5 nM, 0,5 nM la 1 nM, 1 nM la 100 nM, 1 nM la 10 nM, 1 nM la 5 nM, 5 nM la 100 nM, 5 nM la 10 nM sau 10 nM la 100 nM.

În prezenta invenție, CD71 de mamifer este CD71 uman. În unele realizări, AB se leagă specific la CD71 uman cu o constantă de disociere mai mică de 1 nM.

În unele realizări, AB blochează capacitatea unui ligand natural de a se lega la CD71 de mamifer cu un EC_{50} mai mic sau egal cu 5 nM, mai mic sau egal cu 10 nM, mai mic sau egal cu 50 nM, mai mic sau egal cu 100 nM, mai mic sau egal cu 500 nM și/sau mai mic sau egal cu 1000 nM. În unele realizări, AB blochează capacitatea unei transferine de a se lega la CD71 de mamifer cu un EC_{50} mai mic sau egal cu 5 nM, mai mic sau egal cu 10 nM, mai mic sau egal cu 50 nM, mai mic sau egal cu 100 nM, mai mic sau egal cu 500 nM și/sau mai mic sau egal cu 1000 nM. În unele realizări, ligandul natural al CD71 este transferina.

În unele realizări, AB blochează capacitatea unui ligand natural de a se lega la CD71 de mamifer cu un EC_{50} de 5 nM la 1000 nM, 5 nM la 500 nM, 5 nM la 100 nM 5 nM la 50 nM, 5 nM la 10 nM, 10 nM la 1000 nM, 10 nM la 500 nM, 10 nM la 100 nM 10 nM la 50 nM, 50 nM la 1000 nM, 50 nM la 500 nM, 50 nM la 100 nM, 100 nM la 1000 nM, 100 nM la 500 nM, 500 nM la 1000 nM. În unele realizări, AB blochează capacitatea unei transferine de a se lega la CD71 de mamifer cu un EC_{50} de 5 nM la 1000 nM, 5 nM la 500 nM, 5 nM la 100 nM 5 nM la 50 nM, 5 nM la 10 nM, 10 nM la 1000 nM, 10 nM la 500 nM, 10 nM la 100 nM 10 nM la 50 nM, 50 nM la 1000 nM, 50 nM la 500 nM, 50 nM la 100 nM, 100 nM la 1000 nM, 100 nM la 500 nM, 500 nM la 1000 nM. În unele realizări, ligandul natural al CD71 este transferina.

În unele realizări, AB din prezenta dezvoltare inhibă sau reduce creșterea, proliferarea și/sau metastaza celulelor care exprimă CD71 de mamifer. Fără a intenționa să fie legat de nicio teorie, AB din prezenta dezvoltare poate inhiba sau reduce creșterea, proliferarea și/sau metastaza celulelor care exprimă CD71 de mamifer prin legarea specifică la CD71 și inhibarea, blocarea și/sau prevenirea legării unui ligand natural la CD71 de mamifer. În unele realizări, ligandul natural al CD71 de mamifer este transferina.

În unele realizări, MM are o constantă de disociere pentru legarea la AB care este mai mare decât constanta de disociere a AB la CD71.

În unele realizări, MM are o constantă de disociere pentru legarea la AB care nu este mai mare ca constanta de disociere a AB la CD71.

În unele realizări, MM are o constantă de disociere pentru legarea la AB care este mai mică decât constanta de disociere a AB la CD71.

În unele realizări, constanta de disociere (K_d) a MM către AB nu este mai mult de 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 de ori sau mai mult, sau între 1 - 5, 5 - 10, 10 - 100, 10 - 1.000, 10 - 10.000, 10 - 100.000, 10 - 1.000.000, 10 - 10.000.000, 100 - 1.000, 100 - 10.000, 100 - 100.000, 100 - 1.000.000, 100 - 10.000.000, 1.000 - 10.000, 1.000 - 100.000, 1.000 - 1.000.000, 1000 - 10.000.000, 10.000 - 100.000, 10.000 - 1.000.000, 10.000 - 10.000.000, 100.000 - 1.000.000, sau 100.000 - 10.000.000 de ori sau mai mare decât constanta de disociere a AB către țintă.

În unele realizări, MM nu interferează sau concurează cu AB pentru legarea la CD71 atunci când anticorpul activabil este într-o stare clivată.

În unele variante, MM este o polipeptidă cu o lungime de aproximativ 2 până la 40 de aminoacizi. În unele realizări, MM este o polipeptidă cu o lungime de până la aproximativ 40 de aminoacizi.

În unele realizări, secvența de polipeptidă MM este diferită de cea a CD71. În unele realizări, secvența de polipeptidă MM nu este mai mult de 50% identică cu orice partener natural de legare a AB. În unele realizări, secvența de polipeptidă MM este diferită de cea a CD71 și nu este mai mult de 40%, 30%, 25%, 20%, 15% sau 10% identică cu orice partener natural de legare al AB.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin două ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM către CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin cinci ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM către CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin de 10 ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM către CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin 20 de ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM spre CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin 40 de ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM spre CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin 100 de ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM către CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin 1000 de ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM spre CD71.

În unele realizări, cuplarea MM la AB reduce capacitatea AB de a lega CD71 astfel încât constanta de disociere (K_d) a AB atunci când este cuplat la MM spre CD71 este de cel puțin 10.000 de ori mai mare decât K_d a AB atunci când nu este cuplat la MM către CD71.

În unele realizări, în prezența CD71, MM reduce capacitatea AB de a lega CD71 cu cel puțin 90% atunci când CM este neclivat, comparativ cu atunci când CM este clivat atunci când este testat *in vitro* folosind un test de deplasare țintă, cum ar fi de exemplu, testul descris în publicația PCT nr. WO 2010/081173.

În prezenta invenție, MM cuprinde o secvență de aminoacizi din SECV ID NR: 18.

În unele realizări, proteaza care clivează CM este activă, adică, reglată pozitiv sau altfel nereglată, în țesutul bolnav, iar proteaza clivează CM în anticorpul activabil atunci când anticorpul activabil este expus la protează.

În unele realizări, proteaza este colocalizată cu CD71 într-un țesut, iar proteaza clivează CM în anticorpul activabil conjugat atunci când anticorpul activabil este expus la protează.

În unele realizări, CM este poziționat în anticorpul activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpul activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este cel puțin de două ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată (adică, atunci când anticorpul activabil conjugat este în starea clivată), AB se leagă la CD71.

În unele realizări, CM este poziționat în anticorpul activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpul activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpului activabil la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin cinci ori mai mare

decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată (adică, atunci când anticorpus activabil conjugat este în starea clivată), AB se leagă la CD71.

5 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 10 ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă de CD71, în timp ce în starea clivată (adică, atunci când anticorpus activabil conjugat este în starea clivată), AB se leagă la CD71.

10 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 20 de ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată (adică, atunci când anticorpus activabil conjugat este în starea clivată), AB se leagă la CD71.

15 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 40 de ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată, AB se leagă la CD71.

20 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 50 de ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată, AB se leagă la CD71.

25 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 100 de ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată, AB se leagă la CD71.

30 În unele realizări, CM este poziționat în anticorpus activabil conjugat astfel încât atunci când anticorpus activabil conjugat este în stare neclivată, legarea anticorpusului activabil conjugat la CD71 este redusă pentru a avea loc cu o constantă de disociere care este de cel puțin 200 de ori mai mare decât constanta de disociere a unui AB nemodificat care se leagă la CD71, în timp ce în starea clivată, AB se leagă la CD71.

35 În unele realizări, CM este o polipeptidă cu o lungime de până la 15 aminoacizi.

40 În unele realizări, CM este o polipeptidă care include un prim radical clivabil (CM1) care este un substrat pentru cel puțin o metaloprotează matricială (MMP) și un al doilea radical clivabil (CM2) care este un substrat pentru cel puțin o protează serină (SP). În unele realizări, fiecare dintre secvența de substrat CM1 și secvența de substrat CM2 ale substratului CM1-CM2 este independent o polipeptidă cu o lungime de până la 15 aminoacizi.

În unele realizări, CM este un substrat pentru cel puțin o protează care este sau se crede că este reglată pozitiv sau altfel nereglată în cancer.

45 În unele realizări, CM este un substrat pentru cel puțin o protează selectată din grupul constând dintr-o metaloprotează matricială (MMP), trombină, o elastază neutrofilă, o protează cisteină, legumaină și o protează serină, cum ar fi matriptaza (MT-SP1) și urokinaza (uPA). Fără a fi legat de teorie, se crede că aceste proteaze sunt reglate pozitiv sau altfel nereglate în cel puțin unul dintre cancere.

50 În unele realizări, CM este selectat pentru utilizare cu o protează specifică, de exemplu o protează despre care se știe că este colocalizată cu ținta anticorpusului activabil.

În unele realizări, CM este un substrat pentru cel puțin o MMP. În unele realizări, CM este un substrat pentru o protează selectată din grupul format din NIW 9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11 și MMP19. În unele realizări CM este un substrat pentru MMP9. În unele realizări, CM este un substrat pentru MMP14.

55 În prezenta invenție, CM cuprinde secvența de aminoacizi ISSGLLSGRSDNP (SECV ID NR: 156), care este de asemenea menționată aici ca substrat 2011.

În unele realizări, CM este un substrat pentru cel puțin două proteaze. În unele realizări, CM este un substrat pentru cel puțin două proteaze selectate din grupul constând dintr-o MMP, trombină, o elastază neutrofilă, o protează cisteină, uPA, legumaină și matriptază.

60 În unele realizări, anticorpus activabil conjugat include cel puțin un prim CM și un al doilea CM. În unele realizări, primul CM și al doilea CM sunt fiecare polipeptide cu o lungime de

cel mult 15 aminoacizi. În unele realizări, cel puțin unul dintre primul CM și al doilea CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează selectată din grupul constând dintr-o MMP, trombină, o elastază neutrofilă, o protează cisteină, uPA, legumaină și matriptază. În unele realizări, primul CM este clivat de un prim agent de clivare selectat din grupul constând dintr-o MMP, o trombină, o elastază neutrofilă, o protează cisteină, uPA, legumaină și matriptază într-un țesut țintă, și al doilea CM este clivat de un al doilea agent de clivare într-un țesut țintă. În unele realizări, cealaltă protează este selectată din grupul constând din cele prezentate în Tabelul (I). În unele realizări, primul agent de clivare și al doilea agent de clivare sunt aceeași protează selectată din grupul constând dintr-o MMP, trombină, o elastază neutrofilă, o protează cisteină, uPA, legumaină și matriptază, iar primul CM și al doilea CM sunt substraturi diferite pentru enzimă. În unele realizări, primul agent de clivare și al doilea agent de clivare sunt aceeași protează selectată din grupul constând din cele prezentate în Tabelul (I). În unele realizări, primul agent de clivare și al doilea agent de clivare sunt proteaze diferite. În unele realizări, primul agent de clivare și al doilea agent de clivare sunt colocalizați în țesutul țintă. În unele realizări, primul CM și al doilea CM sunt clivați de cel puțin un agent de clivare în țesutul țintă.

În unele realizări, anticorpul activabil conjugat este expus la, și clivat de o protează astfel încât, în starea activată sau clivată, anticorpul activabil conjugat include o secvență de aminoacizi a lanțului ușor care include cel puțin o porțiune din secvența LP2 și/sau CM după ce proteaza a clivat CM.

În prezenta invenție, anticorpul activabil este conjugat la doi echivalenți de agent. În unele realizări ale dezvoltării, anticorpul activabil este parte a unui amestec de anticorpi activabili având un număr omogen de echivalenți de agenți conjugați. În unele realizări, anticorpul activabil este parte a unui amestec de anticorpi activabili având un număr eterogen de echivalenți de agenți conjugați. În unele realizări, amestecul de anticorpi activabili este astfel încât numărul mediu de agenți conjugați la fiecare anticorp activabil este între zero și unu, între unu și doi, între doi și trei, sau între trei și patru. În unele realizări, amestecul de anticorpi activabili este astfel încât numărul mediu de agenți conjugați la fiecare anticorp activabil este unu, doi, trei sau patru.

În unele realizări, anticorpul activabil cuprinde una sau mai multe modificări ale secvenței de aminoacizi specifice situsului, astfel încât numărul reziduurilor de lizină și/sau cisteină este crescut sau scăzut în raport cu secvența originală de aminoacizi a anticorpului activabil, astfel în unele realizări crescând sau scăzând corespunzător numărul de agenți care pot fi conjugați cu anticorpul activabil sau, în unele realizări, limitând conjugarea agenților la anticorpul activabil într-o manieră specifică situsului. În unele realizări, anticorpul activabil modificat este modificat cu unul sau mai mulți aminoacizi nenaturali într-o manieră specifică situsului, astfel, în unele variante, limitând conjugarea agenților doar la situsurile aminoacizilor nenaturali.

Termenul „încărcare de medicament” sau „încărcând medicamentul” se referă la raportul molar al moleculelor de medicament pe anticorp într-un anticorp activabil conjugat individual. În prezenta invenție, încărcarea medicamentului este de 2 molecule de medicament.

În scopul prezentei invenții, un specialist în domeniu ar înțelege că „încărcarea medicamentului” și „raportul medicament-anticorp” (denumit de asemenea ca DAR) nu sunt aceleași. DAR se referă la raportul molar mediu al moleculelor medicamentului pe anticorp într-o populație de cel puțin două molecule de anticorp activabil conjugat, în timp ce încărcarea medicamentului se referă la raportul molar al moleculelor de medicament pe anticorp dintr-o moleculă individuală de anticorp activabil conjugat. Încărcarea medicamentului are relevanță în principal pentru construcția și proiectarea unui anticorp activabil conjugat, în timp ce DAR are relevanță în principal pentru compoziția farmaceutică terapeutică a anticorpului activabil conjugat care va fi administrată pacienților.

În unele realizări, anticorpii activabili ai prezentei invenții pot fi conjugați pentru a genera preparări relativ omogene de anticorpi activabili conjugați având o distribuție DAR îngustă. În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat poate fi substanțial omogenă în ceea ce privește distribuția sa DAR, ceea ce înseamnă că în cadrul preparării este o specie predominantă de ADC specific situsului cu un DAR particular (de ex., un DAR de 2 și/sau 4). În unele realizări, prepararea de anticorp activabil conjugat substanțial omogenă poate fi, de asemenea, uniformă în ceea ce privește situsul de încărcare (adică, pe cisteinele libere).

În unele realizări, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați ai dezvoltării va fi de aproximativ 2 și/sau 4. În acest context, termenul „aproximativ” ar trebui interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat care conține mai mult de 80% din două specii primare în agregat având un DAR egal cu 2 și 4 cu o distribuție aproximativ egală (de ex., mai mare de 40% fiecare), iar restul constând din alte specii DAR.

În unele realizări, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați ai dezvoltării va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2. În acest context, termenul „aproximativ” ar trebui interpretat ca

însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat care conține mai mult de aproximativ 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau $99\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

5 În unele variante, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat conținând mai mult de aproximativ $94\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

10 În unele realizări, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat conținând mai mult de aproximativ $95\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

În unele realizări, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat conținând mai mult de aproximativ $96\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

15 În unele variante, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activat conjugat conținând mai mult de aproximativ $97\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

20 În unele variante, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat conținând mai mult de aproximativ $98\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

25 În unele variante, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați din dezvăluire va fi îmbogățit pentru a fi aproximativ 2, termenul „aproximativ” fiind interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat conținând mai mult de aproximativ $99\% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9\%$.

30 În unele variante, DAR-ul anticorpilor activabili conjugați ai dezvoltării va fi de aproximativ 2 și/sau 4. În acest context, termenul „aproximativ” ar trebui interpretat ca însemnând o preparare de anticorp activabil conjugat care conține mai mult de 80% din două specii primare în agregat având un DAR egal cu 2 și 4 cu o distribuție aproximativ egală (de ex., mai mare de 40% fiecare), iar restul constând din alte specii DAR.

35 În unele realizări, este posibil să se obțină omogenitatea dorită prin utilizarea anticorpilor activabili specifici situsului și/sau reducerea selectivă și conjugarea. În unele realizări, omogenitatea dorită poate fi atinsă prin utilizarea construcțiilor specifice situsului în combinație cu reducerea selectivă. În unele realizări, preparatele pot fi purificate în continuare, cum ar fi prin utilizarea tehnicilor de cromatografie analitică sau preparativă. În aceste realizări, omogenitatea preparării de anticorp activabil conjugat poate fi analizată utilizând diverse tehnici cunoscute în domeniu, inclusiv, dar fără a se limita la, spectrometria de masă, HPLC (de exemplu, HPLC de excludere a dimensiunii, RP-HPLC, HIC-HPLC etc.) sau electroforeza capilară.

40 În ceea ce privește purificarea preparărilor de anticorp activabil conjugat, se va aprecia că pot fi utilizate metode preparative farmaceutice standard pentru a obține puritatea dorită. După cum s-a discutat aici, metodele de cromatografie lichidă, cum ar fi faza inversă (RP) și cromatografia de interacțiune hidrofobă (HIC), pot separa compușii din amestec prin valoarea de încărcare a medicamentului. În unele cazuri, schimbul de ioni (IEC) sau cromatografia în mod mixt (MMC) pot fi de asemenea utilizate pentru a izola speciile cu o încărcătură specifică de medicament.

45 În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat al dezvoltării având un DAR dat cu un nivel relativ ridicat de omogenitate a încărcăturii de medicament poate cuprinde de fapt un amestec de conjugați cu o gamă sau o distribuție a încărcărilor de medicament, dar unde distribuția încărcărilor de medicament în amestec este centrată în jurul (sau având o medie ponderată de) valorii medii DAR. Astfel, în unele realizări, preparările de anticorp activabil conjugat vor include un amestec de conjugați în care DAR-ul mediu al amestecului este de aproximativ 1, 2 sau 3, fiecare $\pm 0,5$. Se va aprecia că intervalul sau deviația pot fi mai mici de 0,4 în anumite realizări preferate. Astfel, în alte realizări, compozițiile vor cuprinde un DAR mediu de 1, 2 sau 3, fiecare $\pm 0,3$.

55 În unele realizări, distribuția medicamentelor pe anticorp în preparatele de anticorpi activabili conjugați din reacțiile de conjugare poate fi caracterizată prin mijloace convenționale, cum ar fi spectrofotometria UV-Vis, HPLC în fază inversă, HIC, spectroscopie de masă, ELISA și electroforeză.

60 În unele realizări, un amestec de anticorpi activabili conjugați din dezvoltare care include un amestec de conjugați având încărcări diferite de medicamente poate fi purificat sau îmbogățit

pentru una sau mai multe specii de conjugat având o încărcare specifică de medicament. De exemplu, un amestec de anticorp activabil conjugat care include un amestec de AADC-uri având o încărcătură de medicament de 0, 2, 4, 6 și 8 poate fi îmbogățit sau purificat pentru anticorpii activabili conjugați cu o încărcare de medicament de 2. Așa cum este utilizat aici, o preparare sau purificare sau anticorp activabil conjugat având o preparare relativ omogenă a speciilor de specii conjugate având o încărcare de medicament de 2 este denumită „E2”, care are un DAR de aproximativ 2. Așa cum este utilizat aici, o preparare sau purificare sau anticorp activabil conjugat având un amestec de specii conjugate având o încărcare de medicament de 2 sau 4 denumită „DE” (DAR-îmbogățit), are un DAR de aproximativ 3. În acest context, termenul „aproximativ” este interpretat ca însemnând +/- 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 sau 1,0 din cantitatea interzisă.

În unele realizări, o preparare a unui anticorp activabil conjugat care este purificat sau îmbogățit pentru specii date de conjugat cu o încărcare specifică de medicament, include cel puțin un anumit procent din speciile date de încărcare ale medicamentului. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 care include cel puțin 50% din preparare, este anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2. În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include cel puțin 75% din anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2.

În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include cel puțin 85% din anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2. În unele realizări, o preparare de anticorp activabil E2 conjugat include cel puțin 90% din anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2. În unele realizări, o preparare de anticorp activabil E2 conjugat include cel puțin 95% din anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2. În unele realizări, o preparare de anticorp activabil E2 conjugat include cel puțin 98% din anticorpul activabil conjugat având o încărcare de medicament de 2.

În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat care este purificat sau îmbogățit pentru specii date de încărcare de medicament include mai mulți echivalenți molari ai speciilor date de încărcare de medicament decât echivalenții molari totali ai tuturor celorlalte specii de încărcare de medicament combinate. De exemplu, în unele realizări, o preparare a anticorpului activat conjugat E2 este astfel încât echivalenții combinați ai fiecăreia din speciile de anticorp activabil conjugat din compoziția în care încărcarea medicamentului nu este 2, este mai mică decât echivalenții anticorpului activabil conjugat cu o încărcare de medicament de 2.

În unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat care este purificată sau îmbogățită pentru speciile DAR date (de exemplu E2 așa cum s-a discutat aici) include mai puțin de un anumit procent din anticorpul activat conjugat care nu este specia de încărcare de medicament dată. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include mai puțin de 50% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament pentru 2 specii. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil E2 conjugat include mai puțin de 25% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament a 2 specii. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include mai puțin de 15% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament pentru 2 specii. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include mai puțin de 10% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament a 2 specii. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include mai puțin de 5% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament pentru 2 specii. De exemplu, în unele realizări, o preparare de anticorp activabil conjugat E2 include mai puțin de 2% din anticorpul activat conjugat care nu este încărcarea de medicament pentru 2 specii. În alte realizări, sau preparatele îmbogățite sau purificate (de exemplu, E4 sau DE) pot avea mai puțin de 50%, mai puțin de 25%, mai puțin de 15%, mai puțin de 10%, mai puțin de 5% sau mai puțin de 2%, adică nu sunt speciile corespunzătoare de încărcare a medicamentelor din compoziția de anticorp activabil conjugat îmbogățite sau purificate.

În unele realizări, anticorpul activabil conjugat include de asemenea un radical detectabil. În unele realizări, radicalul detectabil este un agent de diagnostic.

În unele realizări, anticorpul activabil conjugat include de asemenea o peptidă semnal. În unele realizări, peptida semnal este conjugată la anticorpul activabil printr-un distanțier. În unele realizări, distanțierul este conjugat la anticorpul activabil în absența unei peptide semnal. În unele realizări, distanțierul este unit direct la MM-ul anticorpului activabil. Un exemplu de distanțier unit direct la N-terminalul lui MM al anticorpului activabil este QGQSGQ (SECV ID NR: 109). Alte exemple de un distanțier unit direct la N-terminalul lui MM al anticorpului activabil includ QGQSGQG (SECV ID NR: 138), QGQSG (SECV ID NR: 139), QGQS (SECV ID NR: 140), QGQ, QG, și Q. Alte exemple de un distanțier unit direct la N-terminalul lui MM al anticorpului activabil includ QGSGQG (SECV ID NR: 143), QSGQG (SECV ID NR: 144), SGQG (SECV ID

NR: 145), GQG, și G. În unele realizări, nici un distanțier nu este unit la N-terminalul lui MM. În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QGQSGQ (SECV ID NR: 109). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QGQSGQG (SECV ID NR: 138). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QGQSG (SECV ID NR: 139). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QGQS (SECV ID NR: 140). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QGQ. În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QG. În unele realizări, distanțierul include cel puțin reziduul de aminoacizi Q. În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QSGQG (SECV ID NR: 143). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi QSGQG (SECV ID NR: 144). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi SGQG (SECV ID NR: 145). În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi GQG. În unele realizări, distanțierul include cel puțin secvența de aminoacizi G. În unele realizări, distanțierul este absent.

În unele realizări, AB al anticorpului activabil conjugat conține în mod natural una sau mai multe legături disulfură. În unele realizări, AB poate fi modificat genetic pentru a include una sau mai multe legături disulfură.

În unele realizări, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu selectată din grupul constând din SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor selectată din grupul constând din SECV ID NR: 7. În unele realizări, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu selectată din grupul constând din SECV ID NR: 5 și o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor selectată din grupul constând din SECV ID NR: 7.

În unele realizări, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu selectată din grupul constând din SECV ID NR: 5. În unele realizări, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor selectată din grupul constând din SECV ID NR: 7. În unele variante, anticorpul activabil al anticorpului activabil conjugat al dezvoltării este codificat de o secvență de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu selectată din grupul constând din SECV ID NR: 5 și o secvență de acid nucleic care este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor selectată din grupul constând din SECV ID NR: 7.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele pentru producerea unui anticorp activabil al dezvoltării prin cultivarea unei celule în condiții care conduc la exprimarea anticorpului activabil, în care celula cuprinde o moleculă de acid nucleic a dezvoltării sau un vector al dezvoltării.

O parte a prezentei dezvoltări, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de fabricare a unui anticorp activabil care, într-o stare activată, leagă CD71, metoda cuprinzând: (a) cultivarea unei celule care conține o construcție de acid nucleic care codifică anticorpul activabil în condiții care conduc la exprimarea anticorpului activabil, în care anticorpul activabil cuprinde un anticorp activabil al dezvoltării; și (b) recuperarea anticorpului activabil.

În unele realizări, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este mai lung decât cel al anticorpului corespunzător; de ex., pK al anticorpului activabil conjugat este mai mare decât cel al anticorpului corespunzător. În unele realizări, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este similar cu cel al anticorpului corespunzător. În unele realizări, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 15 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 12 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 11 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat

este de cel puțin 10 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 9 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 8 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil conjugat este de cel puțin 7 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 6 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 5 zile atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 4 zile atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 3 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 2 zile când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 24 de ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 20 de ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 18 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 16 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 14 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 12 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 10 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 8 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 6 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 4 ore atunci când este administrat unui organism. În unele variante, timpul de înjumătățire seric al anticorpului activabil este de cel puțin 3 ore atunci când este administrat unui organism.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de producere a unui anticorp anti-CD71 și/sau a polipeptidei anticorpului anti-CD71 activabil prin cultivarea unei celule în condiții care conduc la exprimarea polipeptidei, în care celula cuprinde o moleculă de acid nucleic izolată care codifică un anticorp și/sau un anticorp activabil descris aici și/sau vectori care includ aceste secvențe de acid nucleic izolate. Dezvăluirea oferă metode de producere a unui anticorp și/sau a unui anticorp activabil prin cultivarea unei celule în condiții care conduc la exprimarea anticorpului și/sau a anticorpului activabil, în care celula cuprinde o moleculă de acid nucleic izolată care codifică un anticorp și/sau un anticorp activabil descris aici și/sau vectori care includ aceste secvențe izolate de acid nucleic.

O parte din prezenta dezvăluire, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de prevenire, întârziere a evoluției, tratare, atenuare a unui simptom sau altfel ameliorarea unei boli mediate de CD71 la un subiect prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp anti-CD71 activabil conjugat activat conform revendicărilor.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de prevenire, întârziere a evoluției, tratare, atenuare a unui simptom sau altfel ameliorarea cancerului la un subiect prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp anti-CD71 activabil conjugat al revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. CD71 este cunoscut a fi exprimat într-o varietate de cancere, cum ar fi, ca exemplu nelimitativ, adenocarcinom, cancer al căilor biliare (biliar), cancer al vezicii urinare, cancer de sân, de exemplu, cancer de sân triplu-negativ și cancer de sân Her2-negativ; cancer carcinoide; cancer cervical; colangiocarcinom; colorectal; endometrial; gliom; cancer de cap și gât, de exemplu, cancer de celule scuamoase de cap și gât; leucemie; cancer de ficat; cancer pulmonar, de exemplu, NSCLC, SCLC; limfom; melanom; cancer osofaringian; cancer ovarian; cancer pancreatic; cancer de prostată, *de ex.*, carcinom de prostată rezistent la castrare metastatică; cancer renal; cancer de piele; cancer cu celule scuamoase, cancer de stomac; cancer de testicule; cancer tiroidian; și cancer urotelial.

În unele realizări, cancerul este asociat cu o tumoră care exprimă CD71. În unele realizări, cancerul se datorează unei tumori care exprimă CD71.

Un anticorp anti-CD71 activabil conjugat utilizat în oricare dintre realizările acestor metode și utilizări poate fi administrat în orice stadiu al bolii. De exemplu, un astfel de anticorp anti-CD71 activabil conjugat poate fi administrat unui pacient care suferă de cancer în orice stadiu, de la timpuriu la metastatic. Termenii subiect și pacient sunt folosiți aici interschimbabil.

În unele realizări, subiectul este un mamifer, cum ar fi o primată umană sau neumană.

Anticorpul anti-CD71 activabil conjugat conform revendicărilor și formulările terapeutice ale acestuia sunt administrate unui subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare asociată cu expresia și/sau activitatea aberantă a CD71. Un subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare asociată cu expresia și/sau activitatea aberantă a CD71 este identificat folosind oricare dintre o varietate de metode cunoscute în domeniu. De exemplu, subiecții care suferă de cancer sau alte afecțiuni neoplazice sunt identificați folosind oricare dintr-o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi, examinarea fizică și analiza sângelui, urinei și/sau a scaunului pentru a evalua starea de sănătate. De exemplu, subiecții care suferă de inflamație și/sau o tulburare inflamatorie sunt identificați folosind oricare dintre o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi examinarea fizică și/sau analiza fluidelor corporale, de exemplu, analiza sangelui, urinei și/sau a scaunului, pentru a evalua starea de sănătate.

Administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat conform revendicărilor la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu exprimarea și/sau activitatea aberantă a CD71 este considerată reușită dacă se atinge oricare dintr-o varietate de obiective de laborator sau clinice. De exemplu, administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu exprimarea și/sau activitatea aberantă a CD71 este considerată reușită dacă unul sau mai multe dintre simptomele asociate bolii sau tulburării este atenuat, redus, inhibat sau nu evoluează către o stare ulterioară, *adică*, mai rea. Administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu exprimarea și/sau activitate aberantă a CD71 este considerată reușită dacă boala sau tulburarea intră în remisie sau nu evoluează către o stare ulterioară, *adică*, mai rea.

În unele realizări, anticorpul anti-CD71 activabil conjugat și formulările terapeutice ale acestuia sunt administrate unui subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare, cum ar fi subiecții care suferă de cancer sau alte afecțiuni neoplazice, în care celulele bolnave ale subiectului exprimă CD71. În unele realizări, celulele bolnave sunt asociate cu exprimarea și/sau activitatea aberantă a CD71. În unele realizări, celulele bolnave sunt asociate cu exprimarea și/sau activitatea normală a CD71. Un subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare în care celulele bolnave ale subiectului exprimă CD71 este identificat utilizând oricare dintre o varietate de metode cunoscute în domeniu. De exemplu, subiecții care suferă de cancer sau alte afecțiuni neoplazice sunt identificați folosind oricare dintre o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi, examinarea fizică și analiza sângelui, urinei și/sau a scaunului pentru a evalua starea de sănătate. De exemplu, subiecții care suferă de inflamație și/sau o tulburare inflamatorie sunt identificați folosind oricare dintre o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi examinarea fizică și/sau analiza fluidelor corporale, de exemplu, analiza sangelui, urinei și/sau a scaunului, pentru a evalua starea de sănătate.

În unele realizări, anticorpul anti-CD71 activabil conjugat și formulările terapeutice ale acestuia sunt administrate unui subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare asociată cu celulele care exprimă CD71 sau prezența, creșterea, proliferarea, metastaza și/sau activitatea unor astfel de celule, cum ar fi subiecții care suferă de cancer sau alte afecțiuni neoplazice. În unele realizări, celulele sunt asociate cu expresia și/sau activitatea aberantă a CD71. În unele realizări, celulele sunt asociate cu exprimarea și/sau activitatea normală a CD71. Un subiect care suferă sau este susceptibil de o boală sau tulburare asociată cu celulele care exprimă CD71 este identificat utilizând oricare dintre o varietate de metode cunoscute în domeniu. De exemplu, subiecții care suferă de cancer sau alte afecțiuni neoplazice sunt identificați folosind oricare dintre o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi, examinarea fizică și analiza sangelui, urinei și/sau a scaunului pentru a evalua starea de sănătate. De exemplu, subiecții care suferă de inflamație și/sau o tulburare inflamatorie sunt identificați folosind oricare dintre o varietate de teste clinice și/sau de laborator, cum ar fi examinarea fizică și/sau analiza fluidelor corporale, de exemplu, analiza sangelui, urinei și/sau a scaunului, pentru a evalua starea de sănătate.

Administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu celulele care exprimă CD71 este considerată reușită dacă se atinge oricare dintr-o varietate de obiective de laborator sau clinice. De exemplu, administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu celule care exprimă CD71 este considerată reușită dacă unul sau mai multe dintre simptomele asociate bolii sau tulburării este atenuat, redus, inhibat sau nu a evoluat către un stare ulterioară, *adică*, mai rea. Administrarea unui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un pacient care suferă de o boală sau tulburare asociată cu celule care exprimă CD71 este considerată reușită dacă boala sau tulburarea intră în remisie sau nu evoluează către o stare ulterioară, *adică*, mai rea.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, ameliorare a unui simptom sau intarziere a evoluției unei tulburări sau a unei

boli în care celulele bolnave exprimă CD71, care cuprind administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp conjugat al revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp conjugat al revendicărilor la un subiect care are nevoie de acestea.

O parte din prezenta dezvăluire, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, ameliorare a unui simptom sau întârziere a evoluției unei tulburări sau a unei boli asociate cu celulele care exprimă CD71, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp conjugat al revendicărilor, sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp conjugat conform revendicărilor unui subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, tulburarea sau boala asociată cu celulele care exprimă CD71 este cancerul. În unele variante, cancerul este un adenocarcinom, un cancer al căilor biliare (biliar), un cancer de vezică urinară, un cancer de os, un cancer de sân, un cancer de sân triplu negativ, un cancer de sân Her2-negativ, un cancer carcinoid, un cancer cervical, colangiocarcinom, cancer colorectal, cancer de colon, cancer endometrial, un gliom, un cancer de cap și gât, un cancer de celule scuamoase de cap și gât, o leucemie, un cancer de ficat, un cancer de plămâni, un cancer pulmonar nonmicrocelular, un cancer pulmonar microcelular, un limfom, un melanom, un cancer orofaringian, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un cancer de prostată, un carcinom de prostată rezistent la castrare metastatică, un cancer renal, un sarcom, un cancer de piele, un cancer cu celule scuamoase, un cancer de stomac, un cancer la testicule, un cancer tiroidian, un cancer urogenital sau un cancer urotelial. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele realizări, metoda cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de inhibare sau reducere a creșterii, proliferării sau metastazării celulelor care exprimă CD71 de mamifer care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp conjugat conform revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp conjugat al revendicărilor unui subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele variante, metoda cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de inhibare, blocare sau prevenire a legării unui ligand natural la CD71 de mamifere, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp conjugat conform revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp conjugat al revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele realizări, metoda cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, ameliorare ale unui simptom sau întârzierea evoluției unei tulburări sau boli în care celulele bolnave exprimă CD71 care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp activat conjugat al revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp activabil conjugat al revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, tulburarea sau boala este cancerul.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de tratare, ameliorare ale unui simptom sau întârziere a evoluției unei tulburări sau a unei boli asociate cu celule care exprimă CD71 care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp activat conjugat al revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp activabil conjugat al revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, tulburarea sau boala asociată cu celulele care exprimă CD71 este cancerul. În unele realizări, cancerul este un adenocarcinom, un cancer al căilor biliare (biliar), un cancer de vezică urinară, un cancer de os, un cancer de sân, un cancer de sân triplu negativ, un cancer de sân Her2-negativ, un cancer carcinoid, un cancer cervical, un colangiocarcinom, un cancer colorectal, un cancer de colon, un cancer endometrial, un gliom, un cancer de cap și gât, un cancer de celule scuamoase de cap și gât, o leucemie, un cancer de ficat, un cancer de plămâni, un cancer pulmonar nonmicrocelular, un cancer pulmonar microcelular, un limfom, un melanom, un cancer orofaringian, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un cancer de prostată, un carcinom de prostată rezistent la castrare metastatică, un cancer renal, un sarcom, un cancer de piele, un cancer cu celule scuamoase, un cancer de stomac, un cancer de testicule, un cancer tiroidian, un cancer urogenital sau un cancer urotelial. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele realizări, metoda

cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

O parte a prezentei dezvăluiri, dar nu invenția revendicată, o constituie de asemenea metodele de inhibare sau reducere a creșterii, proliferării sau metastazei celulelor care exprimă CD71 de mamifer care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele realizări, metoda cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

O parte din prezenta dezvăluire, dar nu invenția revendicată, o constituie, de asemenea, metodele de inhibare, blocare sau prevenire a legării unui ligand natural la CD71 de mamifer, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor sau dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor la un subiect care are nevoie de acesta. În unele realizări, ligandul natural este transferina. În unele realizări, expresia și/sau activitatea CD71 de mamifer este aberantă. În unele realizări, metoda cuprinde administrarea unui agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

În unele realizări ale acestor metode și truse, anticorpul activabil conjugat anti-CD71 include o etichetă detectabilă. În unele realizări ale acestor metode și truse, eticheta detectabilă include un agent de imagistică, un agent de contrast, o enzimă, o etichetă fluorescentă, un cromofor, un colorant, unul sau mai mulți ioni metalici sau o etichetă pe bază de ligand. În unele realizări ale acestor metode și truse, agentul imagistic cuprinde un radioizotop. În unele realizări ale acestor metode și truse, radioizotopul este indiu sau tecnetiu. În unele realizări ale acestor metode și truse, agentul de contrast cuprinde iod, gadolinu sau oxid de fier. În unele realizări ale acestor metode și truse, enzima cuprinde peroxidază de hrean, fosfatază alcalină sau β -galactozidază. În unele realizări ale acestor metode și truse, eticheta fluorescentă cuprinde proteină fluorescentă galbenă (YFP), proteină fluorescentă cian (CFP), proteină fluorescentă verde (GFP), proteină fluorescentă roșie modificată (mRFP), proteină fluorescentă roșie dimer2 (RFP dimer2), HCRED sau un derivat de europiu. În unele realizări ale acestor metode și truse, eticheta luminescentă cuprinde un derivat de N-metilacridiu. În unele realizări ale acestor metode, eticheta cuprinde o etichetă Alexa Fluor®, cum ar fi Alex Fluor® 680 sau Alexa Fluor® 750. În unele realizări ale acestor metode și truse, eticheta pe bază de ligand cuprinde biotină, avidină, streptavidină sau una sau mai multe haptene.

În unele realizări ale acestor metode și truse, subiectul este un mamifer. În unele realizări ale acestor metode, subiectul este un om. În unele realizări, subiectul este un mamifer neuman, cum ar fi o primată neumană, un animal însoțitor (de exemplu, pisică, câine, cal), animal de fermă, animal de lucru sau animal de grădină zoologică. În unele realizări, subiectul este un rozător.

În unele realizări ale acestor metode și truse, metoda este o metodă *in vivo*. În unele realizări ale acestor metode, metoda este o metodă *in situ*. În unele realizări ale acestor metode, metoda este o metodă *ex vivo*. În unele realizări ale acestor metode, metoda este o metodă *in vitro*.

În unele realizări ale metodelor și truselor, metoda este utilizată pentru a identifica sau altfel rafina o populație de pacienți adecvată pentru tratamentul cu un anticorp activabil conjugat anti-CD71 conform revendicărilor, urmată de tratamentul prin administrarea celui anticorp anti-CD71 activabil conjugat la un subiect care are nevoie de aceasta. De exemplu, pacienții care au fost testați pozitiv atât pentru țintă (de exemplu, CD71), cât și pentru o protează care clivează substratul în radicalul clivabil (CM) al anticorpului activabil anti-CD71 care este testat în aceste metode, sunt identificați ca candidați potriviți pentru tratamentul cu un astfel de anticorp activabil anti-CD71 cuprinzând un astfel de CM, iar pacientului i se administrează apoi o cantitate eficientă terapeutic din anticorpul anti-CD71 activabil conjugat care a fost testat. La fel, pacienții care au fost testați negativ pentru una sau ambele ținte (*de ex.*, CD71) și proteaza care clivează substratul din CM în anticorpul activabil care este testat folosind aceste metode, ar putea fi identificați ca candidați potriviți pentru o altă formă de terapie. În unele realizări, astfel de pacienți pot fi testați cu alți anticorpi activabili anti-CD71 până când este identificat un anticorp activabil anti-CD71 adecvat pentru tratament (de ex., un anticorp activabil anti-CD71 care cuprinde un CM care este clivat de pacient la situsul bolii). În unele realizări, pacientului i se administrează apoi o cantitate eficientă terapeutic din anticorpul anti-CD71 activabil și/sau conjugat pentru care pacientul a fost testat pozitiv.

Compozițiile farmaceutice conform invenției pot include anticorpul conform revendicărilor și opțional un purtător acceptabil farmaceutic. Aceste compoziții farmaceutice pot fi incluse în truse, cum ar fi, de exemplu, trusele de diagnostic.

În unele realizări, compoziția farmaceutică cuprinde un anticorp activabil conjugat conform revendicărilor și opțional un purtător acceptabil farmaceutic. În unele realizări, compoziția farmaceutică cuprinde un agent suplimentar. În unele realizări, agentul suplimentar este un agent terapeutic.

- 5 AB-urile din anticorpii activabili conform invenției leagă specific CD71 uman.
- Anticorpii anti-CD71 activabili conjugați conform prezentei invenții includ un radical de mascare. În prezenta invenție, radicalul de mascare este o secvență de aminoacizi care este cuplată sau altfel atașată la anticorpus anti-CD71 și este poziționată în construcția activabilă a anticorpusului anti-CD71 astfel încât radicalul de mascare reduce capacitatea anticorpusului anti-CD71 de a lega
- 10 specific CD71. Radicalii de mascare adecvați sunt identificați folosind oricare dintr-o varietate de tehnici cunoscute. De exemplu, radicalii de mascare peptidici sunt identificați folosind metodele descrise în Publicația PCT nr. WO 2009/025846 de Daugherty și colab. Radicalul de mascare al anticorpusului anti-CD71 activabil conjugați conform prezentei invenții cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18.
- 15 Anticorpii anti-CD71 activabili conjugați conform prezentei invenții includ un radical clivabil. În prezenta invenție, radicalul clivabil include o secvență de aminoacizi care este un substrat pentru o protează, de obicei o protează extracelulară. Substraturile adecvate sunt identificate folosind oricare dintr-o varietate de tehnici cunoscute. De exemplu, substraturile peptidice sunt identificate folosind metodele descrise în brevetul SUA nr. 7.666.817 de Daugherty și colab.; în brevetul SUA nr. 8.563.269 de Stagliano și colab.; și în publicația PCT nr. WO 2014/026136 de La Porte și colab. (vezi de asemenea, Boulware și colab. „Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics.” Biotechnol. Bioeng. 106.3 (2010): 339-46 Conform invenției, radicalul clivabil cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 156.
- 20
- 25 Substraturile exemplificative includ, dar nu se limitează la, substraturile clivabile de una sau mai multe dintre următoarele enzime sau proteaze enumerate în Tabelul (I).

Tabelul (I): Proteaze și/sau enzime exemplificative

ADAMS, ADAMTS, <i>de ex.</i> ADAM8 ADAM9 ADAM10	Proteinaze cisteinice, <i>de ex.</i> , Cruzipain Legumain Otubain-2	Proteaze serine, <i>de ex.</i> , proteina C activată Catepsină A Catepsină G
ADAM12		Cimază
ADAM15 ADAM17/TACE	KLK-uri, <i>de ex.</i> , KLK4	proteaze ale factorului de coagulare (<i>de ex.</i> , FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1	KLK5	Elastază
ADAMTS1	KLK6	Granzimă B
ADAMTS4	KLK7	Guanidinobenzoatază
ADAMTS5	KLK8	HtrA1
	KLK10	Elastază neutrofilă umană
Proteazele aspartate, <i>de ex.</i> , BACE Renin	KLK11 KLK13 KLK14	Lactoferină
		Marapsin
		NS3/4A
Catepsine aspartice, <i>de ex.</i> , Catepsină D Catepsină E	Metalo proteinaze, <i>de ex.</i> , Meprin Neprilisin	PACE4 Plasmin PSA
	PSMA	tPA
Caspaze, <i>de ex.</i> , Caspază 1	BMP-1	Trombină
		Triptază

Caspază 2	MMP-uri, <i>de ex.</i> ,	uPA
Caspază 3	MMP1	
Caspază 4	MMP2	Transmembrană de tip II
Caspază 5	MMP3	Proteaze serine (TTSP), <i>de ex.</i> ,
Caspază 6	MMP7	DESC1
Caspază 7	MMP8	DPP-4
Caspază 8	MMP9	FAP
Caspază 9	MMP10	Hepsin
Caspază 10	MMP11	Matriptază-2
Caspază 14	MMP12	MT-SP1/Matriptază
	MMP13	TMPRSS2
Catepsine cisteinice, <i>de ex.</i> ,	MMP14	TMPRSS3
Catepsină B	MMP15	TMPRSS4
Catepsină C	MMP16	
Catepsină K	MMP17	
Catepsină L	MMP19	
Catepsină S	MMP20	
Catepsină V/L2	MMP23	
Catepsină X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

Anticorpilor activabili anti-CD71 descriși aici depășesc o limitare a terapeuticilor anticorpilor, în special a terapeuticilor anticorpilor despre care se știe că sunt toxice cel puțin într-o oarecare măsură *in vivo*. Toxicitatea mediată de țintă constituie o limitare majoră pentru dezvoltarea anticorpilor terapeutici. Anticorpilor anti-CD71 activabili furnizați aici sunt concepuți pentru a aborda toxicitatea asociată cu inhibarea țintei în țesuturile normale de către anticorpilor terapeutici tradiționali. Acești anticorpi anti-CD71 activabili rămân mascați până când sunt activați proteolitic la situsul bolii. Începând cu un anticorp anti-CD71 ca anticorp terapeutic parental, anticorpilor anti-CD71 activabili conform invenției au fost modificați genetic prin cuplarea anticorpului la o mască inhibitoare printr-un liant care încorporează un substrat de protează.

Când AB este modificat cu un MM și se află în prezența țintei, legarea specifică a AB la ținta sa este redusă sau inhibată, în comparație cu legarea specifică a AB care nu este modificată cu un MM sau legarea specifică a AB parental la țintă.

K_d a AB modificat cu MM către țintă este de cel puțin 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 sau mai mare sau între 5 - 10, 10 - 100, 10 - 1.000, 10 - 10.000, 10 - 100.000, 10 - 1.000.000, 10 - 10.000.000, 100 - 1.000, 100 - 10.000, 100 - 100.000, 100 - 1.000.000, 100 - 10.000.000, 1.000 - 10.000, 1.000 - 100.000, 1.000 - 1.000.000, 1000 - 10.000.000, 10.000 - 100.000, 10.000 - 1.000.000, 10.000 - 10.000.000, 100.000 - 1.000.000, sau 100.000 - 10.000.000 ori mai mare decât K_d a AB nemodificat cu un MM sau un AB parental către țintă. În schimb, afinitatea de legare a AB modificat cu un MM către țintă este de cel puțin 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 sau mai mare sau între 5 - 10, 10 - 100, 10 - 1.000, 10 - 10.000, 10 - 100.000, 10 - 1.000.000, 10 - 10.000.000, 100 - 1.000, 100 - 10.000, 100 - 100.000, 100 - 1.000.000, 100 - 10.000.000, 1.000 - 10.000, 1.000 - 100.000, 1.000 - 1.000.000, 1000 - 10.000.000, 10.000 - 100.000, 10.000 - 1.000.000, 10.000 - 10.000.000, 100.000 - 1.000.000, sau 100.000 - 10.000.000 ori mai mici decât afinitatea de legare a AB nemodificat cu un MM sau un AB parental către țintă.

Constanta de disociere (K_d) a MM către AB este în general mai mare decât K_d a AB către țintă. K_d -ul MM către AB poate fi de cel puțin 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 sau chiar 10.000.000 de ori mai mare decât K_d -ul AB către țintă. În schimb, afinitatea de legare a MM către AB este în general mai mică decât afinitatea de legare a AB către țintă. Afinitatea de legare a MM către AB poate fi de cel puțin 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 sau chiar 10.000.000 de ori mai mică decât afinitatea de legare a AB către țintă.

În unele realizări, constanta de disociere (K_d) a MM către AB este aproximativ egală cu K_d a AB către țintă. În unele realizări, constanta de disociere (K_d) a MM către AB nu este mai mare decât constanta de disociere a AB către țintă.

5 În unele realizări, constanta de disociere (K_d) a MM către AB este mai mică decât constanta de disociere a AB către țintă.

În unele realizări, constanta de disociere (K_d) a MM către AB este mai mare decât constanta de disociere a AB către țintă.

În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB care nu este mai mare decât K_d pentru legarea AB la țintă.

10 În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB care nu este mai mică decât K_d pentru legarea AB la țintă.

În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB, care este aproximativ egală cu K_d pentru legarea AB la țintă.

15 În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB, care este mai mică decât K_d pentru legarea AB la țintă.

În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB, care este mai mare decât K_d pentru legarea AB la țintă.

20 În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB care nu este mai mult de 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 sau 1000 de ori mai mare decât K_d pentru legarea AB la țintă. În unele realizări, MM are o K_d pentru legarea la AB care este între 1 - 5, 2 - 5, 2 - 10, 5 - 10, 5 - 20, 5 - 50, 5 - 100, 10 - 100, 10 - 1.000, 20 - 100, 20 - 1000, sau 100 - 1.000 de ori mai mare decât K_d pentru legarea AB la țintă.

În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care este mai mică decât afinitatea de legare a AB la țintă.

25 În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care nu este mai mare decât afinitatea de legare a AB la țintă.

În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care este aproximativ egală cu afinitatea de legare a AB la țintă.

30 În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care nu este mai mică decât afinitatea de legare a AB la țintă.

În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care este mai mare decât afinitatea de legare a AB la țintă.

35 În unele realizări, MM are o afinitate de legare la AB care este cu 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 sau 1.000 mai mică decât afinitatea de legare a AB la țintă. În unele realizări, MM are o afinitate de legare la AB care este între 1 - 5, 2 - 5, 2 - 10, 5 - 10, 5 - 20, 5 - 50, 5 - 100, 10 - 100, 10 - 1.000, 20 - 100, 20 - 1000 sau 100 - 1.000 ori mai mică decât afinitatea de legare a AB la țintă. În unele realizări, MM are o afinitate pentru legarea la AB care este de 2 până la 20 de ori mai mică decât afinitatea de legare a AB la țintă. În unele realizări, un MM care nu este legat covalent la AB și la concentrație echimolară de AB nu inhibă legarea AB la țintă.

40 Când AB este modificat cu un MM și este în prezența țintei, legarea specifică a AB la ținta sa este redusă sau inhibată, în comparație cu legarea specifică a AB, nemodificat cu un MM sau legarea specifică a AB parental la țintă. În comparație cu legarea AB nemodificat cu un MM sau legarea AB parental la țintă, capacitatea AB-ului de a lega ținta atunci când a fost modificat cu un MM poate fi redusă cu cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 45 97%, 98%, 99% și chiar 100% pentru cel puțin 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 sau 96 de ore, sau 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 sau 180 de zile sau 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 sau 12 luni sau mai mult atunci când este măsurată *in vivo* sau într-un test *in vitro*.

MM inhibă legarea AB la țintă. MM leagă domeniul de legare la antigen al AB-ului și inhibă legarea AB la țintă. MM poate inhiba steric legarea AB la țintă. MM poate inhiba alosteric legarea AB la ținta sa. În aceste realizări, atunci când AB este modificat sau cuplat la un MM și în prezența țintei nu există nici o legare sau substanțial nici o legare a AB la țintă sau nu mai mult de 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% sau 50% din legarea AB la țintă, în comparație cu legarea AB nemodificat cu un MM, AB parental sau AB necuplat la un MM la țintă, pentru cel puțin 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 55 72, 84 sau 96 de ore, sau 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 sau 180 de zile sau 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 sau 12 luni sau mai mult atunci când este măsurată *in vivo* sau într-un test *in vitro*.

60 Când un AB este cuplat la, sau modificat de un MM, MM-ul „maschează” sau reduce sau altfel inhibă legarea specifică a AB la țintă. Când un AB este cuplat la, sau modificat de un MM, o astfel de cuplare sau modificare poate efectua o schimbare structurală care reduce sau inhibă capacitatea AB de a se lega la ținta sa.

În anumite realizări, MM nu este un partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu conține nici o, sau substanțial nici o omologie la orice partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75% sau 80% similar cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75% sau 80% identic cu orice partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 25% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 50% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 20% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 10% identic cu orice partener natural de legare al AB.

În prezenta invenție, anticorpii activabili includ un AB care este modificat de un MM și includ, de asemenea, unul sau mai mulți radicali clivabili (CM). Astfel de anticorpi activabili prezintă legare activabilă/comutabilă, la ținta AB. Anticorpii activabili includ, în general, un anticorp sau un fragment de anticorp (AB), modificat de sau cuplat la un radical de mascare (MM) și un radical modificabil sau clivabil (CM). În prezenta invenție, CM conține o secvență de aminoacizi care servește ca un substrat pentru cel puțin o protează.

Elementele anticorpilor activabili sunt aranjate astfel încât MM și CM sunt poziționate astfel încât într-o stare clivată (sau relativ activă) și în prezența unei ținte, AB leagă o țintă în timp ce anticorpusul activabil este într-o stare neclivată (sau relativ inactivă) în prezența țintei, legarea specifică a AB la ținta sa fiind redusă sau inhibată. Legarea specifică a AB la ținta sa poate fi redusă datorită inhibării sau mascării capacității AB de a se lega specific la ținta sa prin MM.

K_d -ul AB-ului modificat cu un MM și un CM către țintă este de cel puțin 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 sau mai mare, sau între 5 - 10, 10 - 100, 10 - 1.000, 10 - 10.000, 10 - 100.000, 10 - 1.000.000, 10 - 10.000.000, 100 - 1.000, 100 - 10.000, 100 - 100.000, 100 - 1.000.000, 100 - 10.000.000, 1.000 - 10.000, 1.000 - 100.000, 1.000 - 1.000.000, 1.000 - 10.000.000, 10.000 - 100.000, 10.000 - 1.000.000, 10.000 - 10.000.000, 100.000 - 1.000.000, sau 100.000 - 10.000.000 de ori mai mare decât K_d a AB nemodificat cu un MM și un CM sau a AB parental către țintă. În schimb, afinitatea de legare a AB modificat cu un MM și un CM către țintă este de cel puțin 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 sau mai mare sau între 5 - 10, 10 - 100, 10 - 1.000, 10 - 10.000, 10 - 100.000, 10 - 1.000.000, 10 - 10.000.000, 100 - 1.000, 100 - 10.000, 100 - 100.000, 100 - 1.000.000, 100 - 10.000.000, 1.000 - 10.000, 1.000 - 100.000, 1.000 - 1.000.000, 1.000 - 10.000.000, 10.000 - 100.000, 10.000 - 1.000.000, 10.000 - 10.000.000, 100.000 - 1.000.000 sau 100.000 - 10.000.000 de ori mai mică decât afinitatea de legare a AB nemodificat cu un MM și un CM sau cu AB parental către țintă.

Când AB este modificat cu un MM și un CM și se află în prezența țintei, dar nu în prezența unui agent modificador (de exemplu, cel puțin o protează), legarea specifică a AB la ținta sa este redusă sau inhibată, în comparație cu legarea specifică a AB nemodificat cu un MM și un CM sau cu AB parental la țintă. În comparație cu legarea AB parental sau legarea unui AB nemodificat cu un MM și un CM la ținta sa, capacitatea AB de a lega ținta atunci când este modificat cu un MM și un CM poate fi redusă cu cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% și chiar 100% pentru cel puțin 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, sau 96 de ore sau 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 sau 180 de zile sau 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 sau 12 luni sau mai mult atunci când este măsurată *in vivo* sau într-un test *in vitro*.

Așa cum este utilizat aici, termenul stare clivată se referă la starea anticorpilor activabili după modificarea CM prin cel puțin o protează. Termenul stare neclivată, așa cum este utilizat aici, se referă la starea anticorpilor activabili în absența clivării CM de către o protează. După cum s-a discutat mai sus, termenul „anticorpi activabili” este utilizat aici pentru a se referi la un anticorp activabil atât în starea sa neclivată (nativă), cât și în starea sa clivată. Va fi evident pentru un specialist obișnuit calificat că, în unele realizări, un anticorp activabil clivat poate să nu aibă MM datorită clivării CM prin protează, rezultând eliberarea a cel puțin MM (*de ex.*, în cazul în care MM nu este unit cu anticorpii activabili printr-o legătură covalentă (*de ex.*, o legătură disulfură între resturile de cisteină).

Prin activabil sau comutabil se înțelege că anticorpusul activabil prezintă un prim nivel de legare la o țintă atunci când anticorpusul activabil este într-o stare inhibată, mascată sau neclivată (*adică*, o primă conformație) și un al doilea nivel de legare la țintă în starea neinhibată, nemascată și/sau clivată (*adică*, o a doua conformație), unde al doilea nivel de legare la țintă este mai mare decât primul nivel de legare. În general, accesul țintei la AB-ul anticorpului activabil este mai mare în prezența unui agent de clivare capabil să cliveze CM, *adică* o protează, decât în absența unui astfel de agent de clivare. Astfel, atunci când anticorpusul activabil este în starea neclivată, AB-

ul este inhibat de legarea țintei și poate fi mascat de legarea țintei (*adică*, prima conformație este astfel încât AB-ul nu poate lega ținta), iar în starea clivată AB-ul este nu este inhibat sau este nemascat pentru a lega ținta.

CM și AB ale anticorpilor activabili sunt selectați astfel încât AB să reprezinte un radical de legare pentru o țintă dată și CM să reprezinte un substrat pentru o protează. În unele realizări, proteaza este colocalizată cu ținta la un situs de tratament sau la un situs de diagnoză la un subiect. Așa cum este utilizat aici, colocalizat se referă la a fi în același situs sau relativ în vecinătatea apropiată. În unele realizări, o protează clivează un CM care produce un anticorp activat care se leagă la o țintă situată în apropierea situsului de clivare. Anticorpii activabili dezvoltă aici găsesc o utilizare specială unde, de exemplu, o protează capabilă să cliveze un situs în CM, *adică* o protează, este prezentă la niveluri relativ mai ridicate în țesutul care conține ținta al unui situs de tratament sau în situsul de diagnoză decât în țesutul situsurilor de nontratament (de exemplu în țesutul sănătos). În unele variante, un CM al dezvoltării este de asemenea clivat de una sau mai multe alte proteaze. În unele realizări, una sau mai multe alte proteaze sunt colocalizate cu ținta și sunt responsabile pentru clivarea CM *in vivo*.

În unele realizări, anticorpii activabili asigură o toxicitate și/sau efecte secundare adverse reduse care ar putea rezulta altfel din legarea AB la situsurile de nontratament dacă AB nu ar fi mascat sau altfel inhibat de legarea la țintă.

În general, un anticorp activabil poate fi proiectat selectând un AB de interes și construind restul anticorpului activabil astfel încât, atunci când este constrans conformațional, MM să asigure mascarea AB sau reducerea legării AB la ținta sa. Pentru a asigura această caracteristică funcțională, pot fi luate în considerare criteriile de proiectare structurală.

Sunt furnizați anticorpi activabili care prezintă un fenotip comutabil al unui interval dinamic dorit pentru legarea țintei într-o conformație inhibată versus una neinhibată. Intervalul dinamic se referă în general la un raport de (a) un nivel maxim detectat al unui parametru sub un prim set de condiții la (b) o valoare minimă detectată a acelui parametru sub un al doilea set de condiții. De exemplu, în contextul unui anticorp activabil, intervalul dinamic se referă la raportul dintre (a) un nivel maxim detectat de proteină țintă care se leagă de un anticorp activabil în prezența a cel puțin unei proteaze capabile să cliveze CM a anticorpilor activabili la (b) un nivel minim detectat de proteină țintă care se leagă la un anticorp activabil în absența proteazei. Intervalul dinamic al unui anticorp activabil poate fi calculat ca raportul dintre constanta de disociere a unui tratament cu agent de clivare al anticorpului activabil (*de ex.*, enzimă) și constanta de disociere a tratamentului cu agent de clivare al anticorpilor activabili. Cu cât este mai mare intervalul dinamic al unui anticorp activabil, cu atât este mai bun fenotipul comutabil al anticorpului activabil. Anticorpii activabili având valori ale intervalului dinamic relativ mai mari (*de ex.*, mai mari de 1) prezintă fenotipuri de comutare mai dorite, astfel încât legarea proteinei țintă de către anticorpii activabili are loc într-o măsură mai mare (*de ex.*, apare predominant) în prezența unui agent de clivare (*de ex.*, enzimă) capabil să cliveze CM a anticorpilor activabili decât în absența unui agent de clivare.

În anumite realizări, MM nu este un partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu conține nici o, sau substanțial nici o omologie la orice partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau 80% similar cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75% sau 80% identic cu orice partener natural de legare al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 50% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 25% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 20% identic cu orice partener de legare natural al AB. În unele realizări, MM nu este mai mult de 10% identic cu orice partener natural de legare al AB.

În multe realizări se poate dori să se introducă unul sau mai mulți lianți, *de ex.*, lianți flexibili, în construcția anticorpului activabil, astfel încât să se asigure flexibilitate la una sau mai multe dintre joncțiunea MM-CM, joncțiunea CM-AB sau ambele. De exemplu, AB, MM și/sau CM pot să nu conțină un număr suficient de reziduuri (*de ex.*, Gly, Ser, Asp, Asn, în special Gly și Ser, în particular Gly) pentru a oferi flexibilitatea dorită. Ca atare, fenotipul comutabil al unor astfel de construcții de anticorp activabil poate beneficia de introducerea unuia sau mai multor aminoacizi pentru a asigura un liant flexibil. În plus, așa cum este descris mai jos, când anticorpul activabil este furnizat ca o construcție constrânsă conformațional, un liant flexibil poate fi introdus operațional pentru a facilita formarea și menținerea unei structuri ciclice în anticorpul activabil neclivat.

În prezenta invenție, anticorpus activabil cuprinde următoarea formulă (unde formula de mai jos reprezintă o secvență de aminoacizi fie în direcția N- la C-terminal sau fie în direcția C- la N-terminal):

(MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

- 5 În plus, formula de mai sus asigură secvențe de aminoacizi suplimentare care pot fi poziționate N-terminal sau C-terminal la elementele de anticorpi activabili. Exemplele includ, dar nu se limitează la, radicali de țintire (*de ex.*, un ligand pentru un receptor al unei celule prezente într-un țesut țintă) și radicali de extindere a timpului de înjumătățire seric (*de ex.*, polipeptide care leagă proteinele serice, cum ar fi imunoglobulina (*de ex.*, IgG) sau albumina serică (*de ex.*, albumina serică umană (HAS)).

- 10 CM este clivată specific de cel puțin o protează la o rată de aproximativ $0.001 - 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ sau cel puțin 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 sau $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. În unele realizări, CM este clivat specific la o rată de aproximativ $100.000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. În unele realizări, CM este clivat specific la o rată de la aproximativ 1×10^2 la aproximativ $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (adică, de la aproximativ 1×10^2 la aproximativ $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

- 15 Pentru clivarea specifică de către o enzimă, se face contactul dintre enzimă și CM. Când anticorpus activabil cuprinzând un AB cuplat la un MM și un CM este în prezența țintei și a unei activități enzimei suficiente, CM poate fi clivat. Activitatea enzimatică suficientă se poate referi la capacitatea enzimei de a intra în contact cu CM și de a efectua clivarea. Se poate imagina cu ușurință că o enzimă poate fi în vecinătatea CM, dar incapabilă să cliveze din cauza altor factori celulari sau a modificării proteinei enzimei.

- 20 Lianții adecvați pentru utilizare în prezenta invenție sunt în general cei care asigură flexibilitatea AB-ului modificat sau a anticorpilor activabili pentru a facilita inhibarea legării AB la țintă. Astfel de lianți sunt referiți în general ca lianți flexibili. Lianții adecvați pot fi ușor selectați și pot fi de oricare dintre diferitele lungimi potrivite. În prezenta invenție LP1 cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 207 și LP2 cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38.

- 30 Specialiștii obișnuiți în domeniu vor recunoaște că proiectarea anticorpilor activabili poate include lianți care sunt total sau parțial flexibili, astfel încât liantul poate include un liant flexibil, precum și una sau mai multe porțiuni care conferă o structură mai puțin flexibilă pentru a asigura o structură dorită de anticorpi activabili.

- Dezvăluirea oferă de asemenea, compoziții și metode care includ anticorpus activabil conjugat conform revendicărilor. Compozițiile și metodele furnizate aici permit atașarea a doi agenți la două reziduuri de cisteină în AB fără a compromite activitatea (de ex., mascarea, activarea sau activitatea de legare) anticorpului anti-CD71 activabil. În unele realizări, compozițiile și metodele furnizate aici permit atașarea a doi agenți la două reziduuri de cisteină în AB fără a reduce sau perturba altfel una sau mai multe legături disulfură în MM. Compozițiile și metodele furnizate aici produc un anticorp anti-CD71 activabil care este conjugat cu doi agenți, așa cum este definit în revendicări. Compozițiile și metodele furnizate aici produc anticorpi anti-CD71 activabili conjugați în care MM păstrează capacitatea de a masca efectiv și eficient AB-ul anticorpului activabil într-o stare neclivată. Compozițiile și metodele furnizate aici produc anticorpi anti-CD71 activabili conjugați, în care anticorpus activabil este încă activat, *adică* clivat, în prezența unei proteaze care poate cliva CM.

- 45 Anticorpii anti-CD71 activabili au două puncte de conjugare pentru un agent. În unele realizări, punctele de conjugare sunt atomii de sulf implicați în legăturile disulfurice. În unele realizări, punctele de conjugare sunt atomii de sulf implicați în legăturile disulfurice intercatenare. În unele realizări, punctele de conjugare sunt atomii de sulf implicați în legăturile sulfurice intercatenare, dar nu și atomii de sulf implicați în legăturile disulfurice intercatenare. În unele realizări, punctele de conjugare sunt atomii de sulf sau cisteină sau alte reziduuri de aminoacizi care conțin un atom de sulf. Astfel de reziduuri pot apare natural în structura anticorpului sau pot fi încorporate în anticorp prin mutageneză direcționată la situs, conversie chimică sau încorporare greșită a aminoacizilor nenaturali.

- 55 De asemenea, o parte a prezentei dezvăluiri, dar nu și a invenției revendicate, o constituie metodele de preparare a unui conjugat al unui anticorp anti-CD71 activabil care are una sau mai multe legături disulfurice intercatenare în AB și una sau mai multe legături disulfurice intercatenare în MM și este furnizat un medicament reactiv cu tioli liberi. Metoda include, în general, reducerea parțială a legăturilor disulfurice intercatenare în anticorpus activabil cu un agent reducător, cum ar fi, de exemplu, TCEP; și conjugarea medicamentului reactiv cu tioli liberi la anticorpus activabil redus parțial. Așa cum este utilizat aici, termenul de reducere parțială se referă la situații în care un anticorp anti-CD71 activabil este contactat cu un agent reducător și mai puțin

decât toate legăturile disulfurice, *de ex.*, mai puțin decât toate situsurile posibile de conjugare sunt reduse. În unele realizări, mai puțin de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% sau mai puțin de 5% din toate situsurile posibile de conjugare sunt reduse.

5 În alte aspecte ale prezentei dezvăluiri care nu sunt parte din invenția revendicată, este furnizată o metodă de reducere și conjugare a unui agent, *de ex.*, un medicament, la un anticorp anti-CD71 activabil care are ca rezultat selectivitatea în plasarea agentului. Metoda include, în general, reducerea parțială a anticorpului anti-CD71 activabil cu un agent de reducere, astfel încât
10 orice situsuri de conjugare din radicalul de mascare sau altă porțiune non-AB a anticorpului activabil să nu fie reduse și conjugarea agentului cu tiolii intercatenari în AB. Situsurile de conjugare sunt selectate astfel încât să permită plasarea dorită a unui agent pentru a permite ca conjugarea să aibă loc la un situs dorit. Agentul reducător este, *de exemplu*, TCEP. Condițiile reacției de reducere, cum ar fi, *de exemplu*, raportul dintre agentul reducător și anticorpul activabil, lungimea incubăției, temperatura în timpul incubăției, pH-ul soluției de reacție de
15 reducere etc., sunt determinate prin identificarea condițiilor care produc un anticorp activabil conjugat în care MM păstrează capacitatea de a masca efectiv și eficient AB-ul anticorpului activabil într-o stare neclivată. Raportul dintre agentul de reducere și anticorpul anti-CD71 activabil va varia în funcție de anticorpul activabil. În unele realizări, raportul dintre agentul reducător și anticorpul anti-CD71 activabil va fi în intervalul de la aproximativ 20: 1 la 1: 1, de la
20 aproximativ 10: 1 la 1: 1, de la aproximativ 9: 1 la 1: 1 de la aproximativ 8: 1 la 1: 1, de la aproximativ 7: 1 la 1: 1, de la aproximativ 6: 1 la 1: 1, de la aproximativ 5: 1 la 1: 1, de la aproximativ 4: 1 la 1: 1, de la aproximativ 3: 1 la 1: 1, de la aproximativ 2: 1 la 1: 1, de la aproximativ 20: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 10: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 9: 1 la 1: 1,5, de la
25 aproximativ 8: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 7: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 6: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 5: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 4: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 3: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 2: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 1,5: 1 la 1: 1,5, sau de la aproximativ 1: 1 la 1: 1,5. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 5: 1 la 1: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 5: 1 la 1,5: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 4: 1 la 1: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 8: 1 la aproximativ 1: 1. În unele
30 realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 2,5: 1 la 1: 1.

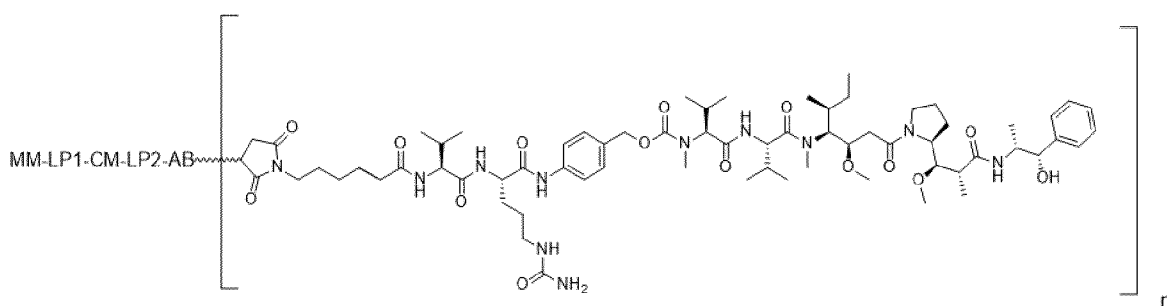
În unele aspecte care nu fac parte dintr-o parte a invenției revendicate, este furnizată o metodă de reducere a legăturilor disulfurice intercatenare în AB-ul unui anticorp anti-CD71 activabil și conjugarea unui agent, *de ex.*, un agent care conține tiol, cum ar fi un medicament, la
35 tiolii intercatenari rezultanți pentru a localiza selectiv agentul pe AB. Metoda include, în general, reducerea parțială a AB-ului cu un agent reducător pentru a forma cel puțin doi tioli intercatenari fără a forma toți tiolii intercatenari posibili în anticorpul activabil; și conjugarea agentului cu tiolii intercatenari ai AB-ului redus parțial. *De exemplu*, AB-ul anticorpului activabil este redus parțial timp de aproximativ 1 oră la aproximativ 37°C la un raport dorit de agent reducător: anticorp activabil. În unele realizări, raportul dintre agentul reducător și anticorpul activabil va fi în
40 intervalul de la aproximativ 20: 1 la 1: 1, de la aproximativ 10: 1 la 1: 1, de la aproximativ 9: 1 la 1: 1, de la aproximativ 8: 1 la 1: 1, de la aproximativ 7: 1 la 1: 1, de la aproximativ 6: 1 la 1: 1, de la aproximativ 5: 1 la 1: 1, de la aproximativ 4: 1 la 1: 1, de la aproximativ 3: 1 la 1: 1, de la aproximativ 2: 1 la 1: 1, de la aproximativ 20: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 10: 1 la 1: 1,5, de la
45 aproximativ 9: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 8: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 7: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 6: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 5: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 4: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 3: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 2: 1 la 1: 1,5, de la aproximativ 1,5: 1 la 1: 1,5, sau de la aproximativ 1: 1 la 1: 1,5. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 5: 1 la 1: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 5: 1 la 1,5: 1. În unele
50 realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 4: 1 la 1: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 4: 1 la 1,5: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 8: 1 la aproximativ 1: 1. În unele realizări, raportul este în intervalul de la aproximativ 2,5: 1 la 1: 1.

Reactivul care conține tiol poate fi, *de exemplu*, cisteină sau N-acetil cisteină. Agentul reducător poate fi, *de exemplu*, TCEP. În unele realizări, anticorpul activabil redus poate fi purificat înainte de conjugare, utilizând, *de exemplu*, cromatografie pe coloană, dializă sau diafiltrare. Alternativ, anticorpul redus nu este purificat după reducerea parțială și înainte de
55 conjugare.

În alte aspecte care nu sunt parte din invenția revendicată, o metodă de reducere și
60 conjugare a unui agent, *de ex.*, un medicament, la un anticorp anti-CD71 activabil are ca rezultat selectivitatea în plasarea agentului prin furnizarea unui anticorp anti-CD71 activabil cu un număr

și poziții definite de reziduuri de lizină și/sau cisteină. În unele realizări, numărul definit de resturi de lizină și/sau cisteină este mai mare sau mai mic decât numărul de reziduuri corespunzătoare din secvența de aminoacizi a anticorpului părinte sau a anticorpului activabil. În unele realizări, numărul definit de reziduuri de lizină și/sau cisteină poate conduce la un număr definit de echivalenți de agent care pot fi conjugați cu anticorpul anti-CD71 sau anticorpul anti-CD71 activabil. În unele realizări, numărul definit de reziduuri de lizină și/sau cisteină poate conduce la un număr definit de echivalenți de agent care pot fi conjugați cu anticorpul anti-CD71 sau anticorpul anti-CD71 activabil într-un mod specific situsului. În unele realizări, anticorpul activabil modificat este modificat cu unul sau mai mulți aminoacizi nenaturali într-o manieră specifică situsului, astfel, în unele realizări, limitând conjugarea agenților doar la situsurile de aminoacizi nenaturali. În unele realizări, anticorpul anti-CD71 sau anticorpul anti-CD71 activabil cu un număr și poziții definite de reziduuri de lizină și/sau cisteină poate fi parțial redus cu un agent reducător, așa cum s-a discutat aici, astfel încât orice situsuri de conjugare din radicalul de mascare sau alte porțiuni nonAB ale anticorpului activabil nu sunt reduse și conjugând agentul cu tiolii intercatenari în AB.

Prezenta invenție se referă la un anticorp activabil conjugat care cuprinde următoarea structură sau o sare a acesteia:



Formula (I)

20

(a) in care

(i) AB este un anticorp care se leagă specific la CD71 uman și cuprinde

i. o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență CDRH1 cuprinzând SECV ID NR: 9, o secvență CDRH2 cuprinzând SECV ID NR: 10 și o secvență CDRH3 cuprinzând SECV ID NR: 11; și

ii. o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență CDRL1 cuprinzând SECV ID NR: 12 sau SECV ID NR: 13, o secvență CDRL2 cuprinzând SECV ID NR: 14 și o secvență CDRL3 cuprinzând SECV ID NR: 15;

(ii) MM este un radical de mascare care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18, în care MM inhibă legarea AB-ului la CD71 uman atunci când anticorpul activabil conjugat este într-o stare neclivată;

(iii) LP1 este un prim radical de legătură care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 207;

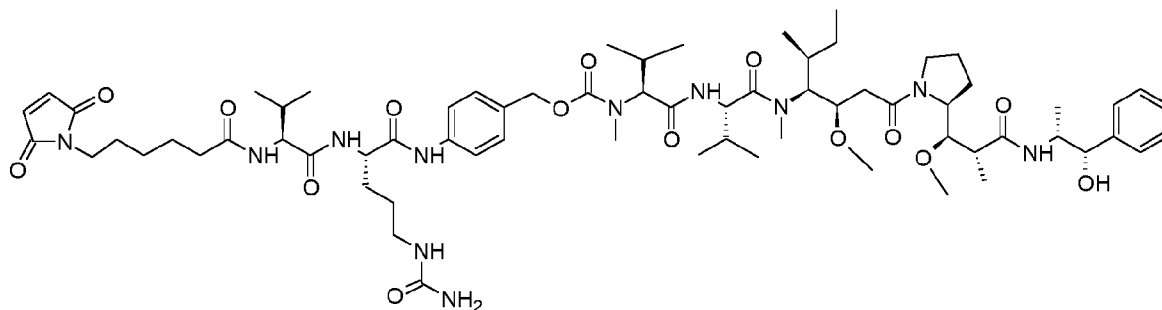
(iv) CM este un radical clivabil cuprinzând secvența din SECV ID NR: 156, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează; și

(v) LP2 este un al doilea radical de legătură cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38; și

(b) in care „n” este 2.

În prezenta invenție, agentul, monometil auristatin E (MMAE), este legat la AB utilizând un liant maleimid caproil-valină-citrulină, și această construcție de încărcare utilă a liantului este referită aici „vc-MMAE”. Structura vc-MMAE este prezentată mai jos:

vc-MMAE



În unele realizări AB cuprinde un izotip IgG1. În unele realizări AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu, în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină. În unele realizări, glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau pe

În unele realizări de anticorpi activabili conjugați conform prezentei invenții, AB include o regiune variabilă a lanțului greu incluzând o secvență a SECV ID NR: 5 și o regiune variabilă a lanțului ușor incluzând o secvență a SECV ID NR: 7.

În unele realizări ale prezentei invenții, AB include un lanț greu care include o secvență din SECV ID NR: 167 și un lanț ușor care include o secvență din SECV ID NR: 19.

În unele realizări ale prezentei invenții, AB include un lanț greu care include o secvență din SECV ID NR: 167 și un lanț ușor care include o secvență din SECV ID NR: 169. În unele realizări ale prezentei invenții, AB include un lanț greu care include o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor care include o secvență a SECV ID NR: 201.

Cuplarea poate fi realizată prin orice reacție chimică care va lega cele două molecule atata timp cat anticorpul și celălalt radical își păstrează activitățile lor respective. Această legătură poate include multe mecanisme chimice, de exemplu legarea covalentă, afinitatea de legare, intercalarea, legarea coordonatelor și complexarea. În unele realizări, legarea este, totuși, legarea covalentă. Legarea covalentă poate fi realizată fie prin condensarea directă a catenelor laterale existente, fie prin incorporarea moleculelor de punte externe. Mulți agenți de legătură bivalenți sau polivalenți sunt utili în cuplarea moleculelor de proteine, cum ar fi anticorpii din prezenta dezvoltare, cu alte molecule. De exemplu, agenții reprezentativi de cuplare pot include compuși organici, cum ar fi tioesterii, carbodiimidele, esterii de succinimide, diizocianatii, glutaraldehida, diazobenzenii și diaminele hexametenă. Această listare nu intenționează să fie exhaustivă diferitelor clase de agenți de cuplare cunoscuți în domeniu, ci, mai degrabă, este exemplificativă pentru agenții de cuplare mai uzuali. (Vezi Killen și Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen și colab., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); și Vitetta și colab., Science 238: 1098 (1987)).

În unele realizări, în plus față de compozițiile și metodele furnizate aici, anticorpul activabil conjugat poate fi de asemenea, modificat pentru conjugarea specifică situsului prin secvențe de aminoacizi modificate inserate sau altfel incluse în secvența de anticorp activabil. Aceste secvențe de aminoacizi modificate sunt concepute pentru a permite plasarea și/sau dozarea controlată a agentului conjugat într-un anticorp activabil conjugat. De exemplu, anticorpul activabil poate fi modificat genetic pentru a include substituții de cisteină în poziții pe lanțurile ușoare și grele care furnizează grupări tiol reactive și nu impactează negativ asupra plierii și asamblării proteinelor și nici nu modifică legarea la antigen. În unele realizări, anticorpul activabil poate fi modificat genetic pentru a include sau altfel introduce unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi nenaturali în anticorpul activabil pentru a furniza situsuri adecvate pentru conjugare. În unele realizări, anticorpul activabil poate fi modificat genetic pentru a include sau altfel introduce secvențe de peptide activabile enzimatic în secvența de anticorp activabil.

Lianții adecvați sunt descriși în literatură. (Vezi, de exemplu, Ramakrishnan, S. și colab., Cancer Res. 44: 201-208 (1984) care descrie utilizarea MBS (ester M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidă). A se vedea, de asemenea, brevetul SUA nr. 5.030.719, care descrie utilizarea derivatului de hidrazidă acetyl halogenată cuplat la un anticorp pe calea liantului oligopeptidic. În unele realizări, lianții adecvați includ: (i) EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimidă clorhidrat; (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)-toluen (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6 [3- (2-piridilditio) propionamido]hexanoat (Pierce Chem. Co., Cat # 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6 [3- (2-piridilditio)-propionamidă]hexanoat (Pierce Chem. Co. Cat. # 2165-G); și (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimidă: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510) conjugat cu EDC. Lianții suplimentari includ, dar

nu se limitează la, SMCC ((succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat), sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat), SPDB (N -succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoat) sau sulfo-SPDB (N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoat).

5 Lianții descriși mai sus conțin componente care au atribute diferite, ducând astfel la conjugăți cu proprietăți fizico-chimice diferite. De exemplu, esterii sulfo-NHS de alchil carboxilați sunt mai stabili decât esterii sulfo-NHS de carboxilați aromatici. Lianții care conțin NHS-ester sunt mai puțin solubili decât esterii sulfo-NHS. Mai mult, liantul SMPT conține o legătură disulfură oprită steric și poate forma conjugăți cu stabilitate crescută. Legăturile disulfurice sunt în
10 general, mai puțin stabile decât alte legături, deoarece legătura disulfură este clivată *in vitro*, rezultand mai puțini conjugăți disponibili. Sulfo-NHS, în special, poate spori stabilitatea cuplajelor carbodimidice. Cuplajele carbodimidice (cum ar fi EDC) când sunt utilizate împreună cu sulfo-NHS, formează esteri care sunt mai rezistenți la hidroliză decât reacția de cuplare carbodimidă singură.

15 În unele realizări, lianții sunt clivabili. În unele realizări, lianții nu sunt clivabili. În unele realizări, sunt prezenți doi sau mai mulți lianți. Cei doi sau mai mulți lianți sunt toți la fel, *adică*, clivabili sau neclivabili, sau cei doi sau mai mulți lianți sunt diferiți, *adică*, cel puțin unul clivabil și cel puțin unul neclivabil.

Prezenta dezvoltare utilizează mai multe metode pentru atașarea agenților la AB-uri: (a) atașarea la radicalii de carbohidrați ai AB sau (b) atașarea la grupările sulfhidril ale AB sau (c) atașarea la grupările amino ale AB sau (d) atașarea la grupările carboxilat ale AB. Conform dezvoltării, AB-urile pot fi atașate covalent la un agent printr-un liant intermediar având cel puțin două grupări reactive, una pentru a reacționa cu AB și una pentru a reacționa cu agentul. Liantul, care poate include orice compus organic compatibil, poate fi ales astfel încât reacția cu AB-ul (sau agentul) să nu afecteze advers reactivitatea și selectivitatea AB-ului. Mai mult, atașarea liantului la agent ar putea să nu distrugă activitatea agentului. Lianți adecvați pentru reacția cu anticorpi oxidați sau fragmentele de anticorpi oxidați îi includ pe cei care conțin o amină selectată din grupul constând din grupări de amină primară, amină secundară, hidrazină, hidrazidă, hidroxilamină, fenilhidrazină, semicarbazidă și tiosemicarbazidă. Astfel de grupări funcționale reactive pot exista ca parte a structurii liantului sau pot fi introduse prin modificarea chimică adecvată a lianților care nu conțin astfel de grupări.

Conform prezentei dezvoltări, lianții adecvați pentru atașarea la AB-urile reduse îi includ pe cei care au anumite grupări reactive capabile să reacționeze cu o grupare sulfhidril a unui anticorp sau fragment redus. Astfel de grupări reactive includ, dar nu se limitează la: grupări haloalchil reactive (incluzând, de exemplu, grupări haloacetil), grupări p-mercuribenzoat și grupări capabile de reacții de adiție de tip Michael (incluzând, de exemplu, maleimide și grupări de tipul descris de Mitra și Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

Conform prezentei dezvoltări, lianții adecvați pentru atașarea la Ab-urile nici oxidate și nici reduse îi includ pe cei care au anumite grupări funcționale capabile să reacționeze cu grupările amino primare prezente în reziduurile de lizină nemodificate din Ab. Astfel de grupări reactive includ, dar nu se limitează la, esteri NHS carboxilici sau carbonici, esteri sulfo-NHS carboxilici sau carbonici, esteri 4-nitrofenil carboxilici sau carbonici, esteri pentafluorofenil carboxilici sau carbonici, acil imidazoli, izocianați și izotiocianați.

Conform prezentei dezvoltări, lianții adecvați pentru atașarea la Ab-urii nici oxidate și nici reduse îi includ pe aceia care au anumite grupări funcționale capabile să reacționeze cu grupările de acid carboxilic prezente în reziduurile de aspartat sau glutamat din Ab, care au fost activate cu reactivi adecvați. Reactivii de activare adecvați includ EDC, cu sau fără NHS sau sulfo-NHS adăugat, și alți agenți de deshidratare utilizați pentru formarea carboxamidei. În aceste cazuri, grupările funcționale prezente în lianții adecvați ar include amine primare și secundare, hidrazine, hidroxilamine și hidrazide.

50 Agentul poate fi atașat la liant înainte sau după ce liantul este atașat la AB. În anumite aplicații poate fi de dorit să se producă mai întâi un intermediar al AB-liantului în care liantul este fără un agent asociat. În funcție de aplicația particulară, un agent specific poate fi apoi atașat covalent la liant. În unele realizări, AB-ul este mai întâi atașat la MM, CM și lianții asociați și apoi
55 atașat la liant în scopuri de conjugare.

Lianți ramificați: în realizările specifice, sunt utilizați lianți ramificați care au mai multe situsuri pentru atașarea agenților. Pentru lianții cu situsuri multiple, o singură atașare covalentă la un AB ar avea ca rezultat un AB-liant intermediar capabil să lege un agent la un număr de situsuri. Situsurile pot fi grupări aldehydă sau sulfhidril sau orice situs chimic la care pot fi atașați agenți.

60 În unele realizări, o activitate specifică mai mare (sau un raport mai mare de agenți față de AB) poate fi obținută prin atașarea unui singur liant de situs la o multitudine de situsuri pe AB.

Această pluralitate de situsuri poate fi introdusă în AB prin oricare dintre cele două metode. În primul rând, se pot genera mai multe grupări aldehydă și/sau grupări sulfhidril în același AB. În al doilea rând, se poate atașa la o aldehydă sau sulfhidril ale AB-ului un „liant ramificat” având mai multe situsuri funcționale pentru atașarea ulterioară la lanți. Situsurile funcționale ale liantului ramificat sau liantului cu mai multe situsuri pot fi grupări aldehydă sau sulfhidril sau pot fi orice situs chimic la care pot fi atașați lanți. Activități specifice încă mai mari pot fi obținute prin combinarea acestor două metode, adică prin atașarea lanților cu mai multe situsuri la mai multe situsuri pe AB.

Lianți clivabili: lianții peptidici care sunt sensibili la clivarea de către enzimele sistemului complementar, cum ar fi, dar fără a se limita la, activatorul u-plasminogen, activatorul plasminogen de țesut, tripsina, plasmina sau o altă enzimă care are activitate proteolitică pot fi folosiți într-o realizare a dezvăluirii prezente. Conform unei metode a prezentei dezvăluiri, un agent este atașat printr-un liant susceptibil de clivare printr-un complement. Anticorpul este selectat dintr-o clasă care poate activa complementul. Conjugatul anticorp-agent activează astfel cascada complementului și eliberează agentul la situsul țintă. Conform unei alte metode a prezentei dezvăluiri, un agent este atașat printr-un liant susceptibil la clivare de către enzime care au o activitate proteolitică, cum ar fi un activator u-plasminogen, un activator plasminogen de țesut, plasmină sau tripsină.

Exemple nelimitative de secvențe de liant clivabil sunt furnizate în Tabelul (II).

Tabelul (II): secvențe de liant exemplificative pentru conjugare

Tipuri de secvențe clivabile	Secvență de aminoacizi
<u>Secvențe clivabile cu plasmă</u>	
Pro-urokinază	PRFKIIGG (SECV ID NR: 110) PRFRIIGG (SECV ID NR: 111)
TGFβ	SSRHRRALD (SECV ID NR: 112)
Plasminogen	RKSSIIIRMRDVVL (SECV ID NR: 113)
Stafilokinază	SSSFDKGKYKKGDDA (SECV ID NR: 114) SSSFDKGKYKRGDDA (ID SECV NR: 115)
<u>Secvențe clivabile cu factor Xa</u>	
	IEGR (SECV ID NR: 116) IDGR (SECV ID NR: 117) GGSIDGR (SECV ID NR: 118)
<u>Secvențe clivabile MMP</u>	
Gelatinază A	PLGLWA (SECV ID NR: 119)
<u>Secvențe clivabile de collagenază</u>	
Colagen de piele de vițel (catena α1(I))	GPQGIAGQ (SECV ID NR: 120)
Colagen de piele de vițel (catena α2(I))	GPQGLLGA (SECV ID NR: 121)
Colagen de cartilaj bovin (catena α1(II))	GIAGQ (SECV ID NR: 122)
Colagen de ficat uman (catena α1(III))	GPLGIAGI (SECV ID NR: 123)
α ₂ M uman	GPEGLRVG (SECV ID NR: 124)
PZP uman	YGAGLGVV (SECV ID NR: 125) AGLGVVER (SECV ID NR: 126) AGLGISST (ID SECV NR: 127)
aiM de șobolan	EPQALAMS (SECV ID NR: 128) QALAMSAI (SECV ID NR: 129)
α ₂ M de șobolan	AAHYHLVSQ (SECV ID NR: 130) MDAFLESS (SECV ID NR: 131)
α ₁ I ₃ (2J) de șobolan	ESLPVVAV (SECV ID NR: 132)

$\alpha_1I_3(27J)$ de șobolan	SAPAVESE (SECV ID NR: 133)
Colagenază de fibroblast uman	DVAQFVLT (SECV ID NR: 134)
<u>(clivaje autolitice)</u>	VAQFVLTE (SECV ID NR: 135)
	AQFVLTEG (SECV ID NR: 136)
	PVQPIGPQ (SECV ID NR: 137)

În plus, agenții pot fi atașați prin legături disulfurice (de exemplu, legăturile disulfurice pe o moleculă de cisteină) la AB. Deoarece multe tumori eliberează în mod natural niveluri ridicate de glutatation (un agent reducător), acesta poate reduce legăturile disulfurice cu eliberarea ulterioară a agentului la situsul de livrare. În unele realizări, agentul reducător care ar modifica un CM ar modifica, de asemenea, liantul anticorpului activabil conjugat.

Distanțieri și elemente clivabile: în unele realizări, poate fi necesar să se construiască liantul în așa fel încât să se optimizeze distanța dintre agent și AB-ul anticorpului activabil. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea unui liant cu structura generală:

10 W - (CH₂)_n - Q

în care

W este fie --NH--CH₂-- sau --CH₂--;

Q este un aminoacid, peptidă; și

n este un întreg de la 0 la 20.

15 În unele realizări, liantul poate cuprinde un element distanțier și un element clivabil. Elementul distanțier servește la poziționarea elementului clivabil departe de miezul AB-ului astfel încât elementul clivabil să fie mai accesibil enzimei responsabile de clivare. Anumite legături ramificate descrise mai sus pot servi ca elemente de distanțare.

20 De-a lungul acestei discuții, trebuie înțeles că atașarea liantului la agent (sau a elementului de distanțiere la elementul clivabil sau a elementului clivabil la agent) nu trebuie să fie un mod particular de atașare sau reacție. Este acceptabilă orice reacție care oferă un produs de stabilitate și compatibilitate biologică adecvată.

25 *Complement seric și selecția lianților:* Conform unei metode a prezentei dezvăluiri, atunci când se dorește eliberarea unui agent, se utilizează un AB care este un anticorp dintr-o clasă care poate activa complementul. Conjugatul rezultat păstrează atât capacitatea de a lega antigenul, cât și de a activa cascada complementului. Astfel, în conformitate cu această realizare a prezentei dezvăluiri, un agent este legat la un capăt al elementului de legare clivabil sau clivabil și celălalt capăt al grupării de legare este atașat la un situs specific pe AB. De exemplu, dacă agentul are o grupare hidroxi sau o grupare amino, acesta poate fi atașat la capătul carboxi al unei peptide, al aminoacidului sau a altui liant ales corespunzător printr-o legătură ester sau respectiv amidă. De 30 exemplu, astfel de agenți pot fi atașați la peptida liant printr-o reacție carbodimică. Dacă agentul conține grupări funcționale care ar interfera cu atașarea la liant, aceste grupări funcționale interferente pot fi blocate înainte de atașare și deblocate odată ce produsul este făcut conjugat sau intermediar. Capătul opus sau amino al liantului este apoi utilizat fie direct, fie după o modificare 35 ulterioară pentru legarea la un AB care este capabil să activeze complementul.

Lianții (sau elementele de distanțiere ale lianților) pot avea orice lungime dorită, un capăt al acestora putând fi atașat covalent la situsuri specifice pe AB-ul anticorpului activabil. Celălalt capăt al liantului sau elementului de distanțiere poate fi atașat la un liant de aminoacid sau peptidă.

40 Astfel, atunci când acești conjugați se leagă la antigen în prezența complementului, legătura amidică sau esterică care atașează agentul la liant va fi clivată, conducând la eliberarea agentului în forma sa activă. Acești conjugați, atunci când sunt administrați unui subiect, vor realiza livrarea și eliberarea agentului la situsul țintă.

45 *Lianți pentru eliberare fără activarea complementului:* Într-o altă aplicație de livrare țintită, se dorește eliberarea agentului fără activarea complementului, deoarece activarea cascadei complementului va liza celula țintă. Prin urmare, această abordare este utilă când livrarea și eliberarea agentului ar trebui realizată fără a ucide celula țintă. Acești conjugați pot fi preparați prin atașarea agentului la un AB care nu este capabil să activeze complementul printr-un liant care este ușor susceptibil la clivare prin proteaze serice. Când acest conjugat este administrat unui individ, complexe antigen-anticorp se vor forma rapid, în timp ce clivarea agentului va avea loc 50 lent, conducând astfel la eliberarea compusului la situsul țintă.

Agenți biochimici reticulați: În unele realizări, anticorpul activabil poate fi conjugat cu agenți terapeutici utilizând anumiți agenți biochimici reticulați. Reactivii de reticulare formează punți moleculare care leagă împreună grupări funcționale de două molecule diferite. Pentru a lega

două proteine diferite într-o manieră treptată, pot fi folosiți agenți reticulați hetero-bifuncționali care elimină formarea nedorită de homopolimeri.

- 5 Lianții peptidici clivabili prin proteazele lizozomale sunt de asemenea utili, de exemplu, Val-Cit, Val-Ala sau alte dipeptide. În plus, pot fi utilizați lianți acid-labili clivabili în mediu cu pH scăzut al lizozomului, de exemplu: eter bisialil. Alți lianți adecvați includ substraturi labile cu catepsină, în special pe cele care prezintă o funcție optimă la un pH acid.

Exemple de agenți de reticulare hetero-bifuncționali sunt menționate în Tabelul (III).

Tabelul (III): Exemple de agenți de reticulare hetero-bifuncționali

<u>AGENȚI DE RETICULARE</u>				
Liant	<u>HETERO-</u>			
	<u>BIFUNCȚIONAL</u>			
	Reactiv către	Avantaje și aplicații	Lungimea distanțier după (Angstromi)	brațului reticulare
SMPT	Sulfhidrili primare	amine	Stabilitate mai mare	11,2 A
SPDP	Sulfhidrili primare	amine	Reticulare clivabilă de tiolare	6,8 A
LC-SPDP	Sulfhidrili primare	amine	Braț distanțier extins	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Sulfhidrili primare	amine	Braț distanțier extensibil solubil în apă	15,6 A
SMCC	Amine primare		Grupare reactivă de maleimidă stabilă	11,6 A
Sulfo-SMCC	Sulfhidrili primare	amine	Conjugarea enzimă-anticorp Conjugarea proteinei Hapten-purtător	11,6 A
			Grupare reactivă de maleimidă stabilă solubilă în apă	
MBS	Amine primare		Conjugare enzimă-anticorp Conjugare enzimă-anticorp	9,9 A
Sulfo-MBS	Sulfhidrili primare	amine	Conjugarea proteinei hapten-purtătoare solubilă în apă	9,9 A
SIAB	Sulfhidrili primare	amine	Conjugarea enzimă-anticorp	10,6 A
Sulfo-SIAB	Sulfhidrili primare	amine	Solubil în apă	10,6 A
SMPB	Sulfhidrili primare	amine	Conjugare enzimă-anticorp cu braț distanțier extins	14,5 A
Sulfo-SMPB	Sulfhidrili primare	amine	Braț distanțier extins solubil în apă Conjugarea Hapten-purtător	14,5 A
EDE/Sulfo-NHS	Grupări amine primare	carboxil		0
ABH	Carbohidrați neselectivi		Reacționează cu grupurile de zahăr	11,9 A

10

Lianți neclivabili sau atașament direct: în unele realizări ale dezvoltării, conjugatul poate fi proiectat astfel încât agentul să fie livrat la țintă, dar să nu fie eliberat. Acest lucru poate fi realizat prin atașarea unui agent la un AB fie direct, fie printr-un liant neclivabil.

Acești lianți neclivabili pot include aminoacizi, peptide, D-aminoacizi sau alți compuși organici care pot fi modificați pentru a include grupări funcționale care pot fi ulterior utilizate ca atașament la AB-uri prin metodele descrise aici. O formulă generală pentru un astfel de liant organic ar putea fi

5 W - (CH₂)_n - Q

in care

W este fie --NH--CH₂-- sau --CH₂--;

Q este un aminoacid, peptidă; și

n este un întreg de la 0 la 20.

10 *Conjugați neclivabili:* în unele realizări, un compus poate fi atașat la AB-uri care nu activează complementul. Atunci când se utilizează AB-uri care sunt incapabile de activare a complementului, acest atașament poate fi realizat folosind lianți care sunt susceptibili la clivare prin complementul activat sau utilizând lianți care nu sunt susceptibili la clivare prin complementul activat.

15 **Definiții:**

Cu excepția cazului în care nu se definește altfel, termenii științifici și tehnici folosiți în legătură cu prezenta dezvăluire vor avea semnificațiile care sunt înțelese în mod obișnuit de către specialiștii în domeniu. Termenul „o” entitate se referă la una sau mai multe din acea entitate. De exemplu, un compus se referă la unul sau mai mulți compuși. Ca atare, termenii „o”, „un”, „unul sau mai mulți” și „cel puțin unul” pot fi folosiți în mod interschimbabil. Mai mult, cu excepția cazului în care contextul necesită altfel, termenii singulari trebuie să includă pluralități, iar termenii plurali să includă singularul. În general, nomenclaturile utilizate în legătură cu, și tehnicile de, cultură celulară și de țesuturi, biologie moleculară și chimia proteinelor și oligo- sau polinucleotidelor și hibridizarea descrise aici sunt cele bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit in domeniu. Tehnicile standard sunt utilizate pentru ADN-ul recombinant, sinteza oligonucleotidelor și cultura și transformarea țesuturilor (de ex., electroporare, lipofecție). Reacțiile enzimatică și tehnicile de purificare sunt efectuate în conformitate cu specificațiile producătorului sau așa cum se realizează în mod obișnuit în domeniu sau așa cum este descris aici. Tehnicile și procedurile de mai sus sunt efectuate în general în conformitate cu metodele convenționale bine cunoscute în domeniu și așa cum sunt descrise în diferite referințe generale și mai specifice care sunt citate și discutate pe parcursul prezentei specificații. *Vezi, de ex.,* Sambrook și colab. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (ediția 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Nomenclaturile utilizate în legătură cu, și procedurile și tehnicile de laborator ale chimiei analitice, chimiei organice sintetice și chimiei medicinale și farmaceutice descrise aici sunt cele bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit în domeniu. Tehnicile standard sunt utilizate pentru sinteze chimice, analize chimice, preparări farmaceutice, formulare și livrare și tratamentul pacienților.

După cum este utilizat în conformitate cu prezenta dezvăluire, următorii termeni, cu excepția cazului în care se indică altfel, vor fi înțeleși că au următoarele semnificații:

40 Așa cum este utilizat aici, termenul „anticorp” se referă la molecule de imunoglobulină și porțiuni active imunologic de molecule de imunoglobulină (Ig), *adică* molecule care conțin un situs de legare la antigen care leagă specific (imunoreacționează cu) un antigen. Prin „legare specifică” sau „imunoreacționează cu” sau „legare imunospecifică” se înțelege că anticorpul reacționează cu unul sau mai mulți determinanți antigenici ai antigenului dorit și nu reacționează cu alte polipeptide sau se leagă la o afinitate mult mai mică ($K_d > 10^{-6}$).

Se știe că unitatea structurală de anticorp de bază cuprinde un tetramer. Fiecare tetramer este compus din două perechi identice de catene polipeptidice, fiecare pereche având un lanț „ușor” (aproximativ 25 kDa) și un lanț „greu” (aproximativ 50-70 kDa). Porțiunea amino-terminală a fiecărei catene include o regiune variabilă de aproximativ 100 până la 110 sau mai mulți aminoacizi responsabili în principal de recunoașterea antigenului. Porțiunea carboxi-terminală a fiecărui lanț definește o regiune constantă responsabilă în primul rând de funcția efectoare. În general, moleculele de anticorpi obținute de la oameni se referă la oricare dintre clasele IgG, IgM, IgA, IgE și IgD, care diferă între ele prin natura lanțului greu prezent în moleculă. Anumite clase au și subclase, precum IgG₁, IgG₂ și altele. Mai mult, la om, lanțul ușor poate fi un lanț kappa sau un lanț lambda.

Termenul „anticorp monoclonal” (mAb) sau „compoziție de anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat aici, se referă la o populație de molecule de anticorp care conține doar o specie moleculară de moleculă de anticorp constând dintr-un produs unic al genei lanțului ușor și un produs unic al genei lanțului greu. În special, regiunile determinante de complementaritate (CDR) ale anticorpului monoclonal sunt identice în toate moleculele populației. MAb-urile conțin un situs

de legare la antigen capabil să imunoreacționeze cu un epitop particular al antigenului caracterizat printr-o afinitate de legare unică pentru acesta.

Termenul „situs de legare la antigen” sau „porțiune de legare” se referă la partea moleculei de imunoglobulină care participă la legarea antigenului. Situsul de legare la antigen este format din reziduuri de aminoacizi din regiunile variabile N-terminale („V”) ale lanțurilor grele („H”) și ușoare („L”). Trei întinderi foarte divergente în regiunile V ale lanțurilor grele și ușoare, denumite „regiuni hipervariabile”, sunt interpușe între întinderi de flancare mai conservate cunoscute ca „regiuni cadru” sau „FR”. Astfel, termenul „FR” se referă la secvențe de aminoacizi care se găsesc în mod natural între, și adiacente, regiunilor hipervariabile din imunoglobuline. Într-o moleculă de anticorp, cele trei regiuni hipervariabile ale unui lanț ușor și cele trei regiuni hipervariabile ale unui lanț greu sunt dispuse una față de cealaltă în spațiul tridimensional pentru a forma o suprafață care leagă antigenul. Suprafața care leagă antigenul este complementară suprafeței tridimensionale a unui antigen legat, iar cele trei regiuni hipervariabile ale fiecărui lanț greu și ușor sunt denumite „regiuni determinante de complementaritate” sau „CDR-uri”. Atribuirea aminoacizilor la fiecare domeniu este în conformitate cu definițiile secvențelor Kabat de proteine de interes imunologic (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 și 1991)), sau Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), Chothia și colab. Nature 342: 878-883 (1989).

Așa cum este utilizat aici, termenul „epitop” include orice determinant proteic capabil de legare specifică la o imunoglobulină, un scFv sau un receptor de celule T. Termenul „epitop” include orice determinant proteic capabil de legare specifică la o imunoglobulină sau la receptorul de celule T. Determinanții epitopici constau de obicei din grupări de suprafață active chimic ale moleculelor, cum ar fi aminoacizii sau catenele laterale ale zahărului și au, de obicei, caracteristici structurale specifice tridimensionale, precum și caracteristici specifice de încărcare. De exemplu, anticorpii pot fi ridicați împotriva peptidelor N-terminale sau C-terminale ale unei polipeptide. Se spune că un anticorp leagă specific un antigen atunci când constanta de disociere este $\leq 1 \text{ ?M}$; în unele realizări, $\leq 100 \text{ nM}$ și în unele realizări, $\leq 10 \text{ nM}$.

Așa cum se utilizează aici, termenii „legare specifică”, „legare imunologică” și „proprietăți de legare imunologică” se referă la interacțiunile necovalente de tip care apar între o moleculă de imunoglobulină și un antigen pentru care imunoglobulina este specifică. Rezistența sau afinitatea interacțiunilor de legare imunologică pot fi exprimate în termeni de constantă de disociere (K_d) a interacțiunii, în care un K_d mai mic reprezintă o afinitate mai mare. Proprietățile de legare imunologică ale polipeptidelor selectate pot fi cuantificate folosind metode bine cunoscute în domeniu. O astfel de metodă presupune măsurarea ratelor de formare și disociere a situsului de legare a antigenului/complexului antigenic, în care acele rate depind de concentrațiile partenerilor complecși, afinitatea interacțiunii și parametrii geometrici care influențează în mod egal rata în ambele direcții. Astfel, atât „constantă ratei de pornire” (K_{pomire}), cat și „constantă ratei de oprire” (K_{oprire}) pot fi determinate prin calcularea concentrațiilor și a ratelor reale de asociere și disociere. (Vezi Nature 361: 186-87 (1993)). Raportul $K_{\text{oprire}}/K_{\text{pomire}}$ permite anularea tuturor parametrilor care nu au legătură cu afinitatea și este egal cu constanta de disociere K_d . (Vezi, în general, Davies și colab. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Se spune că un anticorp al prezentei dezvoltării se leagă specific la țintă, atunci când constanta de legare (K_d) este $\leq 1 \text{ pM}$, în unele realizări $\leq 100 \text{ nM}$, în unele realizări $\leq 10 \text{ nM}$, și în unele realizări $\leq 100 \text{ pM}$ la aproximativ 1 pM , măsurată prin teste cum ar fi testele de legare la radioligand sau teste similare cunoscute specialiștilor în domeniu.

Termenul „polinucleotidă izolată”, așa cum este utilizat aici, ar trebui să însemne o polinucleotidă de origine genomică, ADNc sau sintetică sau o combinație a acestora, care în virtutea originii sale „polinucleotidă izolată” (1) nu este asociată cu toate sau cu o porțiune a polinucleotidei în care „polinucleotida izolată” se găsește în natură, (2) este legată operațional la o polinucleotidă de care nu este legată în natură sau (3) nu apare în natură ca parte a unei secvențe mai mari. Polinucleotidele în conformitate cu dezvoltarea includ moleculele de acid nucleic care codifică moleculele de imunoglobulină ale lanțului greu prezentate aici și molecule de acid nucleic care codifică moleculele de imunoglobulină ale lanțului ușor prezentate aici.

Termenul „proteină izolată” menționat aici înseamnă o proteină de ADNc, ARN recombinant sau de origine sintetică sau o combinație a acestora, care în virtutea originii sale sau a sursei de derivare, „proteina izolată” (1) nu este asociată proteinelor găsite în natură, (2) nu conține alte proteine din aceeași sursă, *de ex.*, nu conțin proteine murine, (3) este exprimată de o celulă dintr-o specie diferită sau (4) nu apare în natură.

Termenul „polipeptidă” este utilizat aici ca termen generic pentru a se referi la proteine native, fragmente sau analogi ai unei secvențe de polipeptide. Prin urmare, fragmentele de proteine native și analogii sunt specii din genul polipeptidic. Polipeptidele în conformitate cu dezvoltarea

cuprind moleculele de imunoglobulină ale lanțului greu prezentate aici și moleculele de imunoglobulină ale lanțului ușor prezentate aici, precum și molecule de anticorp formate din combinații cuprinzând molecule de imunoglobulină ale lanțului greu cu molecule de imunoglobulină ale lanțului ușor, cum ar fi moleculele de imunoglobulină ale lanțului ușor kapa și viceversa, precum și fragmente și analogi ai acestora.

Termenul „care apare natural”, așa cum este utilizat aici, aplicat unui obiect, se referă la faptul că un obiect poate fi găsit în natură. De exemplu, o secvență de polipeptidă sau polinucleotidă care este prezentă într-un organism (inclusiv viruși) care poate fi izolată dintr-o sursă în natură și care nu a fost modificată intenționat de om în laborator sau altfel, este care apare natural.

Termenul „legat operațional”, așa cum este utilizat aici, se referă la pozițiile componentelor descrise astfel care sunt într-o relație care le permite să funcționeze în maniera lor intenționată. O secvență de control „legată operațional” de o secvență de codificare este ligată în așa fel încât expresia secvenței de codificare este obținută în condiții compatibile cu secvențele de control.

Termenul „secvență de control”, așa cum este utilizat aici, se referă la secvențe de polinucleotide care sunt necesare pentru a efectua expresia și procesarea secvențelor de codificare la care ele sunt ligate. Natura acestor secvențe de control diferă în funcție de organismul gazdă din procariote, astfel de secvențe de control includ în general promotor, situs de legare ribozomală și secvență de terminare a transcripției în eucariote, în general, astfel de secvențe de control includ promotori și secvență de terminare a transcripției. Termenul „secvențe de control” este destinat să includă, cel puțin, toate componentele a căror prezență este esențială pentru exprimare și procesare și poate include, de asemenea, componente suplimentare a căror prezență este avantajoasă, de exemplu, secvențe lider și secvențe partenere de fuziune. Termenul „polinucleotidă” cum s-a menționat aici, înseamnă nucleotide cu cel puțin 10 baze în lungime, fie ribonucleotide sau deoxinucleotide sau o formă modificată a oricărui tip de nucleotidă. Termenul include forme de monocatenare și dublu catenare de ADN.

Termenul oligonucleotidă menționat aici include nucleotide care apar natural și modificate legate împreună prin legături oligonucleotidice care apar natural și care apar nenatural. Oligonucleotidele sunt un subset de polinucleotide care cuprind în general o lungime de 200 de baze sau mai puțin. În unele realizări, oligonucleotidele au 10 până la 60 de baze în lungime și în unele realizări, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 până la 40 de baze în lungime. Oligonucleotidele sunt de obicei monocatenare, *de ex.*, pentru sonde, deși oligonucleotidele pot fi dublu catenare, *de ex.*, pentru utilizare în construcția unui mutant genetic. Oligonucleotidele din dezvoltare sunt oligonucleotide fie sens, fie antisens.

Termenul „nucleotide care apar natural” menționat aici include dezoxiribonucleotidele și ribonucleotidele. Termenul „nucleotide modificate” menționat aici include nucleotide cu grupări zaharoase modificate sau substituite și altele asemenea. Termenul „legături oligonucleotidice” menționat aici include legături oligonucleotidice cum ar fi fosforotioate, fosforoditioate, fosforoselenoate, fosforodiselenoate, fosforanilotoate, fosforanilate, fosforonmidate și altele asemenea. *Vezi, de ex.*, LaPlanche și colab. Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec și colab. J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984), Stein și colab. Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988), Zon și colab. Anti Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon și colab. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford Anglia (1991)); Stec și colab. Brevetul SUA nr. 5.151.510; Uhlmann și Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). O oligonucleotidă poate include o etichetă pentru detectare, dacă se dorește.

Așa cum este utilizat aici, cei douăzeci de aminoacizi convenționali și abrevierile lor urmează utilizarea convențională. *Vezi* Immunology - A Synthesis (Ediția a 2-a, ES Golub și DR Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Stereoizomerii (*de ex.*, D-aminoacizii) din cei douăzeci de aminoacizi convenționali, aminoacizii nenaturali precum aminoacizii α -, α -disubstituiți, aminoacizii N-alchil, acidul lactic și alți aminoacizi neconvenționali pot fi de asemenea, componente adecvate pentru polipeptidele din prezenta dezvoltare. Exemple de aminoacizi neconvenționali includ: 4 hidroxiprolină, γ -carboxiglutamat, ϵ -N,N,N-trimetililizină, ϵ -N-acetililizină, O-fosfoserină, N-acetilserină, N-formilmietionină, 3-metilhistidină, 5-hidroxilizină, σ -N-metilarginină și alți aminoacizi și iminoacizi similari (*de ex.*, 4-hidroxiprolină). În notația polipeptidică utilizată aici, direcția din stânga este direcția amino terminală și direcția din dreapta este direcția carboxi-terminală, în conformitate cu utilizarea și convenția standard.

În mod similar, dacă nu se specifică altfel, capătul din stânga al secvențelor de polinucleotide monocatenare este capătul 5', direcția din stânga a secvențelor de polinucleotide cu catenă dublă este denumită direcția 5'. Direcția de adăugare 5' la 3' a transcripțiilor ARN native este denumită ca regiuni de secvență de direcție de transcripție pe catena de ADN având aceeași

secvență ca ARN și, cea este de la 5' la capătul 5' al transcriptului ARN este denumită ca „secvențe in amonte”, regiunile de secvență pe catena ADN având aceeași secvență ca ARN și care sunt de la 3' până la capătul 3' al transcriptului ARN sunt denumite „secvențe în aval”.

Așa cum se aplică polipeptidelor, termenul „identitate substanțială” înseamnă că două secvențe de peptide, atunci când sunt aliniate optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT folosind ponderi de gol implicite, partajează cel puțin 80% identitate de secvență, în unele realizări, cel puțin 90% identitate de secvență, în unele realizări, cel puțin 95% identitate de secvență și în unele realizări, cel puțin 99% identitate de secvență.

În unele realizări, pozițiile reziduurilor care nu sunt identice diferă prin substituții conservative de aminoacizi.

Termenul „fragment de polipeptidă” așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă care are o deleție amino terminală și/sau carboxi-terminală și/sau una sau mai multe deleții interne, dar unde secvența de aminoacizi rămasă este identică cu pozițiile corespunzătoare deduse din secvența care apare natural, de exemplu, dintr-o secvență ADNc de lungime completă. Fragmentele au de obicei cel puțin 5, 6, 8 sau 10 aminoacizi lungime, în unele realizări, cel puțin 14 aminoacizi lungime, în unele realizări, cel puțin 20 aminoacizi lungime, de obicei cel puțin 50 aminoacizi lungime, și în unele realizări, cel puțin 70 de aminoacizi lungime. Termenul „analog”, așa cum este utilizat aici, se referă la polipeptide care sunt compuse dintr-un segment de cel puțin 25 de aminoacizi care are o identitate substanțială la o porțiune a unei secvențe de aminoacizi deduse și care are legare specifică la țintă, în condiții de legare adecvate. De obicei, analogii polipeptidici cuprind o substituție conservatoare de aminoacizi (sau adăugare sau deleție) în raport cu secvența care apare natural. Analogii au în mod tipic cel puțin 20 de aminoacizi lungime în unele realizări, cel puțin 50 de aminoacizi lungime sau mai mulți și pot fi adesea la fel de lungi ca o polipeptidă care apare natural de lungime completă.

Termenul „agent” este utilizat aici pentru a desemna un compus chimic, un amestec de compuși chimici, o macromoleculă biologică sau un extract realizat din materiale biologice.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii „etichetă” sau „etichetat” se referă la încorporarea unui marker detectabil, de ex., prin încorporarea unui aminoacid etichetat radio sau prin atașarea la o polipeptidă de radicali biotinil care poate fi detectată cu avidină marcată (de ex., streptavidină conținând un marker fluorescent sau activitate enzimatică care poate fi detectată prin metode optice sau calorimetrice). În anumite situații, eticheta sau markerul pot fi de asemenea, terapeutice. Diferite metode de marcarea a polipeptidelor și glicoproteinelor sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate. Exemple de etichete pentru polipeptide includ, dar nu se limitează la, următoarele: radioizotopi sau radionuclizi (*de ex.*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etichete fluorescente (*de ex.*, FITC, rodamină, fosfori lantanidici), etichete enzimatică (*de ex.*, peroxidază de hrean, p-galactozidază, luciferază, fosfatază alcalină), chimiluminiscente, grupări biotinil, epitopi polipeptidici determinați recunoscuți de un reporter secundar (*de ex.*, secvențe pereche de leucină fermoar, situsuri de legare pentru anticorpi secundari, domenii de legare ale metalelor, etichete de epitop). În unele realizări, etichetele sunt atașate de brațele distanțierilor de diferite lungimi pentru a reduce potențialul obstacol steric. Termenul „agent farmaceutic sau medicament”, așa cum este utilizat aici, se referă la un compus chimic sau o compoziție capabilă să inducă un efect terapeutic dorit atunci când este administrat corect unui pacient.

Alți termeni chimici de aici sunt utilizați în conformitate cu utilizarea convențională în domeniu, după cum se exemplifică în Dicționarul McGraw-Hill de termeni chimici (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Așa cum este utilizat aici, „substanțial pur” înseamnă că o specie obiect este specia predominantă prezentă (*adică*, pe bază molară, este mai abundentă decât orice altă specie individuală din compoziție) și, în unele realizări, o fracție substanțial purificată este o compoziție în care specia obiect cuprinde cel puțin aproximativ 50 la sută (pe o bază molară) din toate speciile macromoleculare prezente.

În general, o compoziție substanțial pură va cuprinde mai mult de aproximativ 80 la sută din toate speciile macromoleculare prezente în compoziție, în unele realizări, mai mult de aproximativ 85%, 90%, 95% și 99%. În unele variante, specia obiect este purificată până la omogenitatea esențială (speciile contaminante nu pot fi detectate în compoziție prin metode convenționale de detectare) în care compoziția constă esențial dintr-o singură specie macromoleculară.

Termenul pacient include subiecți umani și veterinari.

Utilizarea anticorpilor activabili conjugați

Se va aprecia că administrarea entităților terapeutice în conformitate cu dezvăluirea va fi administrată cu purtători, excipienți și alți agenți acceptabili farmaceutic adecvați care sunt

incorporați în formulări pentru a asigura transfer îmbunătățit, eliberare, toleranță și altele asemenea.

Formulările terapeutice ale dezvoltării, care includ un anticorp activabil conjugat, sunt utilizate pentru a preveni, trata sau altfel ameliora o boală sau o tulburare asociată cu expresia și/sau activitatea aberantă a țintei. De exemplu, formulările terapeutice ale dezvoltării, care includ un anticorp activabil conjugat, sunt utilizate pentru a trata sau ameliora altfel un cancer sau altă afecțiune neoplazică, inflamație, o tulburare inflamatorie și/sau o boală autoimună. În unele realizări, cancerul este o tumoră solidă sau o malignitate hematologică în care ținta este exprimată. În unele realizări, cancerul este o malignitate hematologică în care ținta este exprimată. În unele realizări, ținta este exprimată pe parenchim (de ex., în cancer, porțiunea unui organ sau țesut care îndeplinește adesea funcția (funcțiile) organului sau țesutului). În unele realizări, ținta este exprimată pe o celulă, țesut sau organ. În unele realizări, ținta este exprimată pe stromă (adică, cadrul de susținere conectiv al unei celule, țesuturi sau organ). În unele realizări, ținta este exprimată pe un osteoblast. În unele realizări, ținta este exprimată pe endoteliu (vasculatură). În unele realizări, ținta este exprimată pe o celulă stem de cancer. În unele realizări, agentul la care este conjugat anticorpul și/sau anticorpul activabil este un inhibitor de microtubule. În unele realizări, agentul la care este conjugat anticorpul și/sau anticorpul activabil este un agent de deteriorare a acidului nucleic.

Eficacitatea prevenirii, ameliorării sau tratamentului este determinată în asociere cu orice metodă cunoscută pentru diagnoza sau tratarea bolii sau tulburării asociate cu expresia și/sau activitatea țintei, cum ar fi, de exemplu, expresia și/sau activitatea aberantă a țintei. Prolungirea supraviețuirii unui subiect sau altfel întârzierea evoluției bolii sau tulburării asociate cu expresia și/sau activitatea țintei, de exemplu, expresia și/sau activitatea aberantă a țintei la un subiect indică faptul că anticorpul, anticorpul conjugat, anticorpul activabil și/sau anticorpul activabil conjugat conferă un beneficiu clinic.

Un anticorp activabil conjugat poate fi administrat sub formă de compoziții farmaceutice.

Formulările care trebuie utilizate pentru administrarea *in vivo* trebuie să fie sterile. Acest lucru se realizează cu ușurință prin filtrare prin membrane de filtrare sterile.

În unele realizări, anticorpul activabil conjugat conține o etichetă detectabilă. Se utilizează un anticorp intact sau un fragment al acestuia (*de ex.*, Fab, scFv sau F(ab)₂). Termenul „etichetat”, în ceea ce privește sonda sau anticorpul, este destinat să cuprindă etichetarea directă a sondei sau a anticorpului prin cuplarea (*adică*, legarea fizică) unei substanțe detectabile la sondă sau anticorp, precum și etichetarea indirectă a sondei sau anticorpului prin reactivitate cu un alt reactiv care este etichetat direct. Exemple de etichetare indirectă includ detectarea unui anticorp primar utilizând un anticorp secundar marcat fluorescent și marcarea finală a unei sonde ADN cu biotină, astfel încât să poată fi detectată cu streptavidină marcată fluorescent. Termenul „mostră biologică” este destinat să includă țesuturi, celule și fluide biologice izolate de la un subiect, precum și țesuturi, celule și fluide prezente în interiorul unui subiect. Prin urmare, în cadrul termenului „mostră biologică” este inclus sângele și o fracțiune sau o componentă a sângelui, incluzând serul din sange, plasma sanguină sau limfa. Adică, metoda de detectare a dezvoltării poate fi utilizată pentru a detecta un ARNm analit, o proteină sau un ADN genomic într-o probă biologică *in vitro*, precum și *in vivo*. De exemplu, tehnicile *in vitro* pentru detectarea unui ARNm analit includ hibridizări Northon și hibridizări *in situ*. Tehnicile *in vitro* pentru detectarea unei proteine analite includ teste imunosorbante legate de enzime (ELISA), colorare Western, imunoprecipitații, colorare imunochimică și imunofluorescență. Tehnicile *in vitro* pentru detectarea unui ADN genomic abalit includ hibridizări Southern. Procedurile pentru efectuarea imunoanalizelor sunt descrise, de exemplu în „ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, JR Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; „Immunoassay”, E. Diamandis și T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; și „Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Mai mult, tehnicile *in vivo* pentru detectarea unei proteine analite includ introducerea într-un subiect a unui anticorp proteic anti-analit marcat. De exemplu, anticorpul poate fi marcat cu un marker radioactiv a cărui prezență și localizare la un subiect poate fi detectată prin tehnici imagistice standard.

Anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării sunt de asemenea utili într-o varietate de formulări de diagnostic și profilactice. Într-o realizare, un anticorp activabil conjugat este administrat pacienților care prezintă riscul de a dezvolta una sau mai multe dintre tulburările menționate anterior. Predispoziția unui pacient sau a unui organ la una sau mai multe dintre tulburările menționate anterior poate fi determinată folosind markeri genotipici, serologici sau biochimici.

În unele realizări ale dezvoltării, un anticorp activabil conjugat este administrat indivizilor umani diagnosticați cu o afecțiune clinică asociată cu una sau mai multe dintre tulburările menționate anterior. La diagnoză, se administrează un anticorp activabil conjugat pentru a atenua sau inversa efectele afecțiunii clinice.

5 Un anticorp activabil conjugat al dezvoltării este, de asemenea, util în detectarea unei ținte în mostrele de la pacienți și, în consecință, este util ca diagnostic. De exemplu, anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării sunt utilizați în teste *in vitro*, *de ex.*, ELISA, pentru a detecta nivelurile țintă într-o mostră a pacientului.

10 Într-o realizare, un anticorp activabil conjugat al dezvoltării este imobilizat pe un suport solid (*de ex.*, godeul (ele) unei plăci de microtitrare). Anticorpul activabil conjugat imobilizat servește ca anticorp de captură pentru orice țintă care poate fi prezentă într-o mostră de testare. Înainte de a contacta anticorpul activabil conjugat imobilizat cu o mostră a pacientului, suportul solid este clătit și tratat cu un agent de blocare, cum ar fi proteina din lapte sau albumina, pentru a preveni adsorbția nespecifică a analitului.

15 Ulterior, godeurile sunt tratate cu o mostră de test suspectată că conține antigenul sau cu o soluție care conține o cantitate standard de antigen. O astfel de mostră este, *de ex.*, o mostră de ser de la un subiect suspectat că are niveluri de antigen circulant considerate a fi diagnostice ale unei patologii. După clătirea mostrei sau a standardului de testare, suportul solid este tratat cu un al doilea anticorp care este marcat detectabil. Al doilea anticorp marcat servește ca anticorp de
20 detectare. Se măsoară nivelul etichetei detectabile și concentrația antigenului țintă în mostra testată este determinată prin comparație cu o curbă standard dezvoltată din mostrele standard.

Se va aprecia că, pe baza rezultatelor obținute utilizând anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării într-un test de diagnoză *in vitro*, este posibilă stadierea unei boli la un subiect pe baza nivelurilor de expresie ale antigenului țintă. Pentru o anumită boală, se prelevează mostre de sânge
25 de la subiecții diagnosticați ca fiind în diferite stadii de evoluție ale bolii și/sau în diferite puncte ale tratamentului terapeutic al bolii. Folosind o populație de mostre care oferă rezultate semnificative statistic pentru fiecare stadiu de evoluție sau terapie, este desemnată o gamă de concentrații ale antigenului care pot fi considerate caracteristice fiecărui stadiu.

Un anticorp activabil conjugat poate fi, de asemenea, utilizat în metode de diagnoză și/sau
30 imagistică. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *in vitro*. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *in vivo*. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *ex vivo*. De exemplu, anticorpii activabili având un CM clivabil enzimatic pot fi folosiți pentru a detecta prezența sau absența unei enzime care este capabilă să cliveze CM. Astfel de anticorpi activabili pot fi utilizați în diagnoză, care pot include
35 detectarea *in vivo* (*de ex.*, calitativă sau cantitativă) a activității enzimei (sau, în unele realizări, un mediu cu potențial de reducere crescut, cum ar fi cel care poate asigura reducerea unei legături disulfurice) prin acumulare măsurată de anticorpi activați (adică anticorpi rezultați din clivarea unui anticorp activabil) într-o celulă sau țesut dat dintr-un organism gazdă dat. O astfel de acumulare de anticorpi activi indică nu numai că țesutul exprimă activitate enzimatică (sau un
40 potențial de reducere crescut în funcție de natura CM), ci și că țesutul exprimă ținta la care se leagă anticorpul activat.

De exemplu, CM poate fi selectat pentru a fi substrat pentru cel puțin o protează găsită la situsul unei tumori, la situsul unei infecții virale sau bacteriene la un situs limitat biologic (*de ex.*, într-un abces, într-un organ, și altele asemenea), și altele asemenea. AB poate fi unul care leagă un
45 antigen țintă. Folosind metodele descrise aici sau, dacă este cazul, metode familiare unui specialist în domeniu, o etichetă detectabilă (*de ex.*, o etichetă fluorescentă sau o etichetă radioactivă sau un radiourmăritor) poate fi conjugată la un AB sau altă regiune a unui anticorp și/sau anticorp activabil. Etichetele detectabile adecvate sunt discutate în contextul metodelor de analiză de mai sus și exemple specifice suplimentare sunt furnizate mai jos. Folosind un AB specific unei
50 proteine sau peptide ale stării de boală, împreună cu cel puțin o protează a cărei activitate este crescută în țesutul bolnav de interes, anticorpii activabili vor prezenta o rată crescută de legare la țesutul bolnav în raport cu țesuturile în care enzima specifică CM nu este prezentă la un nivel detectabil sau este prezentă la un nivel mai scăzut decât în țesutul bolnav sau este inactivă (*de ex.*, sub formă de zimogen sau în complex cu un inhibitor). Deoarece proteinele și peptidele mici sunt eliminate rapid din sânge de către sistemul de filtrare renal și deoarece enzima specifică pentru
55 CM nu este prezentă la un nivel detectabil (sau este prezentă la niveluri mai scăzute în țesuturile nebolnave sau este prezentă în conformație inactivă), acumularea de anticorpi activați în țesutul bolnav este sporită în raport cu țesuturile nebolnave.

N- și C-terminalele catenelor polipeptidice ale anticorpilor conform prezentei invenții pot
60 diferi de secvențele descrise aici datorită modificărilor post-tranlaționale observate frecvent. De exemplu, reziduurile de lizină C-terminale lipsesc adesea din lanțurile grele de anticorpi. Dick și

colab. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100: 1132. Reziduurile de glutamină N-terminale și, într-o măsură mai mică, reziduurile de glutamat, sunt frecvent convertite în reziduuri de piroglutamat atât pe lanțurile ușoare, cât și pe lanțurile grele ale anticorpilor terapeutici. Dick și colab. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97: 544; Liu și colab. (2011) *JBC* 286:11211; Liu și colab. (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 11211. În consecință, anticorpul activabil conjugat cu Formula (I) poate avea un anticorp (AB) în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu fie îi lipsește unul sau mai mulți aminoacizi la terminal, îi lipsește lizina C-terminală, are Lizina C-terminală îndepărtată din cauza procesării post-translaționale sau lizina C-terminală este un aminoacid, altul decât lizina. Dacă reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu este un aminoacid altul decât lizina, într-o realizare, este un aminoacid care nu este în general susceptibil de a forma o legătură disulfură sau altfel nu este susceptibil la conjugarea cu un agent citotoxic.

În anumite realizări, anticorpul activabil conjugat cu Formula (I) poate avea un anticorp (AB) în care glutamatul N-terminal fie pe lanțul greu și/sau pe lanțul ușor este opțional fie piroglutamat, fie modificat post-translațional în piroglutamat.

În anumite realizări, regiunea constantă a lanțului greu al anticorpului activabil conjugat cu Formula (I) cuprinde o lizină sau alt aminoacid la C-terminal, de ex., cuprinde următorii ultimi aminoacizi: PGK pentru lanțul greu. În anumite realizări, regiunii constante a lanțului greu îi lipsește unul sau mai mulți aminoacizi la C-terminal și are, de exemplu, secvența C-terminală PG sau P.

În anumite realizări, regiunile variabile ale lanțului greu și/sau ale lanțului ușor ale anticorpului activabil conjugat cu Formula (I) cuprind un aminoacid glutamat sau piroglutamat la N-terminal, de ex., cuprind următorii ultimi aminoacizi: pQGQ pentru lanțul ușor și/sau pQVQ pentru lanțul greu, unde „pQ” reprezintă piroglutamatul.

Anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării sunt utilizați în formulări de diagnostic și profilactice. Într-o realizare, un anticorp activabil este administrat pacienților care prezintă riscul de a dezvolta una sau mai multe dintre inflamațiile, tulburările inflamatorii, cancerul sau alte tulburări menționate anterior.

Predispoziția unui pacient sau a unui organ la una sau mai multe dintre tulburările menționate anterior poate fi determinată folosind markeri genotipici, serologici sau biochimici.

În unele realizări ale dezvoltării, un anticorp activabil conjugat este administrat indivizilor umani diagnosticați cu o afecțiune clinică asociată cu una sau mai multe dintre tulburările menționate anterior. La diagnostic, se administrează un anticorp activabil conjugat pentru a atenua sau inversa efectele afecțiunii clinice.

Anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării sunt, de asemenea, utili în detectarea țintei în mostrele de la pacienți și, în consecință, sunt utili ca diagnostic. De exemplu, anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării sunt utilizați în teste *in vitro*, de ex., ELISA, pentru a detecta nivelurile țintă într-o mostră de la pacient.

Într-o realizare, un anticorp activabil al dezvoltării este imobilizat pe un suport solid (*de ex.*, godeul (godeurile) unei plăci de microtitrare). Anticorpul imobilizat și/sau anticorpul activabil servește ca anticorp de captură pentru orice țintă care poate fi prezentă într-o mostră de testare. Înainte de a contacta anticorpul activabil imobilizat cu o mostră de la pacient, suportul solid este clătit și tratat cu un agent de blocare, cum ar fi proteina din lapte sau albumina, pentru a preveni adsorbția nespecifică a analitului.

Ulterior, godeurile sunt tratate cu o mostră de test suspectată că conține antigenul sau cu o soluție care conține o cantitate standard de antigen. O astfel de mostră este, *de ex.*, o mostră de ser de la un subiect suspectat că are niveluri de antigen circulant considerate a fi diagnostice ale unei patologii. După clătirea mostrei de testare sau a standardului, suportul solid este tratat cu un al doilea anticorp care este marcat detectabil. Al doilea anticorp marcat servește ca anticorp de detectare. Se măsoară nivelul etichetei detectabile și concentrația antigenului țintă în mostra testată este determinată prin comparație cu o curbă standard dezvoltată din mostrele standard.

Se va aprecia că, pe baza rezultatelor obținute folosind anticorpii activabili ai dezvoltării într-un test de diagnostic *in vitro*, este posibilă stadierea unei boli la un subiect pe baza nivelurilor de expresie ale antigenului țintă. Pentru o anumită boală, se prelevează probe de sânge de la subiecții diagnosticați ca fiind în diferite stadii ale evoluției bolii și/sau în diferite puncte ale tratamentului terapeutic al bolii. Folosind o populație de mostre care oferă rezultate semnificative statistic pentru fiecare stadiu de evoluție sau terapie, este desemnată o gamă de concentrații ale antigenului care pot fi considerate caracteristice fiecărui stadiu.

Anticorpii activabili conjugați pot fi folosiți și în metode de diagnostic și/sau imagistică. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *in vitro*. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *in vivo*. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *in situ*. În unele realizări, astfel de metode sunt metode *ex vivo*. De exemplu, anticorpii activabili având un CM clivabil enzimatic pot

fi folosiți pentru a detecta prezența sau absența unei enzime care este capabilă să cliveze CM. Astfel de anticorpi activabili pot fi utilizați în diagnoză, care pot include detectarea *in vivo* (*de ex.*, calitativă sau cantitativă) a activității enzimei (sau, în unele realizări, un mediu cu potențial de reducere crescut, cum ar fi cel care poate asigura reducerea unei legături disulfurice) prin

5 acumularea măsurată de anticorpi activați (adică anticorpi rezultați din clivarea unui anticorp activabil) într-o celulă sau țesut date dintr-un organism gazdă dat. O astfel de acumulare de anticorpi activați indică nu numai că țesutul exprimă activitate enzimatică (sau un potențial de reducere crescut în funcție de natura CM), ci și că țesutul exprimă ținta la care se leagă anticorpul activat.

10 De exemplu, CM poate fi selectat pentru a fi un substrat de protează pentru o protează găsită la situsul unei tumori, la situsul unei infecții virale sau bacteriene la un situs limitat biologic (*de ex.*, într-un abces, într-un organ, și altele asemenea), și altele asemenea. Folosind metode familiare unui specialist în domeniu, o etichetă detectabilă (*de ex.*, o etichetă fluorescentă sau o etichetă radioactivă sau un radiourmăritor) poate fi conjugată cu un AB sau altă regiune a unui

15 anticorp activabil. Exemple specifice sunt furnizate mai jos. Folosind un AB specific unei proteine sau peptide a stării de boală, împreună cu o protează a cărei activitate este crescută în țesutul bolnav de interes, anticorpii activabili vor prezenta o rată crescută de legare la țesutul bolnav în raport cu țesuturile în care enzima specifică CM nu este prezentă la un nivel detectabil sau este prezentă la un nivel mai scăzut decât în țesutul bolnav sau este inactivă (*de ex.*, sub formă de zimogen sau în complex cu un inhibitor). Deoarece proteinele și peptidele mici sunt eliminate rapid din sânge de către sistemul de filtrare renal și deoarece enzima specifică pentru CM nu este prezentă la un nivel detectabil (sau este prezentă la niveluri mai scăzute în țesuturile nebolnave sau este prezentă în conformație inactivă), acumularea de anticorpi activați în țesutul bolnav este sporită în raport cu țesuturile nebolnave.

25 Eticheta detectabilă poate fi un colorant fluorescent, (de exemplu, izotiocianat de fluorescență (FITC), izotiocianat de rodamină (TRITC), un colorant aproape în infraroșu (NIR) (de exemplu, nanocristale Qdot®), un metal coloidal, un haptent, un marker radioactiv, biotină și un reactiv de amplificare cum ar fi streptavidina sau o enzimă (de exemplu, peroxidază de hrean sau fosfatază alcalină).

30 Detectarea etichetei într-o mostră care a fost incubată cu anticorpul activabil marcat indică faptul că mostra conține ținta și conține o protează care este specifică pentru CM al anticorpului activabil.

În unele realizări, imagistica *in situ* este utilizată pentru a identifica sau altfel rafina o populație de pacienți adecvată pentru tratamentul cu un anticorp activabil al dezvoltării. De

35 exemplu, pacienții care au fost testați pozitiv atât pentru țintă, cât și pentru o protează care clivează substratul în radicalul clivabil (CM) al anticorpului activabil testat (*de ex.*, acumulează anticorpi activați la situsul bolii) sunt identificați ca candidați potriviți pentru tratamentul cu un astfel de anticorp activabil cuprinzând un astfel de CM. În mod similar, pacienții care sunt testați negativ pentru una sau pentru ambele ținte și proteaza care clivează substratul în CM în anticorpul activabil testat folosind aceste metode sunt identificați ca candidați potriviți pentru o altă formă de

40 terapie (*adică*, nu sunt adecvați pentru tratamentul cu anticorpul activabil testat).

În unele realizări, imagistica *in vivo* este utilizată pentru a identifica sau altfel rafina o populație de pacienți adecvată pentru tratamentul cu un anticorp activabil al dezvoltării. De

45 exemplu, pacienții care au fost testați pozitiv atât pentru țintă, cât și pentru o protează care clivează substratul în radicalul clivabil (CM) al anticorpului activabil testat (*de ex.*, acumulează anticorpi activați la situsul bolii) sunt identificați ca candidați potriviți pentru tratamentul cu un astfel de anticorp activabil cuprinzând un astfel de CM. În mod similar, pacienții care sunt testați negativ sunt identificați ca candidați potriviți pentru o altă formă de terapie (*adică*, nu sunt adecvați pentru tratamentul cu anticorpul activabil testat).

50 **Compoziții farmaceutice**

Anticorpii activabili conjugați ai dezvoltării (denumiți de asemenea aici ca „compusi activi”) pot fi încorporați în compoziții farmaceutice adecvate pentru administrare.

Este deosebit de avantajos să se formuleze compoziții orale sau parenterale sub formă de unitate de dozare pentru ușurința administrării și uniformitatea dozajelor. Forma unității de dozare, așa cum este utilizată aici, se referă la unități discrete fizic, potrivite ca doze unitare pentru

55 subiectul care urmează a fi tratat; fiecare unitate conținând o cantitate predeterminată de compus activ calculată pentru a produce efectul terapeutic dorit în asociere cu purtătorul acceptabil farmaceutic necesar. Specificațiile pentru formele unității de dozare ale dezvoltării sunt dictate de și direct dependente de caracteristicile unice ale compusului activ și de efectul terapeutic particular care trebuie obținut și de limitările inerente în domeniu de a compune un astfel de compus activ

60 pentru tratamentul indivizilor.

Compozițiile farmaceutice pot fi incluse într-un recipient, pachet sau dozator împreună cu instrucțiunile de administrare.

Invenția va fi descrisă în continuare în următoarele realizări și exemple enumerate, care nu limitează scopul invenției descrise în revendicări.

5 EXAMPLE

EXEMPLUL 1. Anticorpi activabili conjugați anti-CD71 (AADC-uri)

Studiile furnizate aici au fost concepute pentru a crea unii dintre anticorpii activabili conjugați anti-CD71 ai dezvoltării.

Așa cum este descris în cererea de brevet US nr. 2016/0355599 A1, un anticorp monoclonal M21 anti-CD71 a fost obținut utilizând tehnologia hibridomă pe șoarece în conformitate cu tehnicile cunoscute în domeniu. Șoarecii au fost imunizați cu domeniul extracelular CD71 uman (ECD) și hibridomele ulterioare au fost analizate folosind un test piggyback de citotoxicitate, iar clonele cu citotoxicitate pozitivă din acest test au fost confirmate prin ELISA că leagă polipeptida ECD CD71 umană și au fost confirmate că leagă suprafețele celulare prin FACS. Anticorpul monoclonal M21 anti-CD71 include o regiune variabilă a lanțului greu (VH) cu SECV ID NR: 1 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) cu SECV ID NR: 2.

Următorii anticorpi anti-CD71 umanizați, care se bazează pe anticorpul M21 monoclonal anti-CD71 de șoarece, au fost, de asemenea, testați: Ab21.10 LcB: HcA (VH din SECV ID NR: 3 și VL din SECV ID NR: 7), Ab21.11 LcB: HcB (VH din SECV ID NR: 4 și VL din SECV ID NR: 7), Ab21.12 LcB: HcC (VH din SECV ID NR: 5 și VL din SECV ID NR: 7) și M21 (VH din SECV ID NR: 1 și VL din SECV ID NR: 2). Capacitatea diferiților anticorpi anti-CD71 din dezvoltare de a lega CD71 de suprafața celulei a fost confirmată de FACS.

Toți anticorpii anti-CD71 umanizați au prezentat legare la CD71 umană și de cinomolgus, care a fost comparabilă cu legarea demonstrată de anticorpul M21 CD71 de șoarece. Legarea anticorpilor anti-CD71 umanizați a fost confirmată pe linia celulară BxPC3 prin FACS. Pe scurt, celulele BxPC3 au fost marcate cu anticorpi monoclonali de șoarece Mab21 sau huCD71 (Ab21.10, Ab21.11 și Ab21.12) la concentrațiile indicate și ulterior au fost detectați cu un anti-șoarece de capră marcat cu Alexa Fluor 647 sau respectiv cu un Alexa Fluor 647 IgG anti-uman.

Intr-un studiu exemplificativ, a fost măsurată activitatea de legare a anti-CD71 Ab21.12 LcB: HcC (VH din SECV ID NR: 5 și VL din SECV ID NR: 7) la CD71 recombinant (folosind ELISA) și la celulele care exprimă CD71 (folosind citometrie de flux) din surse umane, de maimuțe cinomolgus, de șoareci și de șobolani. Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Tabelul 1, anticorpul anti-CD71 s-a legat la CD71 recombinant uman și de maimuță cu afinitate echivalentă măsurată prin ELISA, și care a fost echivalentă cu afinitatea holo-transferinei umane la CD71 uman. Anticorpul a legat liniile celulare care exprimă CD71 uman și de maimuță (celule umane de cancer pancreatic BxPC3 și celule epiteliale renale primare de maimuță cinomolgus, respectiv) cu afinitate echivalentă măsurată prin citometrie de flux. Nu a fost măsurată nici o legătură semnificativă de anticorp anti-CD71 la CD71 recombinant de șoarece sau la o linie celulară care exprimă CD71 de șobolan (rata celulelor de hepatom H-4-11-E).

Tabelul 1: Legarea anti-CD71 la CD71 uman, de maimuță, de șobolan și de șoarece prin ELISA și citometrie de flux și legarea Holo-transferinei la CD71 uman prin ELISA

Articol de testare	Specii CD71	ELISA (ECD)	Citometrie de flux (linii celulare)
		K _{app} (nM)	K _{app} (nM)
anticorp anti-CD71 Ab21.12	Uman	0,3	3,0
	Maimuță	0,4	3,0
	Șobolan	Netestat	Fără legătură
	Șoarece	Fără legătură	Netestat
* Holo-transferină	Uman	0,5	Netestat

EXEMPLUL 2. Descoperirea măștii

Studiile furnizate aici au fost concepute pentru a identifica și caracteriza radicalii de mascare pentru utilizare în anticorpii anti-CD71 activabili din dezvoltare.

Așa cum este descris în cererea de brevet US nr. US 2016/0355599 A1, anticorpul anti-CD71 21.12, care cuprinde o VH a SECV ID NR: 5 și o VL a SECV ID NR: 7, a fost folosit pentru analiza bibliotecii de peptide X₁₅ aleatoare cu o diversitate totală de 6x10¹⁰, unde X este orice aminoacid, folosind o metodă similară cu cea descrisă în publicația internațională PCT

numărul WO 2010/081173, publicată pe 15 iulie 2010. Analiza a constatat dintr-o rundă MACS și cinci runde de sortare FACS. Sortarea MACS inițială s-a făcut cu proteina-A Dynabeads (Invitrogen) și anticorpul anti-CD71 21.12 la o concentrație de 200 nM. Pentru MACS, aproximativ 1×10^{12} celule au fost analizate pentru legare și 1×10^7 celule au fost colectate. Anti-CD71 21.12 a fost conjugat cu DyLight-488 (ThermoFisher), activitatea de legare CD71 a fost confirmată și anti-CD71 21.12-488 a fost utilizată ca sondă fluorescentă pentru toate rundele FACS. Celulele bacteriene au fost colorate și au fost colectate clone pozitive după cum urmează: 20 nM anti-CD71 21.12-488 cu 1×10^6 celule colectate în runda 1 FACS, 5 nM anti-CD71 21.12-488 cu 6.2×10^4 celule colectate în runda 2 FACS și 5 nM anti-CD71 21.12-488 cu 5×10^3 celule și 1 nM anti-CD71 21.12-488 cu 5×10^2 celule colectate în runda 3 FACS, 1 nM anti-CD71 21.12-488 cu $> 2 \times 10^2$ celule colectate în rundele 4 și 5 FACS. Populația pozitivă din a doua rundă FACS a fost verificată pentru inhibarea legării anticorpului anti-CD71 21.12-488 la proteina CD71 recombinantă. Clonele peptidice individuale au fost identificate prin analiza de secvență de la 5 nM lianți din runda 3 FACS și 1 nM lianți din rundele 3, 4 și 5 FACS.

Radicalii de mascare identificați includ TF01 (QFCPWSYYLIGDCDI; SECV ID NR: 16) și TF02 (NLCTEHS-FALDCRSY; SECV ID NR: 17). Măștile TF01 și TF02 au fost trunchiate și scanate cu alanină pentru a genera familii de anticorpi activabili cu diferite eficiențe de mascare, inclusiv radicalul de mascare TF02.13 (NLCTEHSAAALDCRSY; SECV ID NR: 18).

Aceste peptide de mascare au fost utilizate pentru a genera anticorpii activabili anti-CD71 ai dezvoltării. Secvențele pentru anumiți dintre acești anticorpi activabili anti-CD71 sunt prezentate mai jos în Tabelul A. În unele realizări, acești anticorpi activabili anti-CD71 includ radicalul clivabil 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SECV ID NR: 91), radicalul clivabil 3001 (AVGLLAPPGLSGRSDNH; SECV ID NR: 97), radicalul clivabil 2011 (ISSGLLSGRSDNP; SECV ID NR: 156) sau radicalul clivabil 3011 (AVGLLAPPGLSGRSDNP; SECV ID NR: 164) după cum este indicat.

În timp ce anumite secvențe prezentate mai jos includ secvența distanțieră din SECV ID NR: 138, cei cu calificare obișnuită în domeniu apreciază că anticorpii anti-CD71 activabili din dezvoltare pot include orice secvență distanțieră adecvată, cum ar fi, de exemplu, o secvență distanțieră selectată din grupul format din QGQSGQG (SECV ID NR: 138), QGQSGQ (SECV ID NR: 109), QGQSG (SECV ID NR: 139), QGQS (SECV ID NR: 140), QGQ, QG, GQSGQG (SECV ID NR: 143), QSGQG (SECV ID NR: 144), SGQG (SECV ID NR: 145), GQG, G sau Q. În unele realizări, anticorpii anti-CD71 activabili din dezvoltare pot să nu aibe nici o secvență distanțieră legată la N-terminalul său.

35 **Tabelul A. Secvențe de anticorpi activabili anti-CD71**

Regiunea variabilă a lanțului greu HuCD71_HcC

Secvența de aminoacizi

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTAD
TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFQFWGQGTLLITVSS (SECV ID NR: 5)

Secvența nucleotidică

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 CCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCG
 CGCCATCTACCCCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCGAC
 ACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCT
 GAGAGAACTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCCTGTCTCTCC (SECV ID
 NR: 206)

Lanț greu HuCD71_HcC-des

Secvența de aminoacizi

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTAI
 TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFQFAFWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCI
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPI
 SCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKI
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYH
 QKSLSLSPG (SECV ID NR: 167)

Secvența nucleotidică

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 CCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCG
 CGCCATCTACCCCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCGAC
 ACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCT
 GAGAGAACTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCCTGTCTCTCCGCCAGCACCA
 GGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTC
 GTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACC
 TCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCTCTCCAGCCTGGC
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAA
 TCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTTCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGT
 TCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGT
 CCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC
 AGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAAC
 GCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAI
 GGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
 CTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAG
 ACAACTACAAGACCAACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGG
 CAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCCGCACAACCACTACAC
 CAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCC (SECV ID NR: 168) (8)

Lanț greu HuCD71_HcC

Secvența de aminoacizi

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTAI
 TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAPFWGQGTLLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCI
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPI
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKI
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY
 QKSLSLSPGK (SECV ID NR: 20)

Secvența nucleotidică

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 CCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCG
 CGCCATCTACCCCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCGAC
 ACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCI
 GAGAGAAGTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCCTGTCTCCGCCAGCACCA
 GGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCT
 GTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACC
 TCCCTGCCGTGCTGCACTCCTCCGGCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCTCCTCCAGCCTGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAA
 TCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTTCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGCGGACCTTCCGTGTTTCTG
 TCCCCCACAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGT
 CCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAAGACCAAGCC
 AGAGAGGAACAGTACAAGTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACACAGGACTGGCTGAAC
 GCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCA
 GGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCT
 CTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG
 ACAACTACAAGACCAACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGG
 CAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
 CAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGG (SECV ID NR: 21) .)

HuCD71_LcB

Secvența de aminoacizi

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTL
 ISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNF (SECV SEQ

(ID NR: 19) .9)

HuCD71_LcB

Secvența nucleotidică

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCAGCCTGTCCGCCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTTCCC
 CCAGCTCCTCCGTGTACTACATGTACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTC
 CACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCAGACTACACCTGACC
 ATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGCGGAACACCCCTACACCTTC
 GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCCTCCGACG
 GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAC
 TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGC
 CCTACTCCCTGTCTCCACCCCTGACCCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCCAAG
 GACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGCGGCGA((SECV ID NR: 208) 8)

Lanț ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF01-2001 [distanțier (SECV ID NR: 138)] [huCD71Lc_TF01_2001 (SECV ID NR: 141)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [QFCFWSYYLIGDCDIGGSSSGSISGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
 SASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
 FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKI
 STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR((SECV ID NR: 22) 2)

Lanț ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF02.13-2001
 [distanțier (SECV ID NR: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 (SECV ID NR: 142)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSSGSISGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
 SASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
 FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKI
 STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR((SECV ID NR: 23) 3)

Lanț ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF02.13-3011
 [distanțier (SECV ID NR: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 (SECV ID NR: 146)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSSGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
 TITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRI
 YPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR((SECV ID NR: 147) 7)

Lanț ușor de anticorpi activabil anti-CD71-TF02.13-2011
 [distanțier (SECV ID NR: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 (SECV ID NR: 169)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSSGSISGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
 SASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
 FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKI
 STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR((SECV ID NR: 170) 10)

Lanț ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF01-3011
 [distanțier (SECV ID NR: 138)] [huCD71Lc_TF01_3011 (SECV ID NR: 173)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRV
TITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRI
YPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
DSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR (SECV ID NR: 174) '4)

Regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF02.13-2001

[distanțier (SECV ID NR: 138)] [domeniu VL huCD71Lc_TF02.13_2001 (SECV ID NR: 197)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGS ISSGLLSGRSDNHGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITC
SASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
FGQGTKI (SECV ID NR: 198))

Regiune variabilă a lanțului ușor de anticorpi activabil anti-CD71-TF02.13-3011

[distanțier (SECV ID NR: 138)] [domeniu VL huCD71Lc_TF02.13_3011 (SECV ID NR: 199)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRV
TITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRI
YPYTFGQGTKI (SECV ID NR: 200))

Regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF02.13-2011

[distanțier (SECV ID NR: 138)] [domeniu VL huCD71Lc_TF02.13_2011 (SECV ID NR: 201)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGS ISSGLLSGRSDNPGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITC
SASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
FGQGTKI (SECV ID NR: 202))

Regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF01-2001

[distanțier (SECV ID NR: 138)] [domeniu VL huCD71 Lc_TF0 1_2001 (SECV ID NR: 195)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGS ISSGLLSGRSDNHGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITC
SASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPY
FGQGTKLI (SECV ID NR: 196) 6)

Regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp activabil anti-CD71-TF01-3011

[distanțier (SECV ID NR: 138)] [domeniu VL huCD71Lc_TF01_3011 (SECV ID NR: 203)]

Secvența de aminoacizi

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGS AVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRV
TITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRI
YPYTFGQGTKI (SECV ID NR: 204))

EXEMPLUL 3. Generarea și caracterizarea anticorpilor activabili anti-CD71 activabili și a anticorpilor activabili conjugați anti-CD71

- 5 Studiile furnizate aici au fost concepute pentru a genera cațiva anticorpi activabili anti-CD71 ai dezvoltării.

- 10 Anticorpii activabili anti-CD71 au fost generați cu diferite eficiențe de mascare (de exemplu, o măsură a capacității MM a anticorpului activabil de a bloca legarea AB a anticorpului activabil la ținta sa). Peptidele TF01 și TF02 au fost mutate prin trunchiere și scanare alanină așa cum este descris în Exemplul 2, iar aceste variante de peptide de mascare au fost utilizate pentru a genera familii de anticorpi activabili anti-CD71 din prezenta dezvoltării cu o gamă de eficiențe de mascare.

Legarea anticorpilor activabili anti-CD71 ai prezentei dezvoltării la linia celulară NCI H292 (denumită de asemenea aici ca H292) a fost evaluată utilizând FACS. Pe scurt, celulele au

- 5 fost marcate cu anticorp huCD71 sau anticorp activabil la un interval de concentrații și detectate ulterior cu un anticorp secundar IgG anti-uman de capră marcat cu Alexa Fluor 647 pentru a determina o curbă de legare. Așa cum este rezumat în datele de legare exemplificative de mai jos în Tabelul 2, anticorpii activabili anti-CD71 ai prezentei dezvoltări arată un interval de eficiențe de mascare în comparație cu anticorpurile anti-CD71 parentale (huCD71 21.12 Ab).

Tabelul 2: Eficiența de mascare a radicalilor de mascare

Radical de mascare al anticorpului activabil	VL a lanțului ușor SEC V ID NR	K _{app} (nM)	Eficiența mascării
Nici una (Ab 21.12)	7	2,288	1
TF01	809	809,5	352
TF02.13	813	127,4	55

- 10 Aceste date exemplificative din Tabelul 2 arată că ambele măști (TF01 și TF02.13) inhibă legarea anticorpului anti-CD71 de CD71 atunci când anticorpurile activabile sunt într-o stare intactă sau neclivată. Aceste date exemplificative demonstrează, de asemenea, că radicalul de mascare TF01 demonstrează o eficiență de mascare mai mare decât radicalul de mascare TF02.13.

EXEMPLUL 4: Caracterizarea activității de legare a anticorpului activabil CD71 și a anticorpului activabil conjugat CD71

- 15 Acest exemplu arată că anticorpii activabili anti-CD71 și anticorpii activabili conjugați anti-CD71 ai prezentei dezvoltări au demonstrat o afinitate de legare mai mică la proteina CD71 umană și de cinomolgus recombinantă și de suprafață celulară atunci când se află în forma lor intactă, neclivată, în comparație cu formele lor corespunzătoare clivate cu protează.

- 20 Așa cum se arată în FIG. 3A și 3B, a fost utilizată o analiză de legare a fazei solide (ELISA) pentru a demonstra afinitatea de legare a anticorpilor activabili anti-CD71 și a anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 din prezenta dezvoltări la CD71 recombinant, atât în formele lor intacte, neclivate, cât și în formele lor activate de protează, clivate. În aceste exemple, proteina CD71 recombinantă de cinomolgus (FIG. 3B) sau umană (FIG. 3A) (R&D Systems) a fost acoperită pe plăci ELISA la o concentrație de 1 μg/ml, apoi incubată cu concentrația indicată a anticorpului activabil anti-CD71 intact, neclivabil („anti-CD71-TF02.13-2011”) al prezentei dezvoltări sau a anticorpului activabil conjugat anti-CD71 E2 intact, neclivat (adică având un DAR de ~ 2) („anti-CD71-TF02.13 -2011-vc-MMAE E2”) din prezenta dezvoltări. De asemenea, au fost testați anticorpurile activabile anti-CD71 („anti-CD71-TF02.13-2011 (Act)”) sau anticorpurile activabile conjugate anti-CD71 E2 (adică având un DAR de ~ 2) („anti-CD71-TF02.13-2011 (Act)”) din prezenta dezvoltări după tratamentul cu o protează care a clivat radicalul clivabil al componentei de anticorp activabil.

- 35 Așa cum s-a discutat aici, „E2” se referă la o compoziție a unui anticorp activabil conjugat anti-CD71 dat din prezenta dezvoltări care include esențial numai speciile anticorpului activabil conjugat în care încărcătura medicamentului este de 2 molecule de medicament pentru fiecare moleculă de anticorp activabil și esențial, nu include nici o cantitate sau cantități minime din alte specii posibile (*adică* în care încărcătura de medicament este 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 etc.). După cum s-a discutat aici, „DAR” se referă la raportul mediu dintre medicament (în acest caz, MMAE) și anticorpurile activabile (*adică* CD71-TF02.13-2011) într-o populație de astfel de anticorpi activabili conjugați. Astfel, în acest exemplu, anti-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2 se referă la o compoziție care include doar anticorpurile activabile anti-CD71-TF02.13-2011 în care fiecare anticorp activabil are o încărcătură de medicament de 2 echivalenți de vc-MMAE și un DAR de aproximativ 2 așa cum este descris în Exemplul 26.

- 45 Cantitatea de anticorp legat din fiecare mostră a fost detectată prin incubare și detectare prin anticorp anti-uman de capră conjugat cu peroxidază de hrean și detectare cu Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Un rezumat al afinităților de legare este prezentat mai jos:

Tabelul 3A: Activitatea de legare CD71 exemplificativă observată a anticorpilor activabili anti-CD71 neclivați și clivați și a anticorpilor activabili conjugați anti-CD71

Articol de testare	K _{d(app)} a CD71 uman nM	K _{d(app)} a CD71 de cinomolgus nM
anti-CD71-TF02.13-2011	0,42	1,24
anti-CD71-TF02.13-2011 (Activat)	0,04	0,06

anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	0,48	1,49
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Activat)	0,05	0,07

FIG. 3C și 3D arată într-un test FACS rezultatele exemplificative că anticorpul activabil anti-CD71 din prezenta dezvăluire și anticorpul activabil conjugat anti-CD71 ai prezentei dezvăluiri leagă celulele care exprimă CD71 uman (FIG. 3C) și CD71 de cinomolgus (FIG. 3D) cu o constantă de disociere mai mare și o afinitate mai mică decât cea a anticorpului activabil anti-CD71 activat cu protează sau a anticorpului activabil conjugat anti-CD71 activat cu protează al prezentei dezvăluiri. Aceste rezultate exemplificative arată că afinitatea de legare a anticorpilor activabili anti-CD71 activați cu protează, clivați ai prezentei dezvăluiri și a anticorpilor activabili conjugati anti-CD71, activați cu protează, clivați, conform prezentei dezvăluiri, s-au legat la celule la o afinitate similară cu cea a anticorpului anti-CD71 parental, demonstrând astfel efectul radicalului de mascare în inhibarea legării anti-CD71 la ținta sa în anticorpul activabil intact sau anticorpul activabil conjugat intact.

În studiul exemplificativ prezentat în FIG. 3C și 3D, legarea anticorpilor din prezenta dezvăluire la liniile celulare indicate a fost efectuată utilizând o metodă standard de etichetare FACS. Pe scurt, celulele au fost marcate cu anticorpul indicat sau anticorpul activabil ai prezentei dezvăluiri: un anticorp de control (AB095), un anticorp anti-CD71 uman (Ab 21.12, având o VH a SECV ID NR: 5 și o VL de SECV ID NR: 7), un anticorp activabil anti-CD71 (anti-CD71 TF02.13-2011), sau un anticorp activabil conjugat anti-CD71 E2 (adică având un DAR de ~ 2) (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2). În plus, afinitatea de legare a anticorpului activabil anti-CD71 (anti-CD71 TF02.13-2011 (Act)) și a anticorpului activabil conjugat anti-CD71 E2 (adică având un DAR de ~ 2) (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Act)) au fost, de asemenea, testate după activarea cu protează care a clivat radicalul clivabil al acestora. Fiecare articol de testare a fost aplicat la concentrațiile indicate și detectat ulterior cu un anticorp secundar IgG anti-uman de capră marcat cu Alexa Fluor 647.

Tabelul 3B de mai jos prezintă valorile EC₅₀ pe baza curbelor de legare prezentate în FIG. 3C la 3D. Aceste rezultate arată că anticorpul activabil intact și anticorpul activabil conjugat intact s-au legat la ținta lor cu afinitate mai mică decât omologii lor activați cu protează și că anticorpul activabil activați cu protează s-au legat cu o afinitate care a fost similară cu cea a anticorpului anti-CD71 parental.

Tabelul 3B: Activitatea de legare CD71 exemplificativă observată a lianțurilor anti-CD71

Articol de testare	EC ₅₀ prin FACS a celulelor umane	EC ₅₀ prin FACS a CD71 CHO w/ cinomolgus
Ab 21.12	1,021	-
Ab 21.12-vc-MMAE	-	0,2912
Anti-CD71-TF02.13-2011	46,06	27,83
Anti-CD71-TF02.13-2011 (Activat)	1,429	0,4639
Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	50,97	35,30
Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Activat)	1,854	0,7292

Într-un studiu exemplificativ similar, testele ELISA și citometria de flux au fost utilizate pentru a demonstra afinitatea de legare a anticorpilor anti-CD71, anticorpilor conjugati anti-CD71, anticorpilor activabili anti-CD71 (forma intactă, neclivată și forma clivată, activată cu protează) și a anticorpilor activabili conjugati anti-CD71 (formă intactă, neclivată și forma activată cu protează, clivată) din prezenta dezvăluire la CD71 recombinant la CD71 recombinant uman și de cinomolgus și la liniile celulare care exprimă CD71 uman și de cinomolgus. Articolele testate au fost anticorpul Ab21.12 anti-CD71 (VH a SECV ID NR: 5 și o VL a SECV ID NR: 7), anticorpul conjugat anti-CD71 Ab21.12-vcMMAE E2 (adică având un DAR de 2), anticorpul activabil anti-CD71-TF02.13-2011 și anticorpul activabil conjugat DAR2 anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (adică având un DAR de ~ 2).

În exemplele ELISA, proteinele ECD de CD71 recombinant de cinomolgus sau umane au fost acoperite pe plăci ELISA și apoi incubate cu unul din intervalele de concentrații ale articolelor

de test din prezenta dezvăluire, urmate de măsurarea cantității de articol de test legat cu un anticorp. Articolele de test care au fost activate au fost incubate cu enzima proteazei matriptază. Valorile Kd aparente exemplificative pentru fiecare articol de test sunt prezentate în Tabelul 3C.

- 5 In studiul exemplificativ prezentat de asemenea în Tabelul 3C, legarea anticorpilor din prezenta dezvăluire la liniile celulare indicate a fost efectuată folosind o metodă standard de marcare FACS. Rezultatele citometriei în flux reflectă Kapp medie măsurată din patru linii celulare umane (cancer mamar uman HCC1806, cancer colorectal uman HT-29, cancer pulmonar uman NCI-H292 și cancer pulmonar uman NCI-H520) și dintr-o linie celulară CHO-K1 care exprimă CD71 de maimuță cinomolgus. Valorile Kd aparente exemplificative pentru fiecare articol de test sunt prezentate în Tabelul 3C.

Tabelul 3C: Activitatea de legare CD71 exemplificativă observată a anticorpilor anti-CD71, a anticorpilor conjugați anti-CD71, a anticorpilor activabili anti-CD71 neclivați și clivați și a anticorpilor activabili conjugați anti-CD71

		ELISA rhCD71	ELISA rcCD71	Citometrie de flux medie a 4 linii celulare umane	Citometrie de flux a CD71 cino CHO-K1
	Articol de testare	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)
1	Ab21.12	0,03	0,03	0,8	0,3
2	Ab21.12-vc-MMAE E2	0,04	0,03	Netestat	Netestat
3	anti-CD71-TF02.13-2011	1,94	1,11	105,5	28
4	anti-CD71-TF02.13-2011, activat cu matriptază	0,06	0,04	2,0	0,5
5	anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2	2,58	1,02	98,1	35
6	anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2, activat cu matriptază	0,05	0,04	2,0	0,7
Raport					
	anti-CD71-TF02.13-2011 Ab21.12	65	37	127	93
	anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2 / Ab21.12	86	34	117	117
	anti-CD71-TF02.13-2011 anti-CD71-TF02.13-2011, activat cu matriptază	32	28	55	56
	anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2 / anti-CD71- TF02.13-2011-vcMMAE E2, activat cu matriptază	52	26	48	50

- 15 Aceste rezultate exemplificative arată că anticorpul activabil intact și anticorpul activabil conjugați intacti au prezentat o afinitate aparentă mai mică la CD71 în comparație cu omologii lor activați sau anticorpul lor parental.

EXEMPLUL 5: Expresia CD71 în tumorile primare și metastatice derivate de la mai mulți pacienți

- 20 Acest exemplu arată că CD71 este exprimat într-o mare varietate de tipuri de tumori primare și metastatice prin colorare imunohistochimică (IHC) folosind un anticorp anti-CD71.

FIG. 1 și 2 arată că CD71 este puternic exprimat într-un număr mare de mostre de tumori primare și metastatice, folosind colorarea IHC cu un anticorp anti-CD71 cumpărat comercial pe mai multe tumori primare derivate de la pacienți și micromatrice de țesut metastatic derivate de la pacienți (TMA). FIG. 1 prezintă o colorare IHC a CD71 în cancerul de cap și gât (1), cancerul cervical (2), cancerul de san (3), limfomul non-Hodgkin (NHL) în nodulii limfatici (4), cancerul pulmonar (5), un cancer al vezicii urinare (6), un cancer ovarian (7) și un cancer esofagian (8). FIG. 2 prezintă o colorare IHC a CD71 într-o micromatrice de țesut (TMA) constând din nucleee din tumorile metastatice care au demonstrat un nivel moderat până la ridicat de exprimare a CD71 în majoritatea nucleelor. Un rezumat al expresiei CD71 în mostrele de tumori umane prin imunohistochimie (IHC) este prezentat în Tabelul 4A.

Tabelul 4A: Rezumatul expresiei CD71 în mostrele de tumori umane prin IHC

Indicație	Situs	Total cazuri	% Puternic/ moderat (IHC 2+ sau mai mare)
Esofagian	primar	56	82,1
	metastaze	69	75,4
Gastric	primar	209	63,6
	metastaze	74	83,7
Pancreatic	primar	151	57
	metastaze	15	80
limfom non-Hodgkin	primar	132	66,7
	metastaze	59	88,1
carcinoame pulmonare nonmicrocelulare	primar	127	74,8
	metastaze	87	70,1
San	primar	45	66,7
	metastaze	80	85
Endometrial	primar	147	98
	metastaze	9	88,9
Colorectal	primar	146	77,4
	metastaze	98	74,5
carcinoame cu celule scuamoase la cap și gât	primar	160	53,8
	metastaze	25	60

EXEMPLUL 6: Eficiența de mascare și eficacitatea anti-CD71-AADC activabil *in vivo* în modelul de xenogrefă CRC

Acest exemplu arată că eficiența de mascare a anticorpilor activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC) din prezenta dezvoltare este un factor în eficacitatea sa într-un model de xenogrefă pe șoarece de cancer colorectal (CRC) HT29.

În aceste studii, tumorile cu xenogrefă HT29 la șoareci au crescut la un volum mediu de 150 mm³. Șoarecii au fost apoi randomizați în grupuri și dozați în ziua 1 cu 3 mg/kg (sau altfel indicat) din fiecare articol de testat indicat. Volumul mediu al tumorii ± SEM a fost reprezentat grafic pentru fiecare moment de timp.

FIG. 4A arată că un AADC anti-CD71 exemplificativ al prezentei dezvoltării (anti-CD71 TF01-3011-vc-MMAE) cu o mască de afinitate mai mare a arătat o anumită inhibare a creșterii tumorii în raport cu un control cu vehicul după o singură doză de 3 mg/kg. În comparație, FIG. 4B a arătat că un AADC anti-CD71 exemplificativ al prezentei dezvoltării (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) cu o mască de afinitate mai mică, dar cu același substrat clivabil, a prezentat o regresie esențial completă a xenogrefei după o singură doză de 3 mg/kg. FIG. 4C arată că un AADC anti-CD71 exemplificativ al prezentei dezvoltării (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) cu masca de afinitate mai mică, dar cu același substrat clivabil, a prezentat de asemenea, o regresie esențial

completă a xenogrefei HT29 la ambele doze de 2 mg/kg sau de 3 mg/kg. Aceste rezultate exemplificative arată că un AADC cu radicalul de mascare cu afinitate mai mică a demonstrat o eficacitate mai mare decât un AADC cu un radical de mascare cu afinitate mai mare.

EXEMPLUL 7: Substraturi clivabile și eficacitatea anti-CD71-AADC activabil *in vivo* într-un model de xenogrefă CRC

Acest exemplu arată efectul substratului clivabil asupra eficacității exemplurilor de anticorpi activabili conjugați CD71 anti-umani (AADC-uri) din prezenta dezvoltare într-un model de xenogrefă pe șoarece.

În aceste studii, tumorile xenogrefe HT29 (derivate din cancerul colorectal) la șoareci au crescut la un volum mediu de 150 mm³. Șoarecii au fost apoi randomizați în grupuri și dozați în ziua 1 cu cantitatea indicată din articolul de testare indicat. Volumul mediu al tumorii ± SEM a fost reprezentat grafic pentru fiecare moment de timp.

FIG. 5 arată că AADC-urile anti-CD71 exemplificative ale prezentei invenții (CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) prezintă o regresie completă sau aproape completă în modelul de xenogrefă pe șoarece la două doze diferite. Aceste date exemplificative demonstrează că eficacitatea AADC-ului indicat (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) cu un substrat mai puțin clivabil este substanțial aceeași cu eficacitatea AADC-ului (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) cu un substrat mai clivabil prezentat în FIG. 4B și 4C.

EXEMPLUL 8: Eficacitatea anti-CD71-AADC activabil *in vivo* în mai multe modele de xenogrefă

Acest exemplu arată eficacitatea AADC-ului anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE din prezenta dezvoltare la două rapoarte diferite medicament-anticorp (DAR) în diferite modele de xenogrefă pe șoarece.

În aceste studii, tumorile de xenogrefă de cancer ovarian (OV-90; FIG. 6B), cancer de stomac (NCI-N87; FIG. 6A), cancer de san ER + (BT474; FIG. 6C) sau cancer de san triplu negativ (HCC-70; fig. 6D) la șoareci au crescut la un volum mediu de 150 mm³. Șoarecii au fost apoi randomizați în grupuri și dozați în ziua 1 cu articolul de testare indicat. Cantitatea din fiecare AADC care a fost administrată a fost potrivită cu doza pe baza cantității de toxină MMAE, astfel încât anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (având un DAR mediu de ~ 3) a fost administrat la 3 mg/kg și anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (având un DAR mediu de ~ 2) a fost administrat la 4,3 mg/kg. Volumul mediu al tumorii ± SEM a fost reprezentat grafic pentru fiecare moment de timp.

FIG. 6A-6B arată că un AADC anti-CD71 exemplificativ al prezentei dezvoltării (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) prezintă o regresie completă sau aproape completă într-un model de xenogrefă pe șoarece de cancer ovarian și de stomac. Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (adică având un DAR de ~ 2), care a inclus AADC-uri purificate fiecare cu doi echivalenți de toxină MMAE, a prezentat de asemenea, regresii complete în aceleași modele. În toate cazurile, așa cum este prezentat în FIG. 6C și 6D, chiar și atunci când nu a fost observată regresia completă sau aproape completă, activitățile E2 (adică având un DAR de ~ 2) și AADC-urilor cu DAR mai mare au fost echivalente sau aproape echivalente. Aceste date exemplificative demonstrează că eficacitatea potrivită cu doza a AADC E2 (adică având un DAR de ~ 2) (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2) este comparabilă cu a AADC cu DAR mai mare corespunzător.

Așa cum se arată în Tabelul 4B, eficacitatea AADC anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 având un DAR de ~ 2 a fost testată împotriva unei varietăți de linii celulare derivate de pacienți (PDX) sau cancere (CDX) într-un model de xenogrefă pe șoarece și au fost dozați cu mai puțin sau egal cu 6 mg/kg o dată sau de două ori. Rezultatele, care sunt rezumate mai jos, arată că AADC a demonstrat cel puțin o anumită eficacitate, variind de la regresie la stază până la inhibarea creșterii tumorale în aproape toate modelele testate.

Tabelul 4B: Eficacitatea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 în xenogrefe derivate din linia celulară

Tipuri de tumori	CDX sau PDX	Regresii sau Stază	Inhibarea creșterii tumorale	Nici un răspuns
Gastric	CDX	1		
	PDX	4		1
Esofagian	CDX	3	1	
	CDX	4		

Ovarian	PDX	2	1	
Cancerul pulmonar nonmicrocelular	CDX	3	1	
	PDX	2	1	1
San	CDX	3	2	
	PDX	5		
Colorectal	CDX	2		1
Mielom multiplu			1	
Prostată	CDX	1		
Mezoteliom			1	
Limfom difuz cu celule B mici	PDX	4	1	
Carcinom cu celule mici la cap și gât				
	PDX	5		
Pancreatic	PDX	6		1

EXEMPLUL 9: Analize bioanalitice pentru determinarea nivelurilor de toxină conjugată și liberă și AADC intact și total în mostrele de la animale tratate

Acest exemplu prezintă fluxuri de lucru exemplificative pentru teste pentru a măsura nivelurile de metaboliți în mostrele de test, inclusiv nivelurile de toxină conjugată și liberă, și nivelurile de anticorpi activabili conjugați intacte și totale.

FIG. 7A, 7B și 7C prezintă fluxuri de lucru schematice pentru testele bioanalitice exemplificative pentru a determina cantitatea de anticorp activabil intact și total (*adică* combinat intact și clivat) la maimuțele tratate, precum și cantitatea de AADC intact (cu toxină neclivată) și toxina clivată la maimuțele tratate. Folosind protocolul de testare exemplificativ descris în FIG. 7A, cantitatea totală de anticorp activabil intact și clivat (*de ex.*, anti-CD71 TF02.13-3001) din mostră poate fi capturată de perle magnetice de proteină A și ulterior denaturată (RapiGest™), redusă cu ditiotritol, alchilată și digerată cu tripsină. Fragmentele peptidice rezultate pot fi analizate utilizând LCMS/MS cu fază inversă pentru a identifica și cuantifica fragmente de peptide caracteristice din lanțurile grele și ușoare ale anticorpului. În această analiză specială, una sau mai multe peptide care sunt caracteristice pentru porțiunea de anticorp a anticorpului activabil sau a anticorpului activabil conjugat pot fi identificate și cuantificate folosind LC-MS/MS cu fază inversă pentru a determina cantitatea totală de anticorp activabil atât intact cât și clivat, măsurând astfel cantitatea de anticorp activabil intact și clivat totală din mostră.

În aceeași analiză, una sau mai multe peptide care sunt caracteristice pentru radicalul clivabil neclivat (CM) și porțiunea de radical de mascare (MM) a anticorpului activabil (*de ex.* de la N-terminalul lanțului ușor al anti-CD71 TF02.13-2011) pot fi identificate și cuantificate utilizând LC-MS/MS cu fază inversă pentru a determina cantitatea totală de anticorp activabil intact, măsurând astfel cantitatea de anticorp activabil intact din mostră.

Folosind protocolul de testare exemplificativ descris în FIG. 7B, poate fi determinată cantitatea totală de AADC (*de ex.*, anti-CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) care rămâne conjugată la toxina sa (MMAE) din mostră. În acest test, cantitatea totală de anticorp activabil, atât conjugat, cât și neconjugat, este capturată de proteina A MabSelect®. Această fracție este tratată cu o protează de cisteină pentru a cliva toxina liant, eliberând astfel orice toxină care a rămas conjugată la anticorpul său activabil. Folosind LC-MS/MS cu fază inversă pentru a analiza fracția clivată de protează de cisteină, toxina caracteristică (*de ex.*, MMAE) care a rămas conjugată la anticorpul activabil capturat poate fi identificată și cuantificată, măsurând astfel cantitatea de toxină conjugată din mostră.

Folosind protocolul de testare exemplificativ descris în FIG. 7C, se poate determina cantitatea totală de toxină din mostră, care include toxinele clivate din AADC la animal. În acest test exemplificativ descris în FIG. 7C, proteina totală din mostră este precipitată, lăsând toxină liberă, neconjugată (MMAE) în supernatant. Supernatantul poate fi analizat folosind LC-MS/MS cu fază inversă pentru a identifica și cuantifica toxina caracteristică (*de ex.*, MMAE) care nu s-a asociat cu proteina precipitată, măsurând astfel cantitatea de toxină neconjugată din mostră. În aceste teste, au fost incluse standarde interne (*de ex.*, SILu™ Mab, Sigma-Aldrich) pentru a permite cuantificarea.

EXEMPLUL 10: Tolerabilitatea și stabilitatea ADC-urilor anti-CD71-AADC și anti-CD71 la maimuțele cinomolgus

Acest exemplu arată că anticorpul activabil CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC-uri) din prezenta dezvoltare sunt bine tolerați la maimuțele cinomolgus comparativ cu conjugatul medicament anticorp anti-CD71 parental corespunzător (ADC) bazat pe una sau mai multe citiri hematologice și simptome clinice. Rezultatele sunt rezumate mai jos în Tabelul 5 și rezumate în Figura 17.

În acest studiu, maimuțele cinomolgus au fost tratate intravenos cu AADC sau ADC indicat cu doza indicată în zilele 1 și 21. O singură doză a fost tolerată pentru AADC anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE și numai o singură doză a fost administrată pentru ADC anti-CD71-vc-MMAE E2 (adică având un DAR de ~ 2). Stabilitatea anticorpilor activabili (*adică* anticorpul activabil total versus anticorpul activabil intact) în mostrele obținute de la fiecare animal a fost realizată așa cum este descris în Exemplul 9 folosind LC/MS/MS cu fază inversă)

Tabelul 5: Rezumatul tolerabilității și stabilității AADC și ADC anti-CD71 la maimuțele cinomolgus

Articol testat (raport medicament proteină (DAR))	Doză (mg/kg)	Pierdere în greutatea corporală	Media neutrofilelor Număr ± SD (pe μL)	Stabilitatea relativă a anticorpului activabil circulant	Semne clinice / tolerabilitate
Anti-CD71 TF02.13-3011-vc- MMAE (~ 3)	6	~ 10%	98 ± 60	Inferior	Neutropenie severă,
					letargie, inapetență. Netolerat
Anti-CD71 TF02.13-2011-vc- MMAE (~ 3)	6	~ 8%	290 ± 290	Superior	Nici unul. Tolerat
Anti-CD71 TF02.13-2011-vc- MMAE E2 (~ 2)	12	0%	180 ± 210	Superior	Nici unul. Tolerat
Ab21.12-vc- MMAE E2 (~ 2)	2	~ 8%	70	N/A	Letal la ~ 1 săptămână după prima doză

Pierderea în greutatea corporală a fost determinată pe cea mai mică greutate măsurată după prima doză administrată. Numărul inițial de neutrofile a fost de cel puțin 1000 pe μL.

După cum este rezumat în Tabelul 5, ADC E2 nemascat (*adică* având un DAR de ~ 2) (Anti-CD71-vc-MMAE E2) a demonstrat letalitate în decurs de 8 zile de la prima doză.

Rezultatele exemplificative rezumate în Tabelul 5 arată de asemenea, că AADC-urile cu substrat mai puțin clivabil (*adică* anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE și anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2) au fost mai bine tolerate și au demonstrat un nivel mai ridicat de stabilitate circulatorie la o primată neumană decât AADC corespunzător cu substrat mai clivabil (*adică* anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE). În cele din urmă, rezultatele exemplificative arată că AADC (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (*adică* având un DAR de ~ 2)) a demonstrat o tolerabilitate îmbunătățită măsurabilă la o primată neumană decât AADC corespunzător cu DAR mai mare (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE).

EXEMPLUL 11: Stabilitatea și farmacocineticele anti-CD71-AADC la maimuțele cinomolgus

Acest exemplu arată stabilitatea și farmacocineticele anticorpilor activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC) ale prezentei dezvoltării la maimuțele cinomolgus.

- În acest studiu, ale cărui rezultate sunt descrise mai departe în detaliu în Exemplele 12 la 14, patru grupuri de maimuțe cinomolgus au fost tratate intravenos cu E2 indicat (adică având un DAR de ~ 2) anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE sau cu un control cu vehicul cu doza și programul indicate în Tabelul 6. Mostrele de la fiecare animal au fost obținute în zilele indicate în Tabelul 6, care au fost testate pentru anticorpii activabili total și intact și toxină MMAE conjugată și neconjugată în modul descris în Exemplul 9.

Tabelul 6: Proiectarea studiului de toxicitate AADC anti-CD71

Grup	Articol de testare	Doză (mg/kg)	# Doze	# Animale	Momente de timp de eșantionare în raport cu doza (zile)
1	Vehicul	N/A	2 (Q3W)	3 (2 masculi; 1 femelă)	Ziua 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ziua 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
2	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	6	2 (Q3W)	3 (2 masculi; 1 femelă)	Ziua 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ziua 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
3	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	12	2 (Q3W)	3 (2 masculi; 1 femelă)	Ziua 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ziua 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
4	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	18	1	3 (2 masculi; 1 femelă)	Ziua 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21

- După cum este rezumat în Tabelul 6, maimuțele cinomolgus au fost dozate fie cu vehicul, fie cu anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 AADC prin bolus IV lent la nivelurile de doză și schemele prezentate. Mostrele de sânge pentru analizele toxicocinetice au fost procesate în plasmă și depozitate la -80°C înainte de analiză. Mostrele de ser au fost obținute pentru analiza antimedament înainte de doză și la 7 zile după a doua doză pentru grupurile 1-3 și la 22 de zile după prima doză pentru grupa 4. Toate grupurile conțineau trei animale (2 masculi și 1 femelă).

EXEMPLUL 12: Stabilitatea anti-CD71-AADC la maimuțele cinomolgus

- Acest exemplu arată stabilitatea anticorpilor activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC-uri) din prezenta dezvoltare la maimuțele cinomolgus.

- Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din FIG. 8A și 8B, concentrațiile plasmatice ale anticorpului activabil total și intact (anti-CD71 TF02.13-2011) ale AADC administrat au fost determinate în modul descris în exemplele 9 și 11. Limitele inferioare de cuantificare (LLOQ), pentru anticorpii activabili atât intact, cât și total, au fost de 0,633 nM, după cum s-a indicat. Aceste rezultate exemplificative demonstrează că concentrația plasmatică a anticorpilor activabili intacti a fost în general menținută în timpul intervalului de dozare de 21 de zile și la un nivel proporțional cu doza administrată inițial. Chiar și la 7 zile după administrarea dozei, aproximativ 80% din anticorpii activabili conjugate (anti-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2) în plasmă a fost în formă intactă, promedament.

- Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din FIG. 9A și 9B, concentrațiile plasmatice ale toxinei MMAE conjugate și neconjugate au fost determinate în modul descris în exemplele 9 și 11. Limita inferioară de cuantificare (LLOQ) a fost de 1,77 nM pentru MMAE conjugat și de 0,31 nM pentru MMAE neconjugat, după cum s-a indicat. Aceste rezultate exemplificative demonstrează că mai puțin de 1% din totalul MMAE măsurat în concentrația plasmatică a fost într-o formă neconjugată.

EXEMPLUL 13: Schimbarea medicamentului în rapoarte de anticorpi activabili după dozarea anti-CD71-AADC la maimuțele cinomolgus

- Acest exemplu arată raportul observat dintre medicament (MMAE) și anticorpii activabili (anti-CD71 TF02.13-2011) în plasmă după dozarea maimuțelor cinomolgus cu anticorpi activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC) din prezenta dezvoltare.

- Concentrațiile plasmatice ale anticorpului activabil total și intact (anti-CD71 TF02.13-2011) au fost determinate în modul descris în exemplele 9 și 11. Așa cum se arată în FIG. 10, raportul medicament la anticorpi activabili a fost calculat prin împărțirea concentrației de MMAE conjugat (vezi Exemplul 12 și FIG. 9A) la concentrația anticorpului activabil total (vezi Exemplul 11 și FIG. 8A) la fiecare moment de timp indicat. Raporturile medii și deviațiile standard pentru anumite momente de timp sunt prezentate în Tabelul 7. Aceste rezultate exemplificative demonstrează că raportul observat de medicament MMAE la anticorpii activabili s-a schimbat în

timp într-un mod care a fost consistent între fiecare dintre cele trei (3) doze. În fiecare doză, DAR calculat al AADC intact a început la ~ 2 imediat după și în 4 ore de administrare și că acest raport a scăzut la aproximativ 1 la aproximativ 96 de ore (*adică* aproximativ 4 zile) după doză.

5 **Tabelul 7: Raportul dintre medicament și anticorpul activabil**

Articol de testare	Doză (mg/kg)	Raport (5 min)	Raport (4 ore)	Raport (24 ore)	Raport (4 zile)	Raport (7 zile)
anti-CD71 TF02.13-2011-MMAE E2	6	1,98 0,081	±1,95 0,008	±1,65 0,075	±1,08 0,029	±0,874 0,077
anti-CD71 TF02.13-2011-MMAE E2	12	2,05 0,080	±2,00 0,283	±1,69 0,030	±1,06 0,023	±0,835 0,100
anti-CD71 TF02.13-2011-MMAE E2	18	2,34 0,295	±2,01 0,072	±1,63 0,164	±1,03 0,030	±0,835 0,119

EXEMPLUL 14: Parametrii farmacocinetici ai anti-CD71-AADC la maimuțele cinomolgus

Acest exemplu arată parametrii farmacocinetici ai anticorpilor activabili CD71 anti-umani cu toxine conjugate (AADC-uri) din prezenta dezvoltării la maimuțele cinomolgus.

- 10 Concentrațiile plasmatice ale anticorpului activabil total și intact (anti-CD71 TF02.13-2011) au fost determinate în modul descris în exemplele 9 și 11. Așa cum se arată în Tabelul 8, C_{max} mediu pentru un analit dat s-a bazat pe concentrația plasmatică maximă observată. AUC_{0-7} medie s-a bazat pe aria de sub curba concentrație plasmatică-timp din zilele 0 până la 7. Estimările timpului de înjumătățire pentru anticorpul activabil conjugat total, anticorpul activabil conjugat intact și MMAE conjugat au variat între 2,5 și 6,3 zile. Estimările timpului de înjumătățire nu au
- 15 fost generate pentru MMAE neconjugate.

Tabelul 8: Raportul dintre medicament și anticorpul activabil

Analit	C_{max} mediu (nM)			AUC_{0-7} medie (zi nM)		
	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg
Anticorp activabil total	2610	1810	1060	5560	5490	2850
Anticorp activabil intact	2530	1190	1080	4804	4970	2520
MMAE conjugat	6090	3820	2090	12500	7850	4000
MMAE neconjugat	0,696	0,487	0,195	1680	1170	531

20 **EXEMPLUL 15: Testarea anticorpilor anti-medicament**

Acest exemplu descrie utilizarea unui test de legare în punte pentru a monitoriza formarea anticorpilor anti-medicament (ADA) la animalele testate.

Probele de plasmă pentru analiza ADA au fost colectate înainte de studiu și la 7 zile după a doua doză. Anticorpilor anti-medicament au fost detectați la 3 din cele 9 animale dozate din studiu.

25 **EXEMPLUL 16: Citotoxicitatea *in vitro* a anticorpului activabil conjugat anti-CD71**

Acest exemplu descrie teste de citotoxicitate *in vitro* pe linii celulare derivate de tumori umane de anticorpi activabili conjugate anti-CD71 intacte și activate ai prezentei dezvoltării comparativ cu un ADC de control al izotipului.

- 30 O activitate citotoxică exemplificativă *in vitro* a anticorpului activabil conjugat al prezentei invenții anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (HC din SECV ID NR: 167 și LC din SECV ID NR: 169), cu sau fără pretratare cu matriptază, a fost evaluată și comparată cu un control al anticorpului conjugat care nu se leagă la CD71 al izotipului (AB095-vcMMAE cu DAR de 2, unde AB095 este specific pentru toxina tetanică). Citotoxicitatea articolelor testate a fost testată pe HT29 (linia celulară a cancerului colorectal uman), H292 (linia celulară a cancerului pulmonar uman), H520 (linia celulară a cancerului pulmonar uman) și HCC1806 (linia celulară a cancerului
- 35 mamar uman) prin incubarea fiecărui articol de testare cu fiecare linie celulară timp de 5 zile și apoi măsurarea viabilității celulare pe o gamă de concentrații ale fiecărui articol de testat pentru a determina EC_{50} pentru fiecare articol de testat. Rezultatele sunt rezumate mai jos în Tabelul 9.

Tabelul 9: Valorile EC₅₀ pentru testele de citotoxicitate *in vitro* in celulele tumorale umane

Articol de testare	EC ₅₀ a HT29 (nM)	EC ₅₀ a HCC1806 (nM)	EC ₅₀ a H520 (nM)	EC ₅₀ a H292 (nM)
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, activat cu matriptază	1,3	3,2	1,2	3,3
ADC izotip	Nici un	> 50	> 50	> 50

Aceste rezultate exemplificative arată că citotoxicitatea *in vitro* a anticorpului activabil conjugat anti-CD71 a fost similară cu cea a controlului cu izotip, dar a fost substanțial crescută la activarea cu matriptază.

EXEMPLUL 17: Legarea Fc și activarea complementului de către anticorpul activabil conjugat anti-CD71

Acest exemplu a demonstrat capacitatea anticorpilor activabili conjugați anti-CD71 din prezenta dezvoltare de a media mecanisme bazate pe funcția efectorie, cum ar fi citotoxicitatea mediata de celule dependente de anticorp (ADCC) și citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

Porțiunea fragmentată cristalizabilă (Fc) a unui anticorp IgG poate media o varietate de funcții, dintre care unele apar prin legarea la receptorii Fc și C1q. Aceste funcții includ inducerea citokinelor, citotoxicitatea mediata de celule dependente de anticorp (ADCC), citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) prin activarea căii clasice a sistemului complementului, fagocitoza și homeostazia anticorpilor prin reciclarea IgG. (Ravetch și colab., Annu Rev Immunol. 2001; 19: 275-290; Roopenian și colab., Nat Rev Immunol. 2007; 7: 715-725).

Homeostazia anticorpilor este reglementată parțial de receptorul neonatal legat de Fc, FcRn, care este prezent pe celulele epiteliale intestinale, celulele endoteliale vasculare și celulele profesionale care prezintă antigen. Intracelular, FcRn este prezent în vezicule; în endozomii acizi la pH scăzut, poate lega porțiunea Fc a unui IgG care a fost luată prin pinocitoză. IgG este eliberat atunci când endozomii se reciclează pe suprafața celulară ca urmare a expunerii la pH extracelular neutru. Acest proces permite controlul traficului de IgG peste barierele epiteliale monostrat și protejează moleculele IgG de catabolism, prelungind timpul de înjumătățire serică al IgG. (Roopenian). Într-adevăr, mutațiile care sporesc legarea FcRn la pH scăzut, dar mențin legarea scăzută la pH fiziologic s-au dovedit a avea o perioadă de înjumătățire serică mai lungă. (Hinton și colab., J Biol Chem. 2004; 279: 6213-6216; Hinton și colab., J Immunol. 2006; 176: 346-356)

Sistemul FcγR uman este compus atât din receptori activatori (FcγRI, FcγRIIa și FcγRIIIa), cât și inhibitori (FcγRIIb). FcγRI, un receptor IgG1 cu afinitate ridicată, este exprimat de celulele liniei monocitare. (Li și colab., J Immunol. 2008; 181: 1012-1018) FcγRIIa este un receptor IgG cu afinitate scăzută exprimat mai larg, care se leagă preferențial la complexe imune. (Littau și colab., J Immunol., 1990; 144: 3183-3186) FcγRIIb este exprimat în cea mai mare parte pe linia monocitară și celulele B și este un receptor IgG inhibitor cu afinitate scăzută. La legarea FcγRIIb la complexe IgG, procesele dependente de calciu, cum ar fi degranularea, fagocitoza, ADCC, eliberarea de citokine și activarea proinflamatorie sunt blocate. (Clynes și colab., Nat. Med., 6: 446-446 (2000); Minard-Colin și colab., Blood, 112: 1205-1213 (2008); și Hamaguchi și colab., J. Exp. Med., 203: 743-753 (2006)). FcγRIIIa este un receptor cu afinitate scăzută responsabil pentru activitatea ADCC a celulelor NK. (Ravetch) Pentru a adăuga la diversitatea de receptori Fcγ, există variante polimorfe ale FcγRIIa (H131 vs. R131) și FcγRIIIa (V158 vs. F158) care au diferențe în afinitățile pentru moleculele IgG. (Bruhns și colab., Blood, 2008; 113: 3716-3725).

Capacitatea anticorpilor de a media o varietate de funcții prin FcγR sau sistemele efectorie complementare, permite posibilitatea unei farmacologii exagerate neintenționate în biologicile de inginerie genetică pe bază de IgG. Reactivitatea încrucișată necunoscută asupra limfocitelor din sângele periferic este capabilă să declanșeze reticularea receptorilor Fcγ. Deoarece interacțiunile de reticulare a receptorilor Fcγ pot media o varietate de funcții, inclusiv inducerea citokinelor, ADCC și fagocitoza (Ravetch), este important să se determine capacitatea anticorpilor terapeutici de a lega ținte neintenționate în sânge sau țesuturi.

Metode - Test de legare prin rezonanță plasmonică de suprafață a FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa și FcRn

FcγRII și FcγRIII umane recombinante au fost capturate prin eticheta 6xHis pentru a evalua legarea lor la anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE, anti-CD71 Ab21.12 (IgG1/κ), AB095-

MMAE-E2 și AB095 (IgG1/κ) prin rezonanță plasmonică de suprafață (Biacore). Anticorpul anti-6xS de șoarece au fost imobilizați direct pe un cip CM5 prin cuplare amină conform protocolului producătorului la densitatea de 10000 RU. FcγR umane au fost apoi capturate pe celulele de flux 2, 3 și 4 pentru a atinge nivelul de captare al FcγRs de 250-500 RU. Celula de flux 1 a fost utilizată ca suprafață de referință. Tamponul HBS-EP+ (GE, Healthcare) a fost utilizat ca tampon de rulare. Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, anti-CD71 Ab21.12 (IgG1/κ), AB095-MMAE-E2, AB095 (IgG1/κ) și trastuzumab (IgG1/κ) au fost injectați peste toate celulele de flux la un debit de 50 μL/minut timp de unul până la două minute (un minut pentru FcγRIIb și FcγRIIa H131 și două minute pentru FcγRIIIa F158 și FcγRIIIa V158) la concentrații variind între 46,9 și 12000 nM pentru FcγRII și 7,8 până la 4000 nM pentru FcγRIII (diluție serială de două ori pentru ambele), urmat de un timp de disociere de la unu până la cinci minute (un minut pentru FcγRIIb, FcγRIIa H131 și cinci minute pentru FcγRIIIa F158 și FcγRIIIa V158). Suprafețele cipului au fost regenerate cu o injecție de 100 mM HCl la un debit de 100 μL/minut timp de două secunde pe toate cele patru celule de flux. Au fost efectuate trei experimente cu utilizarea a trei cipuri CM5 diferite pentru fiecare mostră (fiecare în duplicat) pentru a găzdui toate tipurile de erori experimentale (de instrument, de suprafață și de operator). Rezultatele acestor trei experimente au fost mediate.

Pentru analiza legării FcRn, anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, anti-CD71 TF02.13-2011 (IgG1/κ fără vc-MMAE), AB095-vcMMAE-E2 (un anticorp IgG1/κ toxoid anti-tetanus uman monoclonal nespecific care conține MMAE cu DAR = 2 îmbogățit), AB095 (un anticorp IgG1/κ toxoid anti-tetanus uman monoclonal nespecific) și trastuzumab (IgG1/κ) au fost imobilizați direct pe un cip CM5 prin cuplare amină conform protocolului producătorului la densitatea de 500 RU. Hu FcRn a fost injectat peste toate celulele de flux la un debit de 50 μL/minut timp de un minut la concentrații variind între 5,5 și 12000 nM (diluție serială de 3 ori), urmat de un timp de disociere de două minute. Suprafețele au fost regenerate cu o injecție de 100 mM HCl timp de două secunde urmate de HBS-EP+, pH 7,4. Mostrele au fost preparate și rulate în două sisteme tampon, MES-EP+ pH 6,0 și HBS-EP pH 7,4. Au fost efectuate trei experimente cu utilizarea a trei cipuri CM5 diferite pentru fiecare mostră (fiecare în duplicat) pentru a calcula eroarea de instrument, de suprafață și de operator. Rezultatele acestor trei experimente au fost mediate.

Toate datele despre FcγRIIIa V158 uman recombinat și datele despre FcγRIIIa F158 au fost adaptate la modelul de ajustare de legare 1: 1 cu R_{max} fixat local pentru a calcula variabilitatea nivelurilor de captare. Datele de legare ale FcγRIIb uman recombinant, FcγRIIa H131 și FcRn au fost adaptate la un model de afinitate al stării de echilibru. Software-ul de evaluare Biacore T200 Versiunea 2.0 a fost folosit pentru ajustarea tuturor datelor.

Rezultate

Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 conține un izotip Fc IgG1/κ uman. Era de așteptat să se lege la FcγRI, FcγIIa, FcγIIb, FcγIII, consistent cu alți anticorpi IgG1/κ de tip sălbatic. Legarea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 la FcγR a fost analizată prin rezonanță plasmonică de suprafață, o ELISA de legare concurențială a FcγRI (rezultatele nu sunt prezentate) și ELISA de legare concurențială a FcγRIII (rezultatele nu sunt prezentate) și legarea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 la complement a fost analizată prin teste funcționale de activare a complementului uman și de cinomolgus (rezultatele nu sunt prezentate). Aceste teste au fost comparate cu anticorpi umani comerciali și generați intern. Materialul trastuzumab anti-HER2, IgG1/κ, uman de calitate clinică a fost utilizat ca control pozitiv pentru testele de legare a FcγR. Se știe că receptorii Fc și complementul leagă anticorpii IgG1 de tip sălbatic. (Ravetch; Roopenian; Burton și colab., Nature. 1980; 288: 338-344; Hughes-Jones și colab., Mol Immunol., 1979; 16: 697-701; și Hezareh și colab., J Virol. 2001; 75: 12161-12168). Examinarea Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE a relevat faptul că a legat FcγRI, FcγIIa H131, FcγRIII și FcRn, deși s-a observat legarea redusă modest la FcγRIII (prin SPR) în comparație cu controlul pozitiv, trastuzumab. Legarea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 la FcγRIIb a fost prea slabă pentru a fi determinată deoarece a scăzut sub limita de detectare a instrumentului Biacore la 1,0 e-05 KD. (vezi Tabelele 10A și 10B).

Tabelul 10A: Legarea anticorpului activabil conjugat anti-CD71 la FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa prin rezonanță plasmonică de suprafață

	Kd(M)				
FcγR captat	Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	Anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)	AB095-vcMMAE-E2	AB095 (IgG1/κ)	Trastuzumab
huFcγRIIb	Legare prea slabă pentru a fi determinată	Legare prea slabă pentru a fi determinată	Legare prea slabă pentru a fi determinată	$7,2 \pm 1,2$ E-06	$8,6 \pm 1,4$ E-06
huFcγRIIa H131	$6,2 \pm 2,3$ E-06	$4,7 \pm 0,5$ E-06	$2,9 \pm 0,3$ E-06	$2,1 \pm 0,1$ E-06	$3,8 \pm 0,2$ E-06
huFcγRIIIa F158	$2,1 \pm 0,3$ E-06	$1,8 \pm 0,1$ E-06	$8,9 \pm 0,6$ E-07	$1,5 \pm 0,1$ E-06	$7,5 \pm 0,9$ E-07
huFcγRIIIa V158	$2,0 \pm 0,4$ E-07	$1,8 \pm 0,2$ E-07	$1,2 \pm 0,2$ E-07	$1,6 \pm 0,8$ E-07	$8,5 \pm 1,3$ E-08

Tabelul 10B: Rezonanța plasmonică de suprafață a FcRn uman

Articol de testare	K _D (M)	
	FcRn la pH 6,0	FcRn la pH 7,4
Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	$5,3 \pm 0,3$ E-06	Nu există legare semnificativă
Anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)	$4,7 \pm 0,3$ E-06	Nu există legare semnificativă
AB095-vcMMAE-E2	$5,7 \pm 1,3$ E-06	Nu există legare semnificativă
AB095 (IgG1/κ)	$5,5 \pm 1,2$ E-06	Nu există legare semnificativă
Trastuzumab	$4,5 \pm 1,0$ E-06	Nu există legare semnificativă

5

Citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) a fost evaluată prin testarea capacității anticorpului activabil conjugat anti-CD71 de a activa complementul seric uman și de cinomolgus prin captarea iC3b (uman) sau C3 (cino) prin ELISA, pentru CDC.

10 Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Figura 12, legarea articolelor de test indicate la concentrațiile indicate la iC3b sunt prezentate ca o analiză pentru activarea complementului uman. Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a legat iC3b într-un test de activare a complementului atât în serul uman, cât și de cinomolgus, dar într-un grad mai mic decât cel al controlului pozitiv, anticorpul 7C6, care a fost utilizat în testul CDC. Anticorpul 7C6.7 cu mutațiile indicate a fost utilizat ca control negativ. Legarea iC3b a anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a fost, de asemenea, mai mică decât a omologului său anticorpul activabil neconjugat (anti-CD71-TF02.13-2011).

15

EXEMPLUL 18: Eliberarea de citokine în PBMC-uri umane

20 Acest exemplu a arătat că, deși anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 nu leagă celulele mononucleare din sânge periferic uman sau de cinomolgus (PBMC-uri), anticorpii IgG1 sunt capabili de reticularea receptorilor Fcγ de pe limfocitele din sângele periferic, mediind astfel o varietate de funcții, inclusiv inducerea citokinelor.

20

25 Capacitatea anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 sau anti-CD71-TF02.13-2011 de a induce eliberarea citokinelor *in vitro* în PBMC-urile umane a fost evaluată într-un format solubil sau în fază solidă (legată pe plăci) pentru următoarele citokine: interleukină (IL)-1β, IL 6, IL 2, interferon (IFN)γ și factor de necroză tumorală alfa (TNFα). Pentru experimentul în fază solidă, PBMC-urile de la 8 donatori umani sănătoși au fost adăugate la plăci de polipropilenă acoperite anterior cu 0,96 μg de articol de testat și spălate după 1,5 ore. Supernatantul a fost colectat după 48 de ore pentru analiză. Trastuzumab și un ADC de control al izotipului fără legare, AB095-vcMMAE E2, au fost utilizate ca controale negative. Au fost utilizate trei controale pozitive:

25

anticorpi de stimulare a celulelor T, TGN1412 sau visilizumab și celule B și lipopolizaharidă (LPS) de stimulare a celulelor mieloide. La 1 din 8 donatori testați, a fost observată o eliberare substanțială a 3 din cele 5 citokine măsurate, IL-1 β , IL-6 și TNF α , ca răspuns atât la anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, cât și la AB095-vcMMAE-E2. Eliberarea de IL-6 și TNF α a fost observată la încă 2 din 8 donatori ca răspuns atât la anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, cât și la AB095-vcMMAE E2. Trei donatori au fost testați în testul de prezentare solubil, care a fost un test de prezentare cu densitate celulară ridicată, de 24 de ore.

În acest studiu, eliberarea de citokine de la PBMC-urile donatorului uman a fost măsurată după stimularea cu o preacoperire de 0,96 μ g/godeu cu anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 și anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ). Trastuzumab a fost utilizat ca anticorp IgG1 κ de control negativ. AB095-vcMMAE-E2 și AB095 (IgG1 κ) au fost utilizate ca anticorpi de control ai izotipului. TGN1412, visilizumab și lipopolizaharida (LPS) au fost adăugate ca controale pozitive pentru eliberarea de citokine. Valorile articolelor de testare evidențiate în caractere aldine și încadrate au provocat eliberarea citokinelor > de 2 ori decât eliberarea de către trastuzumab.

Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Tabelul 11, anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 nu a provocat eliberarea de citokine peste nivelul indus de controlul negativ trastuzumab. Eliberarea citokinelor a fost, de asemenea, evaluată la 3 donatori maimuțe cinomolgus în format de fază solidă pentru următoarele citokine: IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN γ , IL-8 și IL 10. Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a provocat producția de IL-8 ușor peste nivelul de bază, așa cum este definit de trastuzumab, la 1 din cei 3 donatori testați. În studiile de toxicologie non-GLP și GLP pe maimuța cinomolgus pentru anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, simptomele clinice acute reprezentative pentru eliberarea de citokine nu au fost observate la nici un nivel de doză.

Tabelul 11: Eliberarea de citokine a PBMC-urilor umane ca răspuns la anticorpus activabil conjugat anti-CD71 în fază solidă și alte articole de testare

		pg/mL Citokină listată de donator nr.						
Nr. donator:	32150	32151	32289	32165	32314	32147	32156	32169
IL-1β								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	735	89	39	77	4	96	5594	493
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	294	90	40	64	6	111	4088	299
AB095-vcMMAE-E2	49	24	7	68	0	51	2704	141
AB095 (IgG1 κ)	121	44	10	8	1	72	70	50
Tampon	1	0	0	0	0	0	0	0
Trastuzumab	570	111	29	14	2	103	381	525
TGN1412	288	208	148	128	58	875	104	200
Visilizumab	439	231	616	465	270	172	61	35
LPS	3007	1570	1994	803	2272	0	0	0
IL-6								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2022	176	110	102	8	71	>10000	1182
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	763	160	116	111	15	83	>10000	1213

AB095-vcMMAE-E2	278	59	37	103	5	78	9781	423
AB095 (IgG1κ)	195	63	42	19	2	37	305	132
IL-6								
Tampon	15	1	1	0	1	1	1	8
Trastuzumab	1262	119	60	23	3	33	2776	879
TGN1412	655	521	296	214	207	151	208	248
Visilizumab	292	103	253	76	291	397	234	202
LPS	9668	9244	>10000	5655	>10000	1	1	10
TNFa								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	3741	497	583	2110	133	2830	8581	3854
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	3438	693	881	1425	114	1554	5163	2309
AB095-vcMMAE-E2	1660	568	296	1458	51	1221	4815	815
AB095 (IgG1κ)	3703	634	349	443	50	1906	664	658
Tampon	93	0	1	0	1	0	2	15
Trastuzumab	5276	931	506	553	70	1131	2180	3701
TGN1412	>10000	9651	8913	>10000	>10000	>10000	9126	>10000
Visilizumab	>10000	6593	>10000	>10000	>10000	>10000	3157	1642
LPS	470	308	293	322	257	2	0	12
IFNγ								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	1950	19	3	12	7	349	354	52
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1γ)	7099	44	8	10	2	129	139	245
AB095-vcMMAE-E2	6119	35	4	4	1	161	53	14
AB095 (IgG1κ)	>10000	125	13	14	3	433	30	33
Tampon	26	0	2	1	0	0	0	8
Trastuzumab	9173	59	6	7	1	300	58	4100
TGN1412	>10000	>10000	>10000	>10000	3488	>10000	8685	>10000
Visilizumab	>10000	6159	7957	>10000	7965	>10000	2048	873
LPS	376	607	30	7	29	0	0	14
IL-2								

anti-CD71- TF02.13-2011- vcMMAE E2	145	4	3	3	3	2	3	3
anti-CD71- TF02.13-2011 (IgG1κ)	217	2	3	5	1	1	3	13
AB095- vcMMAE-E2	126	2	3	2	1	1	8	2
AB095	301	8	3	4	2	1	5	3
Tampon	447	6	8	30	7	2	24	33
Trastuzumab	262	5	4	8	1	2	3	12
TGN1412	>10000	8485	9018	8223	>10000	821	636	1318
Visilizumab	396	459	1863	609	4643	>10000	1517	1038
IL-2								
LPS	78	3	6	4	4	7	15	34

EXEMPLUL 19: Eficacitatea antitumorală a AADC anti-CD71 în modelul SW-48 de xenogrefă la șoarece

5 Acest exemplu arată eficacitatea anticorpului activat conjugat anti-CD71 conform prezentei invenții într-un model de xenogrefă tumorală pe șoarece, utilizând celule SW-48 (cancer colorectal uman).

10 În acest studiu exemplificativ, injecțiile intraperitoneale unice de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) la dozele indicate au fost administrate la grupuri de 8 șoareci, iar volumul mediu al tumorii a fost observat în timp. Așa cum se arată în Figura 13 și Tabelul 12, un interval de inhibare a creșterii totale (TGI) la 23 de zile în comparație cu controlul cu vehicul a fost observat la toate dozele, cu regresia tumorală completă observată la dozele de 6 și 12 mg/kg.

Tabelul 12: Inhibiția creșterii tumorii xenogrefei după tratamentul cu AADC anti-CD71

Doză AADC (mg/kg)	TGI (%)	TGD (%)	PR (%)	CR (%)	TR (%)
0,75	35	21	0	0	0
1,5	66	71	0	0	0
3	96	>521	12,5	50	62,5
6	100	>521	0	100	100
12	100	>521	0	100	100

CR = răspuns complet; PR = răspuns parțial; TGI = inhibarea creșterii tumorii; TGD = întârzierea creșterii tumorii; TR = răspuns total.

EXEMPLUL 20: Eficacitatea antitumorală a AADC anti-CD71 într-un model DLBCL PDX pe șoarece

15 Acest exemplu arată eficacitatea anticorpului activat conjugat anti-CD71 conform prezentei invenții în cinci (5) modele tumorale de xenogrefă (PDX) derivată de la pacient pe șoareci, utilizând limfom difuz cu celule B mari (DLBCL) derivat de la pacient HuPrime în SCID femele sau șoareci NOG.

20 În acest studiu exemplificativ, grupuri de 3 șoareci au fost stabilite cu tumori subcutanate (100 - 200 mm³) și li s-a administrat 6 mg/kg de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) sau un control cu vehicul în zilele 0 și 7. Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Figura 14, articolul de testare AADC a atins > 100% TGI în 4 din 5 modele și 72% TFI la 1 model comparativ cu grupul de control cu vehicul. Răspunsurile complete (*de ex.*, absența unei tumori măsurabile la terminarea studiului) la modelele administrate cu AADC au fost observate la 2 din 3 șoareci pentru LY2345, 3 din 3 șoareci pentru modelul LY6933, 2 din 3 șoareci pentru modelul LY6934 și 2 sau 3 șoareci pentru modelul LY2318. Nu s-au observat răspunsuri complete pentru modelul LY3604. Aceste rezultate exemplificative demonstrează că AADC din prezenta

25 dezvoltare a demonstrat eficacitate, până la răspunsul complet în unele modele.

EXEMPLUL 21: Eficacitatea antitumorală a AADC anti-CD71 în modelele PDX de grefă tumorală pe șoareci

Acest exemplu arată eficacitatea anticorpului activat conjugat anti-CD71 al prezentei invenții în nouă (9) modele tumorale de xenogrefă derivată de la pacient (PDX) pe șoarece, utilizând cancer de sân uman derivat de pacient de grefă tumorală (CTG-0437, CTG-0869, CTG-1059), cancer pulmonar nonmicrocelular (NSCLC) (CTG-1082, CTG-0860, CTG-0160, CTG-1012) și carcinom cu celule mici de cap și gât (HNSCC) (CTG-1140, CTG-1082) la șoareci nuzi.

În acest studiu exemplificativ, s-au stabilit grupuri de 3 șoareci pentru fiecare model PDX cu tumori subcutanate (150 - 300 mm³) și li s-a administrat 6 mg/kg de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) sau un controlul cu vehicul în zilele 0 și 7. Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Figurile 15A, 15B și 15C, articolul de testare AADC a atins > 100% inhibare a creșterii tumorale (TGI) în 6 din 9 modele în cele trei indicații de cancer. În aceste 6 modele în care s-a observat > 100% TGI, 6 din 18 șoareci care au primit AADC au obținut un răspuns complet (*adică* absența unei tumori măsurabile la terminarea studiului). În 2 modele suplimentare, 92% și 78% TGI au fost observate pentru HNSCC și respectiv NSCLC. Un model NSCLC nu a răspuns la AADC. Așa cum se arată în aceste rezultate exemplificative, AADC din prezenta dezvăluire a demonstrat eficacitate, inclusiv răspunsuri complete în unele cazuri, la modelul PDX derivat dintr-o varietate de tipuri de cancer uman.

EXEMPLUL 22: Eficacitatea antitumorală a AADC anti-CD71 în modelul PDX pancreatic HuPrime pe șoarece

Acest exemplu arată eficacitatea anticorpului activat conjugat anti-CD71 al prezentei invenții într-un model de xenogrefă (PDX) derivat de la pacient pe șoareci, utilizând cancer pancreatic uman derivat de la pacient HuPrime (PA6237) pe șoareci SCID.

În acest studiu exemplificativ a fost stabilit un grup de 3 șoareci cu tumori subcutanate (100 - 200 mm³) și li s-a administrat 3 sau 6 mg/kg de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) sau un control cu vehicul în zilele 0 și 7. Așa cum se arată în rezultatele exemplificative din Figura 16, articolul de testare AADC a obținut > 100% inhibare a creșterii tumorale (TGI) la 3 și 6 mg/kg. În acest grup de 6 mg/kg, s-au observat 3 din 3 răspunsuri complete până în ziua 59, în timp ce grupul de 3 mg/kg a menținut răspunsul complet până în ziua 31, urmat de creșterea tumorii.

EXEMPLUL 23: Studii de toxicitate pilot non-GLP ale anticorpului activabil conjugat anti-CD71

Acest exemplu arată toxicitățile relative ale anticorpului activabil conjugat anti-CD71 (AADC) anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 al prezentei invenții la niveluri de doză variind între 6 și 18 mg/kg la anticorpii conjugați anti-CD71 (ADC) Ab21.12-vcMMAE E2 la doze variind între 0,6 și 6 mg/kg la maimuțele cinomolgus (1-2 maimuțe pe sex pe grup) după injectarea bolusului IV fie o dată la 3 săptămâni (Q3W), fie o dată la 2 săptămâni (Q2W). Au fost efectuate necropsii terminale la animalele testate în ziua 29 (7 zile după ultima doză). Evaluările din timpul studiului au inclus semnele clinice, greutatea corporală, consumul de alimente, patologia clinică, patologia anatomică, TK și imunogenicitatea. Un rezumat al studiului pilot de toxicitate este prezentat în Tabelul 13.

Tabelul 13: Studiu de toxicitate pilot non-GLP la maimuțele cinomolgus

Articol de testare	Nivel doză (mg/kg)	Raport medicament-proteină	Ziua dozei	Masculin/feminin
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	6	2,7	1 (fără a doua doză)	1/1
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	3	2,7	1, 22	1/1
anti-CD71-TF01-3011-vcMMAE	6	2,9	1, 22	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE	6	2,9	1, 22	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1, 22	1/1
Articol de testare	Nivel doză (mg/kg)	Raport medicament-proteină	Ziua dozei / necropsiei	Masculin/feminin
Control cu vehicul	0	N/A	1, 22/29	2/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22/29	2/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE	12	2,0	1, 22/29	2/1

E2				
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	18	2,0	1/22 (fără a doua doză)	2/1
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2	9	2,0	1, 22/29	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE	8	2,0	1, 15/50	1/1
Ab21.12-vcMMAE E2	6	2,0	1/10 (fără a doua doză)	1/0
Ab21.12-vcMMAE E2	2	2,0	1 (fără a doua doză)	0/1
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	2,0	1, 22/29	1/1

S-a observat toxicitate severă, manifestată prin postură cocoșată, activitate scăzută și creșterea temperaturii corpului în grupurile care au primit o doză mare de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (18 mg/kg), doze frecvente de CD71-TF02.13 -2011-vcMMAE E2 (dozare în zilele 1 și 15) sau conjugat medicament anticorp anti-CD71 parental nemascat (ADC) (Ab21.12-vcMMAE E2) la 6 și 2 mg/kg. Când s-a putut stabili o cauză de deces, s-a stabilit că este o infecție secundară la suprimarea imună legată de medicament.

Rezultatele legate de articolele de testare au fost similare pentru CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 și Ab21.12-vcMMAE E2 și au constat în principal din toxicitate hematologică. Principalele constatări au inclus (1) mortalitatea atribuită infecției secundare care a fost observată la grupurile care au primit o doză unică de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 la 18 mg/kg, CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 în zilele 1 și 15 la 8 mg/kg sau o doză unică de ADC (Ab21.12-vcMMAE E2) la ≥ 2 mg/kg, (2) scăderea greutății corporale la 2 săptămâni după doză, cu recuperare cu 3 săptămâni după doză la ≥ 12 mg/kg de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, (3) scăderea dependentă de doză a masei de celule roșii din sânge și a tuturor populațiilor de leucocite cu recuperare parțială până la completă observată la 3 săptămâni după administrarea dozei, (4) creștere tranzitorie a nivelurilor de trombocite la 2 săptămâni după dozare, (5) creșteri ușoare până la moderate ale fibrinogenului, scăderea albuminei și creșterea globulinei, (6) scăderi ușoare până la moderate ale măduvei osoase, splinei și celularității timice, cu reduceri corespunzătoare ale greutății timusului și splinei. Celularitatea scăzută a fost observată și în mai multe țesuturi limfoide.

În acest studiu exemplificativ, cele mai mari doze tolerate de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 și Ab21.12-vcMMAE E2 (ADC corespunzător) în aceste studii au fost 12 mg/kg și, respectiv, 0,6 mg/kg, administrate o singură dată la fiecare 3 săptămâni pentru 2 doze.

EXEMPLUL 24: Studii de toxicitate GLP ale anticorpului activabil conjugat anti-CD71

Acest exemplu arată un studiu de toxicitate al dozelor repetate GLP la maimuțele cinomolgus ale anticorpului activabil conjugat anti-CD71 (AADC) anti-CD71 -TF02.13-2011-vcMMAE E2 al prezentei invenții la niveluri de dozare de 0, 2, 6 sau 12 mg/kg în zilele 1 și 22 prin injecție bolus IV. Grupurile de dozare sunt prezentate în Tabelul 14.

Tabelul 14: Studiul toxicității GLP la maimuțele cinomolgus

Articol de testare	Nivel doză (mg/kg)	Raport medicament-proteină	Ziua dozei	Masculin/feminin
Vehicul	0	N/A	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2	2,0	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1 (fără a doua doză)	6/6

În acest studiu exemplificativ, fiecărui grup de 6 maimuțe masculi și 6 femele i s-a administrat anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 sau vehicul (bolus IV al dozei indicate în zilele 1 și 22) așa cum se arată în Tabelul 14. Necropsiile terminale au fost efectuate în ziua 29, iar

necropsiile de recuperare au fost efectuate în ziua 64. Evaluările toxicității au inclus mortalitatea, semnele clinice, modificările greutății corporale, consumul de alimente, patologia clinică, patologia anatomică, examinările oftalmologice și evaluările funcției sistemului cardiovascular, respirator și nervos central. Studiul a inclus analiza TK și o evaluare a formării ADA. S-au făcut următoarele observații exemplificative. Un rezumat al rezultatelor selectate din studiul de toxicitate GLP al anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2, având un DAR de ~ 2, comparativ cu studiile corespunzătoare non-GLP ale unui conjugat medicament anticorp anti-CD71 nemascat (ADC) Ab21.12-vcMMAE E2 (având de asemenea un DAR de ~ 2), este rezumat în Tabelul 15.

Tabelul 15: Rezultatele studiului de toxicitate GLP la maimuțele cinomolgus

Articol de testare (q3wx2)	Nivel doză (mg/kg)	Pierdere în greutatea corporală	Numărul mediu de neutrofile ± SD	Tolerabilitate
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	0%	61 ± 44	Netolerat
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	0%	277 ± 132	Tolerat
Ab21.12-vcMMAE E2	2	6%	70	Netolerat
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	4%	280 ± 42	Tolerat

Nu au existat efecte legate de AADC asupra greutății corporale, consumului de alimente, ritmului respirator, electrocardiografiei, coagulării și parametrilor de analiză a urinei și nici nu au existat efecte neurologice, efecte oculare sau descoperiri patologice brute.

Mortalitatea legată de AADC a fost observată la doze de 12 mg/kg; 1 femelă a fost găsită moartă în ziua 10 și 2 femele au fost eutanasiate în ziua 11 într-o stare clinică în declin. Patologia clinică legată de AADC și descoperirile microscopice la aceste animale au fost similare cu cele prezente la animalele care au supraviețuit necropsiei programate (ziua 29), cu excepția dovezilor microscopice ale infecției bacteriene, care a fost considerată a fi o consecință a imunosupresiei legate de AADC.

Așa cum se arată în Tabelul 15, anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a demonstrat tolerabilitate superioară față de Ab21.12-vcMMAE E2 fără pierderi detectabile de greutate corporală. Așa cum se arată, Ab21.12-vcMMAE E2 nu a avut tolerabilitate în decurs de 8 zile de la o singură doză la 2 mpk, în timp ce anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a oferit o protecție ≥ 10 ori față de cea nemascată, Ab21.12-vcMMAE E2.

Semnele clinice legate de AADC la animalele dozate cu 12 mg/kg care au supraviețuit până la necropsia programată au fost leziuni/răni ale pielii, consistente cu infecțiile care s-au corelat cu scăderea populațiilor de leucocite și semne ale răspunsului de fază acută (scăderea albuminei și colesterolului și creșterea globulinelor, bilirubinei totale și trigliceridelor).

Modificările parametrilor hematologici la ≥ 6 mg/kg după prima doză au constatat în scăderea masei de celule roșii din sânge, a reticulocitelor și a tuturor subseturilor de leucocite, împreună cu creșterea trombocitelor. Modificările hematologice la 2 mg/kg au fost limitate la trombocite ușor crescute după prima și a doua doză.

Modificarea parametrilor clinici chimici legați de AADC după prima doză a fost cea mai notabilă la 12 mg/kg și a constatat într-un răspuns de fază acută (scăderi ale albuminei și colesterolului și creșteri ale globulinelor, trigliceridelor [numai la femele], bilirubinei totale) și creșterea azotului ureic (numai pentru indivizi) și creatininei și scăderea fosforului. Schimbările clinice chimice la 6 mg/kg au fost observate numai după prima doză și s-au limitat la creșterea minimă a bilirubinei și la creșterea globulinelor la femele individuale.

Descoperirile chimice hematologice și clinice legate de AADC s-au recuperat până la sfârșitul fazei de recuperare.

Descoperirile microscopice legate de AADC la eutanasierea terminală au fost prezente în timus, glanda suprarenală și măduva osoasă la ≥ 6 mg/kg/doză. Descoperirile la situsul injectării au fost observate la toate grupurile și sunt interpretate ca fiind legate de procedura de administrare și nu specifice AADC. Greutatea timică a fost scăzută la maimuțele masculi dozate cu 12 mg/kg și la maimuțele femele dozate cu 6 mg/kg, care s-au corelat histologic cu scăderea celularității, în special a cortexului timic. Greutatea glandelor suprarenale a fost crescută la maimuțele masculi dozate cu 12 mg/kg și la maimuțele femele dozate cu 6 mg/kg, iar corelația histologică a fost hipertrofia suprarenală. Celularitatea scăzută a fost prezentă în măduva osoasă, în special în femur, la maimuțele masculi dozate cu ≥ 6 mg/kg. După un interval de 6 săptămâni fără doză,

celularitatea scăzută a timusului și hipertrofia adrenocorticală nu au fost prezente, consistent cu recuperarea completă a acestor modificări. Celularitatea crescută a măduvei osoase a persistat, dar la o severitate scăzută, consistent cu recuperarea parțială.

EXEMPLUL 25: Conjugarea MMAE la anticorpul activabil CD71 și metode de scădere a DAR al anticorpului activabil conjugat CD71 rezultat la aproximativ DAR 3

Acest exemplu descrie metodele care au fost utilizate pentru a conjuga vc-MMAE la anticorpul activabil anti-CD71, anti-CD71 TF02.13-2011, pentru a crea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE care conține o încărcătură de medicament de 2 molecule MMAE pentru fiecare moleculă anti-CD71 TF02.13-2011, în plus față de metodele utilizate pentru a îmbogăți DAR la aproximativ 3.

Metoda conjugării

Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE îmbogățit cu E2 - La o soluție de anti-CD71 TF02.13-2011 (13,95 mg/ml), 39 g soluție, 544 mg, 3,5 nmol) s-au adăugat 0,5 MEDTA (0,39 ml) și TCEP (0,77 ml, 10 mM în WFI, 7,7 nmol, 2,2 echivalenți) la 2-8°C peste noapte. Anticorpul redus a fost apoi diluat cu DMSO (2,29 mL) tratat cu vcMMAE în DMSO (1,89 mL de 9,49 mM vcMMAE în DMSO, 17,9 nmol, 5,1 echivalenți) la temperatura camerei timp de 1 oră. Anticorpul conjugat a fost tratat cu N-acetil cisteină (0,29 ml de 100 mM în WFI, 29 nmol, 8,2 echivalenți) pentru a stinge excesul de vcMMAE. Soluția stinsă a fost analizată prin HIC (cromatografie de interacțiune hidrofobă) pentru specii DAR> E4 (specii DAR superioare, 20,9% în preparatul de mai sus).

Metoda de îmbogățire a DAR inferior

Reacția de conjugare a fost suspendată cu rășină HIC, ca cea disponibilă comercial de la Tosoh Biosciences (Toyopearl alchil ca exemplu) în porțiuni la temperatura camerei timp de 2 ore pentru a reduce speciile DAR mai mari la un nivel vizat (în general <2%). Soluția tratată a fost filtrată și rășina a fost spălată succesiv cu PBSE (125 mM fosfat de potasiu, 150 mM NaCl, 6,3 mM EDTA, pH 7,2, 22 g) urmată de PBS (5 mM fosfat de potasiu, 200 mM NaCl, pH 7, 35 g). Filtratul combinat și clătirile au fost concentrate și tamponul a fost schimbat folosind un filtru centrifugal tăiat cu masa moleculară de 30 kD apoi diluate cu componente de formulare pentru depozitare.

Produsul rezultat a conținut 228 mg (A280 6,5 mg/ml) și s-a dovedit a avea un DAR de aproximativ 2,9 măsurat dintr-o coloană HIC disponibilă comercial și a constituit următoarele caracteristici și specii DAR: SEC 98,7% monomer, 0,2% masă moleculară mai mare, 1,1% masă moleculară mai mică, endotoxină <0,06 EU/mg, specii DAR mai mari decât E4 au fost mai mici de 2% din arie; DAR E0 a fost de aproximativ 6,2%, DAR E2 a fost de aproximativ 40,7% din arie și DAR E4 a fost de aproximativ 46,8% din arie).

În exemplele descrise aici, acest produs DAR îmbogățit este denumit „anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE (având un DAR mediu de ~ 3)”

EXEMPLUL 26: Conjugarea MMAE cu anticorpul activabil CD71 și metode de îmbogățire a DAR a anticorpului activabil conjugat CD71 rezultat la aproximativ DAR 2 („E2”)

Acest exemplu descrie metodele care au fost utilizate pentru a conjuga vc-MMAE la anticorpul activabil anti-CD71, anti-CD71 TF02.13-2011, pentru a crea anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE care conține o încărcătură de medicament de 2 molecule MMAE pentru fiecare moleculă anti-CD71 TF02.13-2011, în plus față de metodele utilizate pentru a îmbogăți DAR la aproximativ 2.

Metoda conjugării

Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 - O soluție de anti-CD71 TF02.13-2011 (20,3 mg/mL) s-a diluat cu 1457 g PBSE (125 mM fosfat de potasiu, 150 mM NaCl, 6,3 mM EDTA, pH 7,7) și s-a răcit la 4°C. La soluția răcită, s-a adăugat TCEP (10 mM în WFI, 30,2 ml, 0,30 mmol, 1,5 echivalenți) și s-a menținut la 4°C timp de 15 ore. La anticorpul redus, s-a adăugat o soluție de vc-MMAE (1,056 g, 0,80 mmol, 4 echivalenți) în DMSO (300 g) cu răcire urmată de o clătire DMSO (65 g) după care soluția a fost lăsată să se încălzească la temperatura camerei. După 3,5 ore, s-a adăugat N-acetil cisteină (0,262 g, 1,60 mmol, 8 echivalenți) pentru a stinge excesul de vc-MMAE și amestecul de reacție a fost depozitat la 2-8°C până la purificare.

Metoda de îmbogățire a DAR inferior

Produsul a fost purificat în porțiuni pe coloane de purificare HIC disponibile comercial, precum cele disponibile comercial de la GE Life Sciences (alchil Sefaroză) folosind un gradient de tampon de sulfat de amoniu/fosfat la pH 7,1 cu monitorizare la 280 nm prin UV. Grupului de produse DAR 2 colectat (aproximativ 9,5 g, randament 30%) i-a fost schimbat tamponul cu tampon la pH 6,0 prin TFF folosind membrane Pellicon 3 Ultracel 30 kD apoi a fost diluat cu componente de formulare pentru depozitare.

Produsul rezultat (A280 6,4 mg/ml) s-a dovedit a avea un DAR de aproximativ 2 măsurat dintr-o coloană HIC disponibilă comercial și a constituit următoarele caracteristici și specii DAR: SEC 99,6% monomer, 0,2% HMW, 0,2% LMW, Endotoxina <0,06 EU/mg și DAR E2 a fost de aproximativ 99,0% din arie, cu variabilitate de la o rulare la alta între 94 și 99% DAR E2.

În exemplele descrise aici, acest produs DAR 2 îmbogățit („E2”) este denumit „anti-CD71 TF02.13-2011vcMMAE E2”.

EXEMPLUL 27: Evaluarea caracteristicilor biofizice ale E2 versus speciile DAR superioare la modelele preclinice murine

Produsul nepurificat HIC, conjugat obținut din metoda descrisă în Exemplul 25 a fost rulat pe o coloană HIC folosind tamponi și proceduri standard, așa cum sunt prezentate aici. Așa cum se arată în Figura 18A, a fost identificat un număr de specii cu o încărcare de medicament între 0 și 8.

Produsul E2 purificat obținut din Exemplul 26 a fost supus aceleiași cromatografii HIC. Așa cum se arată în Figura 18B, a fost observată doar o singură specie care conține o încărcare de medicament de 2.

Produsele nepurificate și E2 au fost radiomarcate și injectate la șoareci pentru a evalua eliminarea generală și toxicitatea fiecărui produs. Așa cum se arată în Figura 18C, produsul E2 purificat s-a dovedit a avea o eliminare semnificativ mai scăzută în raport cu produsul nepurificat, cu încărcare ridicată de medicament.

SECVENȚA DE LISTARE

<110> AbbVie, Inc.
Singh, Shweta
Richardson, Jennifer Hope
Serwer, Laura Patterson
Terrett, Jonathan Alexander
Morgan-Lappe, Susan E.
Henriques, Tracy
Ralston, Sherry L.
Leanna, Marvin Robert
Badagnani, Ilaria
Bose, Sahana
<120> Conjugată medicament anticorp activabili anti-CD71 și metode de utilizare a acestora
<130> CYTM-056/001US 322001-2522
<150> US 62/572,467
<151> 2017-10-14
<160> 208
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 118
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Sintetic
<400> 1
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Thr Val Leu
Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
Thr Phe Thr 20 25
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
Gly Leu 30 35 40
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly
Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55
60 60

	Lys 65	Gly Ala	Lys Ser	Ala Thr	Lys Ala	Leu Tyr 70	Thr	Ala	Val	Thr	Ser
5	Met	Asp Ala	Leu Val	Ser Tyr	80 Ser Tyr 85	Leu Cys	Thr	Asn	Glu	Asp 90	Ser
10	Thr	Arg Trp	Glu Gly	95 Asn Gln 100	Trp Gly	Asp Thr	Pro	Gly	Phe 105	Ala	Phe
15	Leu	Ile	Thr 115	Val	Ser	Ala					
20	<210> 2 <211> 108 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic <400> 2										
25	Asp 1	Ile Ala	Val Ser	Met Thr Pro 5	Gln Gly	Thr	Pro	Ala	Ile 10	Met	Ser
30	Glu	Lys Ser	Val Val	Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala 25	Ser	Ser
35	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Thr	Ser	Pro
40	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Val
45	Gly 65	Ser Arg	Gly Met	Thr Glu	Ser Ala	Tyr Glu 70	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser 75
50	Asp	Ala Asn	Ala Tyr	Thr Pro	80 Tyr Tyr 85	Tyr Thr	Cys	Gln	Gln	Arg 90	Arg
55	Phe	Gly Ala	Gly	95 Gly 100	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile 105	Lys	Arg
60	<210> 3 <211> 118 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic <400> 3										
	Gln 1	Val Lys	Gln Lys	Leu Pro	Val Gly 5	Gln Ala	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Val

	Ser	Val	Lys	Val							
	20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser					
	25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr					
5	30	Ser	Tyr								
	Trp	Met	His								
	35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala					
	40	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu					
	45	Glu	Trp	Met							
	Gly	Ala									
10	50	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn					
	55	Ser	Glu	Thr	Gly	Tyr					
	60	Ala	Gln	Lys	Phe						
	Gln										
	65	Gly	Arg	Val	Thr	Met					
15	70	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser					
	75	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr					
	80										
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser						
	85	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp					
20	90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr					
	95	Cys									
	Ala	Arg	Glu	Asn							
	100	Trp	Asp	Pro	Gly	Phe					
	105	Ala	Phe	Trp	Gly	Gln					
25	110	Gly	Thr								
	Leu	Val	Thr								
	115	Val	Ser	Ser							
	<210> 4										
30	<211> 118										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
35	<400> 4										
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val
		Lys	Lys	Pro	Gly	Ala					
	1				5					10	
				15							
40	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
		Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr					
				20					25		
			30								
	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln
45		Gly	Leu	Glu	Trp	Ile					
			35					40			
		45									
	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Glu	Thr	Gly
		Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe					
50		50					55				
		60									
	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
		Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr					
	65					70					75
55					80						
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr
		Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys					
					85					90	
				95							
60	Thr	Arg	Glu	Asn	Trp	Asp	Pro	Gly	Phe	Ala	Phe
		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr					

				100					105		
	Leu	Val	110 Thr	Val	Ser	Ser					
5			115								
	<210> 5										
	<211> 118										
	<212> PRT										
10	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 5										
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val
15		Lys	Lys	Pro	Gly	Ala					
	1				5					10	
	Ser	Val	Lys	15 Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
20		Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr					
				20					25		
	Trp	Met	30 His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln
		Gly	Leu	Glu	Trp	Ile					
			35					40			
25	Gly	45 Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Glu	Thr	Gly
		Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	55				
		50									
30	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
		Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr					
	65					70					75
	Met	Glu	Leu	Ser	80	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr
35		Ala	Val	Tyr	Ser	Cys					
					85					90	
	Thr	Arg	Glu	95 Asn	Trp	Asp	Pro	Gly	Phe	Ala	Phe
40		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr					
				100					105		
	Leu	Ile	110 Thr	Val	Ser	Ser					
			115								
45	<210> 6										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
50	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 6										
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
		Ser	Ala	Ser	Val	Gly					
55	1				5					10	
	Asp	Arg	Val	15 Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
		Ser	Val	Tyr	Tyr	Met					
				20					25		
60			30								

72

5	Tyr	Trp Lys	Tyr Leu 35	Gln Leu	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
	Ser	Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
10	Gly 65	Ser Ser	Gly Leu	Thr Gln	Asp Pro	Phe Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
15	Asp	Phe Asn	Ala Tyr	Thr Pro	80 Tyr Tyr 85	Tyr Thr	Cys	Gln	Gln	Arg 90	Arg
20	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
25	<210> 7										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
30	<220>										
	<223> Sintetic										
35	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
40	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
45	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
50	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
55		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
60	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
	100										
65	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
70	<220>										
	<223> Sintetic										
75	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
80	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
85	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
90	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
95		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
100	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
105	100										
110	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
115	<220>										
	<223> Sintetic										
120	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
125	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
130	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
135	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
140		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
145	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
150	100										
155	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
160	<220>										
	<223> Sintetic										
165	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
170	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
175	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
180	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
185		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
190	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
195	100										
200	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
205	<220>										
	<223> Sintetic										
210	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
215	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
220	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
225	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
230		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
235	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
240	100										
245	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
250	<220>										
	<223> Sintetic										
255	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
260	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
265	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
270	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
275		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
280	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
285	100										
290	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
295	<220>										
	<223> Sintetic										
300	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
305	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
310	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
315	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
320		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
325	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
330	100										
335	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
340	<220>										
	<223> Sintetic										
345	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
350	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
355	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
360	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
365		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
370	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
375	100										
380	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
385	<220>										
	<223> Sintetic										
390	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
395	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
400	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
405	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
410		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
415	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
420	100										
425	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
430	<220>										
	<223> Sintetic										
435	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
440	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
445	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
450	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
455		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
460	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
465	100										
470	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
475	<220>										
	<223> Sintetic										
480	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
485	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
490	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
495	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
500		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
505	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
510	100										
515	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
520	<220>										
	<223> Sintetic										
525	<400> 7										
	Asp 1	Ile Ser	Gln Ala	Met Ser	Thr Val 5	Gln Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
530	Asp	Arg Ser	Val Val	15 Thr Tyr 20	Ile Tyr	Thr Met	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
	Tyr	Trp Lys	30 Phe Leu 35	Gln Trp	Gln Ile	Lys Tyr	Pro	Gly 40	Lys	Ala	Pro
535	Ser	45 Thr Arg 50 60	Ser Phe	Asn Ser	Leu Gly	Ala Ser	Ser 55	Gly	Val	Pro	Ser
540	Gly 65	Ser Ser	Gly Met	Thr Gln	Asp Pro	Tyr Glu 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser 75
	Asp	Phe	Ala	Thr	80 Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	
545		Arg	Asn	Tyr	Pro 85	Tyr	Thr			90	
550	Phe	Gly	Gln	95 Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
555	100										
560	<210> 8										
	<211> 106										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
565	<220>										

73

[illegible]

5	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 12											
	Ser 1	Ala	Ser	Ser	Ser 5	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr 10		
	<210> 13											
10	<211> 11											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
15	<400> 13											
	Cys 1	Arg	Ala	Ser	Ser 5	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met 10	Tyr	
	<210> 14											
	<211> 7											
	<212> PRT											
20	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 14											
	Ser 1	Thr	Ser	Asn	Leu 5	Ala	Ser					
25	<210> 15											
	<211> 9											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
30	<223> Sintetic											
	<400> 15											
	Gln	Gln	Arg 1	Arg	Asn	Tyr	Pro 5	Tyr	Thr			
	<210> 16											
	<211> 15											
35	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 16											
40	Gln	Phe	Cys	Pro	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	
	1	Asp	Cys	Asp	Ile 5							
	15											
	<210> 17											
	<211> 15											
45	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 17											
50	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Phe	Ala	Leu	Asp	
	1	Cys	Arg	Ser	Tyr 5							
	15											
	<210> 18											
	<211> 15											
55	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 18											
60												

	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp
	1	Cys	Arg	Ser	Tyr					10	
				15	5						
5	<210> 19										
	<211> 213										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
10	<223> Sintetic										
	<400> 19										
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
	1	Ser	Ala	Ser	Val	Gly				10	
15				15	5						
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser
		Ser	Val	Tyr	Tyr	Met			25		
			30								
20	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
		Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr		40			
		45									
25	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
		Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	55				
		50									
	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
		Ser	Met	Gln	Pro	Glu					
30	65					70					75
					80						
	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Arg
		Asn	Tyr	Pro	Tyr	Thr				90	
					85						
35				95							
	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
		Thr	Val	Ala	Ala	Pro				105	
				100							
			110								
40	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
		Leu	Lys	Ser	Gly	Thr					
			115							120	
		125									
45	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
		Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	135				
		130									
	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
		Gly	Asn	Ser	Gln	Glu					
50	145					150					155
					160						
	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
		Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser					
					165					170	
55				175							
	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
		His	Lys	Val	Tyr	Ala					
				180						185	
			190								
60	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		Val	Thr	Lys	Ser	Phe					

			195					200			
	Asn	205 Arg	Gly	Glu	Cys						
5		210									
		<210> 20									
		<211> 448									
		<212> PRT									
10		<213> Secvență artificială									
		<220>									
		<223> Sintetic									
		<400> 20									
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val
15		Lys	Lys	Pro	Gly	Ala				10	
	1			15	5						
	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
		Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr					
20											
	20	25	30								
	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln
		Gly	Leu	Glu	Trp	Ile					
25			35					40			
	Gly	45	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Glu	Thr	Gly
		Ala	Ala	Gln	Lys	Phe					
		Tyr					55				
30		50									
	Gln	60	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
		Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr					
	65	Thr				70					75
					80						
35	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr
		Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys					
					85					90	
				95							
	Thr	Arg	Glu	Asn	Trp	Asp	Pro	Gly	Phe	Ala	Phe
		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr					
40				100					105		
	Leu	Ile	110	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		Pro	Thr	Val	Phe	Pro					
45			115					120			
	Leu	125	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		Ala	Ala	Ala	Leu	Gly					
		Thr					135				
50		130									
	Cys	140	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
		Thr	Val	Ser	Trp	Asn					
	145					150					155
					160						
55	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
		Pro	Ala	Val	Leu	Gln					
					165					170	
				175							
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
60		Thr	Val	Pro	Ser	Ser					

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

77

				180					185		
			190	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	Ser	Leu	Gly	Lys	Pro	Ser					
5		Asn	His					200			
			195								
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
		Ser	Cys	Asp	Lys	Thr					
10		205					215				
		210									
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
		Leu	Gly	Gly	Pro	Ser					
	225					230					235
					240						
15	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
		Leu	Met	Ile	Ser	Arg					
					245					250	
				255							
20	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		Ser	His	Glu	Asp	Pro					
				260							
			270						265		
25	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		Glu	Val	His	Asn	Ala					
			275					280			
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
		Thr	Tyr	Arg	Val	Val					
30		285					295				
		290									
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
		Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr					
	305					310					315
35	Lys	Cys	Lys	Val	320	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
		Pro	Ile	Glu	Ser	Thr					
					325					330	
				335							
40	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		Gln	Val	Tyr	Thr	Leu					
				340					345		
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
45		Val	Ser	Leu	Thr	Cys					
			355					360			
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
		Val	Glu	Trp	Glu	Ser					
50		365					375				
		370									
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
		Pro	Pro	Val	Leu	Asp					
	385					390					395
55	Ser	Asp	Gly	Ser	400	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
		Thr	Val	Asp	Phe	Ser					
					405					410	
				415							
60	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
		Val	Met	His	Glu	Ala					

	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 22											
5	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Phe	Cys	Pro	
	1	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Leu				10		
10	Ile	Gly	Asp	Cys	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	
		Gly	Gly	Ser	Ile	Ser			25			
15	Ser	Gly	30	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	
		Gly	Leu	Gly	Ser	Asp		40				
20	Ile	45	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
		Gln	Ser	Val	Gly	Asp	55					
25	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	
	65	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr					75	
30	Trp	Phe	Gln	Gln	80	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
		Leu	Trp	Ile	Lys	Ser				90		
35	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	
		Phe	Ser	Gly	Ser	Gly			105			
40	Ser	Gly	110	Thr	Asp	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
		Met	Thr	Gln	Pro	Asp		120				
45	Phe	125	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Arg	Asn	
		Ala	Pro	Tyr	Thr	Phe	135					
50	Gly	140	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	
		Gln	Ala	Ala	Pro	Ser					155	
55	Val	145			160	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	
		Phe	Ile	Phe	Pro	Ala				170		
60	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	
		Arg	Glu	Ala	Lys	Val			185			
65	Gln	Trp	190	Lys	Val	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	
		Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	200					
70	Val	205	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	
		Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	215					

	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
	225	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys					235
					240	230					
5	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
		Thr	Lys	Ser	Phe	Asn				250	
				255	245						
10	Arg	Gly	Glu	Cys							
				260							
	<210>	23									
	<211>	260									
15	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	23									
20	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Asn	Leu	Cys	Thr
		Glu	His	Ser	Ala	Ala					
	1	5	10	15							
25	Leu	Asp	Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
		Gly	Gly	Ser	Ile	Ser			25		
			30								
30	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His
		Gly	Gly	Gly	Ser	Asp		40			
		45									
	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
		Ala	Ser	Val	Gly	Asp					
35		50					55				
	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser
		Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr					
40	65					70					75
					80						
	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
		Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser				90	
				95							
45	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
		Phe	Ser	Gly	Ser	Gly			105		
			110								
	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
50		Met	Gln	Pro	Glu	Asp		120			
			115								
		125									
	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Arg	Asn
		Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe					
55		130					135				
		140									
	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
		Val	Ala	Ala	Pro	Ser					
60	145				160	150					155

[illegible]

	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	34									
5	Gly	Ser Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	1				5					10	
	<210>	35									
	<211>	16									
10	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	35									
15	Gly	Ser Ser	Ser Gly	Gly Gly	Gly Gly	Ser Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	1				5					10	
				15							
	<210>	36									
20	<211>	10									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
25	<400>	36									
	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	
	1				5					10	
	<210>	37									
	<211>	11									
30	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	37									
35	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser
	1				5					10	
	<210>	38									
	<211>	4									
40	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	38									
45	Gly	Gly	Gly	Ser							
	1										
	<210>	39									
	<211>	5									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
50	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	39									
	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr						
	1				5						
55	<210>	40									
	<211>	4									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
60	<223>	Sintetic									
	<400>	40									

	Gly	Ser	Ser	Gly				
1	<210>	41						
	<211>	8						
5	<212>	PRT						
	<213>	Secvență artificială						
	<220>							
	<223>	Sintetic						
	<400>	41						
10	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Trp	Val
	1				5			
	<210>	42						
	<211>	8						
	<212>	PRT						
15	<213>	Secvență artificială						
	<220>							
	<223>	Sintetic						
	<400>	42						
20	Ser	Ala	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Trp
	1				5			
	<210>	43						
	<211>	8						
	<212>	PRT						
	<213>	Secvență artificială						
25	<220>							
	<223>	Sintetic						
	<400>	43						
	Thr	Ala	Arg	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys
	1				5			
30	<210>	44						
	<211>	8						
	<212>	PRT						
	<213>	Secvență artificială						
	<220>							
35	<223>	Sintetic						
	<400>	44						
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His
	1				5			
	<210>	45						
40	<211>	8						
	<212>	PRT						
	<213>	Secvență artificială						
	<220>							
	<223>	Sintetic						
45	<400>	45						
	Gly	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Arg	Asn
	1				5			
	<210>	46						
	<211>	8						
50	<212>	PRT						
	<213>	Secvență artificială						
	<220>							
	<223>	Sintetic						
	<400>	46						
55	His	Thr	Gly	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu
	1				5			
	<210>	47						
	<211>	8						
	<212>	PRT						
60	<213>	Secvență artificială						
	<220>							

<223> Sintetic
 <400> 47
 Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly Gly
 1 5
 5 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> Sintetic
 <400> 48
 Ala Ala Arg Gly Pro Ala Ile His
 1 5
 15 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <223> Sintetic
 <400> 49
 Arg Gly Pro Ala Phe Asn Pro Met
 1 5
 25 <210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <223> Sintetic
 <400> 50
 Ser Ser Arg Gly Pro Ala Tyr Leu
 1 5
 35 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <223> Sintetic
 <400> 51
 Arg Gly Pro Ala Thr Pro Ile Met
 1 5
 45 <210> 52
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 50 <223> Sintetic
 <400> 52
 Arg Gly Pro Ala
 1
 55 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 60 <223> Sintetic
 <400> 53
 Gly Gly Gln Pro Ser Gly Met Trp Gly Trp
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 54
 5 Phe Pro Arg Pro Leu Gly Ile Thr Gly Leu
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 55
 Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro
 15 1 5 10
 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 56
 Ser Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly
 1 5
 25 <210> 57
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <223> Sintetic
 <400> 57
 Ser Ala Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 1 5
 35 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 40 <400> 58
 Leu Ala Pro Leu Gly Leu Gln Arg Arg
 1 5
 <210> 59
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 59
 50 Ser Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg
 1 5
 <210> 60
 <211> 4
 <212> PRT
 55 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 60
 Pro Leu Gly Leu
 60 1
 <210> 61

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <223> Sintetic
 <400> 61
 Ile Ser Ser Gly Leu Ser Ser
 1 5
 <210> 62
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 15 <400> 62
 Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala
 1 5
 <210> 63
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 63
 25 Ala Gln Asn Leu Leu Gly Met Val
 1 5
 <210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 64
 Ser Thr Phe Pro Phe Gly Met Phe
 35 1 5
 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 40 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 65
 Pro Val Gly Tyr Thr Ser Ser Leu
 1 5
 45 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 50 <223> Sintetic
 <400> 66
 Asp Trp Leu Tyr Trp Pro Gly Ile
 1 5
 <210> 67
 55 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 60 <400> 67
 Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser

1	5							
	<210> 68							
	<211> 8							
	<212> PRT							
5	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
	<400> 68							
	Leu	Lys	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Ala
10	1				5			
	<210> 69							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
15	<220>							
	<223> Sintetic							
	<400> 69							
	Gly	Pro	Ser	His	Leu	Val	Leu	Thr
	1				5			
20	<210> 70							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
25	<223> Sintetic							
	<400> 70							
	Leu	Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Trp
	1				5			
	<210> 71							
30	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
35	<400> 71							
	Met	Gly	Leu	Phe	Ser	Glu	Ala	Gly
	1				5			
	<210> 72							
	<211> 8							
40	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
	<400> 72							
45	Ser	Pro	Leu	Pro	Leu	Arg	Val	Pro
	1				5			
	<210> 73							
	<211> 8							
	<212> PRT							
50	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
	<400> 73							
	Arg	Met	His	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly
55	1				5			
	<210> 74							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
60	<220>							
	<223> Sintetic							

	<400>	74										
	Leu	Ala	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu	Leu				
	1				5							
5	<210>	75										
	<211>	8										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
10	<400>	75										
	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro				
	1				5							
	<210>	76										
	<211>	8										
15	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
	<400>	76										
20	Leu	Leu	Ala	Pro	Ser	His	Arg	Ala				
	1				5							
	<210>	77										
	<211>	8										
	<212>	PRT										
25	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
	<400>	77										
30	Pro	Ala	Gly	Leu	Trp	Leu	Asp	Pro				
	1				5							
	<210>	78										
	<211>	7										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
35	<220>											
	<223>	Sintetic										
	<400>	78										
	Gly	Pro	Arg	Ser	Phe	Gly	Leu					
	1				5							
40	<210>	79										
	<211>	6										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
45	<223>	Sintetic										
	<400>	79										
	Gly	Pro	Arg	Ser	Phe	Gly						
	1				5							
	<210>	80										
50	<211>	12										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
55	<400>	80										
	Asn	Thr	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Glu	Asn	His	Ser	
		Gly										
	1				5					10		
	<210>	81										
60	<211>	12										
	<212>	PRT										

	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 81										
5	Asn	Thr Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Gly	Asn	His	Gly
	1				5					10	
	<210> 82										
	<211> 12										
10	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 82										
15	Thr	Ser Gly	Thr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Pro	Arg
	1				5					10	
	<210> 83										
	<211> 8										
20	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 83										
25	Thr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Pro			
	1				5						
	<210> 84										
	<211> 8										
30	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 84										
35	Val	Ala	Gly	Arg	Ser	Met	Arg	Pro			
	1				5						
	<210> 85										
	<211> 8										
40	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 85										
45	Val	Val	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Ser			
	1				5						
	<210> 86										
	<211> 8										
50	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 86										
55	Ile	Leu	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Phe			
	1				5						
	<210> 87										
	<211> 8										
60	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 87										
	Met	Val	Leu	Gly	Arg	Ser	Leu	Leu			

1												5
	<210> 88											
	<211> 8											
	<212> PRT											
5	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 88											
	Gln	Gly	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ile				
10	1				5							
	<210> 89											
	<211> 8											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
15	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 89											
	Ser	Pro	Arg	Ser	Ile	Met	Leu	Ala				
20	1				5							
	<210> 90											
	<211> 8											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
25	<223> Sintetic											
	<400> 90											
	Ser	Met	Leu	Arg	Ser	Met	Pro	Leu				
30	1				5							
	<210> 91											
	<211> 13											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
35	<400> 91											
	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	
		Asn	His									
	1				5					10		
40	<210> 92											
	<211> 22											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
45	<223> Sintetic											
	<400> 92											
	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	
		Gly	Gly	Ser	Leu	Ser						
	1				5					10		
50	Gly	Arg	Ser	15								
	20	Asn	His	Asp								
55	<210> 93											
	<211> 22											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
60	<400> 93											

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

92

	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Thr
	1	Ser	Thr	Ser	Gly	Arg				10	
5	Ser	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly					
				20							
10	<210> 94 <211> 22 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic										
15	<400> 94										
	Thr	Ser	Thr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Pro	Arg
	1	Gly	Gly	Gly	Ala	Val				10	
20	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro					
				20							
25	<210> 95 <211> 24 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic										
30	<400> 95										
	Val	His	Met	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly
	1	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser				10	
35	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly			
				20							
40	<210> 96 <211> 24 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic										
45	<400> 96										
	Thr	Ser	Thr	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Pro	Arg
	1	Gly	Gly	Gly	Val	His				10	
50	Met	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro			
				20							
55	<210> 97 <211> 18 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic										
60	<400> 97										

	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu
	1	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp				10	
				15	5						
5	Asn	His									
	<210>	98									
	<211>	18									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
10	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	98									
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Ala
		Val	Gly	Leu	Leu	Ala					
15	1			15	5					10	
	Pro	Pro									
20	<210>	99									
	<211>	20									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
25	<223>	Sintetic									
	<400>	99									
	Val	His	Met	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly
		Gly	Leu	Ser	Gly	Arg				10	
	1				5						
30	Ser	Asp	Asn	His							
				20							
35	<210>	100									
	<211>	20									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
40	<223>	Sintetic									
	<400>	100									
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Val
		His	Met	Pro	Leu	Gly				10	
	1				5						
45	Phe	Leu	Gly	15							
				Pro							
				20							
50	<210>	101									
	<211>	22									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
55	<223>	Sintetic									
	<400>	101									
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Ser
		Gly	Gly	Ser	Ile	Ser				10	
	1				5						
60				15							

	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser					
				20							
5	<210> 102										
	<211> 22										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
10	<223> Sintetic										
	<400> 102										
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Gly	Asn	His	Gly	Gly	Ser
	1	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser				10	
15				15	5						
	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser					
				20							
20	<210> 103										
	<211> 22										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
25	<223> Sintetic										
	<400> 103										
	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser
	1	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser				10	
30				15	5						
	Gly	Arg	Ser	Gly	Asn	His					
				20							
35	<210> 104										
	<211> 22										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
40	<223> Sintetic										
	<400> 104										
	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Ser
	1	Gly	Gly	Ser	Gln	Asn				10	
45				15	5						
	Gln	Ala	Leu	Arg	Met	Ala					
				20							
50	<210> 105										
	<211> 22										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
55	<223> Sintetic										
	<400> 105										
	Gln	Asn	Gln	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Gly	Gly	Ser
	1	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser				10	
60				15	5						

[illegible]

	Pro 1	Arg	Phe	Lys	Ile 5	Ile	Gly	Gly			
	<210> 111										
	<211> 8										
5	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 111										
10	Pro 1	Arg	Phe	Arg	Ile 5	Ile	Gly	Gly			
	<210> 112										
	<211> 9										
	<212> PRT										
15	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 112										
20	Ser 1	Ser	Arg	His	Arg 5	Arg	Ala	Leu	Asp		
	<210> 113										
	<211> 14										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
25	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 113										
	Arg	Lys Val	Ser Val	Ser Leu	Ile 5	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp
30	1				5					10	
	<210> 114										
	<211> 15										
	<212> PRT										
35	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 114										
40	Ser 1	Ser Gly	Ser Asp	Phe Asp	Asp Ala 5	Lys	Gly	Lys	Tyr	Lys	Lys
				15						10	
	<210> 115										
	<211> 15										
45	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 115										
50	Ser 1	Ser Gly	Ser Asp	Phe Asp	Asp Ala 5	Lys	Gly	Lys	Tyr	Lys	Arg
				15						10	
	<210> 116										
55	<211> 4										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
60	<400> 116										
	Ile	Glu	Gly	Arg							

1
 <210> 117
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 117
 Ile Asp Gly Arg
 10 1
 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 118
 Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg
 1 5
 20 <210> 119
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> Sintetic
 <400> 119
 Pro Leu Gly Leu Trp Ala
 1 5
 30 <210> 120
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 35 <400> 120
 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5
 40 <210> 121
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 121
 45 Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
 1 5
 <210> 122
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 122
 Gly Ile Ala Gly Gln
 55 1 5
 <210> 123
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 60 <220>
 <223> Sintetic

	<400> 123							
	Gly	Pro	Leu	Gly	Ile	Ala	Gly	Ile
	1				5			
5	<210> 124							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
10	<400> 124							
	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Val	Gly
	1				5			
	<210> 125							
	<211> 8							
15	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
20	<400> 125							
	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Val
	1				5			
	<210> 126							
	<211> 8							
	<212> PRT							
25	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
30	<400> 126							
	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Val	Glu	Arg
	1				5			
	<210> 127							
	<211> 8							
	<212> PRT							
35	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
40	<400> 127							
	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Ser	Thr
	1				5			
	<210> 128							
	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
45	<223> Sintetic							
	<400> 128							
	Glu	Pro	Gln	Ala	Leu	Ala	Met	Ser
	1				5			
	<210> 129							
50	<211> 8							
	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							
	<220>							
	<223> Sintetic							
55	<400> 129							
	Gln	Ala	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Ile
	1				5			
	<210> 130							
	<211> 8							
60	<212> PRT							
	<213> Secvență artificială							

<220>
 <223> Sintetic
 <400> 130
 Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
 5 1 5

<210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 131
 Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
 15 1 5

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 132
 Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val
 1 5

25 <210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <223> Sintetic
 <400> 133
 Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu
 1 5

35 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 40 <400> 134
 Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
 1 5

45 <210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 50 <400> 135
 Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu
 1 5

55 <210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 136
 60 Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly
 1 5

	<210>	137										
	<211>	8										
	<212>	PRT										
5	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
	<400>	137										
	Pro	Val	Gln	Pro	Ile	Gly	Pro	Gln				
	1				5							
10	<210>	138										
	<211>	7										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
15	<223>	Sintetic										
	<400>	138										
	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly					
	1				5							
20	<210>	139										
	<211>	5										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
25	<223>	Sintetic										
	<400>	139										
	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly							
	1				5							
30	<210>	140										
	<211>	4										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
35	<223>	Sintetic										
	<400>	140										
	Gln	Gly	Gln	Ser								
	1											
40	<210>	141										
	<211>	253										
	<212>	PRT										
	<213>	Secvență artificială										
	<220>											
	<223>	Sintetic										
	<400>	141										
45	Gln	Phe	Cys	Pro	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	
	1	Asp	Cys	Asp	Ile	Gly				10		
				15	5							
50	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	
		Leu	Leu	Ser	Gly	Arg			25			
			30	20								
	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	
		Met	Thr	Gln	Ser	Pro		40				
55		45										
	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	
		Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	55					
		50										
		60										
60	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe	
		Gln	Gln	Lys	Pro	Gly						

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

101

	65				80	70					75
5	Lys	Ala Asn	Pro Leu	Lys Ala	Leu Ser 85	Trp Gly	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser
										90	
10	Val	Pro Thr	Ser Asp	95 Arg Tyr 100	Phe Thr	Ser Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
									105		
15	Thr	Ile Thr	110 Ser Tyr 115	Ser Tyr	Met Cys	Gln Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
								120			
20	Gln	125 Arg Gly 130 140	Arg Thr	Asn Lys	Tyr Leu	Pro Glu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
							135				
25	Ile	Lys Ile	Arg Phe	Thr Pro	Val Pro	Ala Ser 150	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
	145										155
30	Asp	Glu Val	Gln Cys	Leu Leu	160 Lys Leu 165	Ser Asn	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
										170	
35	Asn	Phe Lys	Tyr Val	175 Pro Asp 180	Arg Asn	Glu Ala	Ala	Lys	Val	Gln	Trp
									185		
40	Leu	Gln Glu	190 Ser Gln 195	Gly Asp	Asn Ser	Ser Lys	Gln	Glu	Ser	Val	Thr
								200			
45	Asp	205 Ser Leu 210 220	Thr Ser	Tyr Lys	Ser Ala	Leu Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
							215				
50	Tyr	Glu Thr	Lys His	His Gln	Lys Gly	Val Leu 230	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
	225										235
55	Ser	Ser Glu	Pro Cys	Val	240 Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly
					245					250	
60	<210>	142									
	<211>	253									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
65	<223>	Sintetic									
	<400>	142									
70	Asn	Leu Cys	Cys Arg	Thr Ser	Glu Tyr 5	His Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp
	1									10	
75	Gly	Gly Leu	Ser Leu	15 Ser Ser	Gly Gly	Gly Arg	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

102

[illegible]

5	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 143											
10	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly						
	1				5							
	<210> 144											
	<211> 5											
	<212> PRT											
15	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 144											
	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly							
20	1				5							
	<210> 145											
	<211> 4											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
25	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 145											
	Ser	Gly	Gln	Gly								
	1											
30	<210> 146											
	<211> 257											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
35	<223> Sintetic											
	<400> 146											
	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp	
		Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly				10		
	1				5							
40	Gly	Gly	Ser	15	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	
		Leu	Ala	Ser	Pro	Gly			25			
				20								
			30	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Gly	
			35	Ile	Gln	Met		40				
45		45	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
	Thr	Gln	Asp	Arg	Val	Thr	55					
		Gly										
		50										
		60										
50	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	
		Met	Tyr	Trp	Phe	Gln					75	
	65				80	70						
					Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	
					85	Asn				90		
55	Gln	Lys	Pro	Gly								
		Tyr	Ser	Thr								
				95								
	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		Ser	Gly	Ser	Gly	Thr			105			
60			110									

	Asp	Tyr Glu	Thr Asp 115	Leu Phe	Thr Ala	Ile Thr	Ser	Ser	Met	Gln	Pro
								120			
5	Tyr	125 Tyr Thr 130 140	Cys Phe	Gln Gly	Gln Gln	Arg Gly	Arg	Asn	Tyr	Pro	Tyr
							135				
10	Thr	Lys Pro	Leu Ser	Glu Val	Ile Phe	Lys Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
	145					150					155
					160						
15	Phe	Pro Thr	Pro Ala	Ser Ser	Asp Val 165	Glu Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
										170	
	Cys	Leu Lys	Leu Val	175 Asn Gln 180	Asn Trp	Phe Lys	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
20			190						185		
	Val	Asp Glu	Asn Ser 195	Ala Val	Leu Thr	Gln Glu	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
								200			
25	Gln	205 Asp Ser 210 220	Ser Thr	Lys Leu	Asp Thr	Ser Leu	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
							215				
30	Ser	Lys Ala	Ala Cys	Asp Glu	Tyr Val	Glu Thr 230	Lys	His	Lys	Val	Tyr
	225										235
					240						
35	His	Gln Phe	Gly Asn	Leu Arg	Ser Gly 245	Ser Glu	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
				255						250	
	Cys										
40	<210> 147 <211> 264 <212> PRT <213> Secvență artificială										
45	<220> <223> Sintetic <400> 147										
	Gln	Gly Glu	Gln His	Ser Ser	Gly Ala 5	Gln Ala	Gly	Asn	Leu	Cys	Thr
50	1			15						10	
	Leu	Asp Gly	Cys Gly	Arg Ser 20	Ser Ala	Tyr Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
									25		
55	Gly	Leu Arg	30 Leu Ser 35	Ala Asp	Pro Asn	Pro Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly
								40			
60	Gly	45 Gly Ser	Ser Ser	Asp Leu	Ile Ser	Gln Ala	Met	Thr	Gln	Ser	Pro

	Ile	Ser Asn	Ser Pro	Gly Arg	Leu Gly 5	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala
	1			15						10	
5	<210> 149 <211> 18 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
10	<223> Sintetic <400> 149 Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro										
	1			15	5					10	
15	<210> 150 <211> 17 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
20	<223> Sintetic <400> 150 Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro										
25	1			15	5					10	
	Gly										
30	<210> 151 <211> 13 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
35	<223> Sintetic <400> 151 Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His										
	1				5					10	
40	<210> 152 <211> 13 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
45	<223> Sintetic <400> 152 Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His										
	1				5					10	
50	<210> 153 <211> 13 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
55	<223> Sintetic <400> 153 Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His										
60	1				5					10	

[illegible]

	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sinteti										
	<400> 164										
5	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu
		Ser	Gly	Arg	Ser	Asp					
	1				5					10	
				15							
	Asn	Pro									
10	<210> 165										
	<211> 18										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 165										
	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu
		Ser	Gly	Arg	Ser	Ala					
20	1				5					10	
				15							
	Asn	Pro									
	<210> 166										
	<211> 18										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 166										
	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu
		Ser	Gly	Arg	Ser	Ala					
30	1				5					10	
				15							
	Asn	Ile									
	<210> 167										
	<211> 447										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 167										
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val
		Lys	Lys	Pro	Gly	Ala					
45	1				5					10	
				15							
	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
		Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr					
50				20					25		
	Trp	Met	30	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln
		Gly	His	Glu	Trp	Ile					
			35					40			
55	Gly	45	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Glu	Thr	Gly
		Ala	Ala	Gln	Lys	Phe					
		Tyr					55				
		50									
		60									
60	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
		Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr					

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

110

5	65	Met	Glu Ala	Leu Val	Ser Tyr	80 Ser Tyr 85	70 Leu Cys	Arg	Ser	Glu	Asp	75 Thr
											90	
10		Thr	Arg Trp	Glu Gly	95 Asn Gln 100	Trp Gly	Asp Thr	Pro	Gly	Phe	Ala	Phe
										105		
15		Leu	Ile Pro	110 Thr Ser 115	Val Val	Ser Phe	Ser Pro	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
									120			
20		Leu	125 Ala Thr 130 140	Pro Ala	Ser Ala	Ser Leu	Lys Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
								135				
25		Cys	Leu Thr	Val Val	Lys Ser	Asp Trp	Tyr Asn 150	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
		145										155
30		Ser	Gly Pro	Ala Ala	Leu Val	160 Thr Leu 165	Ser Gln	Gly	Val	His	Thr	Phe
											170	
35		Ser	Ser Thr	Gly Val	175 Leu Pro 180	Tyr Ser	Ser Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
										185		
40		Ser	Leu Asn	190 Gly His 195	Thr Lys	Gln Pro	Thr Ser	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
									200			
45		Asn	205 Thr Ser 210 220	Lys Cys	Val Asp	Asp Lys	Lys Thr	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
								215				
50		His	Thr Leu	Cys Gly	Pro Gly	Pro Pro	Cys Ser 230	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
		225										235
55		Val	Phe Leu	Leu Met	Phe Ile	240 Pro Ser 245	Pro Arg	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
											250	
60		Thr	Pro Ser	Glu His	255 Val Glu 260	Thr Asp	Cys Pro	Val	Val	Val	Asp	Val
65		Glu	265 Val Glu	Lys Val 275	Phe His	Asn Asn	Trp Ala	270 Tyr	Val	Asp	Gly	Val
									280			
70		Lys	285 Thr Thr 290 300	Lys Tyr	Pro Arg	Arg Val	Glu Val	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
								295				
75		Ser	Val Asn	Leu Gly	Thr Lys	Val Glu	Leu Tyr	His	Gln	Asp	Trp	Leu

	305					310					315
	Lys	Cys	Lys	Val	320	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
5		Pro	Ile	Glu	Lys	Thr					
					325					330	
	Ile	Ser	Lys	335	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		Gln	Val	Ala	Thr	Leu					
10				Tyr					345		
			350	340							
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
		Val	Ser	Leu	Thr	Cys					
			355					360			
15	Leu	365	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
		Val	Glu	Trp	Glu	Ser					
		Val									
		370					375				
20	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
		Pro	Pro	Val	Leu	Asp					
	385					390					395
					400						
25	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
		Thr	Val	Asp	Lys	Ser					
					405					410	
	Arg	Trp	Gln	415	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
30		Val	Met	Gln	Glu	Ala					
				His					425		
			430	420							
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		Leu	Ser	Pro	Gly						
			435					440			
35		445									
	<210> 168										
	<211> 1341										
	<212> ADN										
	<213> Secvență artificială										
40	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 168										
	cagg	gcagc	tggt	gcagtc	tg	gcgcgaa	gtga	gaaac	ctgg	gcgcctc	
		cgtga	aatg	60							
45	tcct	gcaagg	cctc	cggtc	ca	cttcacc	agct	actgga	tgca	ctgggt	
		gcgac	aggct	120							
	ccagg	ccagg	gcct	cgaatg	ga	tcggcgcc	atct	accccg	gcaact	ccga	
		gacagg	ctac	180							
	gccc	agaagt	tccag	ggcag	ag	ccaccctg	accg	ccgaca	cctcc	acctc	
50		caccg	cctac	240							
	atgga	actgt	ccagc	ctgcg	ga	gcgaggac	accg	ccgtgt	actact	gcac	
		cagag	agaac	300							
	tggg	accccg	gttc	gcctt	ct	ggggccag	ggc	acctga	tcacc	gtgtc	
		ctccg	ccagc	360							
55	acca	agggcc	cctc	ctgtt	cc	ctctggcc	cctt	ecagca	agtc	acctc	
		tggcg	gcaca	420							
	gctg	ccctgg	gctg	cctggt	ga	aaagactac	ttcccc	gagc	ccgtg	accgt	
		gtcct	ggaac	480							
	tctg	gcgccc	tgacc	agcgg	ag	tgcacacc	ttcc	ctgccg	tgctg	cagtc	
60		ctccg	gcctg	540							

	tactccctgt	cctccgtggt										
		gacctacatc	600									
	tgcaacgtga	accacaagcc										
		acccaagtcc	660									
5	tgcgacaaga	cccacacctg										
		cggaccttcc	720									
	gtgtttctgt	tcccccaaaa										
		ccccgaagtg	780									
	acctgcgtgg	tggtggacgt										
10		ttgttacgtg	840									
	gacggcgtgg	aagtgcacaa										
		caactccacc	900									
	taccgggtgg	tgtccgtgct										
		caaagagtac	960									
15	aagtgcagg	tgtccaacaa										
		ctccaaggcc	1020									
	aagggccagc	cccgcgagcc										
		agagatgacc	1080									
	aagaaccagg	tgtccctgac										
20		tatcgccgtg	1140									
	gaatgggaga	gcaacggcca										
		tgtgctggac	1200									
	tccgacggct	cattcttct										
		gtggcagcag	1260									
25	ggcaacgtgt	tctctgcag										
		caccagaag	1320									
	tcctgtccc	tgagccccgg										
	<210> 169											
	<211> 253											
30	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
	<223> Sintetic											
	<400> 169											
35	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp	
		Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly						
	1				5					10		
				15								
40	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	
		Leu	Leu	Ser	Gly	Arg						
				20								
			30									
	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	
		Met	Thr	Gln	Ser	Pro						
45			35									
		45						40				
	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	
		Thr	Ile	Thr	Cys	Ser						
		50					55					
50		60										
	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe	
		Gln	Gln	Lys	Pro	Gly						
	65					70						
					80							
55	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	
		Asn	Leu	Ala	Ser	Gly						
					85							
				95						90		
	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	
60		Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu						

				100					105		
	Thr	Ile	110	Ser	Met	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
5		Thr	Ser Tyr 115	Ser Tyr	Cys	Gln					
								120			
	Gln	125	Arg	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
		Arg Gly 130	Thr	Lys	Leu	Glu					
10		140					135				
	Ile	Lys Ile	Arg Phe	Thr Pro	Val Pro	Ala Ser	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
15	145					150					155
	Asp	Glu Val	Gln Cys	Leu Leu	160 Lys Leu 165	Ser Asn	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
										170	
20	Asn	Phe Lys	Tyr Val	175 Pro Asp 180	Arg Asn	Glu Ala	Ala	Lys	Val	Gln	Trp
									185		
25	Leu	Gln Glu	190 Ser Gln 195	Gly Asp	Asn Ser	Ser Lys	Gln	Glu	Ser	Val	Thr
								200			
	Asp	205 Ser Leu 210 220	Thr Ser	Tyr Lys	Ser Ala	Leu Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
30							215				
	Tyr	Glu Thr	Lys His	His Gln	Lys Gly	Val Leu 230	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
	225										235
35	Ser	Ser Glu	Pro Cys	Val	240 Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly
					245					250	
40	<210> 170 <211> 260 <212> PRT <213> Secvență artificială <220>										
45	<223> Sintetic <400> 170										
	Gln	Gly Glu	Gln His	Ser Ser	Gly Ala 5	Gln Ala	Gly	Asn	Leu	Cys	Thr
	1									10	
50	Leu	Asp Gly	Cys Gly	15 Arg Ser 20	Ser Ile	Tyr Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
									25		
55	Ser	Gly Gly	30 Leu Gly 35	Leu Gly	Ser Ser	Gly Asp	Arg	Ser	Asp	Asn	Pro
								40			
60	Ile	45 Gln Ala	Met Ser	Thr Val	Gln Gly	Ser Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser

115

	<400> 171	Ile	Ser Asn	Ser Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp
5	1					5					10	
10	<210> 172 <211> 18 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic <400> 172	Ala	Val Ser	Gly Gly	Leu Arg	Leu Ser 5	Ala Asp	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu
15	1				15						10	
20	Asn	Ile										
25	<210> 173 <211> 257 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic <400> 173	Gln	Phe Asp	Cys Cys	Pro Asp	Trp Ile 5	Ser Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly
30	1				15						10	
35	Gly	Gly Leu	Ser Ala	Ser Pro 20	Gly Pro	Gly Gly	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	
40	Gly	Leu Ser	Ser Asp 35	Gly Ile	Arg Gln	Ser Met	Asp	Asn	Pro	Gly	Gly	
45	Thr	45 Gln Gly 50 60	Ser Asp	Pro Arg	Ser Val	Ser Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
50	Ile	Thr Met	Cys Tyr	Ser Trp	Ala Phe	Ser Gln 70	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	
55	65				80						75	
60	Gln	Lys Tyr	Pro Ser	Gly Thr	Lys Ser 85	Ala Asn	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	
65	Leu	Ala Ser	Ser Gly	95 Gly Ser 100	Val Gly	Pro Thr	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
70	Asp	Tyr Glu	110 Thr Asp 115	Leu Phe	Thr Ala	Ile Thr	Ser	Ser	Met	Gln	Pro	
75	Tyr	125 Tyr Thr 130 140	Cys Phe	Gln Gly	Gln Gln	Arg Gly	Arg	Asn	Tyr	Pro	Tyr	

	Thr	Lys Pro	Leu Ser	Glu Val	Ile Phe	Lys Ile 150	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
	145										155
5	Phe	Pro Thr	Pro Ala	Ser Ser	160 Asp Val 165	Glu Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
				175						170	
10	Cys	Leu Lys	Leu Val	Asn Gln 180	Asn Trp	Phe Lys	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
			190						185		
15	Val	Asp Glu	Asn Ser 195	Ala Val	Leu Thr	Gln Glu	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
		205						200			
20	Gln	Asp Ser 210 220	Ser Thr	Lys Leu	Asp Thr	Ser Leu	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
							215				
	Ser	Lys Ala	Ala Cys	Asp Glu	Tyr Val	Glu Thr 230	Lys	His	Lys	Val	Tyr
	225										235
25	His	Gln Phe	Gly Asn	Leu Arg	240 Ser Gly 245	Ser Glu	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
				255						250	
30	Cys										
	<210>	174									
	<211>	264									
	<212>	PRT									
35	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	174									
40	Gln	Gly Trp	Gln Ser	Ser Tyr	Gly Tyr 5	Gln Leu	Gly	Gln	Phe	Cys	Pro
	1									10	
	Ile	Gly Gly	Asp Gly	15 Cys Ser 20	Asp Ala	Ile Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
45			30						25		
	Gly	Leu Arg	Leu Ser 35	Ala Asp	Pro Asn	Pro Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly
								40			
50	Gly	45 Gly Ser 50 60	Ser Ser	Asp Leu	Ile Ser	Gln Ala	Met	Thr	Gln	Ser	Pro
							55				
55	Ser	Val Ala	Gly Ser	Asp Ser	Arg Ser	Val Val 70	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser
	65										75
60	Tyr	Tyr Lys	Met Ala	Tyr Pro	80 Trp Lys	Phe Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

117

5	Trp	Ile Val	Tyr Pro	95	85	Ser Phe	Asn	Leu	Ala	90	Ser	Gly
				Ser Ser 100	Thr Arg					105		
				110								
10	Ser	Gly Thr	Ser Ile 115	Gly Ser	Ser Ser	Gly Met	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	
												125
15	Gln	Pro Gln 130 140	Glu Arg	Asp Arg	Phe Asn	Ala Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
												135
												145
20	Ala	Ala Asp	Pro Glu	Ser Gln	160	Phe Lys	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	
					Val Leu 165							170
					175							
25	Ser	Gly Asn	Thr Phe	Ala Tyr 180	Ser Pro	Val Arg	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	
												185
30	Glu	Ala Leu	Lys Gln 195	Val Ser	Gln Gly	Trp Asn	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	
												200
35	Ser	Gln Asp 210 220	Glu Ser	Ser Thr	Val Tyr	Thr Ser	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	
												215
												225
40	Val	Tyr Ser	Ala Ser	Cys Pro	240	Val Thr	Thr	His	Gln	Gly	Leu	
					Glu Val 245							250
45	Lys	Ser	Phe	255	Arg	Gly	Glu	Cys				
				Asn								260
50	<210> 175											
	<211> 8											
	<212> PRT											
	<213> Secvență artificială											
	<220>											
55	<223> Sintetic											
	<400> 175											
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Gly	Asn	His				
												<210> 176
												<211> 9
<212> PRT												
60	<213> Secvență artificială											
	<220>											

	<223> Sintetic								
	<400> 176								
5	Ser 1	Gly	Arg	Ser	Ala 5	Asn	Pro	Arg	Gly
	<210> 177								
	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
10	<223> Sintetic								
	<400> 177								
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Asp	His	
	<210> 178								
15	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
	<223> Sintetic								
20	<400> 178								
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Ile	His	
	<210> 179								
25	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
	<223> Sintetic								
30	<400> 179								
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Gln	His	
	<210> 180								
35	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
	<223> Sintetic								
	<400> 180								
40	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Thr	His	
	<210> 181								
45	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
	<223> Sintetic								
	<400> 181								
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Tyr	His	
50	<210> 182								
	<211> 8								
	<212> PRT								
	<213> Secvență artificială								
	<220>								
55	<223> Sintetic								
	<400> 182								
	Leu 1	Ser	Gly	Arg	Ser 5	Asp	Asn	Pro	
60	<210> 183								
	<211> 8								
	<212> PRT								

<213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 183
 5 Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
 1 5
 <210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 184
 Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile
 15 1 5
 <210> 185
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 185
 Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile
 1 5
 25 <210> 186
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <223> Sintetic
 <400> 186
 Met Ile Ala Pro Val Ala Tyr Arg
 1 5
 35 <210> 187
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 40 <400> 187
 Arg Pro Ser Pro Met Trp Ala Tyr
 1 5
 <210> 188
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 188
 50 Trp Ala Thr Pro Arg Pro Met Arg
 1 5
 <210> 189
 <211> 8
 <212> PRT
 55 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Sintetic
 <400> 189
 Phe Arg Leu Leu Asp Trp Gln Trp
 60 1 5
 <210> 190

	<211>	5											
	<212>	PRT											
	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
5	<223>	Sintetic											
	<400>	190											
	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu								
	1				5								
	<210>	191											
10	<211>	7											
	<212>	PRT											
	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
	<223>	Sintetic											
15	<400>	191											
	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser						
	1				5								
	<210>	192											
	<211>	6											
20	<212>	PRT											
	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
	<223>	Sintetic											
	<400>	192											
25	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu							
	1				5								
	<210>	193											
	<211>	19											
	<212>	PRT											
30	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
	<223>	Sintetic											
	<400>	193											
35	Gly	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly		
	1	Ala	Val	Gly	Leu	Leu				10			
				15									
	Ala	Pro	Pro										
40	<210>	194											
	<211>	21											
	<212>	PRT											
	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
45	<223>	Sintetic											
	<400>	194											
	Gly	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Val	
	1	His	Met	Pro	Leu					10			
50			15										
	Gly	Phe	Leu	Gly									
	20	Pro											
55	<210>	195											
	<211>	146											
	<212>	PRT											
	<213>	Secvență artificială											
	<220>												
	<223>	Sintetic											
60	<400>	195											

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

121

	Gln 1	Phe Asp	Cys Cys	Pro Asp	Trp Ile 5	Ser Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ile 10	Gly
5	Gly	Gly Leu	Ser Leu	15 Ser Ser 20	Gly Gly	Gly Arg	Ser	Ile	Ser 25	Ser	Gly
10	Ser	Asp Met	30 Asn Thr 35	His Gln	Gly Ser	Gly Pro	Gly	Ser 40	Asp	Ile	Gln
15	Ser	45 Ser Thr 50 60	Leu Ile	Ser Thr	Ala Cys	Ser Ser	Val 55	Gly	Asp	Arg	Val
20	Ala 65	Ser Gln	Ser Gln	Ser Lys	Val Pro	Tyr Gly 70	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe 75
25	Lys	Ala Asn	Pro Leu	Lys Ala	80 Leu Ser 85	Trp Gly	Ile	Tyr	Ser	Thr 90	Ser
30	Val	Pro Thr	Ser Asp	95 Arg Tyr 100	Phe Thr	Ser Leu	Gly	Ser	Gly 105	Ser	Gly
35	Thr	Ile Thr	110 Ser Tyr 115	Ser Tyr	Met Cys	Gln Gln	Pro	Glu 120	Asp	Phe	Ala
40	Gln	125 Arg Gly 130 140 Lys	Arg Thr	Asn Lys	Tyr Leu	Pro Glu	Tyr 135	Thr	Phe	Gly	Gln
45	Ile	145									
	<210> 196 <211> 153 <212> PRT <213> Secvență artificială <220> <223> Sintetic <400> 196										
50	Gln 1	Gly Trp	Gln Ser	Ser Tyr	Gly Tyr Leu 5	Gln	Gly	Gln	Phe	Cys 10	Pro
55	Ile	Gly Gly	Asp Gly	15 Cys Ser 20	Asp Ile	Ile Ser	Gly	Gly	Gly 25	Ser	Ser
60	Ser	Gly Gly	30 Leu Gly 35	Leu Gly	Ser Ser	Gly Asp	Arg	Ser 40	Asp	Asn	His
	Ile	45 Gln Ala	Met Ser	Thr Val	Gln Gly	Ser Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser

		50					55				
	Arg	60	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser
5	65	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr					75
		Val				70					
	Trp	Phe	Gln	Gln	80	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
		Leu	Trp	Ile	Lys	Ser					
10					85					90	
	Thr	Ser	Asn	95	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
		Phe	Ser	Leu	Ser	Gly					
				Gly					105		
15	Ser	Gly	110	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
		Met	Thr	Pro	Glu	Asp					
			Gln					120			
			115								
20	Phe	125	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Arg	Asn
		Ala	Pro	Tyr	Thr	Phe					
		Tyr					135				
		130									
	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
25	145										
						150					
	<210>	197									
	<211>	146									
	<212>	PRT									
30	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	197									
35	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp
		Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly					
	1				5					10	
	Gly	Gly	Ser	15	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly
40		Leu	Leu	Ser	Gly	Arg					
				Ser					25		
	Ser	Asp	30	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln
		Met	Asn	Gln	Ser	Pro					
45			Thr					40			
	Ser	45	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val
		Thr	Ile	Thr	Cys	Ser					
		50					55				
50	Ala	60	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe
	65	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly					75
						70					
	Lys	Ala	Pro	Lys	80	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser
55		Asn	Leu	Ala	Leu	Gly					
					Ser					90	
					85						
	Val	Pro	Ser	95	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
60		Thr	Asp	Arg	Thr	Leu					
				Tyr					105		
				100							
				110							

	<213> Secvență artificială										
	<220>										
	<223> Sintetic										
	<400> 199										
5	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp
	1	Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly				10	
				15	5						
10	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Gly	Leu
		Leu	Ala	Pro	Pro	Gly			25		
				20							
			30	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Gly
15	Gly	Leu	Ser	Ile	Gln	Met					
		Ser	Asp					40			
	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
		Gly	Asp	Arg	Val	Thr					
		50					55				
20	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr
		Met	Tyr	Trp	Phe	Gln					
	65					70					75
					80						
25	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile
		Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn				90	
					85						
				95							
30	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		Ser	Gly	Ser	Gly	Thr			105		
				100							
			110	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Gln	Pro
35	Asp	Tyr	Thr	Phe	Ala	Thr					
		Glu	Asp					120			
			115								
		125									
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Arg	Asn	Tyr	Pro	Tyr
		Thr	Phe	Gly	Gln	Gly					
		130					135				
40	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
	145					150					
45	<210> 200										
	<211> 157										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
50	<223> Sintetic										
	<400> 200										
	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Asn	Leu	Cys	Thr
		Glu	His	Ser	Ala	Ala				10	
	1				5						
55	Leu	Asp	Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
		Gly	Gly	Ser	Ala	Val			25		
				20							
			30								
60	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly
		Arg	Ser	Asp	Asn	Pro					

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

125

			35				40				
		45									
	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro
5		Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	55				
		60									
	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser
		Ala	Ser	Ser	Ser	Val					
10	65					70					75
	Tyr	Tyr	Met	Tyr	80	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
		Lys	Ala	Pro	Trp	Leu					
					Lys						
15					85					90	
	Trp	Ile	Tyr	95	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
		Val	Pro	Ser	Arg	Phe					
				Ser							
20				100					105		
	Ser	Gly	110	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu
		Thr	Ser	Ser	Ser	Met					
			Ile								
			115					120			
25	Gln	125	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
		Pro	Arg	Arg	Asn	Tyr					
		Gln					135				
		130									
	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
30		Ile	Lys								
	145					150					155
35	<210>	201									
	<211>	146									
	<212>	PRT									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	201									
40	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp
		Cys	Arg	Ser	Tyr	Gly					
	1				5					10	
45	Gly	Gly	Ser	15	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly
		Leu	Leu	Ser	Gly	Arg					
				Ser							
				20					25		
	Ser	Asp	30	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln
		Met	Asn	Gln	Ser	Pro					
50			Thr								
			35					40			
	Ser	45	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val
		Ser	Ile	Thr	Cys	Ser					
		Thr					55				
55		50		Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe
	Ala	Ser	Gln	Lys	Pro	Gly					
		Gln				70					75
	65										
60	Lys	Ala	Pro	Lys	80	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser
		Asn	Leu	Ala	Leu	Gly					
					Ser						

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

126

					85					90	
5	Val	Pro Thr	Ser Asp	95 Arg Tyr 100	Phe Thr	Ser Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
									105		
	Thr	Ile Thr	110 Ser Tyr 115	Ser Tyr	Met Cys	Gln Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala
10								120			
	Gln	125 Arg Gly 130 140	Arg Thr	Asn Lys	Tyr Leu	Pro Glu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
15	Ile	Lys					135				
	145										
20	<210> 202										
	<211> 153										
	<212> PRT										
	<213> Secvență artificială										
	<220>										
25	<223> Sintetic										
	<400> 202										
	Gln	Gly Glu	Gln His	Ser Ser	Gly Ala 5	Gln Ala	Gly	Asn	Leu	Cys	Thr
	1			15						10	
30											
	Leu	Asp Gly	Cys Gly	Arg Ser 20	Ser Ile	Tyr Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
									25		
35	Ser	Gly Gly	30 Leu Gly 35	Leu Gly	Ser Ser	Gly Asp	Arg	Ser	Asp	Asn	Pro
								40			
40	Ile	45 Gln Ala 50 60	Met Ser	Thr Val	Gln Gly	Ser Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
							55				
	Arg	Val Val	Thr Tyr	Ile Tyr	Thr Met	Cys Tyr 70	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser
45	65										75
	Trp	Phe Leu	Gln Trp	Gln Ile	80 Lys Tyr 85	Pro Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
										90	
50	Thr	Ser Phe	Asn Ser	95 Leu Gly 100	Ala Ser	Ser Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
									105		
55	Ser	Gly Met	110 Thr Gln 115	Asp Pro	Tyr Glu	Thr Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
								120			
60	Phe	125 Ala Tyr	Thr Pro	Tyr Tyr	Tyr Thr	Cys Phe	Gln	Gln	Arg	Arg	Asn

MD/EP 3691692 T2 2021.05.31

127

[illegible]

	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Phe	Cys	Pro
	1	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Leu				10	
5	Ile	Gly	Asp	15	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
		Gly	Gly	Cys	Ala	Val			25		
			30	20							
10	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly
		Arg	Ser	Asp	Asn	Pro		40			
			35								
	Gly	45	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro
15		Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	55				
		Ser	Val	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser
		Ala	Ser	Ser	Ser	Val					75
20	65				80	70					
	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
		Lys	Ala	Pro	Lys	Leu				90	
				95							
25	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
		Val	Pro	Ser	Arg	Phe			105		
				100							
			110								
30	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu
		Thr	Ile	Ser	Ser	Met		120			
			115								
		125									
35	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
		Gln	Arg	Arg	Asn	Tyr					
		130					135				
		140									
	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
		Ile	Lys								
40	145					150					155
	<210>	205									
	<211>	6									
	<212>	PRT									
45	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
	<223>	Sintetic									
	<400>	205									
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser					
50	1				5						
	<210>	206									
	<211>	354									
	<212>	ADN									
	<213>	Secvență artificială									
	<220>										
55	<223>	Sintetic									
	<400>	206									
	caggtgcagc		tggtgcagtc		tggcgccgaa		gtgaagaaac		ctggcgcctc		
		cgtgaagatg		60							
	tcctgcaagg		cctccggeta		caccttcacc		agctactgga		tgcaactgggt		
60		gcgacaggct		120							

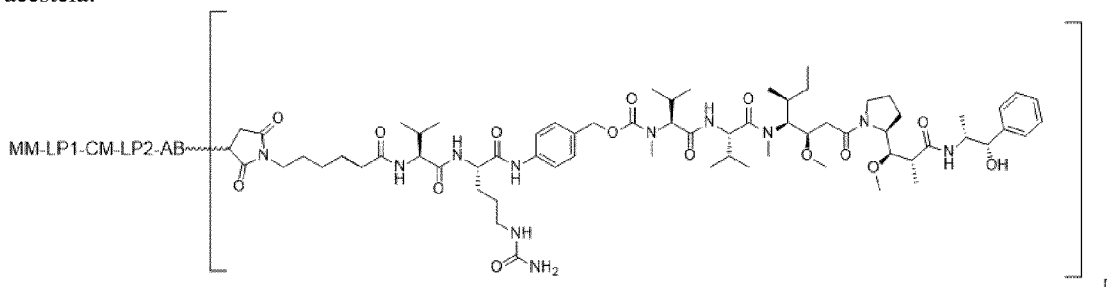
	ccaggccagg	gcctcgaatg	gateggcgcc	atctaccccg	gcaactccga	
	gacaggctac	180				
	gcccagaagt	tccagggcag	agccaccctg	accgccgaca	cctccacctc	
	caccgcctac	240				
5	atggaactgt	ccagcctgcg	gagcgaggac	accgccgtgt	actactgcac	
	cagagagaac	300				
	tgggaccccg	gcttcgcctt	ctggggccag	ggcaccctga	tcaccgtgtc	ctcc
	354					
	<210> 207					
10	<211> 8					
	<212> PRT					
	<213> Secvență artificială					
	<220>					
	<223> Sintetic					
15	<400> 207					
	Gly Gly Gly Ser	Ser Gly Gly Ser				
	1	5				
	<210> 208					
	<211> 639					
20	<212> ADN					
	<213> Secvență artificială					
	<220>					
	<223> Sintetic					
	<400> 208					
25	gacatccaga	tgaccagtc	cccatccagc			
	ctgtccgcct	ccgtgggcga	cagagtgaca	60		
	atcacctgtt	ccgccagctc	ctccgtgtac	tacatgtact	ggttccagca	
	gaagcccggc	120				
	aaggccccca	agctgtggat	ctactccacc	tccaacctgg	cctccggcgt	
30	gccctccaga	180				
	ttctccggct	ctggctccgg	caccgactac	accctgacca	tctccagcat	
	gcagcccagag	240				
	gacttcgcca	cctactactg	ccagcagcgg	cgggaactacc	cctacacctt	
	cggccagggc	300				
35	accaagctgg	aaatcaagcg	gaccgtggcc	gtcccagcg	tgttcatttcccacctcc	
	360					
	gacgagcagc	tgaagtccgg	caccgccagc	gtcgtgtgcc	tgctgaacaa	
	cttctacccc	420				
	cgcgaggcca	aggtgcagtg	gaaggtggac	aacgccctgc	agtccggcaa	
40	ctcccaggaa	480				
	tccgtcaccg	agcaggactc	caaggacagc	acctactccc	tgtctccac	
	cctgaccctg	540				
	tccaaggccg	actacgagaa	gcacaaggtg	tacgcctgcg	aagtgaccca	
	ccagggcctg	600				
45	tccagccccc	tgaccaagtc	cttcaaccgc	ggcagagtgc	639	

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A2-2016/179257

(57) Revendicări:

1. Un anticorp activabil conjugat care cuprinde structura cu Formula (I) sau o sare a acesteia:



Formula (I)

- (a) in care
- (i) AB este un anticorp care se leagă specific la CD71 uman și cuprinde
- i. o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență CDRH1 cuprinzând SECV ID NR: 9, o secvență CDRH2 cuprinzând SECV ID NR: 10 și o secvență CDRH3 cuprinzând SECV ID NR: 11; și
- ii. o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență CDRL1 cuprinzând SECV ID NR: 12 sau SECV ID NR: 13, o secvență CDRL2 cuprinzând SECV ID NR: 14 și o secvență CDRL3 cuprinzând SECV ID NR: 15;
- (ii) MM este un radical de mascare care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18, în care MM inhibă legarea AB-ului la CD71 uman atunci când anticorpul activabil conjugat este într-o stare neclivată;
- (iii) LP1 este un prim radical de legătură care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 207;
- (iv) CM este un radical clivabil cuprinzând secvența din SECV ID NR: 156, în care CM este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează; și
- (v) LP2 este un al doilea radical de legătură cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 38; și
- (b) in care „n” este 2.

2. Anticorpul activabil conjugat conform revendicării 1, în care AB cuprinde un izotip IgG1.

3. Anticorpul activabil conjugat conform revendicării 1 sau 2, în care AB este un anticorp având o regiune constantă a lanțului greu, și în care reziduul C-terminal al regiunii constante a lanțului greu nu este o lizină.

4. Anticorpul activabil conjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde o secvență a SECV ID NR: 5 și regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde o secvență a SECV ID NR: 7.

5. Anticorpul activabil conjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-4, cuprinzând un lanț greu cuprinzând o secvență din SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență din SECV ID NR: 19.

6. Anticorpul activabil conjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-5, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 5 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 201.

7. Anticorp activabil conjugat conform revendicării 6, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 5 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 202.

8. Anticorpul activabil conjugat conform revendicării 6, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență a SECV ID NR: 5 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență a SECV ID NR: 202, în care aminoacidul N-terminal al SECV ID NR: 202 este modificat în pirolutamat.

9. Anticorpul activabil conjugat conform oricăreia dintre revendicările 1-5, cuprinzând un lanț greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 169.

10. Anticorpul activabil conjugat conform revendicării 9, cuprinzând un lanț greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 170.

11. Anticorpul activabil conjugat conform revendicării 9, cuprinzând un lanț greu cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 167 și un lanț ușor cuprinzând o secvență a SECV ID NR: 170, în care aminoacidul N-terminal al SECV ID NR: 170 este modificat în pirolutamat.

FIG. 1

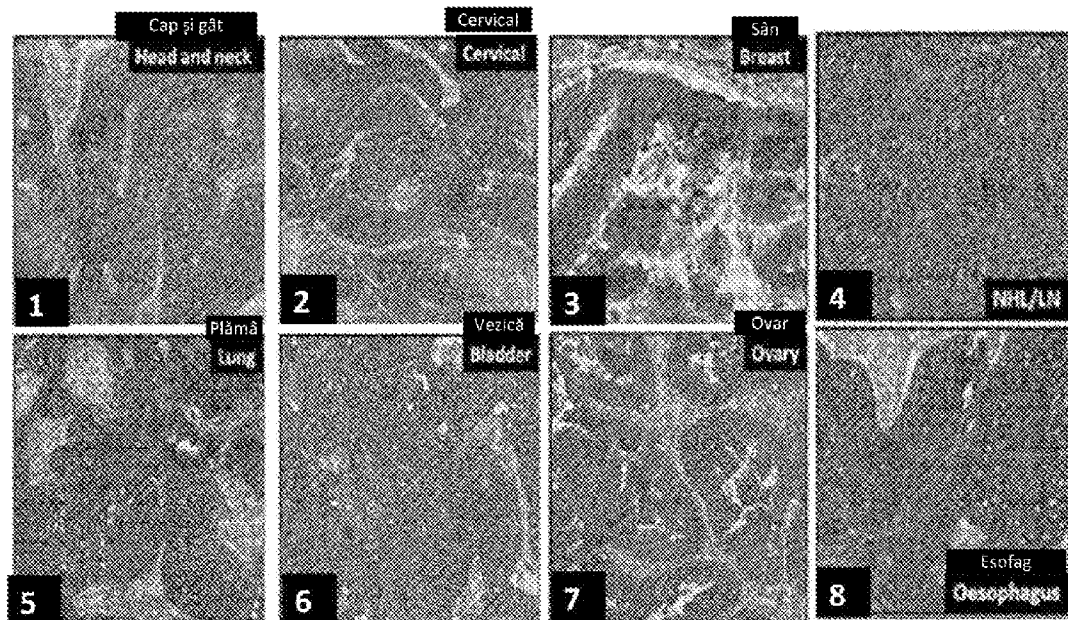


FIG. 2

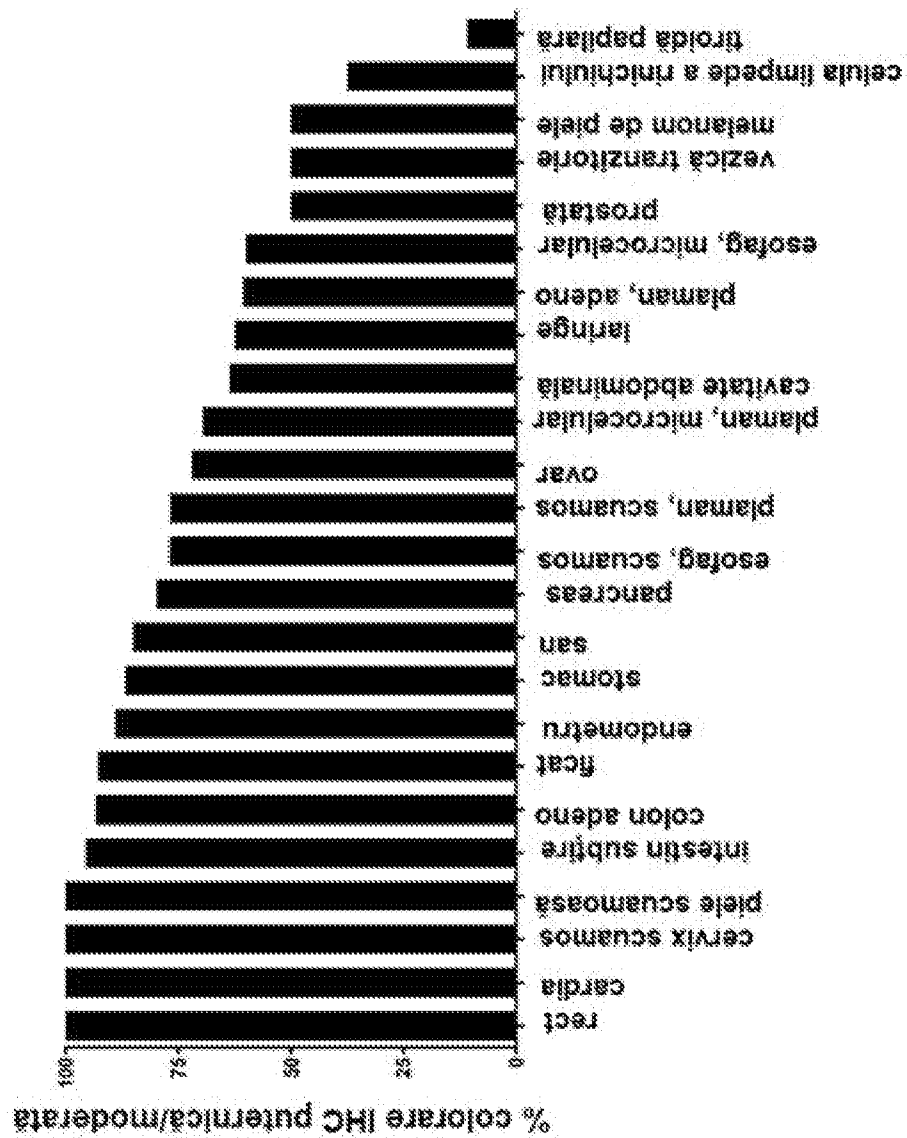
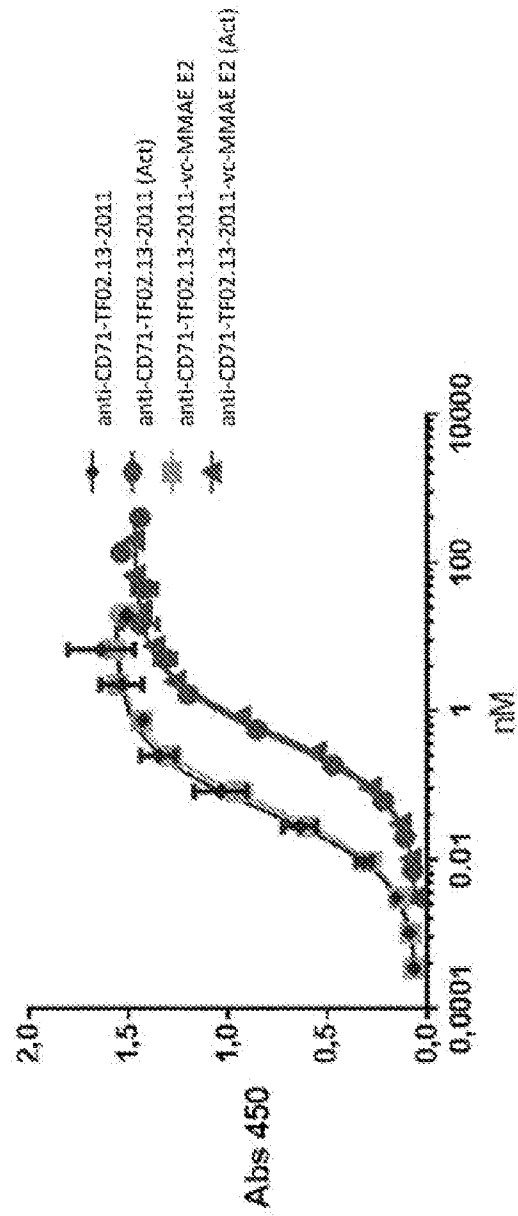


FIG. 3A



Legarea CD71 uman recombinant

FIG. 3B

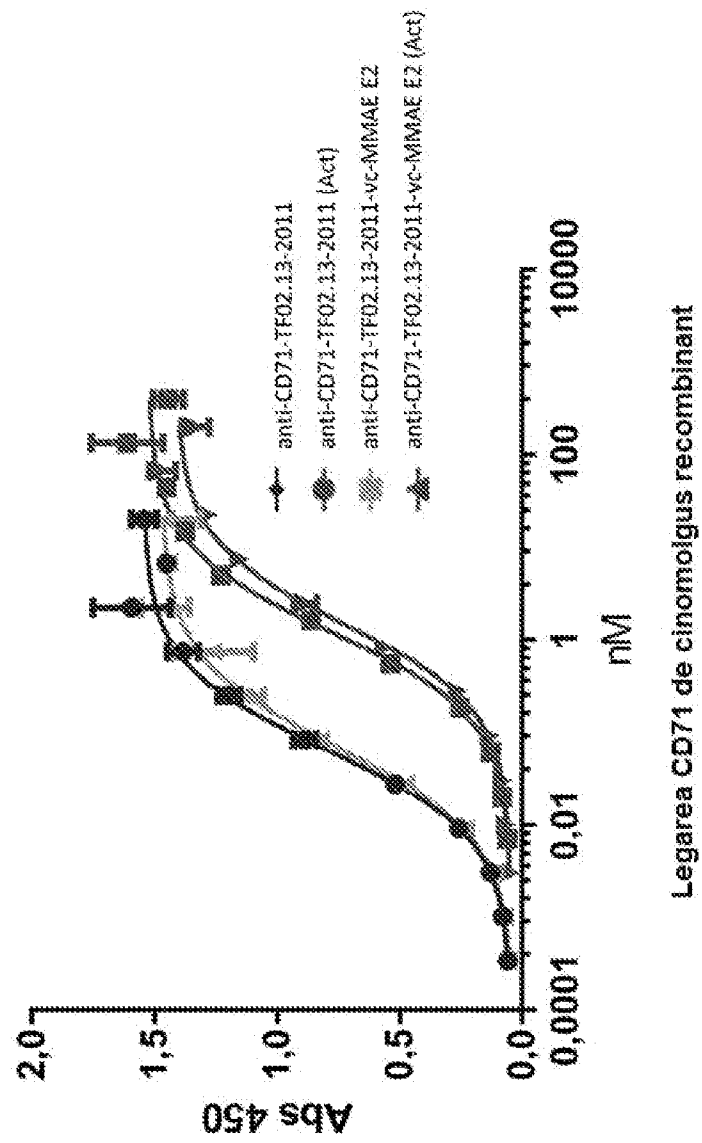


FIG. 3C

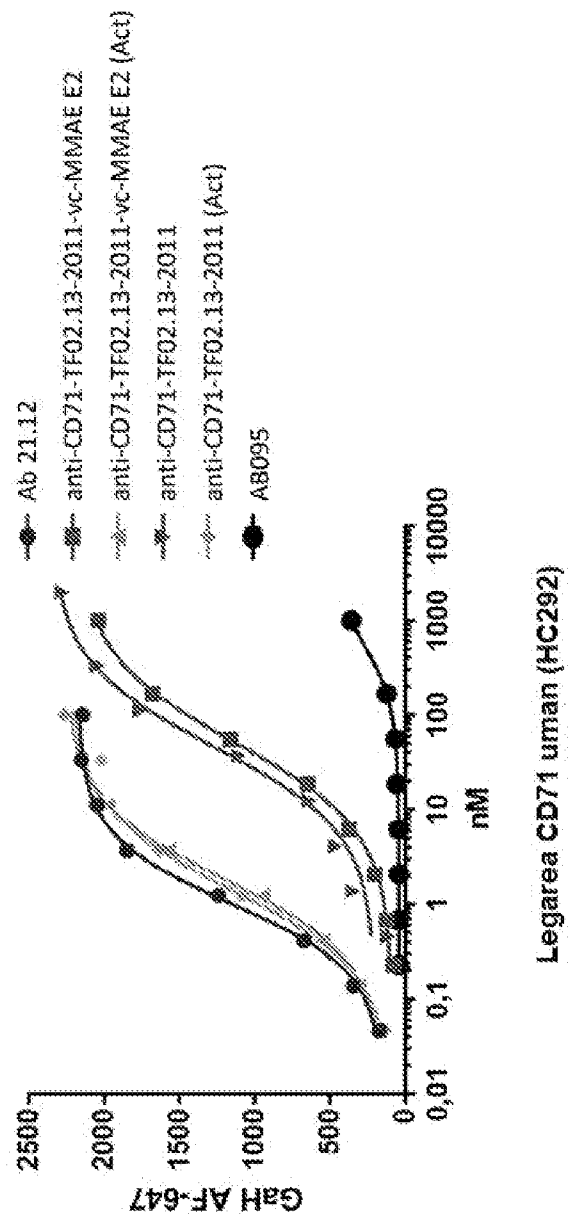
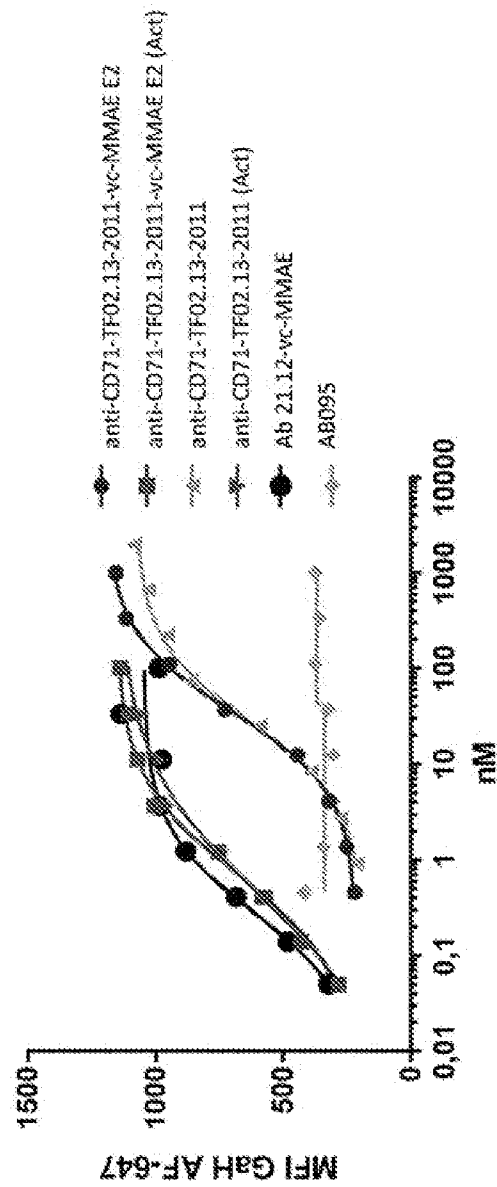


FIG. 3D



Legarea CD71 de cinomolgus (CHO-CD71 cino)

FIG. 4A

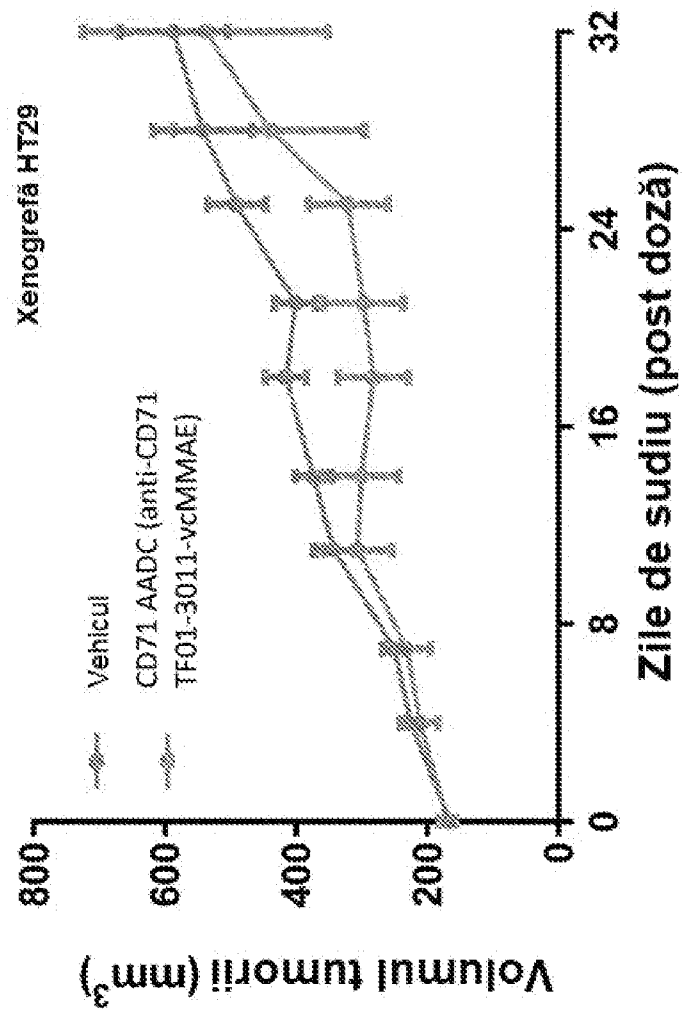


FIG. 4B

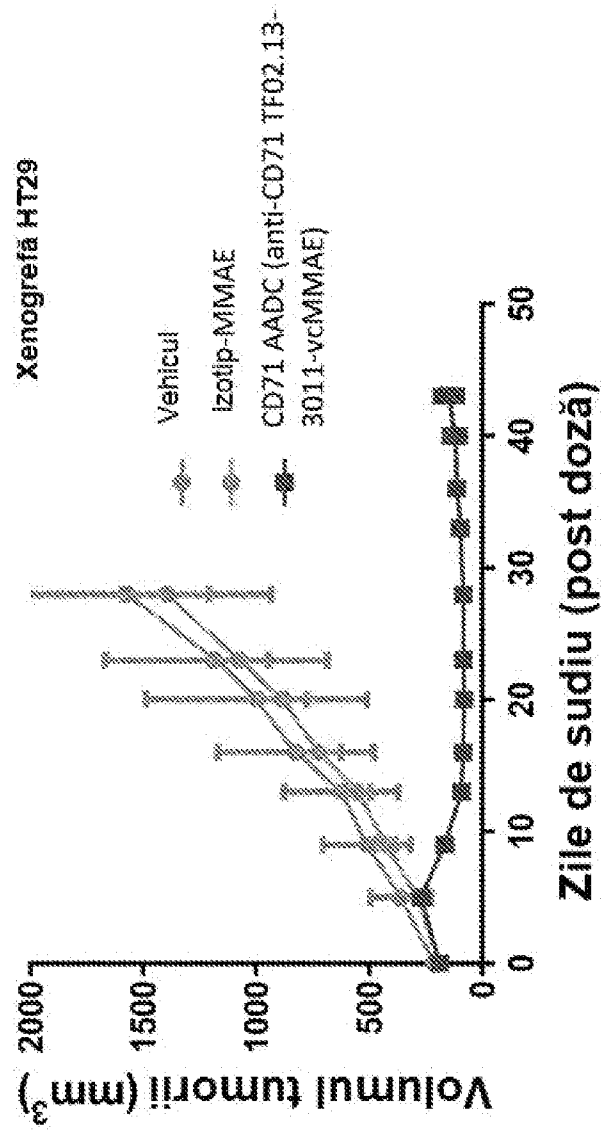


FIG. 4C

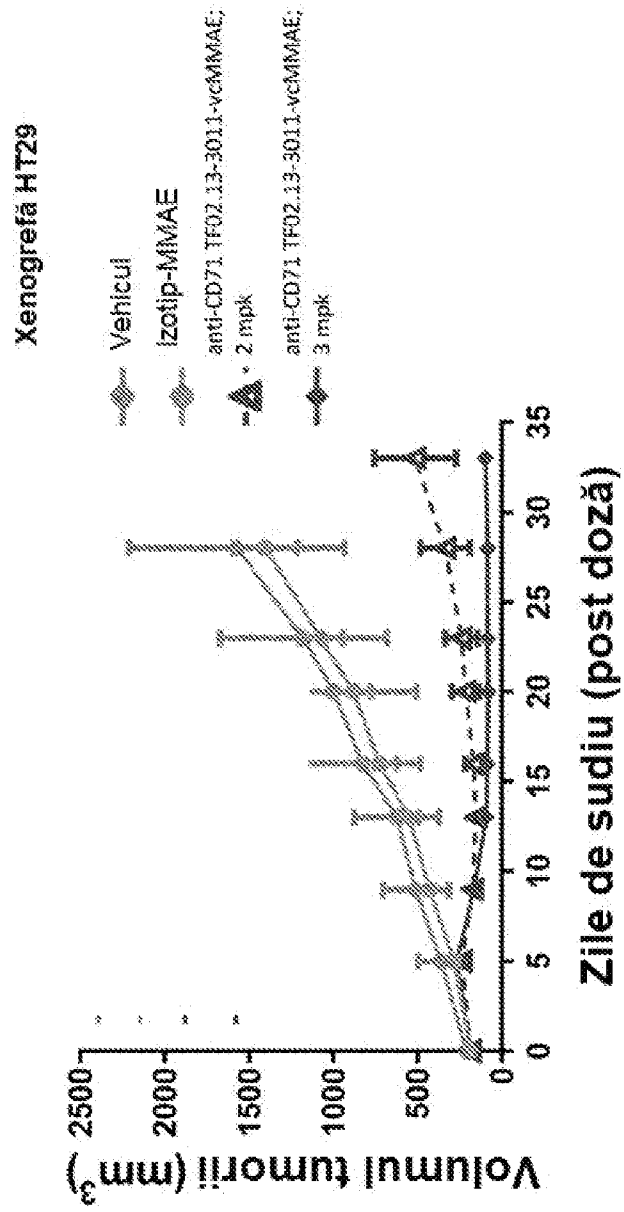


FIG. 5

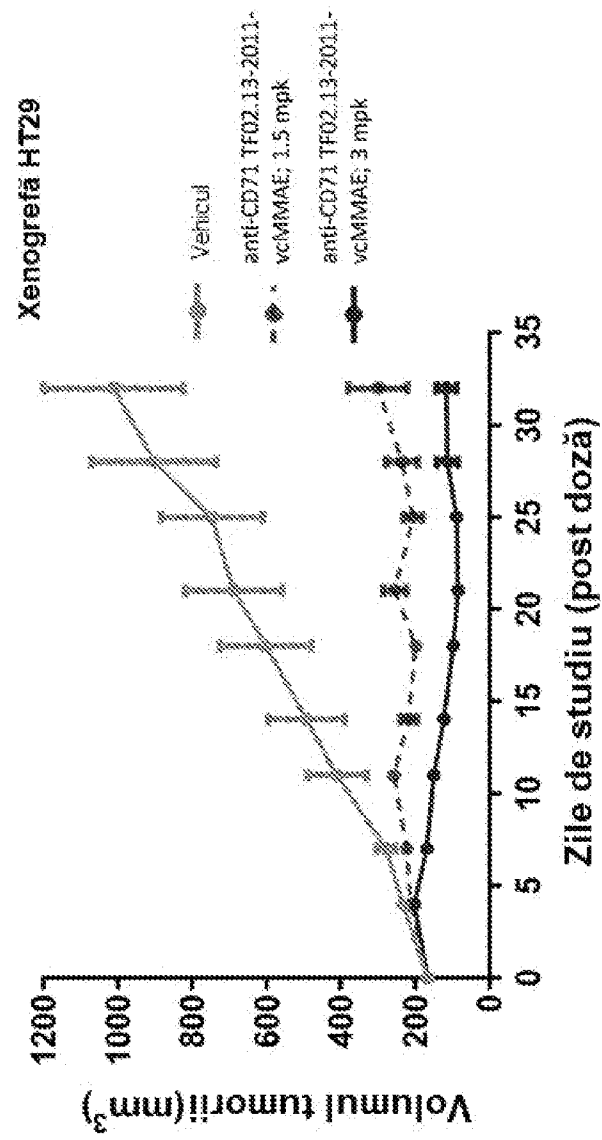


FIG. 6A

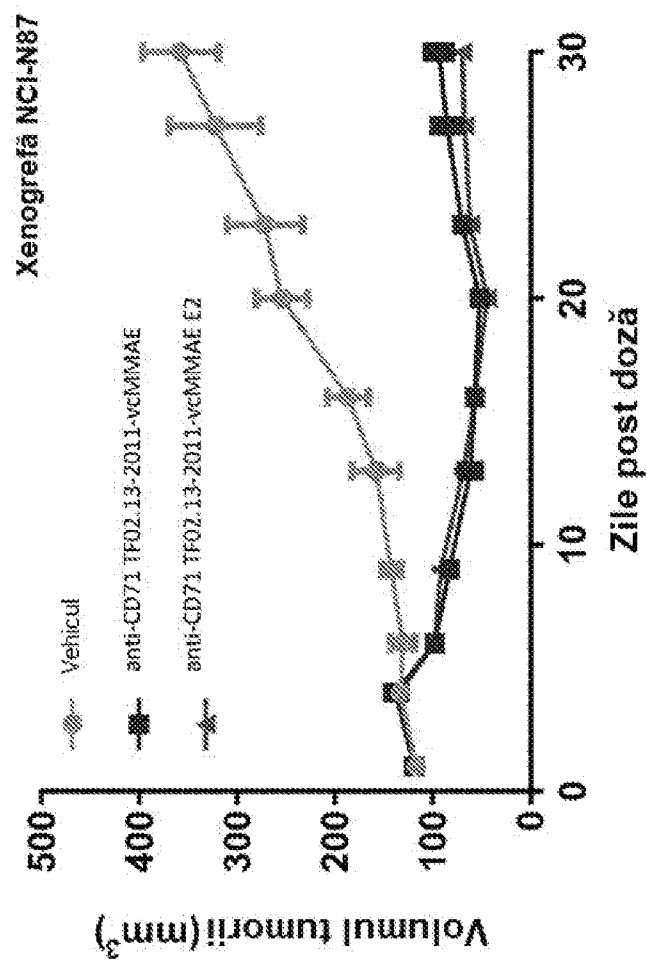


FIG. 6B

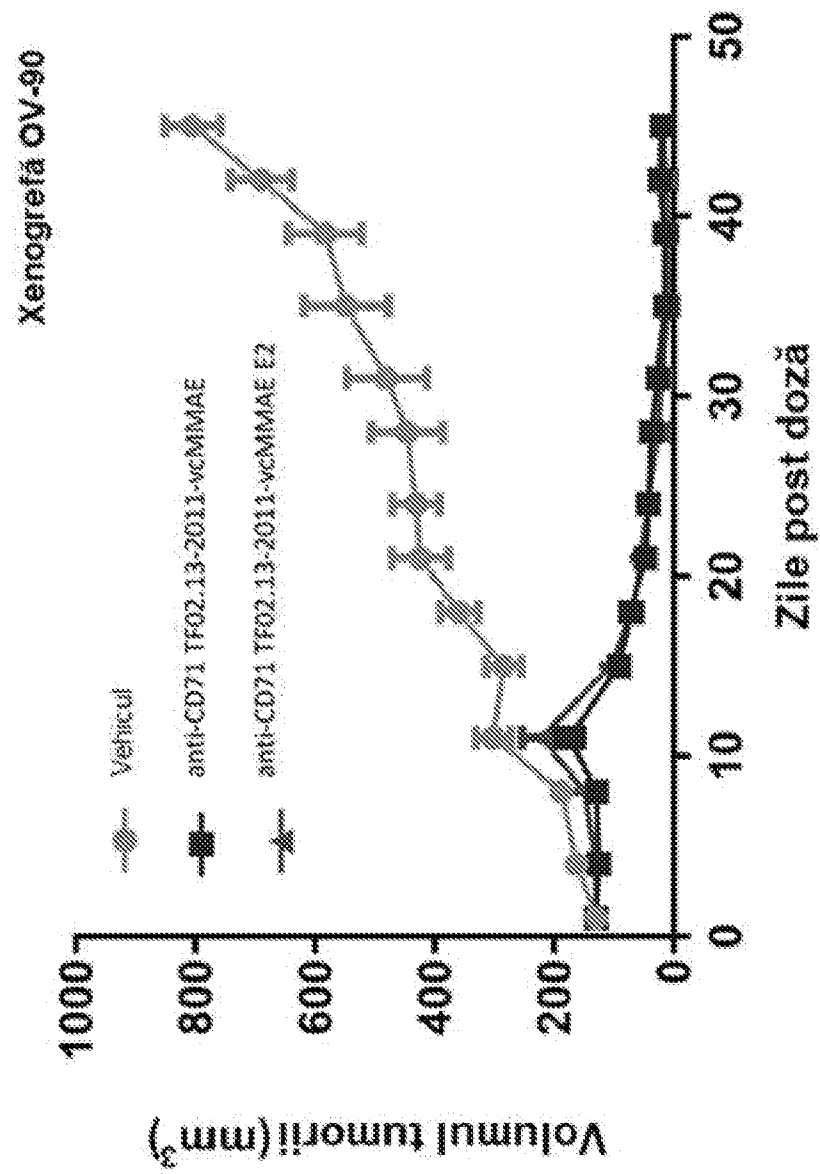


FIG. 6C

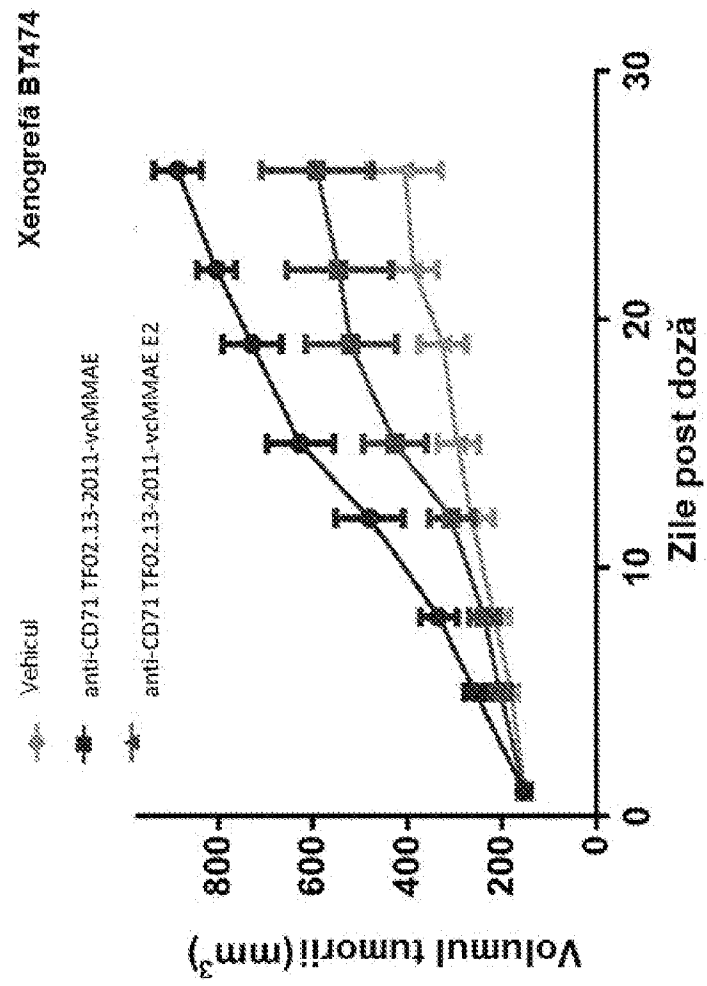


FIG. 6D

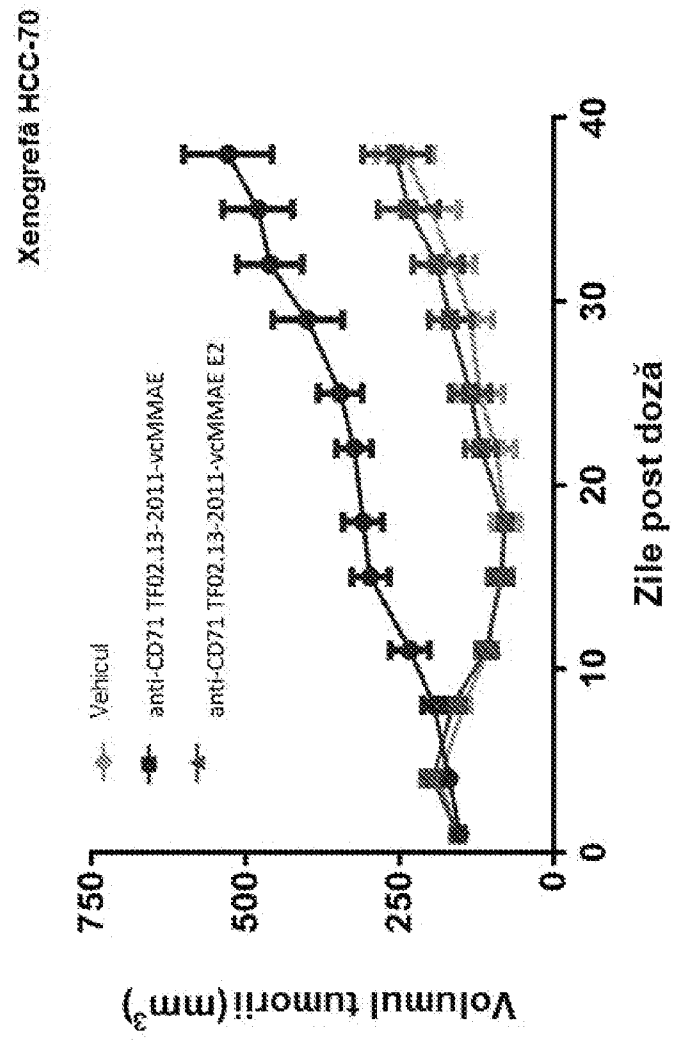


FIG. 7A

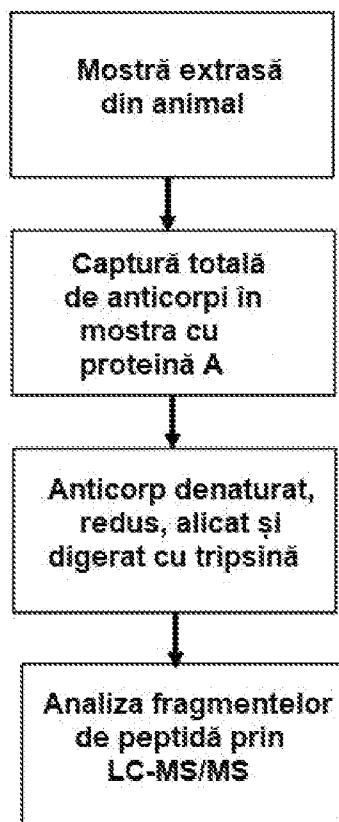


FIG. 7B

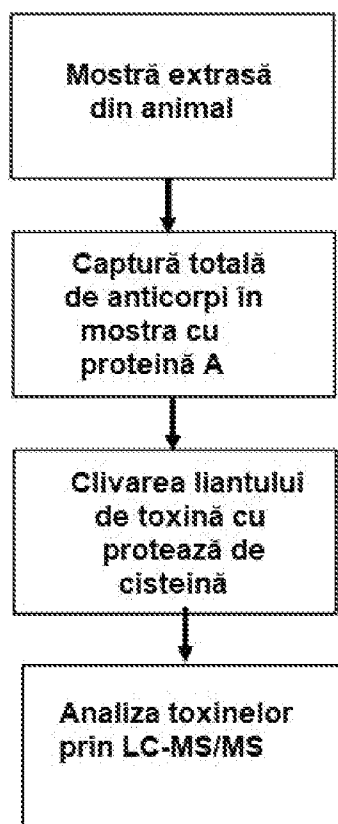


FIG. 7C

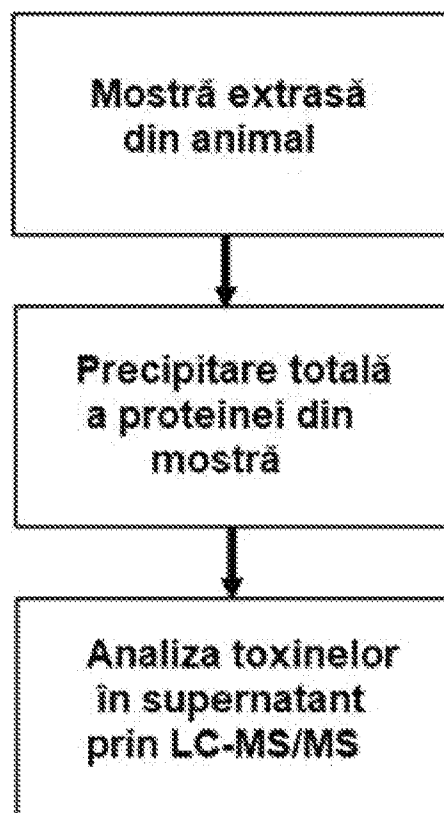
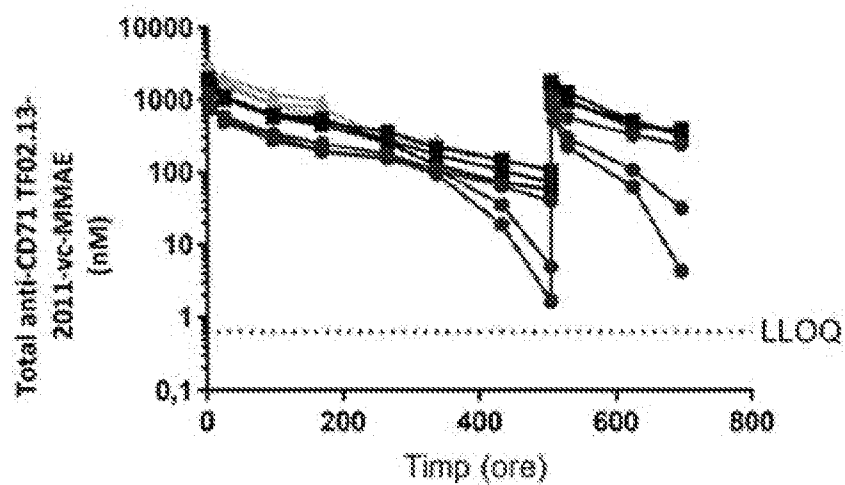


FIG. 8A



Grup 2

Grup 3

Grup 4

FIG. 8B

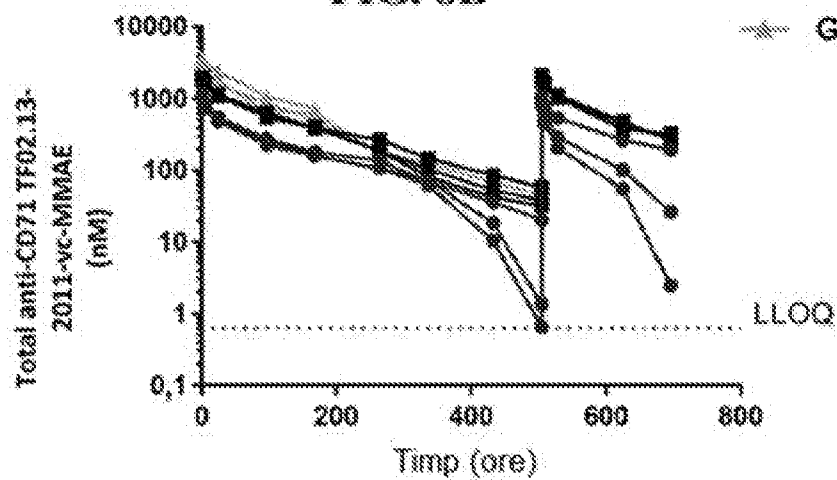


FIG. 9A

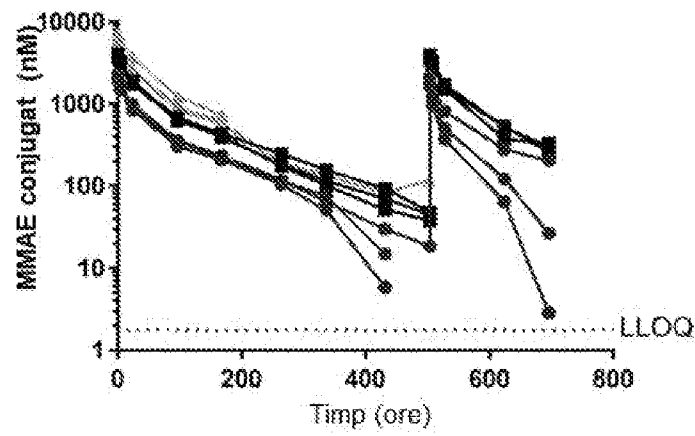


FIG. 9B

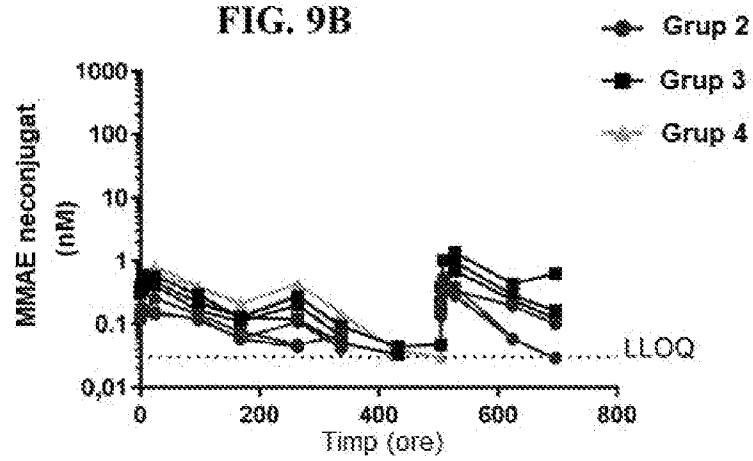


FIG. 10

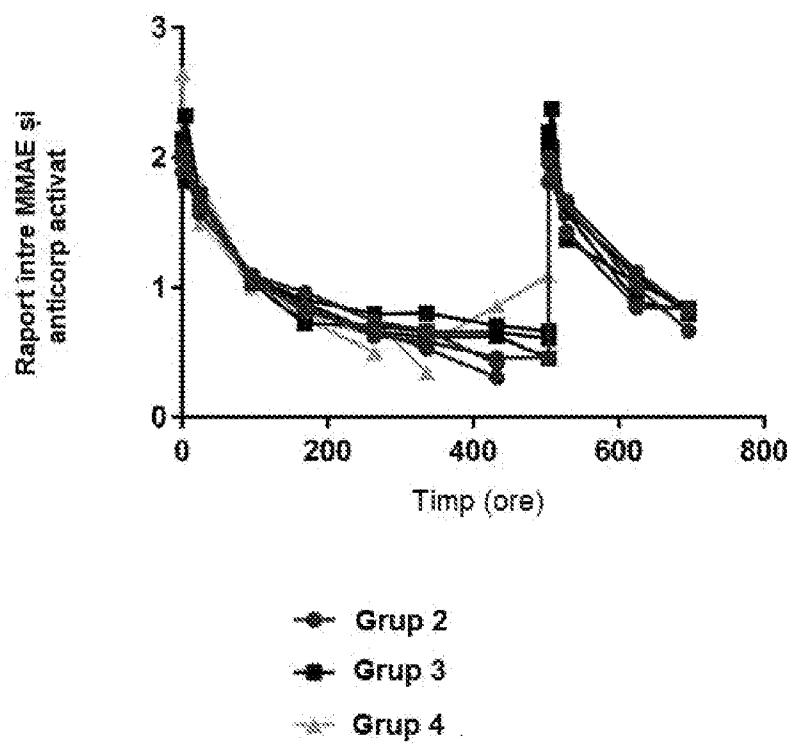


FIG. 11

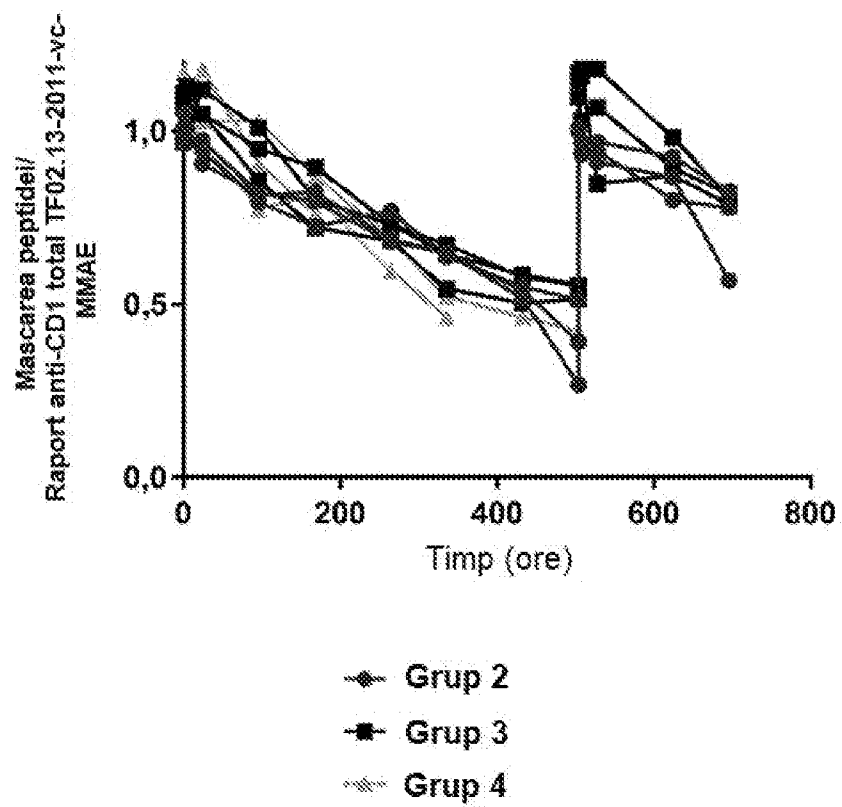


FIG. 12

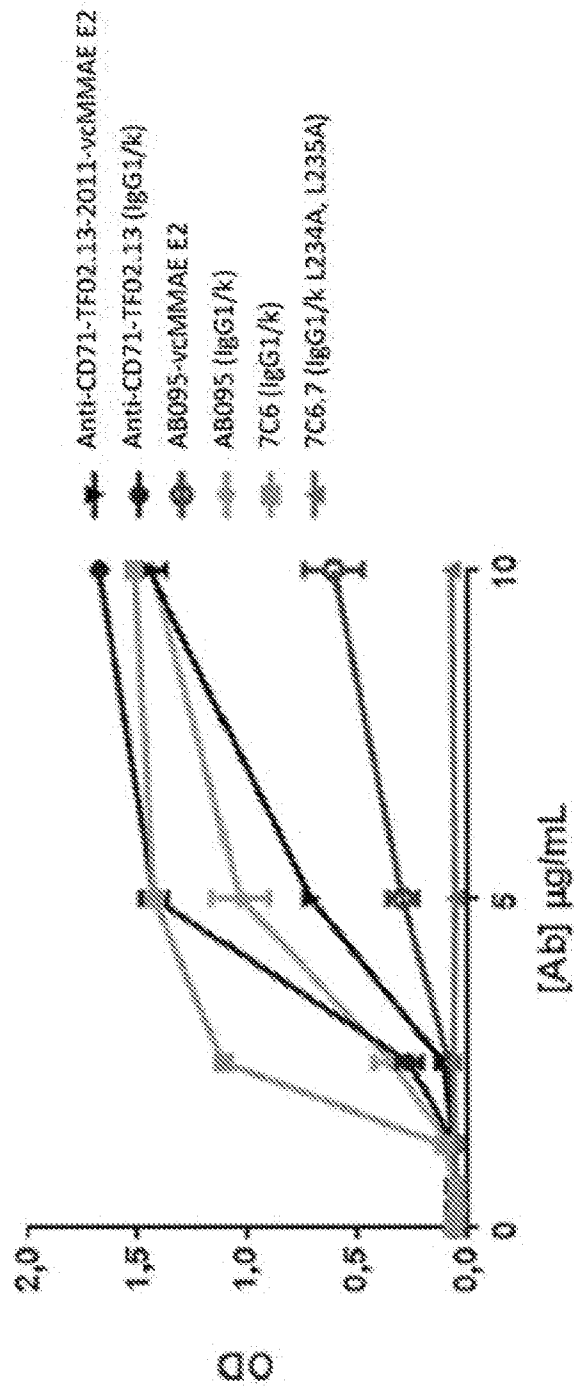


FIG. 13
CDX SW-48 de șoarece

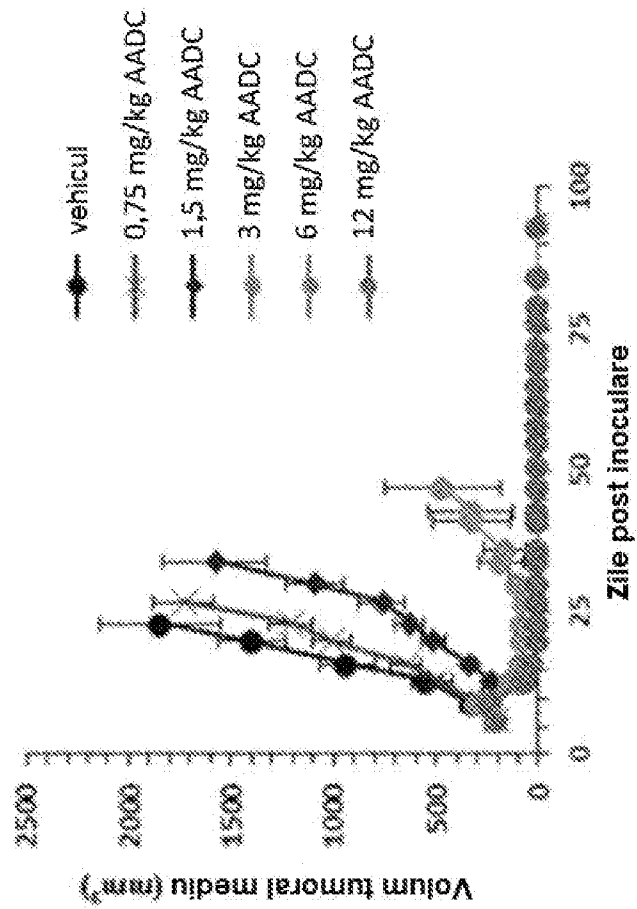


FIG. 14
PDX DLBCL de șoarece

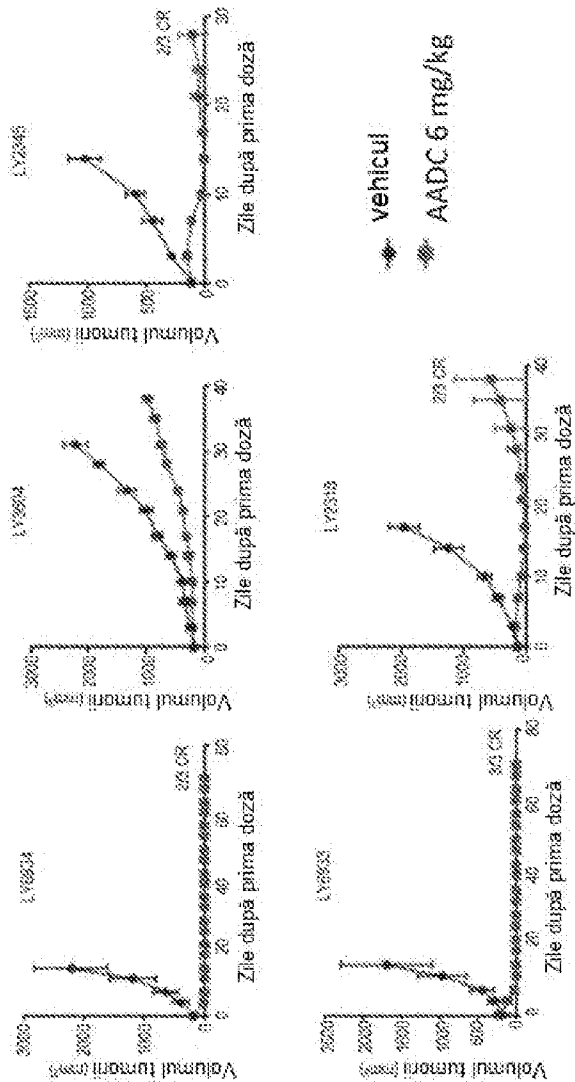


FIG. 15A: PDX de șoarece

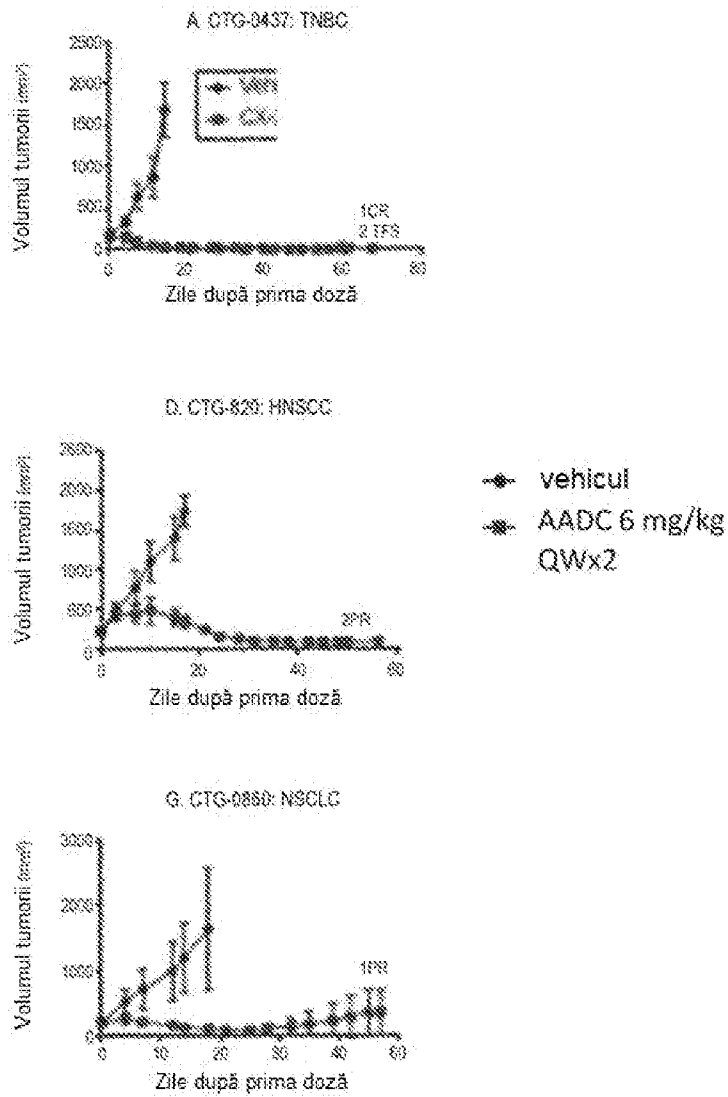


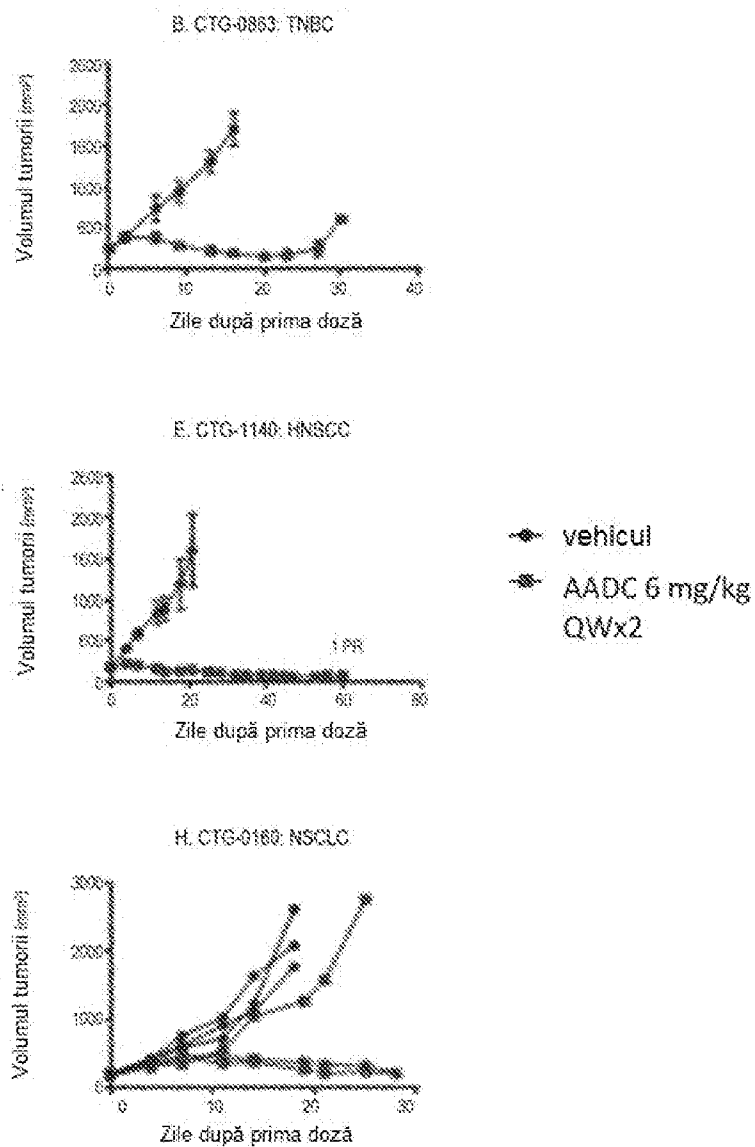
FIG. 15B: PDX de șoarece

FIG. 15C: PDX de șoarece

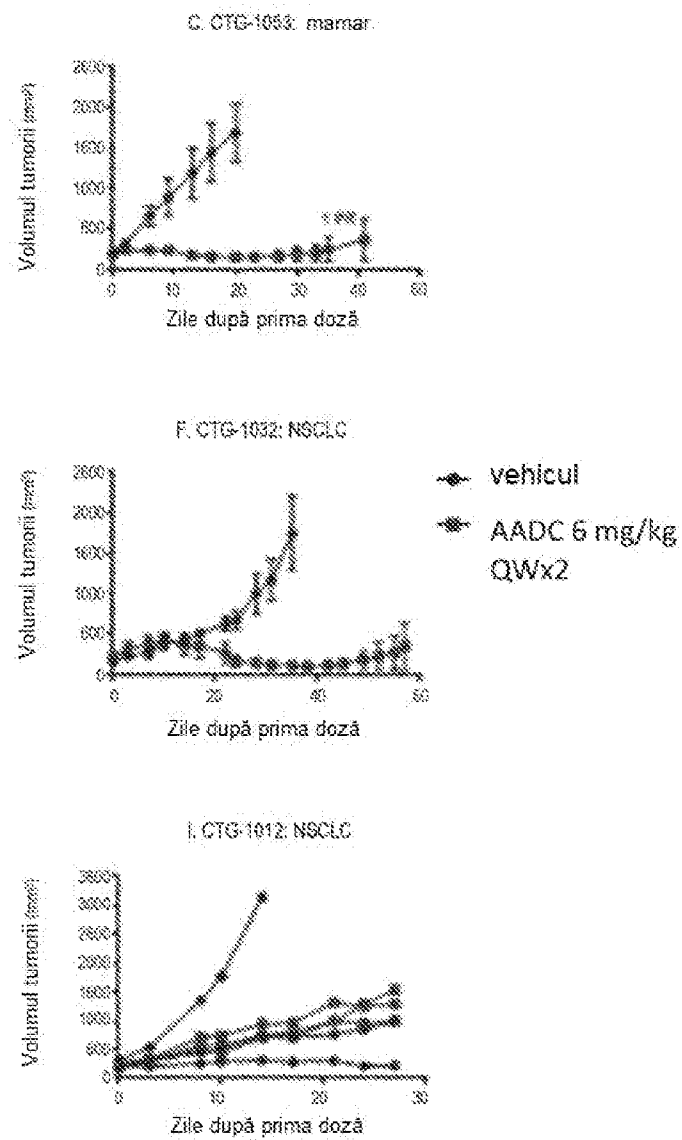


FIG. 16
PDX pancreatic

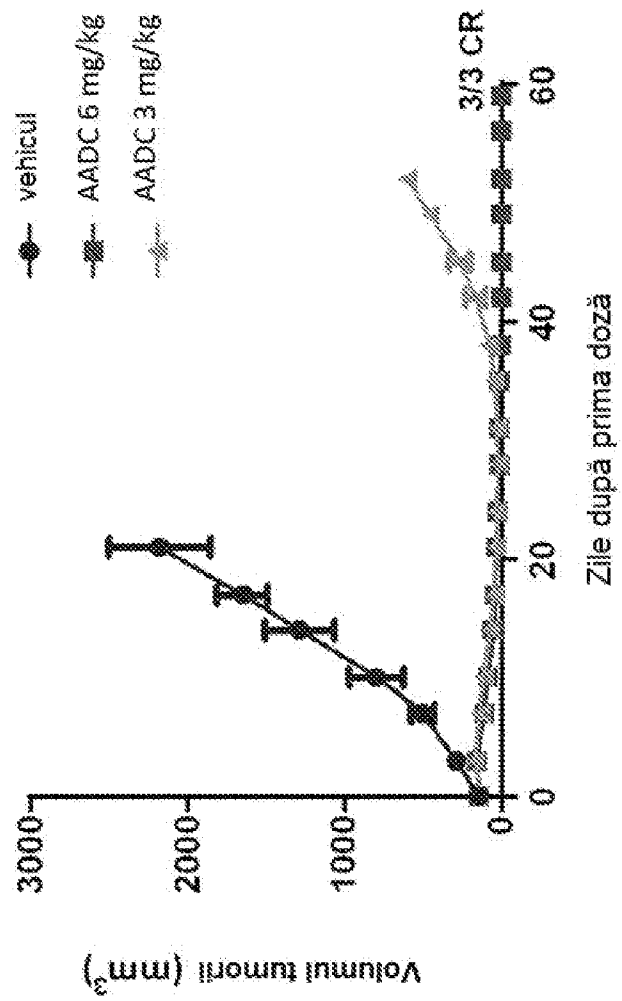


FIG. 17

**Rezumatul tolerabilității și stabilității AADC și ADC anti-CD71
la maiințele cinomolgus**

Articol de test (raport medicament- proteină (DAR))	Doză (mg/kg)	Pierdere greutate corporală	Nr. mediu de neutrofile $\pm$ SD (pe μ L)	Stab. relativă a antic. activ. circulant	Semne clinice/ tolerabilitate
Anti-CD71 TF02.13-3011- vc-MMAE (~3)	6	~10%	98 $\pm$ 60	mai scăzut	Neutropenie severă, letargie, inapetență Netolerat
Anti-CD71 TF02.13-2011- vc-MMAE (~3)	6	~8%	290 $\pm$ 290	ridicat	Nici una Tolerat
Anti-CD71 TF02.13-2011- vc-MMAE E2 (~2)	12	0%	180 $\pm$ 210	ridicat	Nici una. Tolerat
Anti-CD71-vc-MMAE E2 (~2)	2	~8%	70	N/A	Letal la ~ 1 săpt. după prima doză

FIG. 18A

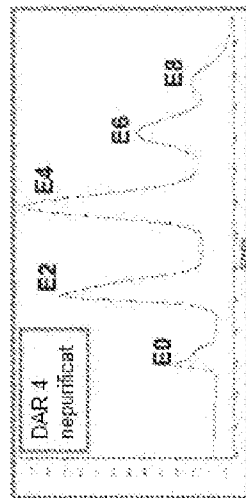


FIG. 18B

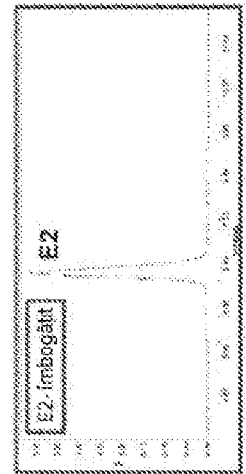


FIG. 18C

