



УКРАЇНА

(19) **UA**  
(51) МПК(11) **122331**(13) **C2****A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61P 35/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2017 09177**  
(22) Дата подання заявки: **09.03.2016**  
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **27.10.2020**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/130,476**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **09.03.2015**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.02.2018, Бюл.№ 3**  
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **26.10.2020, Бюл.№ 20**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2016/021592, 09.03.2016**

(72) Винахідник(и):  
**Рудра-Гангулі Нандіні (US),  
Лоу Крістін (US),  
Малік Файзал Гайат (US),  
Моон Сунг Дзу (US),  
Снайдер Джош (US),  
Авіна Гектор (US),  
Вайрата Сайрус (US),  
Капо Лінет (US),  
Лю Гао (US)**  
(73) Володілець (володільці):  
**ЕДЖЕНСІС, ІНК.,  
1800 Stewart Street Santa Monica, CA 90404,  
United States of America (US)**  
(74) Представник:  
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.  
№367**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
**US 7534867 B1, 19.05.2009  
WO 2009155015 A1, 23.12.2009  
WO 200189577 A2, 29.11.2001  
PILOTO OBDULIO et al. IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. Cancer research, American association for cancer research, US, 2006, Vol. 66, no. 9, P. 4843 – 4851  
WILLIAMS B. et al. Cell-based selection of internalizing fully human antagonistic antibodies directed against FLT3 for suppression of leukemia cell growth. Leukemia, 2005, Vol. 19, no. 8, P. 1432 – 1438**

**(54) АНТИТІЛО ПРОТИ FLT3 ТА КОН'ЮГАТ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ (ADC), ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З БІЛКОМ FLT3**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що специфічно зв'язується з FLT3 та кон'югата антитіло-лікарський засіб (ADC), що зв'язується з білком FLT3 і

**UA 122331 C2**

його варіантами. FLT3 має чітко виражений і обмежений профіль експресії в нормальній тканині/тканинах у дорослих, і його експресія змінена в злоякісних пухлинах, наведених у таблиці 1. Таким чином, ADC за винаходом забезпечують терапевтичну композицію для лікування злоякісної пухлини.

Перехресне посилання на споріднені заявки

[0001] За даною заявкою заявляється пріоритет попередньої патентної заявки Сполучених Штатів Америки №62/130476, поданої 09 березня 2015 року, зміст якої повністю включений як посилання.

5       Подача переліку послідовностей у текстовому файлі ASCII

[0002] Зміст наступної подачі текстового файлу ASCII повністю включений в даний документ як посилання: машиночитана форма (CRF) списку послідовностей (назва файлу: 511582009240SeqList.txt, дата запису: 7 березня 2016 року, розмір: 44,847 байт).

Заява прав на винаходи, зроблені за рахунок фінансування з федерального бюджету

10       [0003] Не застосовно.

Галузь техніки, до якої належить винахід

[0004] Винахід, описуваний у даному документі, стосується антитіл, їх антигензв'язувальних фрагментів і кон'югатів таких антитіл з лікарським засобом (ADC), що зв'язуються з білками, які називаються FLT3. Крім того, винахід стосується прогностичних, профілактичних і терапевтичних способів і композицій, які корисні для лікування злоякісних пухлин, які експресують FLT3.

Рівень техніки, що передує винаходу

[0005] По оцінках у 2013 році в 1660290 чоловіків і жінок (854790 чоловіків і 805500 жінок) була діагностована злоякісна пухлина і 580350 чоловіків і жінок померли від злоякісних пухлин різних органів і тканин. У період з 2006 по 2010 роки, середній вік на момент встановлення діагнозу злоякісної пухлини різних органів і тканин складав 66 років. Частота зустрічальності з поправкою на вік склала 463,0 на 100000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на випадках, діагностованих у 2006-2010 у 18 географічних областях SEER (Примітка: SEER=Програма спостережень, епідеміології і кінцевих результатів, національний інститут раку). У 2006-2010 середній вік смерті від злоякісних пухлин різних органів і тканин складав 72 роки. Смертність з поправкою на вік складала 176,4 на 100000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на пацієнтах, які померли в 2006-2010 роках у США. Загальна п'ятирічна відносна виживаність для 2003-2009 років з 18 географічних областей SEER склала 65,8%.

[0006] Лейкози являють собою злоякісні пухлини, що починаються в кровотворній тканині, такий як кістковий мозок, і викликають вироблення і вихід у кровотік аномально великого числа клітин крові. Основні лейкози включають гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), хронічний мієлогенний лейкоз (ХМЛ) і волосатоклітинний лейкоз (ВКЛ).

[0007] Для групи цих лейкозів по оцінках у 48610 чоловіків і жінок діагностований лейкоз (27880 чоловіків і 20730 жінок) і 23720 чоловіків і жінок померли від лейкозу в 2013 році. У 2006-2010 році середній вік на момент постановки діагнозу лейкозу складав 66 років. Частота зустрічальності з поправкою на вік склала 12,8 на 100000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на випадках, діагностованих у 2006-2010 роках у 18 географічних областях SEER. У 2006-2010 роках середній вік смерті від лейкозу склав 75 років. Смертність з поправкою на вік складала 7,1 на 100000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на пацієнтах, які померли в 2006-2010 роках у США. Загальна п'ятирічна відносна виживаність для 2003-2009 років з 18 географічних областей SEER склала 56,0%.

[0008] ХЛЛ являє собою другий найбільш поширений тип лейкозу в дорослих, і, як правило, погіршення настає повільно. Він часто зустрічається в середньому віці і старше і рідко зустрічається в дітей. Пацієнтів з ранньою стадією ХЛЛ не лікують хіміотерапією, доти, поки в них не з'являються симптоми або вони не починають демонструвати швидке прогресування захворювання. Ранній початок хіміотерапії не має переваг при ХЛЛ і може навіть підвищити смертність. Коли починають хіміотерапію, аналог нуклеозидів флударабін є найбільше широко використовуваною терапією першої лінії при ХЛЛ. Комбіновані схеми лікування показали поліпшену частоту відповідей у декількох клінічних випробуваннях і включають наступні: флударабін, циклофосфамід і ритуксимаб (FCR); пентостатин, циклофосфамід і ритуксимаб (PCR); флударабін, циклофосфамід і мітоксантрон (FCM); циклофосфамід, вінкристин, і преднізон (CVP); циклофосфамід, доксорубіцин, вінкристин і преднізон (CHOP). По оцінках у 15,680 чоловіків і жінок (9,720 чоловіків і 5,960 жінок) буде діагностований хронічний лімфоцитарний лейкоз і 4,580 чоловіків і жінок помруть від хронічного лімфоцитарного лейкозу в 2013 році. У 2006-2010 роках, середній вік на момент постановки діагнозу хронічного лімфоцитарного лейкозу складав 71 рік. Частота зустрічальності з поправкою на вік склала 4,3 на 100,000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на випадках, діагностованих у 2006-2010 роках у 18 географічних областях SEER. У 2006-2010 середній вік смерті від хронічного лімфоцитарного лейкозу склав 79 років. Смертність з поправкою на вік складала 1,4 на 100,000

чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на пацієнтах, які померли в 2006-2010 роках у США. Загальна п'ятирічна відносна виживаність для 2003-2009 років з 18 географічних областей SEER склала 79,2%.

[0009] Гострий мієлолейкоз (ГМЛ) являє собою найбільш поширений тип гострого лейкозу в дорослих. Поточне лікування ГМЛ повинне бути досить агресивним для того щоб досягти повної ремісії (ПР), оскільки часткова ремісія не приносить істотної користі для виживання. Відсоток пацієнтів з ремісією в дорослих з ГМЛ зворотно пропорційний віку, з очікуваним відсотком ремісії не більше 65% для пацієнтів молодше 60 років. Дані дозволяють припустити, що після досягнення ремісії, її тривалість може бути коротшою в пацієнтів більш старшого віку. Пацієнти, які експресують антиген клітини-попередника CD34 і/або Р-глікопротеїн (продукт гена MDR1), мають гірший результат. Цитогенетичний аналіз надає найбільш сильну з доступної прогностичної інформації, прогнозуючи як результат індукції ремісії, так і результат терапії після ремісії. Цитогенетичні аномалії, що вказують на гарний прогноз, включають t(8; 21), inv(16) або t(16;16), і t(15;17). Нормальна цитогенетика прогнозує середній ризик ГМЛ. Пацієнти з ГМЛ, що характеризуються делеціями довгих плечей або моносомією по хромосомах 5 або 7, транслокаціями або інверсіями хромосоми 3, t(6; 9), t(9; 22) або порушеннями хромосоми 1, 1q23, мають особливо поганий прогноз відносно хіміотерапії. По оцінках у 14,590 чоловіків і жінок (7,820 чоловіків і 6,770 жінок) буде діагностований гострий мієлолейкоз і 10,370 чоловіків і жінок помруть від гострого мієлолейкозу в 2013. У 2006-2010 роках, середній вік на момент постановки діагнозу гострого мієлолейкозу склав 67 років. Частота зустрічальності з поправкою на вік склала 3,7 на 100,000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на випадках, діагностованих у 2006-2010 роках у 18 географічних областях SEER. У 2006-2010 роках середній вік смерті від гострого мієлолейкозу склав 72 року. Смертність з поправкою на вік складала 2,8 на 100,000 чоловіків і жінок на рік. Ці частоти ґрунтуються на пацієнтах, які померли в 2006-2010 роках у США. Загальна п'ятирічна відносна виживаність для 2003-2009 років з 18 географічних областей SEER склала 24,2%. Варто відмітити, що, усю загальну інформацію зі злоякісних пухлин одержували з веб-сайту NCI ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)), і всі статистичні дані основані на статистичних даних по зустрічальності з SEER і статистичних даних по смертності з Національного центра медичної статистики (NCHS), які були знайдені в: Howlader N., et. al, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/), на підставі завантаження даних SEER на листопад 2012 року, опублікованих на веб-сайті SEER, 2013 року.

[0010] Гострий лімфобластний лейкоз ("ГЛЛ") являє собою групу злоякісних новоутворень лімфоїдних клітин на стадії попередників В/Т-клітин, що виникають через генетичні зміни, які блокують диференціювання лімфоїдних клітин і приводять до порушеної клітинної проліферації і виживаності. За останні кілька десятиліть були досягнуті примітні успіхи в лікуванні дитячого ГЛЛ, і п'ятирічні коефіцієнти виживаності зараз досягають 90%. Однак аж до 20% дітей залишаються несприятливими до лікування або в них розвивається рецидив після лікування, і коефіцієнт безпідійної виживаності для цих пацієнтів залишається поганим. Лікувати дорослих пацієнтів з ГЛЛ також складно через високу частоту рецидивів навіть після значного прогресу в сучасній хіміотерапії. В останні десятиліття були досягнуті швидкі поліпшення в результатах лікування ГЛЛ, які, в основному, основані на інтенсифікації й оптимізації хіміотерапії, ризик-адаптованого використання трансплантації стовбурових клітин, а також індивідуалізованої і спрямованої терапії, у тому числі моноклональних антитіл. За допомогою секвенування наступного покоління оцінюють додаткові мутації, які порушують нормальний лімфопоез, і значимість взаємодіючих мутацій, а також епігенетичні зміни. Дані, отримані в такий спосіб допоможуть в оцінці прогнозу окремого пацієнта але, що важливо, також у впровадженні спрямованої терапії, що відповідає мутаційним порушенням.

[0011] Крім того, реалізується терапевтична корисність моноклональних антитіл (MAT) (G. Kohler і C.Milstein, Nature 256:495-497 (1975)). Моноклональні антитіла в даний час схвалені як терапія при трансплантації, злоякісній пухлині, інфекційному захворюванні, серцево-судинному захворюванні і запаленні. Різні ізотипи мають різні ефекторні функції. Такі відмінності у функціях відбиті у відмінних тривимірних структурах для різних ізотипів імуноглобулінів (P.M. Alzari et al, Annual Rev. Immunol., 6:555-580 (1988)).

[0012] Оскільки миші зручні для імунізації і розпізнають більшість антигенів людини як чужорідні MAT з терапевтичним потенціалом проти мішеней людини мають, як правило, мишаче походження. Однак мишачі MAT мають властиві їм недоліки як терапевтичні засоби для людини. Вони вимагають більш частого дозування, оскільки MAT мають більш короткий час напівжиття в циркуляції в людей, ніж антитіла людини. Більш принципово те, що повторне введення антитіл миші в імунну систему людини змушує імунну систему людини відповідати,

розпізнаючи білок миші як чужорідний і генеруючи відповідь у вигляді людського антитіла до антитіла миші (НАМА). Така відповідь з НАМА може привести до алергійної реакції і швидкого видалення антитіла миші з циркуляції, тим самим роблячи марним лікування мишачим антитілом. Щоб уникнути таких впливів, були початі спроби створити імунну систему людини усередині мишей.

[0013] Початковим сподівалися створити трансгенних мишей, здатних відповідати на антигени антитілами з людськими послідовностями (См. Bruggemann et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989)), але були обмеження по кількості ДНК, яка могла стабільно зберігатися в доступних клонуючих носіях. Використання клонуючих векторів на основі штучної дріжджової хромосоми (YAC) привело до уведення великих фрагментів локусу Ig зародкової лінії людини в трансгенних ссавців. По суті більшість областей V, D, і J генів людини, розташованих з однаковим інтервалом і знайдених у геномі людини, і константні області людини були введені в мишей з використанням YAC. Одна лінія таких трансгенних мишей відома як миші XenoMouse® і вона комерційно доступна в Amgen Fremont, Inc. (Fremont CA), що була Abgenix, Inc.

[0014] Крім того, антитіла можна одержувати з використанням трансгенних мишей Veloclmmune, у яких геномні послідовності, що несуть мишачі ендегенні локуси варіабельних сегментів важкого ланцюга імуноглобуліну (сегменти VH, DH і JH) і/або легкого ланцюга каппа (VK і JK), були замінені, повністю або частково, геномними послідовностями людини, що несуть неаранжовані локуси варіабельних сегментів важкого ланцюга імуноглобуліну людини (VH, DH, і JH) і/або легкого ланцюга каппа (VK і JK) (Regeneron, Tarrytown, NY) зародкової лінії. Див., наприклад, патенти США №№. 6586251, 6596541, 7105348, 6528313, 6638768 і 6528314.

Суть винаходу

[0015] Винахід стосується антитіл, антигензв'язувальних фрагментів і кон'югатів таких антитіл з лікарським засобом (ADC), які зв'язуються з білками FLT3 і поліпептидними фрагментами білків FLT3. У певних варіантах здійснення винахід включає повнорозмірні антитіла людини, кон'юговані з терапевтичним засобом. У певних варіантах здійснення існує виняток, коли не кодують повну послідовність нуклеїнової кислоти з фігури 2A і/або 2B і/або не одержують повну амінокислотну послідовність з фігури 3A і/або 3B. У певних варіантах здійснення кодують повну послідовність нуклеїнової кислоти з фігури 2A і/або 2B і/або одержують повну амінокислотну послідовність з фігури 3A і/або 3B, кожна з яких знаходиться у відповідних стандартних лікарських формах для людини.

[0016] Винахід додатково стосується різних імуногенних або терапевтичних композицій, таких як кон'югати антитіло-лікарський засіб, і стратегій для лікування злоякісних пухлин, які експресують FLT3, таких як злоякісні пухлини тканин, перераховані в таблиці I (наприклад, ГМЛ, ГПЛ, включаючи В-клітинний лімфобластний лейкоз і лімфобластний лейкоз попередників В-клітин).

Короткий опис креслень

[0017] Фігура 1. кДНК і амінокислотна послідовність FLT3 показані на фігурі 1. Початковий метіонін підкреслений. Відкрита рамка зчитування охоплює нуклеїнову кислоту в межах 67-3048, включаючи стоп-кодон.

[0018] Фігура 2A. кДНК і амінокислотна послідовність важкого ланцюга CHv62.21. Варіабельна область важкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, і константна область важкого ланцюга IgG1 людини підкреслена.

[0019] Фігура 2B. кДНК і амінокислотна послідовність легкого ланцюга CHv62.21 і легкого ланцюга CHv62.21pAF. Варіабельна область легкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, константна область каппа людини підкреслена.

[0020] Фігура 2C. кДНК і амінокислотна послідовність важкого ланцюга CHv62.21, модифікованого шляхом вставки неприродної амінокислоти. Знаком X відзначене розташування амбер-кодона для вставки неприродної амінокислоти ("npAA") пара-ацетилфенілаланіну (pAF) у залишку 371 нуклеїнової кислоти. Варіабельна область важкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, і константна область важкого ланцюга IgG1 людини підкреслена.

[0021] Фігура 3A. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга CHv62.21. Варіабельна область важкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, і константна область важкого ланцюга IgG1 людини підкреслена.

[0022] Фігура 3B. Амінокислотна послідовність легкого ланцюга CHv62.21 і легкого ланцюга CHv62.21pAF. Варіабельна область легкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, константна область каппа людини підкреслена.

[0023] Фігура 3C. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга CHv62.21. Амінокислотне положення 124, позначене X, являє собою розташування амбер-кодона для вставки

неприродної амінокислоти ("npAA") пара-ацетилфенілаланіну (pAF). Варіабельна область важкого ланцюга відзначена подвійним підкресленням, і константна область важкого ланцюга IgG1 людини підкреслена.

[0024] Фігура 4A. Вирівнювання важкого ланцюга CHv62.21 з Ig зародкової лінії людини.

5 [0025] Фігура 4B. Вирівнювання легкого ланцюга CHv62.21 з Ig зародкової лінії людини.

[0026] Фігура 5. Дослідження ефективності і підбору дози CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у моделі підшкірного ксенотрансплантата з лінії клітин MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, імплантованої мишам CB17/SCID.

10 [0027] Фігура 6. Дослідження ефективності CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) і CHv62.21pAF (AGS62P) (голе антитіло) у моделі підшкірного ксенотрансплантата з лінії клітин MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, імплантованої мишам CB17/SCID.

[0028] Фігура 7. CHv62.21 і CHv62.21pAF не опосередковують антитіло залежну цитотоксичність (ADCC) in vitro EOL-1, SEM, і Raji (зліва направо на фігурі). Деталі аналізу: 1) E:T=100:1; 2) концентрація антитіла=2,5 мкг/мл; 3) Час інкубації: 4 години; 4) Контроль ізотипу MAT і ADC: AGS91.1-L363-pAF, AGS91.88-pAF-AGSL-0182-30; 5) Позитивний контроль: ритуксимаб, спрямований на клітини Raji.

[0029] Фігура 8. CHv62.21 демонструє активність, яка неблокує ліганд. MAT-блокатор ліганду FLT3 (1b37.1), що порівнюють з CHv62.21 в аналізі зв'язування лігандів, підтверджує, що MAT CHv62.21 не є блокатором ліганду.

20 [0030] Фігура 9. CHv62.21 не перешкоджає опосередкованій FL проліферації клітин.

[0031] Фігура 10. Цитотоксична активність MAT 1b37.1, яке блокує ліганд FLT3, знижується в присутності FL. Фігура 10(A). Оцінка цитотоксичності in vitro v62-1b21.1-AGL-0129-08 з лігандом і без ліганду FLT3 людини (hFL) на клітинах RS-4-11. Фігура 10(B). Оцінка цитотоксичності in vitro v62-1b37.1-AGL-0129-08 з лігандом і без ліганду FLT3 людини (hFL) на клітинах RS-4-11.

25 [0032] Фігура 11. Ліганд FLT3 не заважає цитотоксичності, опосередкованій CHv62.21pAF-AGL-0182-30, на клітинах MOLM-13. Фігура 11(A). Оцінка зв'язування біотинільованих CHv62.21pAF і v62-1b37.1 у присутності ліганда FLT3 людини на клітинах MOLM-13. Фігура 11(B). Оцінка цитотоксичності in vitro CHv62.21pAF-AGL-0182-30 з лігандом і без ліганду FLT3 людини на клітинах MOLM-13.

30 [0033] Фігура 12. Стабільність in vitro CHv62.21pAF-AGL-0182-30. Фігура 12(A). Оцінка стабільності CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у сироватці людини. Фігура 12(B). Оцінка стабільності CHv62-AGL-0301-20 у сироватці людини.

[0034] Фігура 13. Дослідження ефективності CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) і CHv62.21pAF (голе антитіло) у моделі підшкірного ксенотрансплантата з лінії клітин MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, імплантованої мишам CB17/SCID, за допомогою режиму багаторазових доз.

35 [0035] Фігура 14. Ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у моделі вводи підшкірно ксенотрансплантата SEM-xcl.

Детальний опис винаходу

40 Короткий опис розділів

I.) Визначення

II.) Антитіла до FLT3

III.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб загалом

III(A). Майтанзиноїди

45 III(B). Ауристатини і доластатини

III(C). Каліхіміцин

III(D). Інші цитотоксичні засоби

IV.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб, що зв'язуються з FLT3

V.) Лінкерні групи

50 VI.) Подовжувальна група

VII.) Амінокислотна група

VIII.) Спейсерна група

IX.) Група лікарського засобу

X.) Вміст лікарського засобу

55 XI.) Способи визначення цитотоксичного ефекту ADC

XII.) Лікування злоякісної пухлини/пухлин, які експресують FLT3

XIII.) FLT3 як мішень для терапії на основі антитіл

XIV.) Суміші ADC до FLT3

XV.) Комбіноване лікування

60 XVI.) Набори/Промислові вироби

## I.) Визначення:

[0036] Якщо не визначене інше, усі терміни в галузі винаходу, позначення й інші наукові терміни або термінологія, використані в даному документі, мають значення, у якому їх звичайно розуміють фахівці в галузі, до якої належить винахід. У деяких випадках, терміни з загальноприйнятими значеннями визначені в даному документі для ясності і/або для одержання довідки, і включення таких визначень у даний документ не обов'язково повинне тлумачитися як наявність істотних відмінностей від того, як це розуміється в даній галузі. Багато зі способів і процедур, описаних або згаданих у даному документі добре зрозумілі і широко використовуються за допомогою загальноприйнятої методології фахівцями в даній галузі, такі як, наприклад, широко використовувані методології молекулярного клонування, описані в Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. При необхідності, процедури, пов'язані з використанням комерційно доступних наборів і реагентів, звичайно виконують відповідно до протоколів і/або параметрів, визначених виробником, якщо не вказано інакше.

[0037] При вказівці торгового найменування в даному документі, посилання на торгове найменування також належать до складу продукту, непатентованому лікарському засобу, і активному фармацевтичному інгредієнту/інгредієнтам продукту з торговим найменуванням, якщо інше не вказано в контексті.

[0038] Терміни "прогресуюча злоякісна пухлина", "місцево-поширений рак", "прогресуюче захворювання" і "місцевопоширене захворювання" означають злоякісні пухлини, які поширилися через відповідну тканинну капсулу, і включають стадію захворювання C по системі Американської урологічної асоціації (AUA), стадію захворювання C1-C2 по системі Уїтмора-Джеветта, і стадію захворювання T3-T4 і N+ по системі TNM (пухлина, вузол, метастаз). Звичайно, пацієнтам з місцевопоширеним захворюванням операція не рекомендована, і ці пацієнти мають по суті менш сприятливих результати порівняно з пацієнтами з клінічно локалізованою (у рамках одного органа) злоякісною пухлиною.

[0039] Термін "алкіл" сам по собі або як частина іншого терміна стосується насиченого вуглеводню C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, який містить нормальні, вторинні, третинні або циклічні атоми вуглецю. Зокрема, алкільними групами є ті групи, які мають від 1 до 8 атомів вуглецю, від 1 до 6 атомів вуглецю, або від 1 до 4 атомів вуглецю. Приклади алкільних груп як необмежувальні приклади включають: метил (Me), етил (Et), н-пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, втор-бутіл, трет-бутіл (tBu), н-пентил, ізопентил, трет-пентил, і н-гексил, ізогексил. У певних варіантах здійснення алкільна група має нормальні, вторинні або третинні атоми вуглецю і не має циклічних атомів вуглецю.

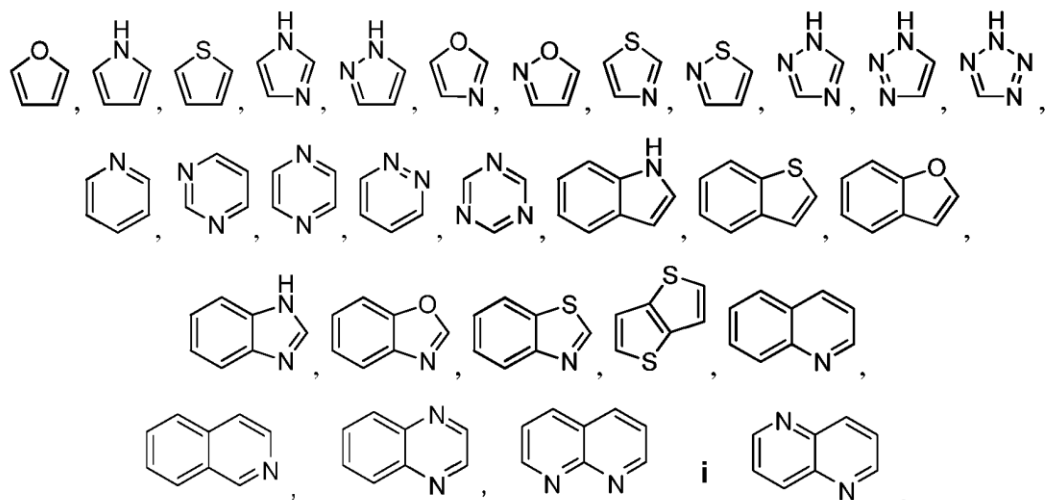
[0040] Термін "алкеніл" сам по собі або як частина іншого терміна стосується вуглеводню C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, що містить нормальні, вторинні, третинні або циклічні атоми вуглецю, щонайменше, з однією ненасиченою ділянкою, тобто, вуглець-вуглець, подвійний зв'язок sp<sup>2</sup>. Зокрема, алкенільними групами є ті групи, які мають від 2 до 8 атомів вуглецю, від 2 до 6 атомів вуглецю, або від 2 до 4 атомів вуглецю. Приклади як необмежувальні приклади включають: вініл (-CH=CH<sub>2</sub>), аліл (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), циклопентеніл (-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>) і 5-гексеніл (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>). У певних варіантах здійснення алкенільна група має нормальні, вторинні або третинні атоми вуглецю і не має циклічних атомів вуглецю.

[0041] Термін "алкініл" сам по собі або як частина іншого терміна стосується вуглеводню C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, що містить нормальні, вторинні, третинні або циклічні атоми вуглецю, щонайменше, з однією ненасиченою ділянкою, тобто, вуглець-вуглець, потрійний зв'язок sp. Зокрема, алкінільними групами є ті групи, які мають від 2 до 8 атомів вуглецю, від 2 до 6 атомів вуглецю, або від 2 до 4 атомів вуглецю. Приклади як необмежувальні приклади включають: етиніл (-C≡CH) і 2-пропініл (-CH<sub>2</sub>C≡CH). У певних варіантах здійснення алкінільна група має нормальні, вторинні або третинні атоми вуглецю і не має циклічних атомів вуглецю.

[0042] Термін "алкокси" стосується -О-алкільної групи, де О є точкою приєднання іншої частини молекули, і алкіл визначений вище.

[0043] Термін "гетероциклоалкіл" стосується моноциклічної, або злитої, у вигляді містка, або спіральної поліциклічної кільцевої структури, яка є насиченою або частково насиченою і має від 3 до 12 атомів кільця на кільцеву структуру, вибраних з атомів вуглецю і до трьох гетероатомів, вибраних з азоту, кисню і сірки. Зокрема, гетероциклоалкільними групами є ті групи, що мають від 3 до 8 атомів кільця або від 5 до 7 атомів кільця на кільцеву структуру. Кільцева структура може необов'язково містити до двох оксогруп на вуглеці або сірці в складі кільця. Ілюстративні об'єкти, у формі відповідним чином зв'язаних компонентів, включають:

5



10

15

20

[0049] Будь-яка формула, приведена в даному документі, призначена для представлення сполук, що мають структури, зображені структурною формулою, а також певних варіацій або форм. Зокрема, сполуки з будь-якою формулою, приведеною в даному документі, можуть мати центри асиметрії і, таким чином, існувати в різних енантіомерних формах. Всі оптичні ізомери і стереоізомери сполук із загальної формули, і їхні суміші, розглядаються в об'єму формули. Таким чином, будь-яка формула, приведена в даному документі, призначена для представлення рацемата, однієї або декількох енантіомерних форм, однієї або декількох діастереоізомерних форм, однієї або декількох атропоізомерних форм і їхніх сумішей. Крім того, визначені структури можуть існувати у вигляді геометричних ізомерів (тобто, цис- і трансізомерів), у вигляді таутомерів, або у вигляді атропоізомерів. Крім того, будь-яка формула, приведена в даному документі, стосується також будь-яких з гідратів, сольватів і аморфних і поліморфних форм таких сполук, і їхні суміші, навіть якщо такі форми явно не перераховані. У певних варіантах здійснення розчинник являє собою воду і сольвати являють собою гідрати.

[0050] Будь-яка формула, приведена в даному документі, також призначена для представлення немічених форм, а також форм сполук, мічених ізотопами. Сполуки, мічені ізотопами, мають структури, зображені за допомогою формул, наведених у даному документі, за винятком одного або декількох атомів, які заміщені атомом з вибраною атомною масою або масовим числом. Приклади ізотопів, які можна вводити в сполуки, описувані в даному документі, включають ізопои водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, фтору, хлору і йоду, такі як  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  і  $^{125}\text{I}$ , відповідно. Такі сполуки, мічені ізотопами, підходять для метаболічних досліджень (переважно з  $^{14}\text{C}$ ), дослідження кінетичних реакцій (наприклад, з  $^2\text{H}$  або  $^3\text{H}$ ), способів детекції або візуалізації [таких як позитронно-емісійна томографія (PET) або однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (SPECT)], включаючи аналізи розподілу в тканині лікарського засобу або субстрату, або для радіоактивного лікування пацієнтів. Зокрема, сполука, мічена  $^{18}\text{F}$  або  $^{11}\text{C}$ , може бути особливо переважною для досліджень PET або SPECT. Крім того, заміна більш важкими ізотопами, такими як дейтерій (тобто,  $^2\text{H}$ ) може давати певні терапевтичні переваги в результаті більш високої метаболічної стабільності, наприклад, підвищеного часу напівжиття in vivo або знижених вимог до дозування. Сполуки, мічені ізотопами, які описані в даному документі, і їхні пролікарські засоби, як правило, можна одержувати, способами, описаними у схемах або у прикладах і одержанні препаратів, описаних нижче, шляхом заміни легкодоступним реагентом, міченим ізотопом, реагенту, не міченого ізотопом.

[0051] При звертанні до будь-якої формули, наведеної в даному документі, вибір конкретного компонента зі списку можливих видів для вказаної змінної не означає такий же вибір видів для змінної, що з'являється в іншому місці. Іншими словами, там де змінна з'являється більше одного разу, вибір видів із вказаного списку є незалежним від вибору видів для тієї ж самої змінної в іншому місці формули, якщо не вказано інакше.

[0052] Номенклатура " $\text{C}_{i-j}$ ", де  $j > i$  стосовно класу замісників у даному документі призначена для позначення варіантів здійснення будь-яких композицій, застосувань або способів, описуваних у даному документі, для яких незалежно реалізуються все і кожне число вуглецевих одиниць, від  $i$  до  $j$ , включаючи  $i$  і  $j$ . Як приклад, термін  $\text{C}_{1-3}$  стосується незалежно варіантів здійснення, що мають одну вуглецеву одиницю ( $\text{C}_1$ ), варіантів здійснення, що мають дві вуглецеві одиниці ( $\text{C}_2$ ), і варіантів здійснення, що мають три вуглецеві одиниці ( $\text{C}_3$ ).

[0053] Термін  $\text{C}_{n-m}$ -алкіл стосується нерозгалуженого або розгалуженого аліфатичного ланцюга з загальною кількістю  $N$  вуглецевих одиниць у ланцюзі, що відповідає вимогам  $n \leq N \leq m$ , де  $m > n$ .

[0054] Хімічні найменування, які перелічуються в даному документі, одержували з використанням програмного забезпечення AutoNOM™. Якщо є розбіжність між хімічною структурою і назвою, визначеною для цієї структури, перевага у структурі.

[0055] Відповідно до вищевказаних розумінь про інтерпретацію присвоювання значень і номенклатури, варто розуміти, що під прямим посиланням в даному документі на множину мають на увазі, хімічно значиме, і якщо не вказано інакше, незалежне посилання на варіанти здійснення такого набору, і посилання на всі і кожний з можливих варіантів здійснення підмножин такої множини є явно вказаним.

[0056] Термін "зміна патерна природного глікозилювання" у даному документі призначений для позначення видалення однієї або декількох вуглеводних груп, які зустрічаються в нативній послідовності FLT3 (або шляхом видалення вихідної ділянки глікозилювання або шляхом видалення глікозилювання хімічними і/або ферментативними способами), і/або додавання однієї або декількох ділянок глікозилювання, які відсутні в нативній послідовності FLT3, де "патерн природного глікозилювання" стосується природного посттрансляційного паттерна

глікозилювання, який є результатом конкретної комбінації послідовності FLT-3, типу клітин і використаних умов росту. Крім того, фраза містить у собі якісні зміни в глікозилюванні нативних білків, що включають зміни природи і співвідношень різних присутніх вуглеводних груп.

[0057] Термін "аналог" стосується молекули, яка структурно подібна або розділяє подібність або відповідні ознаки з іншою молекулою (наприклад, спорідненим FLT3 білком). Наприклад, аналог білка FLT3 міг би специфічно зв'язуватися з антитілом або Т-клітиною, які специфічно зв'язуються з FLT3.

[0058] Термін "антитіло" використовують у найширшому значенні, якщо явно не вказане інше. Таким чином, "антитіло" може бути природним або синтетичним, таким як моноклональні антитіла, вироблені загальноприйнятою технологією гібридами або трансгенними мишами. Антитіла до FLT3 включають моноклональні і поліклональні антитіла, а також фрагменти, які містять антигензв'язувальний домен і/або одну або декілька областей, які визначають комплементарність, цих антитіл. Застосовуваний у даному документі термін "антитіло" стосується будь-якої форми антитіла або його фрагмента, що специфічно зв'язується з FLT3 і/або демонструє бажану біологічну активність, і конкретно включає моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл за умови, що вони специфічно зв'язуються з FLT3 і/або демонструють бажану біологічну активність. Будь-яке специфічне антитіло можна використовувати в способах і композиціях, запропонованих у даному документі. Таким чином, в одному з варіантів здійснення термін "антитіло" включає молекулу, яка містить щонайменше одну варіабельну область з легкого ланцюга молекули імуноглобуліну і щонайменше одну варіабельну область з важкого ланцюга молекули, які у комбінації формують ділянку специфічного зв'язування для антигену-мішені. В одному з варіантів здійснення антитіло являє собою антитіло IgG. Наприклад, антитіло являє собою антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Антитіла, які підходять для даних способів і композицій, можна одержувати в культурі клітин, у фагу, або різних тварин, включаючи як необмежувальні приклади корів, кроликів, кіз, мишей, пацюків, хом'яків, морських свинок, овець, собак, кішок, нелюдиноподібних мавп, шимпанзе і людиноподібних мавп. Таким чином, в одному з варіантів здійснення антитіло за даним винаходом являє собою антитіло ссавця. Способи на основі фагів можна використовувати для виділення вихідного антитіла або для створення варіантів зі зміненими характеристиками специфічності або авідності. Такі способи є звичайними і добре відомими в даній галузі. В одному з варіантів здійснення антитіло вироблене рекомбінантними способами, відомими в даній галузі. Наприклад, рекомбінантне антитіло можна одержувати шляхом трансфекції клітини-хазяїна вектором, що містить послідовність ДНК, яка кодує антитіло. Можна використовувати один або кілька векторів для трансфекції послідовності ДНК, яка експресує щонайменше одну область VL і щонайменше одну область VH у клітині-хазяїні. Ілюстративні описи рекомбінантних способів для створення і продукції антитіл включають Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, et al, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); і CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, найбільш останнє видання). Антитіло за даним винаходом можна модифікувати рекомбінантними способами, щоб підвищити ефективність антитіла в опосередкуванні бажаної функції. Таким чином, у межах об'єму винаходу знаходиться те, що антитіла можна модифікувати шляхом заміни з використанням рекомбінантних способів. Як правило, заміни будуть консервативними замінами. Наприклад, щонайменше, одна амінокислота в константній області антитіла може бути заміщена іншим залишком. Див., наприклад, патент США № 5624821, патент США № 6194551, заявку № WO 9958572; і Angal, et al, Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). Модифікація в амінокислотах включає делеції, додавання і заміни амінокислот. У деяких випадках, такі заміни зроблені для зменшення небажаних дій, наприклад, зумовленої комплементом цитотоксичності. Часто, антитіла мітять, ковалентно або нековалентно приєднуючи речовину, яка забезпечує детектований сигнал. Відомий і широко описаний у науковій і патентній літературі широкий спектр міток і способів кон'югації. Можна проводити відбір цих антитіл по зв'язуванню з нормальним або дефектним FLT3. Див. наприклад, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Прийнятні антитіла з бажаною біологічною дією можна ідентифікувати з використанням наступних аналізів *in vitro*, включаючи як необмежувальні приклади аналізи проліферації, міграції, адгезії, росту на м'якому агарі, ангіогенезу, міжклітинної взаємодії, апоптозу, транспорту, передачі сигналу, і наступних аналізів *in vivo*, таких як інгібування росту пухлини. Антитіла, пропоновані в даному документі, можуть також бути корисними для діагностичного застосування. Як захоплювальні або не-нейтралізуючі антитіла, можна проводити відбір антитіл по їхній здатності зв'язуватися зі

специфічним антигеном без інгібування зв'язування з рецептором або біологічної активності антигена. Як нейтралізуючі антитіла, антитіла можуть бути корисні в аналізах конкурентного зв'язування. Їх також можна використовувати для кількісної оцінки FLT3 або його рецептора.

[0059] Термін "антигензв'язувальний фрагмент" або "фрагмент антитіла" з антитіла (або просто "частина антитіла"), застосовуваний у даному документі, стосується одного або декількох фрагментів антитіла до FLT3, що зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, FLT3 і варіантами; див., фігуру 1). Показано, що антигензв'язувальну функцію антитіла можна виконувати за допомогою фрагментів повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язувальних фрагментів, які включені в термін "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла, включають (i) фрагмент Fab, одновалентний фрагмент, що складається з доменів  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  і  $C_H1$ ; (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , двовалентний фрагмент, що складається з двох фрагментів Fab, з'єднаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) фрагмент Fd складається з доменів  $V_H$  і  $C_H1$ ; (iv) фрагмент Fv, який складається з доменів  $V_L$  і  $V_H$  домени з одного плеча антитіла, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), що складається з домена  $V_H$ ; і (vi) окрема область, яка визначає комплементарність (CDR). Крім того, хоча два домени фрагмента Fv,  $V_L$  і  $V_H$ , кодуються роздільними генами, вони можуть бути з'єднані з використанням рекомбінантних способів за допомогою синтетичного лінкера, що дозволяє їм вироблятися у вигляді єдиного білкового ланцюга, у якому області  $V_L$  і  $V_H$  з'єднані для утворення одновалентних молекул (відомих як одноланцюжкові Fv (scFv); див. наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такі одноланцюжкові антитіла також включені в термін "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла. Ці фрагменти антитіла одержують з використанням загальноприйнятих способів, відомих фахівцям у даній галузі, і роблять відбір фрагментів для використання в такий же спосіб, що і інтактні антитіла.

[0060] Термін "Fc", застосовуваний у даному документі, стосується області, що містить шарнірну область, домени  $CH2$  і/або  $CH3$ .

[0061] Як застосовують у даному документі, будь-яку форму "антигена" можна використовувати для одержання антитіла, яке буде специфічне до FLT3. Таким чином, активуючий антиген може бути одиничним епітопом, декількома епітопами або цілим білком окремо або в комбінації з однією або декількома речовинами, які підсилюють імуногенність, відомими в даній галузі. Активуючий антиген може бути виділеним повнорозмірним білком, білком клітинної поверхні (наприклад, імунізація клітинами, трансфікованими щонайменше частиною антигена), або розчинним білком (наприклад, імунізація тільки частиною з позаклітинним доменом білка). Антиген можна одержувати в генетично модифікованій клітині. ДНК, яка кодує антиген може бути геномною або не геномною (наприклад, кДНК) і кодує щонайменше частину позаклітинного домена. Застосовуваний у даному документі термін "частина", відносно антигену, стосується мінімального числа амінокислот або нуклеїнових кислот, при необхідності, що складає імуногенний епітоп антигену, який представляє інтерес. Можна використовувати будь-які генетичні вектори, що підходять для трансформації клітин, які представляють інтерес, включаючи як необмежувальні приклади, аденовірусні вектори, плазміди, і невірусні вектори, такі як катіонні ліпіди. В одному з варіантів здійснення антитіло зі способів і композицій у даному документі специфічно зв'язується, щонайменше, з частиною позаклітинного домена FLT3, що представляє інтерес.

[0062] Антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, пропоновані в даному документі, можуть складати "біоактивний засіб" або бути частиною "біоактивного засобу". Застосовуваний у даному документі термін "біоактивний засіб" стосується будь-якої синтетичної або природної сполуки, що зв'язується з антигеном і/або підсилює або опосередковує бажану біологічну дію для посилення токсинів, які убивають клітини. В одному з варіантів здійснення зв'язувальні фрагменти, що підходять для даного винаходу, являють собою біологічно активні фрагменти. Застосовуваний у даному документі термін "біологічно активний" стосується антитіла або фрагмента антитіла, які здатні зв'язуватися з бажаним антигенним епітопом і прямо або опосередковано викликати біологічний вплив. Прямі впливи як необмежувальні приклади включають модулювання, стимуляцію і/або інгібування ростового сигналу, модулювання, стимуляцію і/або інгібування протиапоптозного сигналу, модулювання, стимуляцію і/або інгібування апоптозного або сигналу сигналу для некрозу, модулювання, стимуляцію і/або інгібування каскаду ADCC, і модулювання, стимуляцію і/або інгібування каскаду CDC.

[0063] Афіність зв'язування антигензв'язувального білка визначають за допомогою константи асоціації ( $K_a$ ) і константи дисоціації ( $K_d$ ) ( $KD=K_d/K_a$ ). Афіність зв'язування можна вимірювати за допомогою BIACORE, наприклад, шляхом захоплення досліджуваного антитіла на сенсорну поверхню, покриту білком A, і наливання FLT3 на цю поверхню. Альтернативно,

афінність зв'язування можна вимірювати за допомогою FORTEBIO, наприклад, з рецептором для досліджуваного антитіла, захопленим на голку, покриту білком А, і наливання FLT3 на цю поверхню. Фахівець у даній галузі може ідентифікувати інші прийнятні аналізи, відомі в даній галузі для виміру афінності зв'язування.

5 [0064] Термін "специфічно зв'язується", застосовуваний у даному документі відносно антигензв'язувальних білків, означає, що антигензв'язувальний білок зв'язується з FLT3, а також з визначеним доменом, або визначеною амінокислотною послідовністю в межах FLT3 без зв'язування або з незначним зв'язуванням з іншими (наприклад, неспорідненими) білками. Однак цей термін не виключає той факт, що антитіла або їхні зв'язувальні фрагменти також

10 можуть перехресно реагувати з близькоспорідненими молекулами. Антитіла і їхні фрагменти, а також кон'югати антитіло-лікарський засіб, що містять антитіла, описувані в даному документі, можуть специфічно зв'язуватися з FLT3, з афінністю, щонайменше, у 2, 5, 10, 50, 100 або 1000 разів вищою, ніж вони зв'язуються з близькоспорідненими молекулами.

[0065] При зв'язуванні будь-якого з антитіл, описуваних у даному документі, у якій би то не

15 було формі, наприклад, у кон'югаті антитіла з лікарським засобом, з FLT3 можна було б очікувати часткового або повного блокування зв'язування FL з FLT3. Однак у даному документі присутні антитіла до FLT3, які по суті не інгібують зв'язування FL з FLT3. Для того щоб "по суті інгібувати" зв'язування, варто очікувати виявлюваної кількості зниження зв'язування за межами мінімальної зміни; невелику зміну в зв'язуванні, яка еквівалентна не більше, ніж мінімальній

20 кількості зв'язування, яку можна очікувати при випадкових білок-білкових взаємодіях або при неспецифічних взаємодіях антитіло-антиген, не охоплюється терміном. Вимірювання того, чи інгібує антитіло по суті зв'язування іншої молекули з антигеном-мішенню, можна проводити з використанням біофізичного вимірювання або функціонального вимірювання за допомогою способів, відомих у даній галузі. Наприклад, взаємодію двох білків можна вимірювати прямо у

25 фізичному аналізі зв'язування (наприклад, див. приклад 14, нижче), або опосередковано через функціональний аналіз, що вимірює впливи, які виникають після взаємодії білків, такі як передача сигналу через рецептор або наступні клітинні ефекти, такі як ріст або інгібування росту клітин. Таким чином, антитіла до FLT3, описувані в даному документі, які по суті не інгібують зв'язування FL з FLT3, не викликають значного зниження зв'язування FL з FLT3, і

30 виявляється передача сигналу при зв'язуванні FL через FLT3.

[0066] "Біспецифічні" антитіла також є корисними для даних способів і композицій. Застосовуваний у даному документі термін "біспецифічне антитіло" стосується антитіла, як правило, моноклонального антитіла зі специфічністю зв'язування, щонайменше, до двох різних антигенних епітопів. В одному з варіантів здійснення епітопи стосуються одного антигена. В

35 іншому варіанті здійснення епітопи стосуються різних антигенів. Способи для одержання біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Наприклад, біспецифічні антитіла можна одержувати рекомбінантно з використанням спільної експресії двох пар важкий ланцюг імунoglobulin/легкий ланцюг. Див., наприклад, Milstein et al., Nature 305:537-39 (1983). Альтернативно, біспецифічні антитіла можна одержувати з використанням хімічного зв'язку.

40 Див., наприклад, Brennan, et al., Science 229:81 (1985). Біспецифічні антитіла включають фрагменти біспецифічних антитіл. Див., наприклад, Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48 (1993), Gruber, et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

[0067] Моноклональні антитіла, описувані в даному документі, конкретно включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого і/або легкого ланцюгів ідентична або гомологічна

45 відповідним послідовностям в антитілах, які отримані з конкретних видів або належать до конкретного класу або підкласу антитіл, у той час як інша частина ланцюга/ланцюгів ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, які отримані з інших видів або належать до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, за умови, що вони специфічно зв'язуються з антигеном-мішенню і/або демонструють бажану біологічну

50 активність (патент США № 4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0068] Як використовують у даному документі, терміни "злоякісна пухлина", "неоплазія" і "пухлина" використовують взаємозамінно, і у формі однини або множини вони стосуються клітин, які піддалися злоякісній трансформації, що зробила їх патологічними відносно організму-хазяїна. Первинні злоякісні клітини (які є клітинами, отриманими з ділянки, поруч з ділянкою

55 злоякісної трансформації) можна легко відрізнити від не злоякісних клітин за допомогою загальноновизнаних способів, зокрема, гістологічного дослідження. Визначення злоякісної клітини, застосовуване в даному документі, включає не тільки первинну злоякісну клітину, але також будь-яку клітину, отриману зі злоякісної клітини-попередника. Ці клітини включають

60 метастазовані злоякісні клітини, і культури і лінії клітин in vitro, отримані зі злоякісних клітин.

Відносно типу злоякісної пухлини, що звичайно маніфестує у вигляді ас солідної пухлини, "клінічно виявлювана" пухлина являє собою пухлину, яку можна виявити на основі маси пухлини; наприклад, за допомогою способів, таких як комп'ютерна томографія, магнітно-резонансна томографія, рентген, ультразвук або пальпація, і/або яку можна виявити по експресії одного або декількох пухлино-специфічних антигенів у зразку, отриманому від пацієнта. Пухлини можуть бути пухлинами гемопоетичного походження, наприклад, пухлинами клітин або крові т. п., тобто рідкими пухлинами. Конкретні приклади клінічних станів на основі такої пухлини включають лейкоз, такий як хронічний мієлоцитарний лейкоз або гострий мієлоцитарний лейкоз; мієлому, таку як множинна мієлома; лімфома і т.п.

[0069] Термін "терапевтичний засіб" стосується всіх речовин, які забезпечують терапевтичну вигоду і/або є терапевтично ефективними, як визначено в даному документі. Терапевтичний засіб може, наприклад, повертати назад, поліпшувати стан, зменшувати, сповільнювати або обмежувати прогресування, або зменшувати тяжкість захворювання, порушення або стану, або впливати, або поліпшувати, або полегшувати один або кілька симптомів захворювання, такого як злоякісна пухлина. Така речовина може бути цитотоксичною або цитостатичною. Термін як необмежувальні приклади включає, хіміотерапевтичні засоби, протипухлинні засоби і речовини "група лікарського засобу", визначені в даному документі.

[0070] Термін "протипухлинний засіб" стосується всіх речовин, які забезпечують терапевтичну вигоду і/або є терапевтично ефективними, як визначено в даному документі, при лікуванні неоплазії або злоякісної пухлини.

[0071] У певних варіантах здійснення використання будь-якого з кон'югатів антитіла з лікарським засобом і їхніх фармацевтичних композицій, описаних у даному документі, кон'югата антитіла з лікарським засобом, що містить терапевтичний засіб, і його фармацевтичних композицій, також є ефективним для лікування передракового стану або щонайменше однієї передзлоякісної клітини, наприклад, профілактики злоякісної трансформації в злоякісну клітину. В інших варіантах здійснення один або декілька протипухлинних засобів також ефективні при лікуванні передракового стану або, щонайменше, однієї передзлоякісної клітини, наприклад, профілактика злоякісної трансформації в злоякісну клітину.

[0072] Термін "хіміотерапевтичний засіб" стосується всіх хімічних сполук, які ефективні для інгібування росту пухлини. Необмежувальні приклади хіміотерапевтичних засобів включають алкілюючі засоби; наприклад, азотисті іприти, етиленімінові сполуки й алкілсульфонати; антиметаболіти, наприклад, фолієву кислоту, антагоністи пурину або піримідину; інгібітори мітозу, наприклад, антитубулінові речовини, такі як алкалоїди барвінку, ауристатини і похідні подофілотоксину; цитотоксичні антибіотики; сполуки, які руйнують або заважають реплікації або експресії ДНК, наприклад, засоби, які зв'язуються з малою канавкою ДНК; і антагоністи рецепторів для факторів росту. Крім того, хіміотерапевтичні засоби включають цитотоксичні засоби (як визначено в даному документі), антитіла, біологічні молекули і низькомолекулярні сполуки.

[0073] Термін "сполука" стосується власне хімічних сполук, а також, чи вказано це явно чи ні, і якщо не зрозуміло з контексту, що наступні повинні бути виключені, до аморфних і кристалічних форм сполук, включаючи поліморфні форми, при цьому ці форми можуть бути частиною суміші або окремо; сполук у формі вільних кислот і вільних основ, які, як правило, є формами, показаними в структурах, пропонуваннях у даному документі; ізомерів сполук, які позначають оптичні ізомери, і таутомерні ізомери, при цьому оптичні ізомери включають енантіомери і діастереомери, хіральні ізомери і нехіральні ізомери, і оптичні ізомери включають виділені оптичні ізомери, а також суміші оптичних ізомерів, включаючи рацемічні і не-рацемічні суміші; де ізомер може бути у виділеній формі або в суміші з одним або декількома іншими ізомерами; ізотопних сполук, включаючи дейтерій- і тритій-вмісні сполуки, і включаючи сполуки, що містять радіоактивні ізотопи, включаючи терапевтично і діагностично ефективні радіоактивні ізотопи; мультимерних форм сполук, включаючи димерні, тримерні і т. д. форми; солей сполук, переважно фармацевтично прийнятних солей, включаючи солі приєднання кислот і солі приєднання основ, включаючи солі з органічними протиіонами і неорганічними протиіонами, і включаючи цвітер-іонні форми, де якщо сполука асоційована з двома або більше протиіонами, два або більше протиіонів можуть бути однаковими або різними; і сольватів сполук, включаючи гемісольвати, моносольвати, дисольвати, і т.д., включаючи органічні сольвати і неорганічні сольвати, вказані неорганічні сольвати включають гідрати; де якщо сполука асоційована з двома або більше молекулами розчинника, дві або більше молекули розчинника молекули можуть бути однаковими або різними. У деяких випадках, посилання в даному документі на сполуку за винаходом буде включати пряме посилання на одну або більше вищевказаних форм, наприклад, солі і/або сольвати; однак це посилання призначене тільки для особливої

уваги, і не повинне розглядатися як таке, що виключає інші з вищевказаних форм, визначених вище.

[0074] Терміни "область, яка визначає комплементарність" і "CDR" відомі в даній галузі як такі, що стосуються безперервної послідовності амінокислот у межах варіабельних областей антитіла, що додають антигенну специфічність і афінність зв'язування. Як правило, існують три (3) CDR у кожній варіабельній області важкого ланцюга (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) і три (3) CDR у кожній варіабельній області легкого ланцюга (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3).

[0075] Точні межі амінокислотної послідовності вказаної CDR можна легко визначити за допомогою будь-якої з ряду добре відомих систем, включаючи системи, описані Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерації "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (система нумерації "Chothia"), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography". Mol. Biol. 262, 732-745". (система нумерації Contact"), Lefranc MP et al., "EVIGT unique numbering for immunoglobulin and T-ctrl receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains" Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (система нумерації "IMGT"), і Honegger A і Pliickthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (система нумерації AHo).

[0076] Межі вказаної CDR можуть варіювати залежно від системи, використаної для ідентифікації. Наприклад, система Kabat основана на структурному вирівнюванні, у той час як система Chothia основана на структурній інформації. Нумерація по обох системах Kabat і Chothia основана на найбільш поширених довжинах послідовностей областей антитіл із вставками, відзначеними вставленими буквами, наприклад, "30a", і делеціями, що з'являються в деяких антитілах. Дві системи розташовують визначені вставки і делеції ("indel") у різних положеннях, що приводить до різної нумерації. Система Contact основана на аналізі складних кристалічних структур і багато в чому схожа на систему нумерації Chothia. Таблиця V, нижче, перелічує положення CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 і CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, ідентифіковані по системах Kabat, Chothia і Contact, відповідно. Для CDR-H1, нумерація залишків дана і по системі нумерації Kabat, і по Chothia.

[0077] Таким чином, якщо не вказано інакше, терміни "CDR" і "область, яка визначає комплементарність" вказаного антитіла або його області, такої як варіабельна область, а також окремі CDR (наприклад, "CDR-H1", "CDR-H2") антитіла або його області, варто розуміти як такі, що включають у себе область, яка визначає комплементарність, визначену по будь-якій з відомих систем, описаних вище в даному документі. У деяких випадках, позначена система для ідентифікації CDR або декількох CDR, у такий спосіб як CDR, що визначена за способом Kabat, Chothia, або Contact. В інших випадках, приведена конкретна амінокислотна послідовність CDR. Див., наприклад, Таблицю V.

[0078] Як використовують у даному документі, термін "консервативна заміна" стосується заміни амінокислот і/або амінокислотних послідовностей, що відомі фахівцям у даній галузі і можуть бути зроблені, як правило, без зміни біологічної активності отриманої молекули. Фахівці в даній галузі усвідомлюють, що, в основному, одиничні заміни амінокислот у несуттєвих областях поліпептиду по суті не змінюють біологічну активність (див., наприклад, Watson, et al, MOLECULAR BIOLOGY OF GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Такі ілюстративні заміни переважно роблять відповідно до заміни, вказаних в таблиці II і Таблиці/таблицях III(a-b). Наприклад, такі заміни включають заміну будь-якого з ізолейцину (I), валіну (V), і лейцину (L) на будь-яку іншу з цих гідрофобних амінокислот; аспарагінової кислоти (D) на глютамінову кислоту (E) і навпаки; глютаміну (Q) на аспарагін (N) і навпаки; і серину (S) на треонін (T) і навпаки. Інші заміни можуть також розглядатися як консервативні, залежно від оточення конкретної амінокислоти і її ролі в тривимірній структурі білка. Наприклад, гліцин (G) і аланін (A) часто можуть бути взаємозамінними, також як і аланін (A) з валіном (V). Метіонін (M), який є відносно гідрофобним, може часто бути замінений лейцином і ізолейцином, і іноді валіном. Лізин (K) і аргінін (R) часто взаємозамінні в положеннях, де значимою рисою амінокислотного залишку є його заряд і відмінні рК цих двох амінокислотних залишків не важливі. Ще інші заміни можуть розглядатися як "консервативні" у конкретному оточенні (див., наприклад, Таблиця III(a) у даному документі; сторінки 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff et al, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al, J Biol Chem 1995 May 19; 270(20): 11882-6). Інші заміни також припустимі, і їх можна визначати емпіричним шляхом або відповідно до відомих консервативних заміни.

[0079] Термін "цитотоксичний засіб" стосується речовини, яка інгібує або запобігає експресійній активності клітин, функцію клітин і/або викликає руйнування клітин. Термін включає

радіоактивні ізотопи, хіміотерапевтичні засоби і токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їхні фрагменти і/або варіанти. Приклади цитотоксичних засобів як необмежувальні приклади включають ауристатини (наприклад, ауристатин Е, ауристатин F, MMAE і MMAF), ауроміцини, майтанзиноїди, рицин, А-ланцюг рицину, комбрестатин, дуокарміцини, доластатини, доксорубіцин, даунорубіцин, таксоли, цисплатин, ccl065, бромистий етидій, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрестин, вінбластин, колхіцин, дигідроксіантрацидін, актиноміцин, дифтерійний токсин, екзотоксин А *Pseudomonas* (PE), PE40, абрин, ланцюг А абрину, ланцюг А модекцину, альфа-сарцин, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин, курицин, кротин, каліхіміцин, інгібітор *Saponaia officinalis*, і глюкокортикоїди й інші хіміотерапевтичні засоби, а також радіоактивні ізотопи, такі як  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$  або  $^{213}$ ,  $P^{32}$ , радіоактивні ізотопи Lu, включаючи  $Lu^{177}$ , і токсини за даним винаходом, що позначаються AGD-0182.

[0080] Антитіла, включаючи антитіла за винаходом, також можуть бути кон'юговані з будь-якими з вказаних вище цитотоксичних засобів і також з ферментом, що активує протипухлинні проліки, здатним переводити проліки в їхню активну форму.

[0081] Застосовуваний у даному документі термін "діатіла" стосується малих фрагментів антитіл із двома ділянками зв'язування антигену, чий фрагменти включають варіабельний домен важкого ланцюга ( $V_H$ ), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга ( $V_L$ ) в одному поліпептидному ланцюзі ( $V_H-V_L$ ). За допомогою лінкера, який занадто короткий, щоб дозволити спарюватися двом доменам одного і того ж ланцюга, домени змушені спарюватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і створювати дві антигензв'язувальні ділянки. Діатіла описані більш повно, наприклад, у EP 404,097; WO 93/11161; і Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

[0082] Термін "виснаження" відносно впливу FLT3-зв'язувального засобу на FLT3-експресуючі клітини, стосується зниження числа або усунення FLT3-експресуючих клітин. Для цілей даного винаходу, FLT3, також відомий як рецептор Fms-подібної тирозинкінази 3, також відомий як Flk2 (кіназа 2 зародкової печінки), STK1 (тирозинкіназа 1 стовбурових клітин) і CD135, є представником сімейства рецепторів типу III тирозинкінази (RTK). FLT3 людини кодує RTK довжиною 993 амінокислот, що містить мембранозв'язаний рецептор з п'ятьма імуноглобуліно-подібними позаклітинними доменами і двома внутрішньоклітинними тирозинкіназними доменами (TKD), зв'язаними за допомогою кіназного домена-вставки (Stirewalt D L et al; Nat Rev Cancer; 650-665(2003). Ген FLT3 людини (ID № гена 2322 (національний центр біотехнологічної інформації)) розташований на хромосомі 13q12 і має 85% гомології амінокислотної послідовності з мишачим FLT3 (Rosnet O et al; Oncogene 8:173-179 (1993). FLT3 експресований у нормальних мієлоїдних і лімфоїдних клітинах-попередниках і в лейкозних клітинах у 70-90% пацієнтів з ГМЛ (Carow, C.E et al; Blood 87: 1089-1096 (1996); Rosnet O et al; Leukemia 10:238-248 (1996), а також при ГЛЛ.

[0083] Термін "продукт гена" використовують у даному документі для вказівки на пептид/білок або мРНК. Наприклад, "продукт гена за винаходом" іноді в даному документі стосується "амінокислотної послідовності злоякісної пухлини", "білка злоякісної пухлини", "білка злоякісної пухлини, вказаної в таблиці I", "мРНК злоякісної пухлини", "мРНК злоякісної пухлини, вказаної в таблиці I", і т.д. В одному з варіантів здійснення білок злоякісної пухлини кодує нуклеїнову кислоту за фігурою 1. Білок злоякісної пухлини може бути фрагментом, або альтернативно, може бути повнорозмірним білком, який кодується нуклеїновими кислотами з фігури 1. В одному з варіантів здійснення амінокислотну послідовність злоякісної пухлини використовують для визначення ідентичності або подібності послідовностей. В іншому варіанті здійснення послідовності являють собою природні алельні варіанти білка, який кодується нуклеїновою кислотою з фігури 1. В іншому варіанті здійснення послідовності являють собою варіанти послідовності, як додатково описано в даному документі.

[0084] "Гетерокон'югати" антитіл підходять для даних способів і композицій. Застосовуваний у даному документі термін "гетерокон'юговане антитіло" стосується двох ковалентно з'єднаних антитіл. Такі антитіла можна одержувати з застосуванням способів, відомих у хімії білкового синтезу, включаючи використання агентів для перехресного зшивання. Див., наприклад, патент США № 4676980.

[0085] Термін "гомолог" стосується молекули, яка демонструє гомологію з іншою молекулою, наприклад, за рахунок наявності послідовностей хімічних залишків, які є однаковими або аналогічними у відповідних положеннях.

[0086] Термін "ідентичний" або "ідентичність послідовностей" указує на ступінь ідентичності між двома послідовностями нуклеїнових кислот або двома амінокислотними послідовностями, що вирівнювали оптимальним чином і порівнювали з відповідними вставками або делеціями.

[0087] "Відсоток ідентичності" між двома послідовностями є функцією від числа ідентичних положень, загальних для послідовностей (тобто,  $\% \text{ ідентичності} = \text{числу ідентичних положень} / \text{загальне число положень} \times 100$ ), з урахуванням числа пропусків, і довжини кожного пропуску, який необхідно ввести для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Порівняння послідовностей і визначення відсотка ідентичності між двома послідовностями можна проводити з використанням математичного алгоритму, як описано нижче.

[0088] Відсоток ідентичності двох нуклеотидних послідовностей можна визначати з використанням програми GAP у пакеті програмного забезпечення GCG, з використанням матриці NWSgapdna.CMP і штрафу за делецію 40, 50, 60, 70 або 80 і штрафу за продовження делеції 1, 2, 3, 4, 5 або 6. Відсоток ідентичності двох нуклеотидних послідовностей також можна визначати з використанням алгоритму Meyers, et al., Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988), що убудований у програму ALIGN (версія 2.0), з використанням таблиці ваг залишків PAM120, штрафом за довжину делеції 12 і штрафом за делецію 4. Крім того, відсоток ідентичності двох нуклеотидних послідовностей можна визначати з використанням алгоритму Needleman, et al., J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970), який убудований у програму GAP у пакеті програмного забезпечення GCG, з використанням матриці Blossum 62 або PAM250 і штрафу за делецію 16, 14, 12, 10, 8, 6 або 4 і штрафу за продовження делеції 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

[0089] Як приклад, полінуклеотидна послідовність може бути ідентична референтній полінуклеотидній послідовності, що значить, на 100% ідентичній референтній послідовності, або вона може включати нуклеотидні заміни аж до певного цілого числа в порівнянні з референтною послідовністю, і бути, щонайменше, на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 або 99% ідентичною. Такі зміни вибрані щонайменше з однієї нуклеотидної делеції, заміни, включаючи транзицію і трансверсію, або вставку, і де вказані зміни можуть відбуватися в 5'- або 3'-кінцевих положеннях референтної нуклеотидної послідовності або в будь-якому місці між кінцевими положеннями, або чергуючись окремо серед нуклеотидів у референтній послідовності або в одній або декількох безперервних групах усередині референтної послідовності. Число нуклеотидних змін визначають, помножуючи загальне число нуклеотидів у референтній полінуклеотидній послідовності, описаній в даному документі, на числовий відсоток відповідного відсотка ідентичності (діленого на 100) і віднімаючи отримане число з вказаного загального числа нуклеотидів у референтній полінуклеотидній послідовності, або:  $n.\text{sub.a}.\text{ltoreq.x.sub.a}-(x.\text{sub.a.y})$ , де  $n.\text{sub.n}$  являє собою число нуклеотидних змін,  $x.\text{sub.n}$  являє собою загальне число нуклеотидів у референтній полінуклеотидній послідовності, описаній в даному документі (див. послідовності нуклеїнової кислоти в "Списку послідовностей" для приклада референтної полінуклеотидної послідовності), і  $y$  є 0,50 для 50%, 0,60 для 60%, 0,70 для 70%, 0,75 для 75%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85%, 0,90 для 90%, 0,95 для 95%, 0,98 для 98%, 0,99 для 99% або 1,00 для 100%, являє собою символ для знака множення, і де будь-яке не ціле число  $x.\text{sub.n}$  і  $y$  округляють до найближчого цілого числа перед тим як відняти його від  $x.\text{sub.n}$ .

[0090] Аналогічно, поліпептидна послідовність може бути ідентична референтній поліпептидній послідовності, описаній в даному документі (див. амінокислотні послідовності в "Списку послідовностей" для прикладів референтних поліпептидних послідовностей), що значить, на 100% ідентичній референтній послідовності, або вона може включати амінокислотні заміни аж до певного цілого числа в порівнянні з референтною послідовністю, таким чином, що ідентичність складає менше 100%, і є, щонайменше, на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 або 99% ідентичною. Такі заміни вибрані з групи, яка складається зі щонайменше однієї амінокислотної делеції, заміни, включаючи консервативну і неконсервативну заміну, або вставку, і де вказані зміни можуть відбуватися по аміно- або карбоксикінцевих положеннях у референтній поліпептидній послідовності або в будь-якому місці між цими кінцевими положеннями, або чергуючись окремо серед амінокислот у референтній послідовності або в одній або декількох безперервних групах усередині референтної послідовності. Число амінокислотних змін для даного відсотка ідентичності визначають, помножуючи загальне число амінокислот у поліпептидній послідовності, яка кодується полінуклеотидною референтною послідовністю, на числовий відсоток відповідного відсотка ідентичності (поділеного на 100), а потім віднімаючи отримане число з вказаного загального числа амінокислот у поліпептидній референтній послідовності, описаній в даному документі (див., наприклад, SEQ ID NO: 1-21), або:  $n.\text{sub.a}.\text{ltoreq.x.sub.a}-(x.\text{sub.a.y})$ , де  $n.\text{sub.a}$  являє собою число амінокислотних змін,  $x.\text{sub.a}$  являє собою загальне число амінокислот у поліпептидній референтній послідовності, і  $y$  є 0,50 для 50%, 0,60 для 60%, 0,70 для 70%, 0,75 для 75%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85%, 0,90 для 90%,

0,95 для 95%, 0,98 для 98%, 0,99 для 99% або 1,00 для 100%, являє собою символ для знака множення, і де будь-яке не ціле число  $x_{\text{sub.a}}$  і у округляють до найближчого цілого числа перед тим як відняти його від  $x_{\text{sub.a}}$ .

[0091] Відсоток ідентичності можна визначати по довжині послідовностей. Як визначено в даному документі, термін "більш 75% ідентичності" включає більше 75%, 80%, 85%, 95% і 99% ідентичності, а також всі окремі значення й окремі піддіапазони в цьому діапазоні.

[0092] В одному з варіантів здійснення антитіло, пропонуване в даному документі, являє собою "антитіло людини". Застосовуваний у даному документі термін "антитіло людини" стосується антитіла, у якому по суті повні послідовності легкого ланцюга і важкого ланцюга, включаючи області, які визначають комплементарність (CDR), походять з генів людини. В одному з варіантів здійснення моноклональні антитіла людини одержують способом триоми, способом з В-клітинами людини (див., наприклад, Kozbor, et al, Immunol. Today 4:72 (1983), спосіб трансформації за допомогою вірусу Епштейна-Барр (див., наприклад, Cole et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96 (1985)), або з використанням фагового дисплея (див., наприклад, Marks et al, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). У конкретному варіанті здійснення антитіло людини одержують у трансгенній миші. Способи одержання таких частково або повністю людських антитіл відомі в даній галузі і можна використовувати будь-які такі способи. Відповідно до одного, особливо переважного варіанту здійснення, повні послідовності антитіла людини виробляються в трансгенній миші, сконструйованій для експресії генів важкого і легкого ланцюгів антитіла людини. Ілюстративний опис одержання трансгенних мишей, які виробляють антитіла людини, можна знайти в заявці № WO 02/43478 і патенті США 6657103 (Abgenix) і в дочірніх патентах. В-клітини від трансгенних мишей, які виробляють бажане антитіло, можна потім зливати для одержання ліній гібридомних клітин для постійної продукції антитіла. Див., наприклад, патенти США №№ 5569825; 5625126; 5633425; 5661016; і 5545806; і Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42 (1998); Green, et al, J. Exp. Med. 188:483-95 (1998).

[0093] Застосовуваний у даному документі термін "гуманізоване антитіло" стосується форм антитіл, що містять послідовності з антитіл, які не належать людині (наприклад, мишачих), а також антитіл людини. Такі антитіла є химерними антитілами, що містять мінімальну послідовність, отриману з імуноглобуліну, який не належить людині. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити по суті усі з, щонайменше, одного, і як правило, двох варіабельних доменів, у яких усі або по суті усі з гіперваріабельних петель відповідають петлям імуноглобуліну, що не належить людині, і всі або по суті усі з областей FR мають послідовність з імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити, щонайменше, частину константної області імуноглобуліну (Fc), як правило, з імуноглобуліну людини. Див. наприклад, патент США № 4816567, виданий Cabilly; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; і ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

[0094] Терміни "інгібувати" або "інгібування", застосовувані в даному документі, означають зниження вимірюваної кількості, або повне запобігання.

[0095] Фрази "виділений" або "біологічно чистий" стосуються матеріалу, який значно або істотно вільний від компонентів, що звичайно супроводжують матеріал, коли він знаходиться в нативному стані. Таким чином, виділені пептиди за винаходом переважно не містять матеріалів, звичайно пов'язаних з пептидами в їхньому оточенні *in situ*. Наприклад, полінуклеотид буде "виділеним", коли він по суті відділений від забруднюючих полінуклеотидів, які відповідають або комплементарні генам, іншим ніж гени FLT3, або які кодують поліпептиди, інші ніж продукт гена FLT3 або його фрагменти. Фахівець у даній галузі може легко використовувати способи для виділення нуклеїнових кислот для одержання виділеного полінуклеотида FLT3. Білок буде "виділеним", наприклад, коли використовують фізичні, механічні або хімічні способи для видалення білків FLT3 із клітинних компонентів, які звичайно асоційовані з білком. Фахівець у даній галузі може легко використовувати стандартні способи очищення для одержання виділеного білка FLT3. Альтернативно, виділений білок можна одержувати хімічними способами.

[0096] Прийнятні "мітки" включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні молекули, хемілюмінесцентні молекули, магнітні частинки, і т.п. Патенти, які описують застосування таких міток, включають патенти США №№ 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149; і 4366241. Крім того, антитіла, пропонувані в даному документі, можуть бути корисні як антигензв'язувальний компонент флуоротіл. Див. наприклад, Zeytun et al, Nat. Biotechnol. 21: 1473-79 (2003).

[0097] Термін "ссавець" стосується будь-якого організму, класифікованого як ссавець, включаючи мишей, пацюків, кроликів, собак, кішок, корів, коней і людей. В одному з варіантів здійснення винаходу ссавець являє собою мишу. В іншому варіанті здійснення винаходу ссавець являє собою людину.

5 [0098] Терміни "метастатична злоякісна пухлина" і "метастатичне захворювання" означають злоякісні пухлини, що поширилися в регіональні лімфовузли або у віддалені ділянки, і включають стадію захворювання D по системі AUA і стадію T×N×M+ по системі TNM.

10 [0099] Термін "модифікований", застосовуваний у даному документі, стосується наявності зміни в природній амінокислоті, не природній амінокислоті, природному амінокислотному поліпептиді або неприродному амінокислотному поліпептиді. Такі зміни або модифікації можна одержувати шляхом постсинтетичних модифікацій природних амінокислот, неприродних амінокислот, природних амінокислотних поліпептидів або неприродних амінокислотних поліпептидів, або шляхом со-трансляції, або шляхом посттрансляційних модифікацій природної амінокислоти, не природної амінокислоти, природного амінокислотного поліпептиду або неприродного амінокислотного поліпептиду.

15 [0100] Термін "модулятор" або "тестована сполука" або "кандидатний лікарський засіб" або граматичні еквіваленти, використовувані в даному документі, описують будь-яку молекулу, наприклад, білок, олігопептид, малу органічну молекулу, полісахарид, полінуклеотид, і т.д., яку досліджують на здатність прямо або опосередковано змінювати фенотип злоякісної пухлини або експресію пухлинних послідовностей, наприклад, послідовностей нуклеїнових кислот або білків, або ефекти пухлинних послідовностей (наприклад, передачу сигналу, експресію гена, взаємодію білка і т.д.) В одному з аспектів модулятор буде нейтралізувати ефект пухлинного білка за винаходом. Під "нейтралізацією" мають на увазі інгібування або блокування дії білка, поряд з наступним впливом на клітину. В іншому аспекті модулятор буде нейтралізувати ефект гена за винаходом, і його відповідного білка, шляхом нормалізації рівнів вказаного білка. У переважних варіантах здійснення модулятори змінюють профілі експресії, або профіль експресії нуклеїнових кислот або білків, пропонованих у даному документі, або нижчерозташовані ефекторні шляхи. В одному з варіантів здійснення модулятор придушує фенотип злоякісної пухлини, наприклад, до характерних ознак нормальної тканини. В іншому варіанті здійснення модулятор викликає пухлинний фенотип. Як правило, множину аналізованих сумішей досліджують паралельно з різними концентраціями речовини для одержання різних відповідей на різні концентрації. Як правило, одна з цих концентрацій служить негативним контролем, тобто, нульова концентрація або нижче рівня детекції.

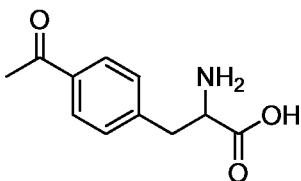
20 [0101] Модулятори, кандидатні лікарські засоби або тестовані сполуки охоплюють численні хімічні класи, хоча, як правило, вони являють собою органічні молекули, переважно, малі органічні сполуки з молекулярною масою більшою ніж 100 і меншою ніж приблизно 2,500 Дальтон. Переважно, низькомолекулярні сполуки мають масу, меншу ніж 2000, або меншу ніж 1500, або меншу ніж 1000 або меншу ніж 500 Дальтон. Кандидатні речовини містять функціональні групи, необхідні для структурної взаємодії з білками, зокрема, для утворення водневих зв'язків, і, як правило, включають, щонайменше, амінову, карбонільну, гідроксильну або карбоксильну групи, переважно, щонайменше, дві з функціональних хімічних груп. Кандидатні речовини часто містять циклічний вуглець або гетероциклічні структури і/або ароматичні або поліароматичні структури, заміщені однією або декількома вищевказаними функціональними групами. Модулятори також містять біомолекули, такі як пептиди, сахариди, жирні кислоти, стероїди, пурини, піримідини, похідні, структурні аналоги або їхні сполучення. Особливо переважними є пептиди. Одним із класів модуляторів є пептиди, наприклад, із приблизно від п'яти до приблизно 35 амінокислот, переважно приблизно від п'яти до приблизно 20 амінокислот, і особливо переважно, приблизно від 7 до приблизно 15 амінокислот. Переважно, білок-модулятор пухлини є розчинним, включає не-трансмембранну область, і/або має N-кінцевий Cys для полегшення розчинності. В одному з варіантів здійснення C-кінець фрагмента зберігається у вигляді вільної кислоти і N-кінець являє собою амін для полегшення приєднання, тобто, до цистеїну. В одному з варіантів здійснення білок-модулятор пухлини за винаходом кон'югований з імуногенною речовиною, як обговорюється в даному документі. В одному з варіантів здійснення білок-модулятор пухлини кон'югований з BSA. Пептиди за винаходом, наприклад, переважних довжин, можуть бути зв'язані один з одним або з іншими амінокислотами для створення більш довгого пептиду/білка. Пептиди-модулятори можуть бути продуктами розщеплення природних білків, як вказано вище, випадковими пептидами або "зміщеними" випадковими пептидами. У переважному варіанті здійснення модулятори на основі пептиду/білка являють собою антитіла і їхні фрагменти, як визначено в даному документі.

[0102] Термін "моноклональне антитіло", застосовуваний у даному документі, стосується антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто, окремі антитіла, що складають популяцію, ідентичні, за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними і спрямовані проти одного антигенного епітопа. Навпаки, загальноприйняті (поліклональні) препарати антитіл, як правило, включають множину антитіл, спрямованих проти (або специфічних) різних епітопів. В одному з варіантів здійснення поліклональне антитіло містить множину моноклональних антитіл з різними епітопними специфічностями, афінностями або авідностями в межах одного антигену, що містить декілька антигенних епітопів. Модифікатор "моноклональний" указує на ознаку антитіла, як отриманого по суті з гомогенної популяції антитіл, і не повинен бути витлумачений, як такий, що потребує виробництва антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даного винаходу можна одержувати гібридомним способом, вперше описаним Kohler et al, Nature 256: 495 (1975), або можна одержувати способами рекомбінантних ДНК (див., наприклад, патент США № 4816567). "Моноклональні антитіла" також можна ізолювати з фагових бібліотек антитіл за допомогою способів, описаних у Clackson et al, Nature 352: 624-628 (1991) і Marks et al, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), наприклад. Ці моноклональні антитіла будуть, як правило, зв'язуватися щонайменше з Kd приблизно 1 мкМ, як правило, щонайменше, приблизно 300 нМ, як правило, щонайменше, приблизно 30 нМ, переважно, щонайменше, приблизно 10 нМ, більш переважно, щонайменше, приблизно 3 нМ або або краще, як правило, при визначенні шляхом ELISA.

[0103] Термін "моноклональне антитіло", застосовуваний у даному документі, стосується антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто, окремі антитіла, що складають популяцію, ідентичні, за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними і спрямовані проти одного антигенного епітопа. Навпроти, загальноприйняті (поліклональні) препарати антитіл, як правило, включають множину антитіл, спрямованих проти (або специфічних) різних епітопів. В одному з варіантів здійснення поліклональне антитіло містить множину моноклональних антитіл з різними епітопними специфічностями, афінностями або авідностями в межах одного антигену, що містить декілька антигенних епітопів. Модифікатор "моноклональний" указує на ознаку антитіла, як отриманого по суті з гомогенної популяції антитіл, і не повинен бути витлумачений, як такий, що потребує виробництва антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даного винаходу можна одержувати гібридомним способом, вперше описаним Kohler et al, Nature 256: 495 (1975), або можна одержувати способами рекомбінантних ДНК (див., наприклад, патент США № 4816567). "Моноклональні антитіла" також можна ізолювати з фагових бібліотек антитіл за допомогою способів, описаних у Clackson et al, Nature 352: 624-628 (1991) і Marks et al, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), наприклад. Ці моноклональні антитіла будуть, як правило, зв'язуватися, щонайменше, з Kd приблизно 1 мкМ, як правило, щонайменше, приблизно 300 нМ, як правило, щонайменше, приблизно 30 нМ, переважно, щонайменше, приблизно 10 нМ, більш переважно, щонайменше, приблизно 3 нМ або або краще, як правило, при визначенні шляхом ELISA.

[0104] "Неприродна амінокислота" або інакше позначувана як "npAA" стосується амінокислоти, яка не є однією з двадцяти (20) основних амінокислот або піролізином, або селеноцистеїном. Іншими термінами, які можна використовувати як синоніми для терміна npAA, є "не кодована в природі амінокислота", "амінокислота не природного походження", "амінокислота, яка не зустрічається в природі". Крім того, термін npAA як необмежувальні приклади включає амінокислоти, що не зустрічаються в природі і які можна одержувати синтетичним шляхом або можна одержувати шляхом модифікації неприродних амінокислот. Наприклад, у контексті даного винаходу, пара-ацетилфенілаланін розглядається як npAA.

[0105] Термін "пара-ацетилфенілаланін" або "pAF" означає 3-(4-ацетилфеніл)-2-амінопропіонову кислоту, позначену наступною хімічною структурою:



[0106] "Фармацевтичної експіцієнт" включає матеріал, такий як ад'ювант, носій, рН-коригуючі і буферні засоби, речовини, які коригують тонічність, засоби для змочування, консервант, і т.п.

5 [0107] "Фармацевтично прийнятний" стосується нетоксичного, інертного матеріалу і/або композиції, які фізіологічно сумісні з людьми або іншими ссавцями.

10 [0108] Термін "полінуклеотид" означає полімерну форму нуклеотидів, щонайменше, з 10 основ або пар основ у довжину, або рибонуклеотидів, або дезоксинуклеотидів, або модифікованої форми кожного з типів нуклеотидів, і включає одноланцюжкову і дволанцюжкову форми ДНК і/або РНК. У даній галузі, цей термін часто використовують взаємозамінно з "олігонуклеотидом". Полінуклеотид може містити нуклеотидну послідовність, описану в даному документі, де тимідин (Т), як показано, наприклад, на фігурі 1, може також бути урацилом (U); це визначення стосується відмінностей між хімічними структурами ДНК і РНК, зокрема, спостереження, що однією з чотирьох основних основ у РНК є урацил (U) замість тимідину (Т).

15 [0109] Термін "поліпептид" означає полімер, щонайменше, приблизно з 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислот. На всьому протязі опису, використовують стандартні трибуквені (див., Таблицю III) або однобуквені позначення для амінокислот. У даній галузі, цей термін часто використовують взаємозамінно з "пептидом" або "білком".

20 [0110] "Рекомбінантна" ДНК або молекула РНК являє собою ДНК або молекулу РНК, які піддавалися молекулярному впливу *in vitro*.

25 [0111] Застосовуваний у даному документі термін "одноланцюжковий Fv" або "scFv" або "одноланцюжкове" антитіло стосується фрагментів антитіл, що містять домени V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> антитіла, де ці домени присутні в одному поліпептидному ланцюзі. Як правило, поліпептид Fv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub>, що дозволяє sFv формувати необхідну структуру для зв'язування антигену. Для огляду sFv, див. Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg і Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

30 [0112] Застосовувані в даному документі терміни "специфічний", "специфічно зв'язується" і "зв'язується специфічним чином" стосуються селективного зв'язування антитіла з епітопом антигена-мішені. Антитіла можна тестувати на специфічність зв'язування шляхом порівняння зв'язування з відповідним антигеном зі зв'язуванням з неспорідненим антигеном або сумішшю антигенів при заданому наборі умов. Якщо антитіло зв'язується з відповідним антигеном, щонайменше, у 2, 5, 7, і переважно 10 разів більше, ніж з неспорідненим антигеном або сумішшю антигенів, то воно вважається специфічним. В одному з варіантів здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується тільки з антигеном FLT3, але не зв'язується з неспорідненим антигеном. В іншому варіанті здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується тільки з антигеном FLT3 людини, але не зв'язується з антигеном FLT3, що не належить людині, з 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більшою амінокислотною гомологією з антигеном FLT3. В іншому варіанті здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується тільки з антигеном FLT3 людини, але не зв'язується з антигеном FLT3, яке не належить людині, з 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або великим відсотком ідентичності з амінокислотною послідовністю антигену FLT3. В іншому варіанті здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується з антигеном FLT3 людини і зв'язується з мишачим антигеном FLT3, але в більшому ступені зв'язується з антигеном людини. В іншому варіанті здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується з антигеном FLT3 людини і зв'язується з антигеном FLT3 примата, але в більшому ступені зв'язується з антигеном людини. В іншому варіанті здійснення специфічне антитіло являє собою антитіло, що зв'язується з антигеном FLT3 людини і з будь-яким антигеном FLT3, який не належить людині, але в більшому ступені зв'язується з антигеном людини або будь-яких їхнім сполученням.

50 [0113] Застосовувані в даному документі "лікувати" або "терапевтичний" і граматично споріднені терміни стосуються поліпшення будь-якого наслідку захворювання, такого як подовжене виживання, менша захворюваність, і/або зменшення побічних ефектів, які є побічними продуктами альтернативного терапевтичного способу впливу; фахівцю в даній галузі легко буде зрозуміло, що повне лікування захворювання є переважним, хоча і не обов'язковим для лікування.

60 [0114] Термін "варіант" стосується молекули, яка демонструє відхилення від описаного типу або норми, таке як білок, що має один або кілька різних амінокислотних залишків у відповідних положеннях конкретно описаного білка (наприклад, білка FLT3, показаного на фігурі 1). Аналог

являє собою приклад варіантного білка. Сплайсингові ізоформи й однонуклеотидні поліморфізми (SNP) є додатковими прикладами варіантів.

[0115] "Білки FLT3" і/або "білки, споріднені з FLT3" за винаходом включають білки, конкретно ідентифіковані в даному документі (див., фігуру 1), а також алельні варіанти, варіанти з консервативними замінами, аналоги і гомологи, які можна виділяти/створювати й охарактеризовувати без зайвого експериментування за допомогою способів, викладених у даному документі або легкодоступних у даній галузі. Також термін включає злиті білки, які сполучають частини різних білків FLT3 або їхніх фрагментів, а також злиті білки з білка FLT3 і гетерологічного поліпептиди. Такі білки FLT3, у сукупності позначають як білки, споріднені з FLT3, білки за винаходом, або FLT3. Термін "білок, споріднений з FLT3" стосується поліпептидного фрагмента або послідовності білка FLT3 з 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, або більше ніж 25 амінокислот; або щонайменше 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 991, 992 або 993 або більше амінокислот.

## II.) Антитіла до FLT3

[0116] В іншому аспекті винаходу пропонуються антитіла, що зв'язуються з білками, спорідненими з FLT3 (див. фігуру 1). В одному з варіантів здійснення антитіло, що зв'язується з білками, спорідненими з FLT3, являє собою антитіло, що специфічно зв'язується з білком FLT3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.: 2. Антитіло, яке специфічно зв'язується з білком FLT3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.: 2, включає антитіла, які можуть зв'язуватися з іншими білками, спорідненими з FLT3. Наприклад, антитіла, які зв'язуються з білком FLT3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.: 2, можуть зв'язуватися з білками, спорідненими з FLT3, такими як варіанти FLT3, і їхні аналоги і гомологи.

[0117] Антитіла до FLT3 за винаходом особливо підходять для злоякісної пухлини (див., наприклад, Таблицю I), для прогностичних аналізів, візуалізації, діагностики і терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення описаний аналіз зв'язування FLT3 для застосування для виявлення злоякісної пухлини, наприклад, при імунологічному аналізі. Аналогічно, такі антитіла підходять (наприклад, у комбінації з терапевтичним засобом, у ADC), для лікування і/або прогнозу гострого мієлолейкозу ("ГМЛ") і гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ), і інших злоякісних пухлин, у тих випадках, коли FLT3 також експресується або надекспресується в цих інших злоякісних пухлинах. Крім того, внутрішньоклітинно експресовані антитіла (наприклад, однокланцюжкові антитіла) є терапевтично корисними для лікування злоякісних пухлин, у які залучена експресія FLT3, такі як прогресуючий або метастатичний ГМЛ або ГЛЛ або інші прогресуючі або метастатичні злоякісні пухлини.

[0118] У даній галузі добре відомі різні способи одержання антитіл, зокрема, моноклональних антитіл. Наприклад, антитіла можна одержувати, імунізуючи прийнятного ссавця-хазяїна за допомогою білка, спорідненого з FLT3, пептиду, або фрагмента, у виділеній формі або у формі імунокон'югата (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Крім того, також можна використовувати злиті білки FLT3, такі як злитий білок FLT3-GST. У конкретному варіанті здійснення виробляють білок, який злитий з GST і містить усю або більшу частину амінокислотної послідовності з фігури 1, а потім використовують як імуноген для одержання відповідних антитіл. В іншому варіанті здійснення синтезують білок, споріднений з FLT3, і використовують як імуноген.

[0119] Крім того, використовують способи імунізації з "голою" ДНК, відомі в даній галузі (з наявністю або відсутністю білка, спорідненого з FLT3, або клітин, які експресують FLT3) для одержання імунної відповіді до кодованого імуногена (для огляду, див. Donnelly et al, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

[0120] Амінокислотну послідовність білка FLT3, показану на фігурі 1, можна аналізувати для вибору конкретних областей білка FLT3 для одержання антитіл. Наприклад, використовують аналізи гідрофобності і гідрофільності амінокислотної послідовності FLT3 для виявлення гідрофільних областей у структурі FLT3. Області білка FLT3, що демонструють імуногенну структуру, а також інші області і домени, можна легко виявляти з використанням інших різних відомих у даній галузі способів, таких як аналізи Чоу-Фасмана, Гарнье-Робсона, Кайт-Дулітл, Ейзенберга, Карплуса-Шульца або Джеймсона-Вольфа. Профілі гідрофільності можна одержувати з використанням способу Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828. Профілі гідропатичності можна одержувати з використанням способу Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Профілі відсотка доступних залишків можна

одержувати з використанням способу Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Профілі середньої гнучкості можна одержувати з використанням способу Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Профілі бета-вигину можна одержувати з використанням способу Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Таким чином, кожна область, ідентифікована за допомогою будь-якої з цих програм або способів, входить в об'єм даного винаходу. Переважні способи для одержання антитіл до FLT3 далі проілюстровані за допомогою прикладів, пропонує у даному документі. Способи одержання білка або поліпептиду для застосування як імуногена добре відомі в даній галузі. Також добре відомі в даній галузі способи одержання імуногенних кон'югатів білка з носієм, таким як БСА, KLH або іншим білком-носієм. У деяких обставинах, використовують пряму кон'югацію, наприклад, з використанням карбодіімідних реагентів; в інших випадках ефективними є зв'язувальні реагенти, такі як реагенти, що поставляються Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Уведення імуногена FLT3 часто здійснюють шляхом ін'єкції протягом прийнятної періоду часу і з використанням прийнятної ад'юванта, як розуміють у даній галузі. Під час схеми імунізації, можна відбирати титри антитіл для визначення адекватності утворення антитіл.

[0121] Моноклональні антитіла FLT3 можна одержувати різними способами, добре відомими в даній галузі. Наприклад, імуорталізовані лінії клітин, що секретують бажане моноклональне антитіло, одержують з використанням стандартної гібридомної технології по Кохлер і Мільштейну або модифікаціях, які імуорталізують антитіло-продукуючі В-клітини, що є загальновідомим. Імуорталізовані лінії клітин, які секретують бажані антитіла, відбирають шляхом імунологічного аналізу, у якому антигеном є білок, споріднений з FLT3. Коли виявляють відповідну імуорталізовану культуру клітин, клітини можна нарощувати й одержувати антитіла або з культур *in vitro*, або з асцитної рідини.

[0122] Антитіла або фрагменти за винаходом також можна одержувати рекомбінантними способами. Області, що специфічно зв'язуються з бажаними областями білка FLT3, також можна одержувати в рамках химерних антитіл або антитіл із щепленою областю, яка визначає комплементарність (CDR), які походять з різних видів. Також можна одержувати гуманізовані або людські антитіла до FLT3, і вони є переважними для застосування в терапевтичному контексті. Добре відомі способи для гуманізації мишачих і інших антитіл, які не належать людині, шляхом заміни однієї або декількох CDR, які не належать людському антитілу, на відповідні послідовності антитіла людини (див. наприклад, Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen et al, 1988, Science 239: 1534-1536). Також див., Carter et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 і Sims et al, 1993, J. Immunol. 151: 2296.

[0123] У переважному варіанті здійснення моноклональні антитіла людини за винаходом можна одержувати з використанням мишей VelocImmune миші, у яких геномні послідовності, що несуть мишачі ендегенні локуси варіабельних сегментів важкого ланцюга імуноглобуліну (сегменти VH, DH і JH) і/або легкого ланцюга каппа (VK і JK), були замінені, повністю або частково, геномними послідовностями людини, що несуть неаранжовані локуси варіабельних сегментів важкого ланцюга імуноглобуліну людини (VH, DH, і JH) і/або легкого ланцюга каппа (VK і JK) (Regeneron, Tarrytown, NY) зародкової лінії. Див., наприклад, патенти США №№ 6586251, 6596541, 7105348, 6528313, 6638768 і 6528314.

[0124] Крім того, антитіла людини за винаходом можна одержувати з використанням миші HuMAb миша (Medarex, Inc.), яка містить мінілокуси генів імуноглобуліну людини, що кодують неаранжовані послідовності важких (мю і гамма) і легкого каппа ланцюгів імуноглобулінів людини, разом зі спрямованими мутаціями, які інактивують ендегенні локуси ланцюгів мю і каппа (див. наприклад, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859).

[0125] В іншому варіанті здійснення повнорозмірні антитіла людини за винаходом можна індукувати з використанням миші, що несе послідовності імуноглобуліну людини в трансгенах і трансхромосомах, такої як миша, яка несе трансген важкого ланцюга людини і трансхромосому з легким ланцюгом людини. Такі миші в даному документі позначені як "миші КМ", такі миші описані в Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 і в публікації PCT WO 02/43478 для Tomizuka, et al.

[0126] Моноклональні антитіла людини за винаходом також можна одержувати з використанням способів фагового дисплея для скринінгу бібліотек генів імуноглобуліну людини. Такі способи фагового дисплея для виділення антитіл людини добре відомі в даній галузі. Див. наприклад: патенти США №№ 5223409; 5403484; і 5571698 to Ladner et al.; патенти США №№ 5427908 і 5580717 для Dower et al.; патенти США №№ 5969108 і 6172197 для McCafferty et al.; і патенти США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 і 6593081 для Griffiths et al.

[0127] Моноклональні антитіла людини за винаходом також можна одержувати з використанням мишей SCID, у яких були відновлені імунні клітини людини таким чином, що можна одержувати антитільну відповідь людини після імунізації. Такі миші описані, наприклад, у патентах США №№ 5476996 і 5698767 для Wilson, et al.

[0128] Крім того, антитіла людини за даним винаходом можна одержувати способами з використанням трансгенних мишей, що позначаються Xenomouse, інактивованих для продукції антитіл, сконструйованих за допомогою локусів важких і легких ланцюгів людини (Amgen Fremont, Inc., раніше Abgenix, Inc.). Ілюстративні описи одержання трансгенних мишей, які виробляють антитіла людини, можна знайти в патенті США 6657103. Див., також, патенти США №№ 5569825; 5625126; 5633425; 5661016; і 5545806; і Mendez, et. al. Nature Genetics, 15: 146-156 (1998); Kellerman, S.A. & Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597 (2002).

[0129] Будь-які з вищевказаних способів виробництва приводять у результаті до антитіл, що мають певну здатність зв'язуватися з FLT3, або гомологами, або фрагментами або послідовностями поліпептидів з 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% ідентичності послідовностей з FLT3. Афінність зв'язування ( $K_D$ ) антитіл, їхніх зв'язувальних фрагментів і кон'югатів антитіла з лікарським засобом, що містять такого ж антитіла для FLT3, може складати 1 мМ або менше, 100 нМ або менше, 10 нМ або менше, 2 нМ або менше 1 нМ або менше. Альтернативно,  $K_D$  може складати від 5 до 10 нМ; або від 1 до 2 нМ.  $K_D$  може знаходитися в межах від 1 мікромоль до 500 мікромоль або у межах від 500 мікромоль до 1 нМ.

[0130] Афінність зв'язування антигензв'язувального білка визначають шляхом константи асоціації ( $K_a$ ) і константи дисоціації ( $K_d$ ) ( $KD=K_d/K_a$ ). Афінність зв'язування можна вимірювати за допомогою BIACORE, наприклад, шляхом захоплення досліджуваного антитіла на сенсорну поверхню, покриту білком А, і наливання FLT3 на цю поверхню. Альтернативно, афінність зв'язування можна вимірювати за допомогою FORTEBIO, наприклад, з рецептором для досліджуваного антитіла, захопленим на голку, покриту білком А, і наливання FLT3 на цю поверхню. Фахівець у даній галузі може ідентифікувати інші прийнятні аналізи, відомі в даній галузі для вимірювання афінності зв'язування.

[0131] Термін "специфічно зв'язується", застосовуваний у даному документі відносно антигензв'язувальних білків, означає, що антигензв'язувальний білок зв'язується з FLT3, а також з визначеним доменом, або визначеною амінокислотою послідовністю в межах FLT3 без зв'язування або з незначним зв'язуванням з іншими (наприклад, неспорідненими) білками. Цей термін, однак не виключає той факт, що антитіла або їхні зв'язувальні фрагменти також можуть перехресно реагувати з близькоспорідненими молекулами. Антитіла і їхні фрагменти, а також кон'югати антитіло-лікарський засіб, що містять антитіла, описувані в даному документі, можуть специфічно зв'язуватися з FLT3, з афінністю, щонайменше, у 2, 5, 10, 50, 100 або 1000 разів вищою, ніж вони зв'язуються з близькоспорідненими молекулами.

[0132] У переважному варіанті здійснення МАТ до FLT3 за винаходом містить варіабельні області важкого і легкого ланцюгів антитіла, позначеного CHv62.21 і виробленого клітинами китайського хом'яка (CHO), що знаходяться на збереженні в Американській колекції типових культур (ATCC), номер доступу РТА-121831 (див., фігуру 3 А і/або 3В), або варіабельні області важкого і легкого ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, які гомологічні амінокислотним послідовностям варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів CHv62.21, і де антитіла зберігають бажані функціональні властивості МАТ до FLT3 за винаходом. Варіабельна область важкого ланцюга CHv62.21 складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (Е) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 9, і варіабельна область легкого ланцюга CHv62.21 складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 108 (R) SEQ ID NO: 10. CDR 1-3 (по Kabat) варіабельної області важкого ланцюга CHv62.21 складаються з амінокислотної послідовності в діапазоні від 31-35, від 50-65, і від 95-102 f SEQ ID NO: 9, відповідно, і CDR 1-3 (по Kabat або Chothia) варіабельної області легкого ланцюга CHv62.21 складаються з амінокислотної послідовності в діапазоні від 24-34, від 50-56, і від 89-97 SEQ ID NO: 10, відповідно (див., фігуру 4 і Таблицю V). Як константну область антитіла за винаходом можна вибирати будь-який підклас константної області. В одному з варіантів здійснення можна використовувати константну область IgG1 людини як константну область важкого ланцюга і константну область каппа Ig людини як константну область легкого ланцюга.

[0133] Наприклад, винахід стосується виділеного моноклонального антитілу або його антигензв'язувальної частини, яка містить варіабельну область важкого ланцюга і варіабельну область легкого ланцюга, де:

[0134] (a) варіабельна область важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка, щонайменше, на 80% ідентична амінокислотній послідовності варіабельної області важкого ланцюга, викладеній на фігурі 3A і/або 3B; і

5 [0135] (b) варіабельна область легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка, щонайменше, на 80% ідентична амінокислотній послідовності варіабельної області легкого ланцюга, викладеній на фігурі 3A і/або 3B.

10 [0136] В інших варіантах здійснення амінокислотні послідовності V<sub>H</sub> і/або V<sub>L</sub> на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичні послідовностям V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub>, викладеним на фігурі 3A і/або 3B. Опис у даному документі також пропонує полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, яка кодує або b, або послідовності V<sub>H</sub> або V<sub>L</sub>, викладені на фігурі 3A і/або 3B, а також полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, що на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичні цим.

15 [0137] В іншому варіанті здійснення винахід стосується виділеного моноклонального антитіла або його антигензв'язувальної частини, що містить гуманізовану варіабельну область важкого ланцюга і гуманізовану варіабельну область легкого ланцюга, де:

[0138] (a) варіабельна область важкого ланцюга містить області, які визначають комплементарність (CDR), з амінокислотними послідовностями CDR варіабельної області важкого ланцюга, викладеними на фігурі 3A і/або 3B;

20 [0139] (b) варіабельна область легкого ланцюга містить області, які визначають комплементарність (CDR), з амінокислотними послідовностями CDR варіабельної області легкого ланцюга, викладеними на фігурі 3A і/або 3B.

[0140] Сконструйовані антитіла за винаходом включають антитіла, у яких були зроблені модифікації в каркасних залишках у межах V<sub>H</sub> і/або V<sub>L</sub> (наприклад, для поліпшення властивостей антитіла). Як правило, такі модифікації каркаса роблять для зниження імуногенності антитіла. Наприклад, один зі способів призначений для "зворотної мутації" одного або декількох каркасних залишків до відповідної послідовності зародкової лінії. Більш конкретно, антитіло, яке піддалося соматичній мутації, може містити каркасні залишки, які відрізняються від послідовності зародкової лінії, з якої отримане антитіло. Такі залишки можна виявляти, порівнюючи каркасні послідовності антитіла з послідовностями зародкової лінії, з якої отримане антитіло. Для повернення послідовностей каркасної області до конфігурації зародкової лінії, соматичні мутації можуть бути "зворотно мутовані" до послідовності зародкової лінії, наприклад, шляхом сайт-специфічного мутагенезу або ПЛР-опосередкованого мутагенезу (наприклад "зворотно мутовані" з лейцину в метіонін). Такі "зворотно мутовані" антитіла також включені у винахід.

35 [0141] Інший тип модифікації каркаса включає мутування одного або декількох залишків усередині каркасної області, або навіть усередині однієї або декількох областей CDR, для видалення Т-клітинних епітопів і, таким чином, зниження потенційної імуногенності антитіла. Цей спосіб також позначають як "деіmunізація", і він додатково детально описаний у патентній публікації США № 2003/0153043 Carr et al.

40 [0142] Крім того або альтернативно, для модифікацій у каркасі або областях CDR, антитіла за винаходом можуть бути сконструйовані для включення модифікацій у межах Fc-області, як правило, для зміни однієї або декількох функціональних властивостей антитіла, таких як час напіввиведення із сироватки, фіксація комплементу, зв'язування з Fc-рецептором, і/або антиген-залежна клітинна цитотоксичність. Крім того, MAT до FLT3 за винаходом можна хімічно модифікувати (наприклад, можна приєднати одну або кілька хімічних груп до антитіла) або модифікувати для зміни його глікозилювання, знову для зміни однієї або декількох функціональних властивостей MAT. Кожний з цих варіантів здійснення описаний у додаткових деталях нижче.

50 [0143] В одному з варіантів здійснення шарнірна область CH1 модифікована таким чином, що число залишків цистеїну в шарнірній області змінене, наприклад, збільшене або зменшене. Цей спосіб додатково описаний у патенті США № 5677425, виданому Bodmer et al. Число залишків цистеїну в шарнірній області CH1 змінене, наприклад, для полегшення зборки легкого і важкого ланцюгів або для підвищення або зниження стабільності MAT до FLT3.

55 [0144] В іншому варіанті здійснення шарнірна область Fc антитіла мутована для зниження біологічного часу напівжиття MAT для FLT3. Більш конкретно, одну або кілька амінокислотних мутацій вводять в область поверхневої ділянки доменів CH2-CH3 Fc-шарнірні фрагменти таким чином, що антитіло має порушене зв'язування з білком А стафілокока (SpA) відносно нативного домена зв'язування з SpA Fc-шарніра. Цей спосіб додатково описаний у патенті США № 6165745, виданому Ward et al.

[0145] В іншому варіанті здійснення МАТ до FLT3 модифіковано для збільшення його біологічного часу напівжиття. Можливі різні способи. Наприклад, мутації можна вводити, як описано в патенті США № 6277375, виданому Ward. Альтернативно, для збільшення біологічного часу напівжиття антитіло можна змінювати в межах області CH1 або CL для включення епітопа зв'язування рецептора порятунку, що узятий із двох петель домена CH2 Fc-області IgG, як описано в патентах США №№ 5869046 і 6121022, виданих Presta et al.

[0146] В інших варіантах здійснення Fc-область змінен шляхом заміни, щонайменше, одного амінокислотного залишку іншим амінокислотним залишком для зміни ефекторної функції/функцій МАТ до FLT3. Наприклад, можна заміщати одну або кілька амінокислот, вибраних з конкретних амінокислотних залишків, іншим амінокислотним залишком, таким чином, що антитіло має змінену афінність для ефекторного ліганду, але зберігає антигензв'язувальну здатність батьківського антитіла. Ефекторний ліганд, афінність до якого змінюють, може бути, наприклад Fc-рецептором або компонентом C1 комплементу. Цей спосіб додатково описаний у патентах США №№ 5624821 і 5648260, обоє видані Winter, et al.

[0147] В іншому варіанті здійснення важкий ланцюг змінений шляхом заміни, щонайменше, одного амінокислотного залишку неприродною амінокислотою за допомогою технології ReCODE, розробленої Ambrx (La Jolla, CA). Одним із прикладів неприродної амінокислоти є пара-ацетилфенілаланін.

[0148] Реактивність антитіл до FLT3 з білком, спорідненим FLT3, можна встановлювати за допомогою ряду добре відомих способів, включаючи Вестерн-блотинг, імуопреципітацію, ELISA, і аналізи FACS, з використанням, при необхідності, білків, споріднених з FLT3, клітин, які експресують FLT3 або їхніх екстрактів. Антитіло до FLT3 або його фрагмент можна мітити детектованим маркером або кон'югувати із другою молекулою. Прийнятні детектовані маркери як необмежувальні приклади включають радіоактивний ізотоп, флуоресцентну сполуку, біолоюмінесцентну сполуку, хемілюмінесцентну сполуку, хелатор металів або фермент. Крім того, біспецифічні антитіла, специфічні для двох або більше епітопів FLT3, одержують з використанням способів, загально відомих у даній галузі. Гомодимерні антитіла можна також одержувати за допомогою способів перехресного зшивання, відомих у даній галузі (наприклад, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

[0149] У ще одному переважному варіанті здійснення, МАТ до FLT3 за винаходом являє собою антитіло, яка містить важкі і легкі ланцюги антитіла, позначеного CHv62.21. Важкий ланцюг CHv62.21 складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, і легкий ланцюг CHv62.21 складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO: 10. Їхня послідовність представлена на фігурі 2A і/або 2B і фігурі 3A і/або 3B. У переважному варіанті здійснення CHv62.21 модифіковано неприродною амінокислотою ("npAA") і кон'юговано з цитотоксичним засобом. В одному з варіантів здійснення npAA являє собою rAF. У переважному варіанті здійснення цитотоксичний засіб специфічно кон'югований до npAA.

[0150] У ще одному варіанті здійснення МАТ до FLT3 за винаходом вироблене способом виробництва антитіла або антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна, що дозволяє експресуватися антитілу або антигензв'язувальному фрагменту, де клітина-хазяїн вибрана із групи, яка складається з наступних клітин-хазяїнів від (a) до (c):

(a) клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 9, і полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10;

(b) клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 9, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10; і

(c) клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 9, і клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10.

[0151] У ще одному варіанті здійснення МАТ до FLT3 за винаходом вироблене способом виробництва антитіла або антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна, що дозволяє експресуватися антитілу або антигензв'язувальному фрагменту, де клітина-хазяїн вибрана із групи, яка складається з наступних клітин-хазяїнів від (а) до (с):

(а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 9, і полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 9, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10; і

(с) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 9, і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10.

[0152] Клітини китайського хом'яка (CHO), які продукують антитіло, позначене CHv62.21, були відправлені (через Federal Express) в американську колекцію типових культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 09 грудня 2014 року, і їм присвоєний номер доступу РТА-121831.

[0153] Альтернативно або додатково, в іншому варіанті здійснення винаходу МАТ, яке зв'язується з FLT3, у цьому випадку, МАТ CHv62.21 може піддаватися посттрансляційним модифікаціям, відомим у даній галузі. Приклади посттрансляційних модифікацій як необмежувальні приклади включають хімічні модифікації, такі як дисульфідні зв'язки, олігосахариди, утворення N-кінцевого піроглутаміну, процесинг С-кінцевого лізину, деамідування, ізомеризацію, окиснення, глікування, розщеплення пептидного зв'язку, необоротна перехресна зшивка, укорочення й інші, відомі в даній галузі. Див., Liu, et. al, Heterogeneity of monoclonal antibodies, J. Pharma. Sci. vol. 97, no. 7, pp. 2426-2447 (липень 2008 року). Інші типи модифікацій включають нековалентну взаємодію, конформаційну гетерогенність і агрегацію. (там же).

[0154] У додатковому варіанті здійснення МАТ CHv62.21 містить циклізацію глутаміну в залишку 1 N-кінця важкого ланцюга в піроглутамінат. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що така циклізація відбувається спонтанно. Див., Dick, et. al, Determination of the Origin of the N-Terminal Pyro-Glutamate Variation in of monoclonal antibodies using Model Peptides, Biotechnology i Bioengineering, vol. 97, no. 3, pp 544-553 (June 15, 2007).

[0155] Додатково або альтернативно, амінокислоти МАТ CHv62.21 можуть піддаватися додатковим посттрансляційним модифікаціям, включаючи як необмежувальні приклади, деамідування, ізомеризацію, глікування і/або окиснення. Поліпептиди за винаходом або їхні фрагменти можуть піддаватися додатковим посттрансляційним модифікаціям, включаючи глікозилювання, наприклад, N-зв'язаних або О-зв'язаних ділянок глікозилювання, які добре відомі в даній галузі. Як описано раніше, можна робити зміни в амінокислотній послідовності поліпептиду або умовах способу (таких як зміни в культурі, очищення, і/або умови зберігання) для виключення або зведення до мінімуму таких змін, або для полегшення їх у таких обставинах, коли така обробка є вигідною. Крім того, такі препарати можуть містити поліпептид, які мають варіювані рівні більш ніж одного типу модифікацій, пов'язаних із процесингом, наприклад, у поліпептида можуть бути видалені декілька, більша частина або по суті всі С-кінцеві лізини і/або декілька, більша частина або по суті всі N-кінцеві амінокислоти перетворені в піроглутамінову кислоту (наприклад, поліпептиди, показані на фігурі 2А і/або 2В або фігурі 3А і/або 3В, або в консенсусній послідовності або антигензв'язувальних фрагментах). Умови процесу, такі як різний склад буферів і температура, можуть впливати на ступінь таких модифікацій.

[0156] У додатковому варіанті здійснення МАТ CHv62.21 містить укорочення по С-кінцевому лізину в залишку 453 важкого ланцюга з SEQ ID NO: 9.

[0157] У додатковому варіанті здійснення МАТ CHv62.21 містить додавання глікозилювання по аспарагіну в залишку 303 важкого ланцюга, включаючи як необмежувальні приклади,

G0(асіало-, агалакто, афукозилований двоантенарний N-глікан складеного типу); G0F (асіало-, агалакто- двоантенарний N-глікан складеного типу з коровою фукозою); Маноза-5 (N-зв'язана олігоманоза-5); GIF (асіало-, моногалакто, двоантенарний N-глікан складеного типу з коровою фукозою); G2 (асіало-, бігалакто-, афукозилований двоантенарний N-глікан складеного типу); G2F (асіало-, бігалакто-, двоантенарний N-глікан складеного типу з коровою фукозою); A1 (моносіалований, двоантенарний N-зв'язаний олігосахарид, 5-ацетилнейрамінова кислота); i/або A2 (дисіалований, двоантенарний N-зв'язаний олігосахарид, 5-ацетилнейрамінова кислота).

[0158] Додатково або альтернативно в іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 містить додавання глікування по одному або декількох залишках серину легкого ланцюга. Як правило, глікування відбувається через неферментативну реакцію між відновлювальними цукрами і N-кінцевим первинним аміном або аміновою групою бічних ланцюгів лізину. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що глікування може маскувати позитивний заряд на N-кінцевій первинній амінокислотній групі або бічному ланцюзі залишків лізину, що буде робити антитіло кислішим.

[0159] Амінокислотну послідовність поліпептидів за винаходом можна перевіряти будь-якими способами, відомими в даній галузі (наприклад, мас-спектрометрією), і вона може бути ідентична послідовностям, описуваним у даному документі (див., фігуру 2A i/або 2B і фігуру 3A i/або 3B) або може відрізнятися від цих послідовностей по одному або декількох амінокислотних залишках у результаті процесингу з посттрансляційними модифікаціями. Як необмежувальний приклад, в усіх або частині по суті гомогенних поліпептидів, може бути видалена C-кінцева амінокислота або в легкого ланцюга або важкого ланцюга шляхом протеолітичної обробки або іншої обробки, що відбувається в процесі культивування. Аналогічно, можуть бути відсутні N-кінцеві амінокислоти, наприклад, можуть бути відсутні одна (1), дві (2), три (3), чотири (4), або п'ять (5) N-кінцевих амінокислот.

[0160] В іншому варіанті здійснення варіабельна область важкого ланцюга MAT CHv62.21 вибрана із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 9 і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту.

[0161] В іншому варіанті здійснення важкий ланцюг MAT CHv62.21 вибраний із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де C-кінцевий залишок 453 (K) видалений, і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, і C-кінцевий залишок 453 (K) видалений.

[0162] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 або його антигензв'язувальний фрагмент являє собою суміш рекомбінантно вироблених білків, отриманих шляхом експресії в клітині-хазяїні, де варіабельна область важкого ланцюга антитіла або його антигензв'язувальний фрагмент вибрані з групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 9 і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту.

[0163] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 або його антигензв'язувальний фрагмент являє собою суміш рекомбінантно вироблених білків, отриманих шляхом експресії в клітині-хазяїні, де важкий ланцюг антитіла вибраний із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де C-кінцевий залишок 453 (K) видалений, і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 9, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту і C-кінцевий залишок 453 (K) видалений.

[0164] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 9, де 1E модифікований до піроглутамінату, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

[0165] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 9, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

5 [0166] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 9, де 1E модифікований до піроглутаміну, і С-кінцевий залишок 453K видалений, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

10 [0167] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21 містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 9, де С-кінцевий залишок 453K видалений, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

15 [0168] У додатковому переважному варіанті здійснення винаходу MAT до FLT3 за винаходом, і конкретно, MAT, позначене CHv62.21, модифіковане неприродною амінокислотою ("npAA") у важкому ланцюзі. У переважному варіанті здійснення амбер кодон розташований в амінокислотному положенні 124 SEQ ID NO: 11 для вставки npAA, позначеної пара-ацетилфенілаланін (фігура 3C). Модифіковане CHv62.21 у рамках даного винаходу позначають CHv62.21pAF.

[0169] Таким чином, у переважному варіанті здійснення винаходу CHv62.21pAF включає наступне:

20 [0170] Варіабельна область важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 11, і варіабельна область легкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 108 (R) SEQ ID NO: 10. CDR 1-3 (по Kabat) варіабельної області важкого ланцюга складаються з амінокислотної послідовності в діапазоні від 31-35, від 50-65, і від 95-102 SEQ ID NO: 11, відповідно, і CDR 1-3 (по Kabat або Chothia) варіабельної області легкого ланцюга складаються з амінокислотної послідовності в діапазоні від 24-34, 50-56, і 89-97 SEQ ID NO: 10 відповідно (див., фігуру 3B, фігуру 3C і таблицю V).

30 [0171] Важкий ланцюг складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 11 з npAA пара-ацетилфенілаланіном, вставленої по залишку 124 SEQ ID NO: 11, і легкий ланцюг CHv62.21 складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO: 10. Послідовності цих ланцюгів викладені на фігурі 2B і/або 2C і фігурі 3B і/або 3C. У переважному варіанті здійснення CHv62.21pAF кон'югований з цитотоксичним засобом.

35 [0172] У ще одному варіанті здійснення MAT до FLT3 за винаходом вироблене способом для виробництва антитіла або антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна з можливістю експресії антитіла або антигензв'язувального фрагмента, де клітина-хазяїн вибрана із групи, яка складається з наступних клітин-хазяїнів від (а) до (с):

40 (а) клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 11, і полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10;

45 (b) клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 11, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10; і

50 (с) клітина-хазяїн трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S у SEQ ID NO: 11, клітина-хазяїн, трансфікована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R у SEQ ID NO: 10.

55 [00100] У ще одному варіанті здійснення MAT до FLT3 за винаходом вироблене способом для виробництва антитіла, що включає культивування клітини-хазяїна з можливістю експресії антитіла, де клітина-хазяїн вибрана із групи, яка складається з наступних клітин-хазяїнів від (а) до (с):

(a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10; і

(c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10.

[0173] У ще одному варіанті здійснення MAT до FLT3 за винаходом вироблене способом для виробництва антитіла, що включає культивування клітини-хазяїна з можливістю експресії антитіла, де клітина-хазяїн вибрана із групи, яка складається з наступних клітин-хазяїнів від (a) до (d):

(a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10;

(c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K в SEQ ID NO: 11, і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10; і

(d) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який включає послідовність основ, які кодують варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 452G в SEQ ID NO: 11, де 1E модифікований до піроглутаміну, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C в SEQ ID NO: 10.

[0174] В іншому варіанті здійснення варіабельна область важкого ланцюга MAT CHv62.21pAF вибраний із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) в SEQ ID NO: 11 і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) в SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту.

[0175] В іншому варіанті здійснення важкий ланцюг MAT CHv62.21pAF вибраний із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) в SEQ ID NO: 11, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) в SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) в SEQ ID NO: 11, де C-кінцевий залишок 453 (K) видалений, і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) в SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, і C-кінцевий залишок 453 (K) видалений.

[0176] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF або його антигензв'язувальний фрагмент являє собою суміш рекомбінантно вироблених білків, отриманих шляхом експресії в

клітині-хазяїні, де варіабельна область важкого ланцюга або антитіла його антигензв'язувального фрагмента, вибрана з групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 11 і амінокислотної послідовності від залишку 1 (E) до залишку 123 (S) SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту.

[0177] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF являє собою суміш рекомбінантно вироблених білків, отриманих шляхом експресії в клітині-хазяїні, де важкий ланцюг вибраний із групи, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 11, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 11, де C-кінцевий залишок 453 (K) видалений, і амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO: 11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту, і C-кінцевий залишок 453 (K) видалений.

[0178] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 11, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

[0179] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 11, де 1E модифікований до піроглутаміну, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

[0180] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 11, де 1E модифікований до піроглутаміну і C-кінцевий залишок 453K видалений, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

[0181] В іншому варіанті здійснення MAT CHv62.21pAF містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K SEQ ID NO: 11, де C-кінцевий залишок 453K видалений, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO: 10.

[0182] Клітини китайського хом'яка (CHO), які продукують антитіло, позначене CHv62.21pAF, відправлені (за допомогою Federal Express) в Американську колекцію типових культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 09 грудня 2014 року, і йому присвоєний номер доступу PTA-121836.

### III.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб загалом

[0183] В іншому аспекті винахід стосується кон'югатів антитіла з лікарським засобом (ADC), що містять антитіло, кон'юговане з терапевтичним засобом. Терапевтичний засіб може бути цитотоксичним засобом, цитостатичною речовиною, хімотерапевтичним засобом, лікарським засобом, засобом, який інгібує ріст, токсином (наприклад, ферментативно активним токсином бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або його фрагментами), або радіоактивним ізотопом (тобто, радіокон'югатом). В іншому аспекті винахід додатково стосується способів з використанням ADC. В одному з аспектів ADC містить будь-яке з вищеописаних MAT до FLT3, ковалентно приєднане або приєднане через оксимовий зв'язок до цитотоксичного засобу або детектованого засобу.

[0184] Застосування кон'югатів антитіла з лікарським засобом для місцевої доставки цитотоксичних або цитостатичних речовин, тобто лікарських засобів для знищення або інгібування пухлинних клітин при лікуванні злоякісної пухлини (Syrgos і Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz і Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; патент США 4975278) дозволяє спрямовано доставляти компонент лікарського засобу до пухлин, і здійснювати його внутрішньоклітинне накопичення, при цьому системне введення цих некон'югованих лікарських речовин може приводити до неприйнятних рівнів токсичності для нормальних клітин, і також як і пухлинні клітини, їх можна знищити (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody carriers Of Cytotoxic agents In cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). У зв'язку з цим намагалися домогтися максимальної ефективності з мінімальною токсичністю. Були описані і поліклональні антитіла, і моноклональні антитіла, корисні для цих стратегій (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Лікарські засоби, застосовувані в цих способах включають дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндезин (Rowland et al., (1986) вище). Токсини, застосовувані в кон'югатах антитіло-токсин включають бактеріальні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин,

низькомолекулярні токсини, такі як гелданаміцин (Mandler et al (2000) Jour, °F the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноїди (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) і каліхіміцин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Токсини можуть реалізовувати свої цитотоксичні і цитостатичні впливи за допомогою механізмів, що включають зв'язування з тубуліном, зв'язування з ДНК або інгібування топоізомерази. Деякі цитотоксичні лікарські засоби виявляють тенденцію до неактивності або до зниження активності, коли вони кон'юговані з великими антитілами або лігандами білкових рецепторів.

[0185] Прикладами кон'югатів антитіла з лікарським засобом є ЗЕВАЛІН® (ібритумомаб тіуксетан, Biogen/Idec), який являє собою кон'югат антитіло-радіоактивний, що складається з моноклонального антитіла каппа IgG1 миші, спрямованого проти антигену CD20, що знаходиться на поверхні нормальних і злоякісних В-лімфоцитів, і радіоактивного ізотопу <sup>111</sup>In або <sup>90</sup>Y, зв'язаного шляхом лінкера-хелатора з тіосечовини (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69).

[0186] Також, у 2000 році для лікування гострого мієлолейкозу шляхом ін'єкції схвалений МІЛОТАРГ™ (гемтузумаб озогаміцин, Wyeth Pharmaceuticals), кон'югат антитіло-лікарський засіб, що складається з антитіла huCD33, зв'язаного з каліхіміцином (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенти США №№ 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001).

[0187] Крім того, раніше оцінені антитіла до FLT3 людини як потенційні терапевтичні засоби для мієлолейкозу. Наприклад, IMC-EB 10, антитіло проти FLT3, було розроблене Imclone. Це антитіло являє собою блокатор ліганду, що інгібує FLT3-опосередковану активацію нижче розташованих кіназ (MAPK, Akt і Stat5). Антитіло також інгібує проліферацію лейкозних клітин *in vitro*; і відомо, що воно діє через антитілозалежну клітинну токсичність (ADCC). EB10 викликало тривале виживання лейкозних ксенотрансплантатів при лікуванні ним окремо й у комбінації з метотрексатом (див., WO2009/155015 і US2011/0008355). Це антитіло також оцінювали в клінічних випробуваннях у людей (NCT00887926), але випробування були припинені через відсутність ефективності. Також див., EB10, кон'юговане з MMAF, було розроблено Imclone (див., Proc Amer Assoc Cancer Res, 46 Volume 2005 року).

[0188] У даній галузі відомо, що антитіла-агоністи, розроблені проти FLT3, можуть підсилювати проліферацію і диференціювання недиференційованих гемопоетичних клітин (див., WO 95/27062).

[0189] На додаток до біологічного була розроблена множина низькомолекулярних інгібіторів і досліджено в клінічних випробуваннях у людей. Більшість з цих інгібіторів спрямоване до FLT3 і іншим кіназ і, таким чином, вони не є специфічними тільки відносно кінази FLT3. У більшості випадків ці інгібітори спрямовані до FLT3-ITD і можливо до FLT-TKD. Таким чином, доступних інгібіторів, спрямованих тільки до FLT3 дикого типу немає. Низькомолекулярні інгібітори, про які відомо, що вони ввійшли в клінічні випробування в людей, являють собою:

[0190] Мідостаурин або PKC-412 (Novartis), квізартиніб або AC220 (Ambit), нексавар (Onyx/Bayer), AZD1152 або барасертиб (Astrazeneca), кренолініб (Arog), плексикон (Daichi Sankyo) і ASP2215 (Astellas). Як правило, більшість із клінічних випробувань у людей усе ще продовжуються. У більшості випадків спостерігали побічні ефекти у вигляді тромбоцитопенії, нейтропенії, анемії.

[0191] Крім того, у випробування фази II перейшов мертанзин кантузумабу (Immunogen, Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, що складається з антитіла huC242, зв'язаного через дисульфідний лінкер SPP з лікарською групою майтанзиноїду, DM1, для лікування злоякісних пухлин, які експресують CanAg, таких як пухлини товстого кишечника, підшлункової залози, шлунка й інші.

[0192] Крім того, у розробці знаходиться MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen, Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, що складається з моноклонального антитіла до специфічного мембранного антигену (PSMA) передміхурової залози, зв'язаного з лікарською групою майтанзиноїду, DM1, для потенційного лікування пухлин передміхурової залози.

[0193] Нарешті, ауристатинові пептиди, ауристатин Е (АЕ) і монометилауристатин (ММАЕ), синтетичні аналоги доластатину, були кон'юговані з химерними моноклональними антитілами сBR96 (специфічними до антигену Льюїса Y на карциномах) і сAC10 (специфічне до CD30 на гемобластозах) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784).

[0194] МАТ до CD30, кон'юговане з MMAE, зараз комерційно доступне як ADCETRIS (Seattle Genetics, Bothell, WA). ADCETRIS (ведотин брентуксимабу) являє собою спрямований на CD30 кон'югат антитіло-лікарський засіб, що складається з трьох компонентів: 1) химерного антитіла IgG1, позначеного сAC10, специфічного до людського CD30, 2) речовини, яка руйнує мікротрубочки MMAE, і 3) лінкера, що розщеплюється протеазою, який ковалентно приєднує MMAE до сAC10. Див., інструкцію з застосування препарату ADCETRIS.

[0195] Крім того, у даному документі описані терапевтичні засоби, що включають як необмежувальні приклади хіміотерапевтичні засоби, що підходять для створення ADC. Ферментативно активні токсини і їхні фрагменти, які можна використовувати, включають ланцюг А дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модекцину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, і PAP-S), інгібітор *Momordica Charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia Officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецини. Див., наприклад, WO 93/21232, опублікований 28 жовтня 1993 року. Різні радіонукліди доступні для виробництва радіокон'югованих антитіл. Приклади включають  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ . Кон'югати антитіла і цитотоксичного засобу виробляють з використанням різних біфункціональних білок-зв'язувальних речовин, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональних похідних імідоефірів, таких як диметил адипімідат HCl), активних складних ефірів (таких як дисукцинімідил суберат), альдегідів (таких як глутаральдегід), біс-азидо сполук (таких як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідних біс-діазонію (таких як біс(р-діазонійбензоїл)-етилєндіамін), діізоціанатів (таких як толуол 2,6-діізоціанат), і біс-активних сполук фтору (таких як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицину можна одержувати, як описано в Vitetta et al (1987) Science, 238: 1098. 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилєн триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA), мічена вуглецем-14, являє собою приклад хелатуючого засобу для кон'югації радіонукліда з антитілом (WO94/11026).

[0196] Кон'югати антитіла й одного або декількох низькомолекулярних токсинів, таких як каліхіміцин, майтанзиноїди, доластатини, ауристатини, трихотецен і CC1065, і похідних цих токсинів, що мають активність токсину, також розглядаються в даному документі.

#### III(A). Майтанзиноїди

[0197] Сполуки майтанзину, що підходять для використання як лікарської групи майтанзиноїдів, добре відомі в даній галузі, і їх можна виділяти з природних джерел відповідно до відомих способів, виробляти з використанням способів генетичної інженерії (див. Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), або одержувати майтанзинол і аналоги майтанзинолу синтетичним шляхом відповідно до відомих способів.

[0198] Ілюстративні лікарські групи майтанзиноїдів включають групи з модифікованим ароматичним кільцем, такі як: C-19-дехлор (US 4256746) (отримана шляхом відновлення ансамітоцину P2 за допомогою літій алюмогідриду); C-20-гідрокси (або C-20-деметил) +/-C-19-дехлор (патенти США №№ 4361650 і 4307016) (отримана шляхом деметилювання з використанням *Streptomyces* або *Actinomyces* або дехлорування з використанням літій алюмогідриду (LAH)); і C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757) (отримана шляхом ацилювання з використанням ацилхлоридів), і групи з модифікаціями в інших положеннях.

[0199] Ілюстративні лікарські групи майтанзиноїдів також включають групи з такими модифікаціями як: C-9-SH (US 4424219) (отримана шляхом реакції майтанзинолу з  $\text{H}_2\text{S}$  або  $\text{P}_2\text{S}_5$ ); C-14-алкоксиметил(деметокси/ $\text{CH}_2\text{OR}$ )(US 4331598); C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил ( $\text{CH}_2\text{OH}$  або  $\text{CH}_2\text{OAc}$ ) (US 4450254) (отримана з *Nocardia*); C-15-гідрокси/ацилокси (US 4364866) (отримана шляхом конверсії майтанзинолу за допомогою *Streptomyces*); C-15-метокси (патенти США №№ 4313946 і 4315929) (виділена з *Trewia nudiflora*); C-18-N-деметил (патенти США №№ 4362663 і 4322348) (отримана шляхом деметилювання майтанзинолу за допомогою *Streptomyces*); і 4,5-дезоксид (US 4371533) (отримана шляхом відновлення майтанзинолу за допомогою трихлориду титану/LAH).

[0200] ADC, які містять майтанзиноїди, способи їхнього одержання і їхнє терапевтичне застосування описані, наприклад, у патентах США №№ 5208020; 5416064; 6441163 і європейському патенті EP 0425235B1, описи яких явно включені в даний документ як посилання. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описали ADC, що містять майтанзиноїд, позначений DM1, зв'язаний з моноклональним антитілом C242, спрямованим проти колоректального раку людини. Було виявлено, що кон'югат виявляє високу токсичність відносно культивованих клітин раку товстого кишечника і показує протипухлинну активність в

аналізі росту пухлини *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) описують ADC, у яких майтанзиноїд був кон'югований через дисульфідний лінкер з антитілом миші A7, що зв'язується з антигеном лінії клітин раку товстого кишечника людини, або з іншим мишачим моноклональним антитілом ТА.1, що зв'язується з онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичність кон'югата ТА.1-майтанзиноїд тестували *in vitro* на лінії злоякісних клітин молочної залози людини SK-BR-3, яка експресує  $3 \times 10^5$  поверхневих антигенів HER-2 на клітину. Кон'югат з лікарським засобом досяг ступеня цитотоксичності, подібного до вільного мایتанзиноїду, що може збільшуватися зі збільшенням числа молекул мایتанзиноїду на молекулу антитіла. Кон'югат A7-майтанзиноїд показав низьку системну цитотоксичність у мишей.

### III(B). Ауристатини і доластатини

[0201] У певних варіантах здійснення ADC містить антитіло за винаходом, кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами і похідними доластатинів, ауристатинами (патенти США №№ 5635483; 5780588). Було показано, що доластатини й ауристатини перешкоджають динаміці мікротрубочок, гідролізу ГТФ і розподілу ядра і клітинному розподілу (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584), і мають протиракову (US 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Лікарську групу доластатинів або ауристатинів можна приєднати до антитіла через N(аміно)-кінець або C(карбокси)-кінець пептидної лікарської групи (WO 02/088172).

[0202] Приклади варіантів здійснення з ауристатином включають зв'язані по N-кінцю монометилауристатинові лікарські групи DE і DF, описані в "Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, представленої 28 березня 2004 року, і описані в патентній публікації США No. 2005/0238649, зміст якої повністю явно включений як посилання.

[0203] Як правило, лікарські групи на основі пептидів можна одержувати шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можна одержувати, наприклад, способом рідкофазного синтезу (див. E. Schroder і K. Liibke, "Пептиди", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), який добре відомий в галузі хімії пептидів. Лікарські групи з ауристатином/доластатином можна одержувати способами з US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; і Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

### III(C). Каліхіміцин

[0204] В інших варіантах здійснення ADC містить антитіло за винаходом, кон'юговане з одним або декількома молекулами каліхіміцину. Сімейства каліхіміцинових антибіотиків здатні до утворення дволанцюжкових розривів ДНК у субмікомольних концентраціях. Для одержання кон'югатів сімейства каліхіміцину, див. патенти США 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (усі видані American Cyanamid Company). Структурні аналоги каліхіміцину, які можна використовувати, як необмежувальні приклади включають  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-ацетил- $\gamma_1^1$ , PSAG і  $\theta_1^1$  (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) і вказані вище патенти США для American Cyanamid). Іншим протипухлинним лікарським засобом, з яким може бути кон'юговане антитіло, є QFA, що являє собою антифолат. І каліхіміцин, і QFA мають внутрішньоклітинні ділянки дії і насилу перетинають плазматичну мембрану. Таким чином, клітинне захоплення цих речовин шляхом інтерналізації, опосередкованої антитілом, значно підсилює їх цитотоксичні ефекти.

### III(D). Інші цитотоксичні засоби

[0205] Інші протипухлинні засоби, які можна кон'югувати з антитілами за винаходом, включають BCNU, стрептозоїцин, вінкрисдин і 5-фторурацил, сімейство речовин, спільно відомих як комплекс LL-E33288, описане в патентах США 5053394, 5770710, а також еспераміцини (патент США 5877296).

[0206] Ферментативно активні токсини і їхні фрагменти, які можна використовувати, включають ланцюг А дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин, і трихотецини. Див., наприклад, WO 93/21232 (опубліковану 28 жовтня 1993 року).

[0207] Даний винахід додатково стосується ADC, утвореного між антитілом і сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

[0208] Для селективного руйнування пухлини, антитіло може включати високорадіоактивний атом. Різні радіонукліди доступні для виробництва радіокон'югованих антитіл. Приклади включають  $At^{211}$ ,  $^{131}I$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  і радіоактивні ізотопи Lu. Якщо кон'югат використовують для детекції, він може містити радіоактивний атом для

5 сцинтиграфічних досліджень, наприклад,  $Tc^{99}$  або  $I^{123}$ , або спінову мітку для візуалізації шляхом ядерно-магнітного резонансу (ЯМР) (також відомої як візуалізація шляхом магнітного резонансу, mri), таку як знову йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

[0209] Радіо- або інші мітки можна вводити в кон'югат відомими способами. Наприклад, пептид може бути синтезований біологічним шляхом або може бути синтезований за допомогою хімічного синтезу амінокислот з використанням прийнятних амінокислот попередників, що містять, наприклад, фтор-19 замість водню. Мітки, такі як  $Tc^{99}$  або  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  і  $In^{111}$  можна приєднувати через залишок цистеїну до пептиду. Ітрій-90 можна приєднувати через залишок лізину. Можна використовувати спосіб IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) для вставки йоду-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) детально описує інші способи.

IV.) Сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб, які зв'язуються з FLT3

[0210] Даний винахід стосується, у числі іншого, сполук кон'югатів антитіло-лікарський засіб для спрямованої доставки терапевтичних засобів. Автори винаходу зробили відкриття, що

20 сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб мають потужну цитотоксичну і/або цитостатичну активність проти клітин, які експресують FLT3.

[0211] Такі кон'югати антитіло-лікарський засіб не блокують зв'язування FL з FLT3, так що FL може передавати сигнал через FLT3, навіть коли зв'язується антитіло. Такі антитіла демонструють цитотоксичну активність, що не знижується в присутності FL (де кон'югат антитіло до FLT3/ лікарський засіб, що не блокує зв'язування FL з FLT3, демонструє знижену цитотоксичність у присутності FL). У переважних варіантах здійснення кон'югати з лікарським засобом проти FLT3, описувані в даному документі, по суті не інгібують зв'язування FL з FLT3.

[0212] Сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять групу антитіла, ковалентно зв'язану, щонайменше, з однією групою лікарського засобу. Групи лікарського засобу можуть бути ковалентно зв'язані безпосередньо з групою антитіла або через лінкерну групу (-LU-).

[0213] У певних варіантах здійснення сполука кон'югата антитіла з лікарським засобом має наступну формулу:

$L-(LU-D)_p$ , (I)

або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват; де:

35 L являє собою групу антитіла, наприклад, МАТ до FLT3 за даним винаходом, таке як CHv62.21 або CHv62.21pAF, і

(LU-D) являє собою компонент лінкерна група-група лікарського засобу, де:

LU- являє собою лінкерну групу, і

40 -D являє собою групу лікарського засобу з цитостатичною або цитотоксичною активністю проти клітини-мішені; і

p знаходиться в діапазоні від 1 до 20.

[0214] У певних варіантах здійснення p знаходиться в діапазоні від 1 до 10, від 1 до 9, від 1 до 8, від 1 до 7, від 1 до 6, від 1 до 5, від 1 до 4, від 1 до 3 або від 1 до 2. У певних варіантах здійснення p знаходиться в діапазоні від 2 до 10, від 2 до 9, від 2 до 8, від 2 до 7, від 2 до 6, від 2 до 5, від 2 до 4 або від 2 до 3. В інших варіантах здійснення p являє собою 1, 2, 3, 4, 5 або 6. У певних варіантах здійснення p являє собою 2 або 4. У певних варіантах здійснення p являє собою ціле число. В інших варіантах здійснення p вимірюють у вигляді середнього співвідношення лікарського засобу до антитіла, і воно може являти собою ціле або дробове число.

50 [0215] У певних варіантах здійснення сполука кон'югата антитіла з лікарським засобом має наступну формулу:

$L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$  (II)

або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват; де:

55 L являє собою групу антитіла, наприклад, МАТ до FLT3, таке як CHv62.21 або CHv62.21pAF; і - $A_a-W_w-Y_y$ - являє собою лінкерну групу (LU), де:

-A- являє собою розтягуювальну групу,

а являє собою 0 або 1, або 2, або 3,

кожна -W- незалежно являє собою амінокислотну групу,

w являє собою ціле число в діапазоні від 0 до 12,

60 -Y- являє собою саморозщеплювану спейсерну групу,

у являє собою 0, 1 або 2;

-D являє собою групи лікарського засобу з цитостатичною або цитотоксичною активністю проти клітини-мішені; і

р являє собою ціле число від 1 до 20.

5 [0216] У певних варіантах здійснення а являє собою 0 або 1, w являє собою 0 або 1, і у являє собою 0, 1 або 2. У певних варіантах здійснення а являє собою 0 або 1, w являє собою 0 або 1, і у являє собою 0 або 1. У певних варіантах здійснення р знаходиться в діапазоні від 1 до 10, від 1 до 9, від 1 до 8, від 1 до 7, від 1 до 6, від 1 до 5, від 1 до 4, від 1 до 3 або від 1 до 2. У певних варіантах здійснення р знаходиться в діапазоні від 2 до 8, від 2 до 7, від 2 до 6, від 2 до 5, від 2 до 4 або від 2 до 3. В інших варіантах здійснення р являє собою 1, 2, 3, 4, 5 або 6. У певних варіантах здійснення р являє собою 2 або 4. У певних варіантах здійснення, коли w не дорівнює нулю, у являє собою 1 або 2. У певних варіантах здійснення, коли w складає від 1 до 12, у являє собою 1 або 2. У певних варіантах здійснення w складає від 2 до 12, і у являє собою 1 або 2. У певних варіантах здійснення а являє собою 1, і w і у являють собою 0.

15 [0217] Для композицій, які містять множину антитіл, вміст лікарського засобу представлений р, середнім числом молекул лікарського засобу на антитіло. Вміст лікарського засобу може знаходитися в діапазоні від 1 до 20 лікарських засобів (D) на антитіло. Середнє число лікарських засобів на антитіло в препараті, отриманому при реакціях кон'югації, можна характеризувати загальноприйнятими способами, такими як мас-спектроскопія, аналіз ELISA і ВЕРХ. Можна також визначати кількісний розподіл антитіло-лікарський засіб у кон'югатах відносно р. У деяких випадках, відділення, очищення і характеристики гомогенних кон'югатів антитіло-лікарський засіб, де р має визначену величину, від кон'югатів антитіло-лікарський засіб з іншим вмістом лікарських засобів можна робити такими способами, як зворотно-фазова ВЕРХ або електрофорез. В ілюстративних варіантах здійснення р складає від 2 до 8.

25 [0218] Одержання сполук кон'югатів антитіло-лікарський засіб можна здійснювати будь-яким способом, відомим фахівцю в даній галузі. У короткому викладі, Сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять МАТ до FLT3 за винаходом як групу антитіла, лікарський засіб і необов'язковий лінкер, що з'єднує лікарський засіб і зв'язувальний засіб. У переважному варіанті здійснення антитіло являє собою МАТ до FLT3, що містить варіабельні області важких і легких ланцюгів антитіла, позначеного CHv62.21 і описаного вище. У більш переважному варіанті здійснення антитіло являє собою МАТ до FLT3, що містить важкі і легкі ланцюги антитіла, позначеного CHv62.21pAF і описаного вище (див., формулу (I)).

30 [0219] Доступний ряд різних реакцій для ковалентного приєднання лікарських засобів і/або лінкерів до зв'язувальних засобів. Це часто досягається реакцією амінокислотних залишків зв'язувального засобу, наприклад, молекули антитіла, включаючи аміногрупи лізину, вільні групи карбонових кислот глутамінової і аспарагінової кислоти, сульфгідрильні групи цистеїну і різні групи ароматичних амінокислот. Один з найбільш загальноприйнятих неспецифічних способів ковалентного приєднання являє собою карбодіімідну реакцію для зв'язування карбокси (або аміно) груп сполук з аміно (або карбокси) групами антитіла. Крім того, для зв'язку аміногруп сполук з аміногрупами молекули антитіла використовували біфункціональні речовини, такі як діальдегіди або імідоефіри. Також можливо приєднувати лікарські засоби до зв'язувальних засобів шляхом реакції з основою Шиффа. Цей спосіб включає йодноокислення лікарського засобу, що містить гліколь або гідроксигрупи, таким чином, утворюється альдегід, який потім реагує зі зв'язувальним засобом. Приєднання відбувається за допомогою утворення основи Шиффа з аміногрупами зв'язувального засобу. Ізотіоціанати також можна використовувати як зв'язувальні речовини для ковалентного приєднання лікарських засобів до зв'язувальних засобів. Інші способи відомі фахівцю в даній галузі і знаходяться в об'ємі даного винаходу.

40 [0220] У певних варіантах здійснення проміжна сполука, яка є попередником лінкера, реагує з лікарським засобом при прийнятних умовах. У певних варіантах здійснення використовують реакційноздатні групи на лікарському засобі і/або проміжній сполуці. Продукт реакції між лікарським засобом і проміжною сполукою, або дериватизований лікарський засіб потім реагує з МАТ до FLT3 при прийнятних умовах.

V.) Лінкерні групи

55 [0221] Як правило, сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять лінкерну групу між групою лікарського засобу і групою антитіла. У певних варіантах здійснення лінкер розщеплюється при внутрішньоклітинних умовах, таким чином, що розщеплення лінкера вивільняє групу лікарського засобу з антитіла у внутрішньоклітинному оточенні. В інших варіантах здійснення лінкерна група не розщеплюється і лікарський засіб вивільняється, наприклад, при руйнуванні антитіла.

[0222] У певних варіантах здійснення лінкер розщеплюється розщеплювальною речовиною, яка присутня у внутрішньоклітинному оточенні (наприклад, усередині лізосоми або ендосоми або кавеоли). Лінкер може бути, наприклад, пептидним лінкером, що розщеплюється внутрішньоклітинною пептидазою або протеазним ферментом, включаючи як необмежувальні приклади, лізосомальну або ендосомальну протеазу. Лінкер також можна розщеплювати розщеплювальною речовиною, яка присутня у позаклітинному оточенні (наприклад, у безпосередній близькості до клітинної мембрани або в тканинному просторі). Лінкер може бути, наприклад, пептидним лінкером, що розщеплюється позаклітинною пептидазою або протеазним ферментом, включаючи як необмежувальні приклади, ферменти катепсинового сімейства або матриксні металопротеїнази). У певних варіантах здійснення пептидний лінкер має, щонайменше, дві амінокислоти в довжину або, щонайменше, три амінокислоти в довжину. У переважному варіанті здійснення пептидний лінкер містить, щонайменше, одну аміно-окси кислотну групу (Ambrx, Inc., La Jolla, CA). Розщеплювальні речовини можуть включати речовини, відомі в даній галузі (див., наприклад, Dubowchik і Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123 і патент США №: 6214345). Однією з переваг використання внутрішньоклітинного протеолітичного вивільнення терапевтичного засобу є те, що речовина, як правило, ослаблена, коли кон'югована, і стабільність кон'югатів у сироватці, як правило, висока.

[0223] В інших варіантах здійснення розщеплюваний лінкер є pH-чутливим, тобто, чутливим до гідролізу при визначених значеннях pH. Як правило, pH-чутливий лінкер гідролізується при кислих умовах. Наприклад, можна використовувати кислото-нестійкий лінкер, який гідролізується в лізосомі (наприклад, оксим, гідразон, семікарбазон, тіосемікарбазон, цис-аконітний амід, ортоєфір, ацеталь, кеталь, або т.п.). (див., наприклад, патенти США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik і Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661). Такі лінкери відносно стабільні при нейтральних умовах pH, таких як, умови в крові, але нестабільні або менш стабільні при pH нижче 5,5 або 5,0, приблизного pH лізосоми. У певних варіантах здійснення гідролізований лінкер являє собою тіоефірний лінкер (такий як, наприклад, тіоефір, приєднаний до терапевтичного засобу через ацилгідразоновий зв'язок (див., наприклад, патент США № 5622929).

[0224] В інших варіантах здійснення лінкер розщеплюється при відновних умовах, відомих у даній галузі. (див., наприклад, Thorpe et al, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Також див. патент США № 4880935). Лінкер також може розщеплюватися при відновних умовах внутрішньоклітинно (або позаклітинно). Наприклад, у переважному варіанті здійснення конкретна лінкерний зв'язок N-O може бути формально відновлений і зруйнований, що в результаті приводить до розщеплення лінкера.

[0225] В інших варіантах здійснення лінкерна група не розщеплюється і лікарський засіб вивільняється при руйнуванні антитіла. (Див. публікацію PCT № WO2012/166560 (Ambrx, Inc.), повністю включену в даний документ як посилання, і для всіх цілей).

[0226] В інших невзаємовиключних варіантах здійснення, лінкер сприяє клітинній інтерналізації, як відомо в даній галузі.

[0227] Множина ілюстративних лінкерів, які можна використовувати з даними композиціями і способами, описана в WO 2004/010957, публікації США No. 2006/0074008, публікації США No. 20050238649, і публікації США No. 2006/0024317 (кожна з яких включена в даний документ як посилання повністю і для всіх цілей).

[0228] У переважному варіанті здійснення LU за даним винаходом позначена AGL і загальновідома як 2-(амінооксі)оцтова кислота або  $C_2H_5NO_3$ .

#### VI.) Подовжувальна група

[0229] Подовжувальна група, (A), якщо присутня, здатна зв'язувати групу антитіла з амінокислотною групою (-W-), якщо присутня, зі спейсерною групою (-Y-), якщо присутня; або з групою лікарського засобу (-D). Прийнятні функціональні групи, які можуть бути присутніми на МАТ до FLT3 (наприклад, CHv62.21 або CHv62.21pAF), або природним чином або шляхом хімічних маніпуляцій, як необмежувальні приклади включають кетогрупу, альдегід, сульфгідрил, аміногрупу, гідроксил, аномерну гідроксильну групу вуглеводу, і карбоксил. Прийнятні функціональні групи являють собою кетогрупу, альдегід, сульфгідрил і аміногрупу. В одному з прикладів кетогрупа знаходиться на неприродній амінокислоті (npAA), введений в МАТ за винаходом. У додатковому прикладі, альдегідна група знаходиться на npAA, введений в МАТ за винаходом. В іншому прикладі, сульфгідрильні групи можна одержувати шляхом відновлення внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків МАТ до FLT3. В іншому варіанті здійснення сульфгідрильні групи можна одержувати при реакції аміногрупи лізину на МАТ до FLT3 з 2-

імінотіоланом (реагентом Траута) або з іншими реагентами, які утворюють сульфгідрил. У певних варіантах здійснення МАТ до FLT3 є рекомбінантним антитілом і сконструйоване зі вмістом одного або декількох лізинів. В інших певних варіантах здійснення рекомбінантне МАТ до FLT3 сконструйоване зі вмістом додаткових сульфгідрильних груп, наприклад, додаткових цистеїнів.

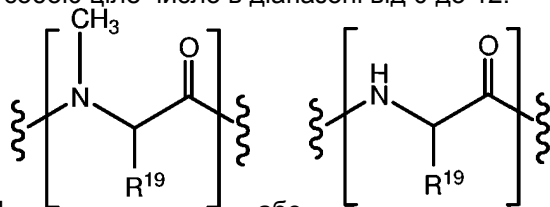
[0230] В одному з варіантів здійснення подовжувальна група формує оксимний зв'язок з кетогрупою групи антитіла. Кетогрупа присутня на ппАА, введений в МАТ.

[0231] Варто розуміти по всіх ілюстративних варіантах здійснення, що навіть якщо не позначене явно, до антитіла можна приєднувати від 1 до 20 молекул лікарського засобу ( $p=1-20$ ).

[0232] Амінокислотна група

[0233] Амінокислотна група (-W-), якщо присутня, зв'язує подовжувальну групу зі спейсерною групою, якщо спейсерна група присутня, зв'язує подовжувальну групу із групою лікарського засобу, якщо спейсерна група відсутня, і зв'язує групу антитіла з групою лікарського засобу, якщо подовжувальна група, і спейсерна група відсутні.

[0234] Ww- може являти собою, наприклад, монопептид, дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид, гексапептид, гептапептид, октапептид, нонапептид, декапептид, ундекапептид або додекапептид. Кожна -W-група незалежно має формулу, викладену нижче в квадратних дужках, і w являє собою ціле число в діапазоні від 0 до 12:



[0235]

або

[0236] де  $R^{19}$  як необмежувальні приклади включає водень, метил, ізопропіл, ізобутил, вторбутил, бензил, п-гідроксибензил,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил. Для додаткового посилання, див. US2014/0072586 і WO2012/047724, які повністю включені в даний документ як посилання.

[0237] У певних варіантах здійснення амінокислотна група може містити природні амінокислоти. В інших варіантах здійснення Амінокислотна група може містити неприродні амінокислоти.

[0238] У певних варіантах здійснення амінокислотну групу можна ферментативно розщеплювати одним або декількома ферментами, включаючи протеазу, асоційовану з пухлиною, для вивільнення групи лікарського засобу (-D), що в одному з варіантів здійснення протонуються *in vivo* після вивільнення для одержання лікарського засобу (D).

[0239] В одному з аспектів амінокислотна група є валіном-цитруліном (vc або val-cit). В іншому аспекті амінокислотна група є фенілаланіном-лізином (тобто, fk). У ще одному аспекті амінокислотна група є N-метилваліном-цитруліном.

VII.) Спейсерна група

[0240] Спейсерна група (-Y-), якщо присутня, зв'язує амінокислотну групу з групою лікарського засобу, коли амінокислотна група присутня. Альтернативно, спейсерна група зв'язує подовжувальну групу із групою лікарського засобу, коли амінокислотна група відсутня. Спейсерна група також зв'язує групу лікарського засобу з групою антитіла, коли й амінокислотна група, і подовжувальна група, відсутні. Спейсерні групи являють собою два загальні типи: несаморозщеплювальні або саморозщеплювальні. Приклади можливих спейсерів за винаходом відомі в даній галузі. Див., Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67: 1866-1872 і Nature Biotechnology 21(7):778- 784).

[0241] Інші приклади саморозщеплювальних спейсерів як необмежувальні приклади включають, ароматичні сполуки, які в електронному вигляді аналогічні групі PAB, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) і орто- або пара-амінобензилацеталі. Можна використовувати спейсери, які піддалися циклізації після гідролізу амідного зв'язку, такі як заміщені і незаміщені амідні 4-аміномасляної кислоти (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), відповідним чином заміщені біцикло[2.2.1] і біцикло[2.2.2] циклічні системи (Storm et al, 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) і амідні 2-амінофенілпропіонової кислоти амідні (Amsberry et al, 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Видалення аміновмісних лікарських

засобів, які заміщені по  $\alpha$ -положенню гліцину (Kingsbury et al, 1984, J. Med. Chem. 27:1447) також є прикладами саморозщеплювальних спейсерів.

#### VIII.) Група лікарського засобу

[0242] Група лікарського засобу (D) може бути будь-як терапевтичним засобом. Наприклад, група лікарського засобу може бути групою, яка є цитотоксичним, цитостатичним або імуномодуляторним (наприклад, імуносупресивним) або хіміотерапевтичним засобом. D являє собою групу лікарського засобу (молекулу) з атомом, що може утворювати зв'язок зі спейсерною групою (якщо присутня), з амінокислотою групою (якщо присутня), із подовжувальною групою (якщо присутня) або з групою антитіла. У певних варіантах здійснення група лікарського засобу D має атом азоту, що може утворювати зв'язок зі спейсерною групою (якщо її використовують). Застосовувані в даному документі терміни "група лікарського засобу" і "молекула лікарського засобу" є синонімами і використовуються взаємозамінно.

[0243] Прийнятні класи цитотоксичних або імуномодуляторних засобів включають, наприклад, антитубулінові засоби, засоби, що зв'язуються з малою канавкою ДНК, інгібітори реплікації ДНК і алкілюючі засоби. У певних варіантах здійснення лікарський засіб являє собою ауристатин, такий як ауристатин Е (також відомий у даній галузі як похідне доластатину-10) або його похідне. Інші типові ауристатини включають AFP, MMAF, і MMAE. Синтез і структура ілюстративних ауристатинів описані в патентах США №№ 6323315; 6239104; 6034065; 5780588; 5665860; 5663149; 5635483; 5599902; 5554725; 5530097; 5521284; 5504191; 5410024; 5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444; і 4486414, кожний з яких включений у даний документ як посилання повністю і для всіх цілей.

[0244] У певних варіантах здійснення група лікарського засобу являє собою каліхіміцин, камптотecin, майтанзиноїд або антрациклін. У певних варіантах здійснення лікарський засіб являє собою таксан, інгібітор топоізомерази, алкалоїд барвінку, або т.п.

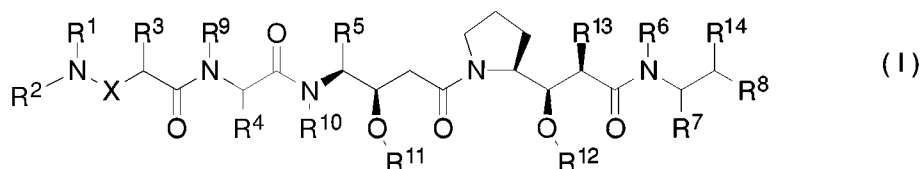
[0245] У визначених типових варіантах здійснення, прийнятні цитотоксичні засоби включають, наприклад, засоби, які зв'язуються з малою канавкою ДНК (наприклад, енедини і лекситропсини, сполука CBI; також див. патент США № 6130237), дуокарміцини, таксани (наприклад, паклітаксел і доцетаксел), пуроміцини, і алкалоїди барвінку. Інші цитотоксичні засоби включають, наприклад, CC-1065, SN-38, топотекан, морфоліно-доксорубіцин, ризоксин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, ехіноміцин, комбретастатин, нетропсин, епотилон А і В, естрамустин, криптофізини, цематодин, майтанзиноїди, дискодермолід, елеутеробін, і мітоксантрон.

[0246] У певних варіантах здійснення лікарський засіб являє собою антитубуліновий засіб. Приклади антитубулінових засобів включають, ауристатини, таксани (наприклад, Таксол® (паклітаксел), Таксотер® (доцетаксел)), Т67 (Туларик) і алкалоїди барвінку (наприклад, вінкрисдин, вінбластин, віндезин, і вінорелбін). Інші антитубулінові засоби включають, наприклад, похідні бакатину, аналоги таксану (наприклад, епотилон А і В), нокодазол, колхіцин і колцимід, естрамустин, криптофізини, цематодин, майтанзиноїди, комбретастатини, дискодермолід і елеутеробін.

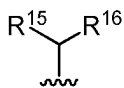
[0247] У певних варіантах здійснення цитотоксичний засіб являє собою майтанзиноїд, іншу групу антитубулінових засобів. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення майтанзиноїд є майтанзином або DM-1 (Immunogene, Inc.; також див. Chari et al., 1992, Cancer Res. 52: 127-131).

[0248] У певних варіантах здійснення цитотоксичний або цитостатичний засіб являє собою доластатин. У певних варіантах здійснення цитотоксичний або цитостатичний засіб стосується класу ауристатину.

[0249] У додатковому варіанті здійснення групи лікарського засобу являють собою нові пептидні аналоги долапроліну-долаізолейцину. Таким чином, у даному документі надані сполуки формули (I):

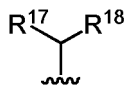


де  
кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або алкіл;  
X являє собою -O-, -NR<sup>2</sup>-, -S- або відсутній;  
де  $R^2$  являє собою -H або алкіл;  
 $R^3$  являє собою групу з формулою:



де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, алкіл, алкеніл, алкініл, -алкіл-N<sub>3</sub>;

$R^4$  являє собою групу з формулою:



5

де кожна з  $R^{17}$  і  $R^{18}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N, -CO<sub>2</sub>H, алкіл, алкеніл, алкініл, -алкіл-OH, -алкіл-NH<sub>2</sub>, -алкіл-SH, -алкіл-N<sub>3</sub> або -алкіл-CO<sub>2</sub>H;

$R^5$  являє собою втор-бутил або ізобутил;

$R^6$  являє собою -H або алкіл;

10

кожна з  $R^7$  і  $R^8$  незалежно являє собою -H, алкіл, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, заміщений або незаміщений феніл або заміщене або незаміщене гетероциклічне кільце;

де R<sup>a</sup> являє собою -H або алкіл;

кожна з R<sup>b</sup> і R<sup>c</sup> незалежно являє собою H або алкіл;

$R^9$  являє собою -H або алкіл; або  $R^9$  разом з  $R^4$  і атомами, з якими вони зв'язані, утворюють заміщене або незаміщене гетероциклоалкільне кільце;

15

$R^{10}$  являє собою -H або алкіл;

$R^{11}$  являє собою -H або алкіл;

$R^{12}$  являє собою -H або алкіл;

$R^{13}$  являє собою -H або алкіл; і

20

$R^{14}$  являє собою -H, -OH або алкіл;

за умови, що коли X відсутній і кожна з  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$  і  $R^{18}$  являє собою метил, тоді  $R^8$  являє собою незаміщений або незаміщений феніл або заміщене або незаміщене гетероциклічне кільце;

або їх ні армацевтично прийнятні солі.

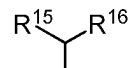
25

[0250] У певних варіантах здійснення кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою алкіл. У певних варіантах здійснення обидві  $R^1$  і  $R^2$  являють собою метил. У певних варіантах здійснення обидві  $R^1$  і  $R^2$  являють собою -H.

30

[0251] У певних варіантах здійснення X відсутній. В інших варіантах здійснення X являє собою -O-. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою алкіл, а X відсутній. У певних варіантах здійснення обидві  $R^1$  і  $R^2$  являють собою метил, а X відсутній. В інших варіантах здійснення обидві  $R^1$  і  $R^2$  являють собою -H, а X являє собою -O-. У певних варіантах здійснення X являє собою -NR<sup>Z</sup>-, де R<sup>Z</sup> являє собою -H або алкіл. У певних варіантах здійснення R<sup>Z</sup> являє собою -H. У певних варіантах здійснення X являє собою R<sup>Z</sup>, що являє собою алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл або метилметил.

35

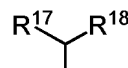


[0252] У певних варіантах здійснення  $R^3$  являє собою  $\begin{array}{c} R^{15} \quad R^{16} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{---} \end{array}$ , де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, алкіл, алкеніл, алкініл, -алкіл-OH, -алкіл-NH<sub>2</sub>, -алкіл-SH або -алкіл-N<sub>3</sub>. В інших варіантах здійснення кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, алкіл, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>C=CH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>CH=CH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>SH або -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>N<sub>3</sub>. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або алкіл. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або метил. У певних варіантах здійснення  $R^{15}$  являє собою -OH, а  $R^{16}$  являє собою водень. У певних варіантах здійснення  $R^{15}$  являє собою -OH, а  $R^{16}$  являє собою метил.

40

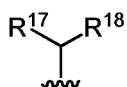
45

[0253] У певних варіантах здійснення  $R^3$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^3$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули. У певних варіантах здійснення група  $R^3$  сама містить один або декілька хіральних центрів, і кожний з цих стереохімічних центрів незалежно знаходиться в конфігурації R або S.



50

[0254] У певних варіантах здійснення  $R^4$  являє собою  $\begin{array}{c} R^{17} \quad R^{18} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{---} \end{array}$ , де кожна з  $R^{17}$  і  $R^{18}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, алкіл, алкеніл, алкініл, -алкіл-OH, -алкіл-NH<sub>2</sub>, -алкіл-SH, -алкіл-N<sub>3</sub> або -алкіл-CO<sub>2</sub>H. В інших варіантах здійснення  $R^4$  являє собою



, де  $R^{17}$  являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, алкіл, алкеніл, алкініл, -алкіл-OH, -алкіл-NH<sub>2</sub>, -алкіл-SH, -алкіл-N<sub>3</sub> або -алкіл-CO<sub>2</sub>H, і  $R^{18}$  являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, алкеніл, алкініл, -алкіл-OH, -алкіл-NH<sub>2</sub>, -алкіл-SH, -алкіл-N<sub>3</sub> або -алкіл-CO<sub>2</sub>H. В інших варіантах здійснення кожна з  $R^{17}$  і  $R^{18}$  незалежно являє собою -H, алкіл, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>C≡CH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>CH=CH<sub>2</sub>, -  
 5 (CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>SH або -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>N<sub>3</sub>. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^{17}$  і  $R^{18}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, алкіл, -алкіл-NH<sub>2</sub> або -алкіл-N<sub>3</sub>. У певних варіантах здійснення кожна з  $R^{17}$  і  $R^{18}$  незалежно являє собою -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -N<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, метил, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> або -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>.

[0255] У певних варіантах здійснення  $R^4$  разом з  $R^9$  і атомами, з якими вони зв'язані, утворюють заміщене або незаміщене гетероциклоалکیلне кільце. У певних варіантах здійснення  $R^4$  разом з  $R^9$  і атомами, з якими вони зв'язані, утворюють 5-7-членне гетероциклоалکیلне кільце, яке може бути незаміщеним або заміщеним однією або декількома групами, вибраними з -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH і -N<sub>3</sub>. У певних варіантах здійснення гетероциклоалکیلне кільце являє собою піролідинове кільце, яке може бути незаміщеним або заміщеним однією або  
 15 декількома групами, вибраними з -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH і -N<sub>3</sub>.

[0256] У певних варіантах здійснення  $R^4$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^4$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули. У певних варіантах здійснення група  $R^4$  сама містить один або декілька хіральних центрів, і кожний з цих стереохімічних центрів незалежно  
 20 знаходиться в конфігурації R або S.

[0257] У певних варіантах здійснення  $R^5$  являє собою втор-бутил. В інших варіантах здійснення  $R^5$  являє собою ізобутил. У певних варіантах здійснення  $R^5$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^5$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули. У певних варіантах здійснення хіральний центр у групі  $R^5$  знаходиться в конфігурації R, а в інших варіантах здійснення цей центр знаходиться в конфігурації S.  
 25

[0258] У певних варіантах здійснення  $R^6$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^6$  являє собою алкіл, наприклад, C<sub>1-8</sub>-алкіл, C<sub>1-4</sub>-алкіл, метил або етил.

[0259] У певних варіантах здійснення кожна з  $R^7$  і  $R^8$  незалежно являє собою -H, алкіл, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup> або -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>; де R<sup>a</sup> являє собою -H або алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл або метилметил; і кожна з R<sup>b</sup> і R<sup>c</sup> незалежно являє собою -H або алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл або метилметил.  
 30

[0260] У певних варіантах здійснення кожна з  $R^7$  і  $R^8$  незалежно являє собою заміщений або незаміщений феніл або заміщене або незаміщене гетероциклічне кільце, де феніл або гетероциклічне кільце можуть бути заміщеними однією або декількома групами, вибраними з галогену, оксо, гідрокси, аміно, алкілу й алкокси. В інших певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою незаміщене 3-8-членне гетероциклічне кільце. В інших певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою заміщене 3-8-членне гетероциклічне кільце. В інших певних варіантах здійснення  $R^8$  являє собою феніл, що необов'язково заміщений галогеном.  
 35

[0261] У певних варіантах здійснення  $R^7$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^7$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули.  
 40

[0262] У певних варіантах здійснення  $R^8$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^8$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули.  
 45

[0263] У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup> -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>; тетразоліл або тіазоліл, де R<sup>a</sup> являє собою -H або алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл або метилметил; і кожна з R<sup>b</sup> і R<sup>c</sup> незалежно являє собою -H або алкіл, наприклад, C<sub>1-6</sub>-алкіл або метилметил; і  $R^8$  являє собою феніл, який необов'язково заміщений галогеном.  
 50

[0264] У певних варіантах здійснення  $R^9$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^9$  являє собою алкіл, наприклад, C<sub>1-8</sub>-алкіл, C<sub>1-4</sub>-алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^9$  являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення  $R^9$  являє собою метил.  
 55

[0265] У певних варіантах здійснення  $R^{10}$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^{10}$  являє собою алкіл, наприклад, C<sub>1-8</sub>-алкіл, C<sub>1-4</sub>-алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^{10}$  являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення  $R^{10}$  являє собою метил.  
 55

[0266] У певних варіантах здійснення  $R^{11}$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^{11}$  являє собою алкіл, наприклад, C<sub>1-8</sub>-алкіл, C<sub>1-4</sub>-алкіл, метил або етил. У певних варіантах

здійснення  $R^{11}$  являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення  $R^{11}$  являє собою метил.

[0267] У певних варіантах здійснення  $R^{12}$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^{12}$  являє собою алкіл, наприклад,  $C_{1-8}$ -алкіл,  $C_{1-4}$ -алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^{12}$  являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення  $R^{12}$  являє собою метил.

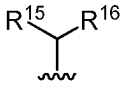
[0268] У певних варіантах здійснення  $R^{13}$  являє собою -H. В інших варіантах здійснення  $R^{13}$  являє собою алкіл, наприклад,  $C_{1-8}$ -алкіл,  $C_{1-4}$ -алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^{13}$  являє собою -H або метил. У певних варіантах здійснення  $R^{13}$  являє собою метил.

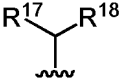
[0269] У певних варіантах здійснення  $R^{14}$  являє собою -H. У певних варіантах здійснення  $R^{14}$  являє собою алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^{14}$  являє собою -OH.

[0270] У певних варіантах здійснення  $R^{14}$  знаходиться в стехіометричній конфігурації R відносно іншої молекули. В інших варіантах здійснення  $R^{14}$  знаходиться в стехіометричній конфігурації S відносно іншої молекули.

[0271] У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою  $-CO_2R^a$ , де  $R^a$  являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил;  $R^8$  являє собою феніл; і  $R^{14}$  являє собою -H. У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою  $-CONR^bR^c$ , де кожна з  $R^b$  і  $R^c$  незалежно являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил;  $R^8$  являє собою феніл; і  $R^{14}$  являє собою -H. У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил;  $R^8$  являє собою феніл; і  $R^{14}$  являє собою -OH. У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою метил,  $R^8$  являє собою феніл, і  $R^{14}$  являє собою -OH. У певних варіантах здійснення обидві  $R^7$  і  $R^{14}$  являють собою -H, і  $R^8$  являє собою піридиніл, піперидиніл, незаміщений феніл або феніл, заміщений галогеном, наприклад, фтор, хлор або бром. У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою  $-CO_2R^a$ , де  $R^a$  являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил;  $R^8$  являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил; і  $R^{14}$  являє собою алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл, метил або етил. У певних варіантах здійснення  $R^7$  являє собою  $-CO_2R^a$ , де  $R^a$  являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метилметил;  $R^8$  являє собою -H або алкіл, наприклад,  $C_{1-6}$ -алкіл або метил; і  $R^{14}$  являє собою -OH.

[0272] У певних варіантах здійснення  
кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл;  
X являє собою -O- або відсутній;

$R^3$  являє собою ; де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або  $C_{1-6}$ -алкіл;

$R^4$  являє собою ; де  $R^{17}$  являє собою -OH,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-N_3$ ,  $-CO_2H$ ,  $-C_{1-6}$ -алкіл- $NH_2$ , алкініл, алкеніл або  $-C_{1-6}$ -алкіл- $N_3$ ; і  $R^{18}$  являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл;

$R^5$  являє собою втор-бутил;

$R^6$  являє собою -H;

$R^7$  являє собою -H,  $C_{1-6}$ -алкіл,  $-CO_2R^a$ ,  $-CONR^bR^c$ , тетразоліл або тіазоліл; де  $R^a$  являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл; і кожна з  $R^b$  і  $R^c$  являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл;

$R^8$  являє собою -H,  $C_{1-6}$ -алкіл, заміщений або незаміщений феніл або заміщене або незаміщене гетероциклічне кільце;

$R^9$  являє собою -H;

кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  незалежно являє собою  $C_{1-6}$ -алкіл; і

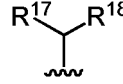
$R^{14}$  являє собою -H,  $C_{1-6}$ -алкіл або -OH.

[0273] У певних варіантах здійснення

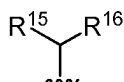
кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або метил;

X являє собою -O- або відсутній;

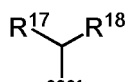
$R^3$  являє собою ; де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або метил;

$R^4$  являє собою ; де  $R^{17}$  являє собою -OH,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-N_3$ ,  $-CO_2H$ , амінометил, алкініл, алкеніл або азідометил; і  $R^{18}$  являє собою -H або метил;

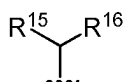
$R^5$  являє собою втор-бутил;  
 $R^6$  являє собою -H;  
 $R^7$  являє собою -H, метил,  $-\text{CO}_2R^a$  або  $-\text{CONR}^bR^c$ ; де  $R^a$  являє собою -H або метил; і кожна з  $R^b$  і  $R^c$  являє собою -H або метил;  
 5  $R^8$  являє собою -H, метил, етил, піридиніл, піперидиніл, незаміщений феніл, феніл, заміщений галогеном;  $R^9$  являє собою -H;  
 кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  являє собою метил; і  
 $R^{14}$  являє собою -H, метил або -OH.  
 [0274] У певних варіантах здійснення  
 10 кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;  
 X відсутній;



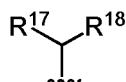
$R^3$  являє собою  $\text{---}$ ; де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;



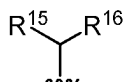
15  $R^4$  являє собою  $\text{---}$ ; де  $R^{17}$  являє собою  $-\text{N}_3$ , і  $R^{18}$  являє собою -H або метил;  
 $R^5$  являє собою втор-бутил;  
 $R^6$  являє собою -H;  
 $R^7$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл,  $-\text{CO}_2R^a$ ,  $-\text{CONR}^bR^c$ , тетразоліл або тіазоліл; де  $R^a$  являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл; і кожна з  $R^b$  і  $R^c$  являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;  
 $R^8$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл, заміщений або незаміщений феніл або заміщене або  
 20 незаміщене гетероциклічне кільце;  
 $R^9$  являє собою -H;  
 кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  незалежно являє собою  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл; і  
 $R^{14}$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл або -OH.  
 [0275] У певних варіантах здійснення  
 25 кожна з  $R^1$  і  $R^2$  незалежно являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;  
 X являє собою -O-;



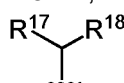
$R^3$  являє собою  $\text{---}$ ; де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно являє собою -H, -OH або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;



30  $R^4$  являє собою  $\text{---}$ ; де  $R^{17}$  являє собою  $-\text{N}_3$ , і  $R^{18}$  являє собою -H або метил;  
 $R^5$  являє собою втор-бутил;  
 $R^6$  являє собою -H;  
 $R^7$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл,  $-\text{CO}_2R^a$ ,  $-\text{CONR}^bR^c$ , тетразоліл або тіазоліл; де  $R^a$  являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл; і кожна з  $R^b$  і  $R^c$  являє собою -H або  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл;  
 $R^8$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл, заміщений або незаміщений феніл або заміщене або  
 35 незаміщене гетероциклічне кільце;  
 $R^9$  являє собою -H;  
 кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  незалежно являє собою  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл; і  
 $R^{14}$  являє собою -H,  $\text{C}_{1-6}$ -алкіл або -OH.  
 [0276] У певних варіантах здійснення формули (I), де  
 40 кожна з  $R^1$  і  $R^2$  являє собою метил;  
 X відсутній;

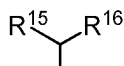


$R^3$  являє собою групу формули:  $\text{---}$ ; де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  являє собою метил;

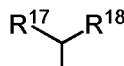


45  $R^4$  являє собою групу формули:  $\text{---}$ ; де  $R^{17}$  являє собою  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ , -OH, -SH, і  $R^{18}$  являє собою -H або метил;  
 $R^5$  являє собою втор-бутил;  
 $R^6$  являє собою -H;  
 $R^7$  являє собою  $-\text{CO}_2R^a$  або  $\text{CONR}^bR^c$ ;

де  $R^a$  являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл;  
 кожна з  $R^b$  і  $R^c$  незалежно являє собою H або  $C_{1-6}$ -алкіл;  
 $R^8$  являє собою феніл;  
 $R^9$  являє собою -H;  
 5 кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  незалежно являє собою метил; і  
 $R^{14}$  являє собою -H.  
 [0277] У певних варіантах здійснення формули (I), де  
 кожна з  $R^1$  і  $R^2$  являє собою -H;  
 X являє собою -O-;



10  $R^3$  являє собою групу формули:  $\text{---}$  ;  
 де кожна з  $R^{15}$  і  $R^{16}$  являє собою метил;



$R^4$  являє собою групу формули:  $\text{---}$  ;  
 де  $R^{17}$  являє собою  $-N_3$ , і  $R^{18}$  являє собою -H або метил;  
 $R^5$  являє собою втор-бутил;  
 15  $R^6$  являє собою -H;  
 $R^7$  являє собою  $-CO_2R^a$  або  $CONR^bR^c$ ,  
 де  $R^a$  являє собою -H або  $C_{1-6}$ -алкіл;  
 кожна з  $R^b$  і  $R^c$  незалежно являє собою H або  $C_{1-6}$ -алкіл;  
 $R^8$  являє собою феніл;  
 20  $R^9$  являє собою -H;  
 кожна з  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  і  $R^{13}$  незалежно являє собою метил; і  
 $R^{14}$  являє собою -H.

[0278] Варто розуміти, що будь-яке визначення варіабельної групи, що приводиться в даному документі, можна використовувати в комбінації з будь-яким іншим визначенням варіабельної групи, що приводиться в даному документі, так, що передбачені всі можливі комбінації і перестановки варіабельних груп, що приводяться в даному документі, що хімічно можливі.

[0279] У певних варіантах здійснення сполуки формули (I) вибрані з групи, яка складається з:

30 (S)-метил-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-3-гідрокси-N-метилпропанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноату;  
 (S)-метил-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3R)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-3-гідрокси-N-метилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноату;  
 35 (S)-2-(диметиламіно)-N-((S)-3-гідрокси-1-(((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((2-(піридин-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)(метил)аміно)-1-оксопропан-2-іл)-3-метилбутанаміду;  
 (2S,3R)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-3-гідрокси-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((2-(піридин-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду;  
 40 (2S)-2-(диметиламіно)-N-(((2S)-3-гідрокси-1-(((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((2S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((2-(піперидин-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)(метил)аміно)-1-оксопропан-2-іл)-3-метилбутанаміду;  
 (2S,3R)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-3-гідрокси-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-(((2S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((2-(піперидин-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду;  
 45 (S)-метил-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноату;  
 (S)-метил-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-3-аміно-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилпропанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноату;  
 (S)-N-((S)-3-аміно-1-(((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((2-піридин-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)(метил)аміно)-1-оксопропан-2-іл)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанаміду;



[illegible]

(2S,3S)-3-аміно-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанаміду;

(2S,3S)-3-аміно-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(трет-бутиламіно)-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанаміду;  
метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)пропанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

(2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанаміду;

((2S,3S)-3-азидо-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(трет-бутиламіно)-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанаміду;

трет-бутил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

трет-бутил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

(2S,3S)-3-азидо-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(1H-тетразол-5-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду;

(2S,3S)-3-азидо-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(1H-тетразол-5-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанаміду;

(2S,3S)-3-азидо-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду;

трет-бутил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-аміно-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату;

(2S,3S)-3-аміно-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(1H-тетразол-5-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду; і

(2S,3S)-3-аміно-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N-метилбутанаміду і їхніх фармацевтично прийнятних солей.

[0280] Також у даному документі надані фармацевтично прийнятні солі сполук формули (I), переважно сполук, описаних вище і конкретних сполук, що приводяться як приклади в даному документі, фармацевтичні композиції, що містять такі солі, і способи застосування таких солей.

[0281] "Фармацевтично прийнятна сіль" призначена для позначення солі вільних кислоти або основи сполуки, наданої в даному документі, яка є нетоксичною, біологічно прийнятною або в інших відношеннях біологічно прийнятною для введення індивідууму. В основному див., S.M. Berge, et al. "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19. Переважні фармацевтично прийнятні солі являють собою солі, які є фармакологічно ефективними і прийнятними для контакту з тканинами індивідуумів без неприйнятної токсичності, подразнення або алергійної відповіді. Сполука, описувана в даному документі, може містити достатньо кислотну групу, достатньо основну групу або обидва типи функціональних груп і, таким чином, реагувати з рядом неорганічних або органічних основ і неорганічних і органічних кислот з формуванням фармацевтично прийнятої солі. Приклади фармацевтично прийнятних солей включають солі приєднання кислот, такі як сульфати, піросульфати, бісульфати, сульфіти, бісульфіти, фосфати, моногідрофосфати, дигідрофосфати, метафосфати, пірофосфати, хлориди, броміди,

йодиди, ацетати, пропіонати, деканоати, каприлати, акрилати, форміати, ізобутирати, капроати, гептаноати, пропіолати, оксалати, малонати, сукцинати, суберати, себацинати, фумарати, малеати, бутин-1,4-діоати, гексин-1,6-діоати, бензоати, хлорбензоати, метилбензоати, динітробензоати, гідроксибензоати, метоксибензоати, фталати, сульфонати, метилсульфонати, пропілсульфонати, безилати, ксилолсульфонати, нафталін-1-сульфонати, нафталін-2-сульфонати, фенілацетати, фенілпропіонати, фенілбутирати, цитрати, лактати, γ-гідроксибутирати, гліколяти, тартрати і солі мигдальної кислоти, і солі з неорганічними основами, такими як натрій, калій, магній, кальцій, алюміній і т.п., або органічними основами, такими як метиламін, етиламін, етаноламін, лізин, орнітин і т.п., солі з різними амінокислотами або похідними амінокислот, такі як ацетиллейцин і т.п., амонійні солі і т.д.

[0282] Для цілей лікування фармацевтичні композиції, що містять сполуки, описувані в даному документі, можуть додатково містити один або декілька фармацевтично прийнятних ексципієнтів. Фармацевтично прийнятний ексципієнт являє собою речовину, яка є нетоксичною і іншим способом біологічно прийнятною для введення індивідууму. Такі ексципієнти полегшують складання і введення сполук, описуваних у даному документі, і сумісні з активним інгредієнтом. Приклади фармацевтично прийнятних ексципієнтів включають стабілізатори, мастильні засоби, поверхнево-активні речовини, розріджувачі, антиоксиданти, зв'язувальні засоби, барвники, емульгатори або модифікуючі смак засоби. У переважних варіантах здійснення фармацевтичні композиції являють собою стерильні композиції.

[0283] Фармацевтичні композиції, описувані в даному документі, можна формулювати у вигляді розчинів, емульсій, суспензій або дисперсій у прийнятних фармацевтичних розчинниках або носіях або у вигляді пігулок, таблеток, таблеток-льодяників, супозиторіїв, порошків для відновлення або капсул разом із твердими носіями загальновідомими в даній галузі способами одержання різних лікарських форм. Для місцевого застосування сполуки, описаної в даному документі, переважно формулюють у вигляді кремів або мазей або з подібним носієм, що підходить для місцевого застосування. Фармацевтичні композиції і сполуки, описувані в даному документі, можна вводити способами за винаходом прийнятним способом доставки, наприклад, пероральним, назальним, парентеральним, ректальним, місцевим, очним або за допомогою інгаляції.

[0284] Як використовують у даному документі, термін "лікувати" або "лікування" призначений для позначення введення індивідууму сполуки, описаної в даному документі, з метою забезпечення позитивної терапевтичної дії. Лікування включає реверсію, поліпшення стану, полегшення, придушення прогресу або зниження тяжкості захворювання, порушення або патологічного стану або одного або декількох симптомів злоякісної пухлини. Термін "індивідуум" стосується пацієнта-савця, який потребує такого лікування, такого як людина.

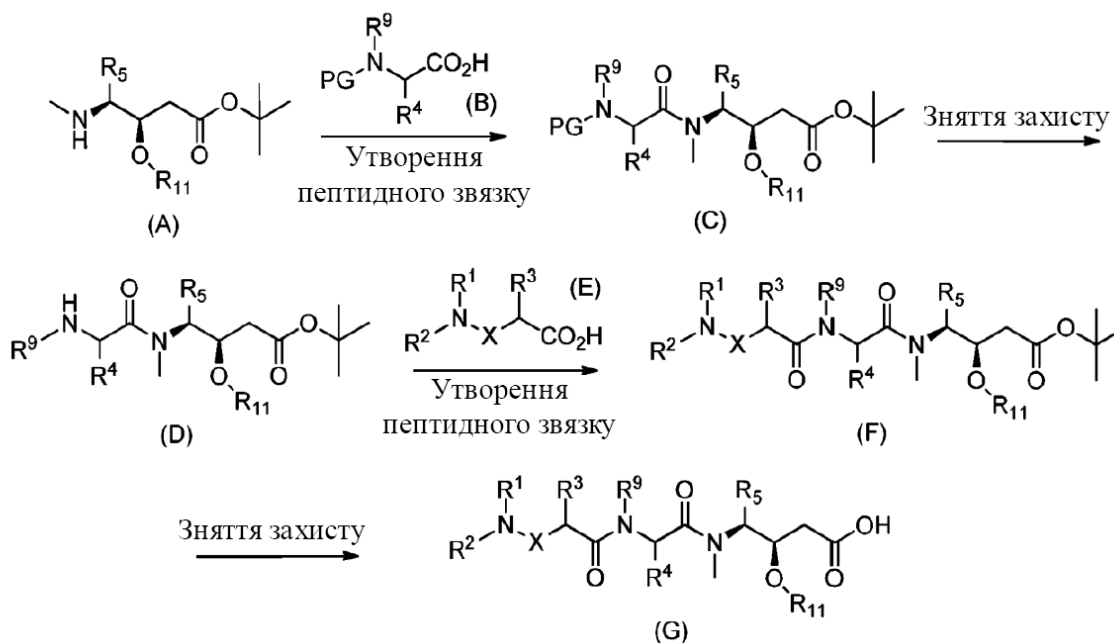
[0285] У способах лікування, що приводяться в даному документі, "ефективна кількість" означає кількість або дозу, достатні для загального забезпечення необхідної позитивної терапевтичної дії в індивідуумів з необхідністю такого лікування. Крім того, термін "терапевтично ефективна кількість" означає будь-яку кількість яка, при порівнянні з відповідним індивідуумом, що не одержував такої кількості, як необмежувальні приклади, приводить до видужання, запобігання або поліпшення стану захворювання, порушення або побічного ефекту або до зниження швидкості прогресування захворювання або порушення. Термін також включає у свій об'єм кількості, ефективні для поліпшення нормальної фізіологічної функції, а також кількості, ефективні для забезпечення фізіологічної функції в індивідуума, наприклад, людини, що підсилює або допомагає терапевтичній дії другого фармацевтичного засобу. Ефективні кількості, включаючи терапевтично ефективні кількості або дози сполук, описуваних у даному документі, можна визначати загальноприйнятими способами, такими як моделювання, збільшення дози або клінічні випробування, з огляду на стандартні фактори, наприклад, спосіб або маршрут введення або доставки лікарського засобу, фармакокінетику засобу, тяжкість і перебіг інфекції, стан здоров'я, патологічний стан і масу індивідуума і рішення лікуючого лікаря. Ілюстративна доза кон'югатів антитіл з лікарськими засобами, описуваними у даному документі, знаходиться в діапазоні приблизно від 1 мкг до 2 мг активної сполуки на кілограм маси тіла індивідуума на добу, переважно приблизно від 0,05 до 100 мг/кг/добу, або приблизно від 1 до 35 мг/кг/добу, або приблизно від 0,1 до 10 мг/кг/добу. Загальну дозу можна вводити у вигляді однієї або розділених одиниць дозування (наприклад, двічі на добу, тричі на добу, чотири рази на добу).

[0286] Сполуки, описувані в даному документі, при лікуванні злоякісної пухлини можна використовувати у фармацевтичних композиціях або способах у комбінації з додатковими активними інгредієнтами. Додаткові активні інгредієнти можна вводити окремо від сполуки, описаної в даному документі, або їх можна включати зі сполукою, описуваною у даному

документі, у фармацевтичну композицію, надану за даним документом. Наприклад, додаткові активні інгредієнти являють собою інгредієнти, відомі або виявлені як ефективні при лікуванні злоякісних пухлин, включаючи засоби, активні проти іншої мішені, асоційованої зі злоякісною пухлиною, наприклад, але не обмежуючись ними, велкейд, ритуксимаб, метотрексат, герцептин, вінкрисдин, преднізон, іринотекан або т.п. або їхнє сполучення. Така комбінація може служити для збільшення ефективності, зниження одного або декількох побічних ефектів або зниження необхідної дози описуваної сполуки.

[0287] Далі сполуки формули (I) описані відносно ілюстративних синтетичних схем для їхнього загального одержання, наведених нижче, і прикладів, які йдуть далі. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що для одержання різних сполук за даним документом вихідні речовини можна відповідно вибирати так, що кінцеві необхідні замісники переходили за схемою реакції з захистом або без захисту по необхідності з виходом необхідного продукту. Альтернативно, необхідним або бажаним може бути застосування замість кінцевого необхідного замісника, прийнятної групи, що може переходити за схемою реакції і при необхідності бути заміщеною необхідним замісником. Крім того, фахівцю в даній галузі зрозуміло, що для захисту визначених функціональних груп (аміно, карбокси або групи бічних ланцюгів) від умов реакції можна використовувати захисні групи, і що при необхідності такі групи видаляють у стандартних умовах. Кожну з реакцій, що приводяться на схемі А переважно проводять при температурі приблизно від кімнатної температури до температури кипіння використовуваного органічного розчинника зі зворотним холодильником. Якщо не вказано інакше, змінні є такими, як визначено вище відносно формули (I).

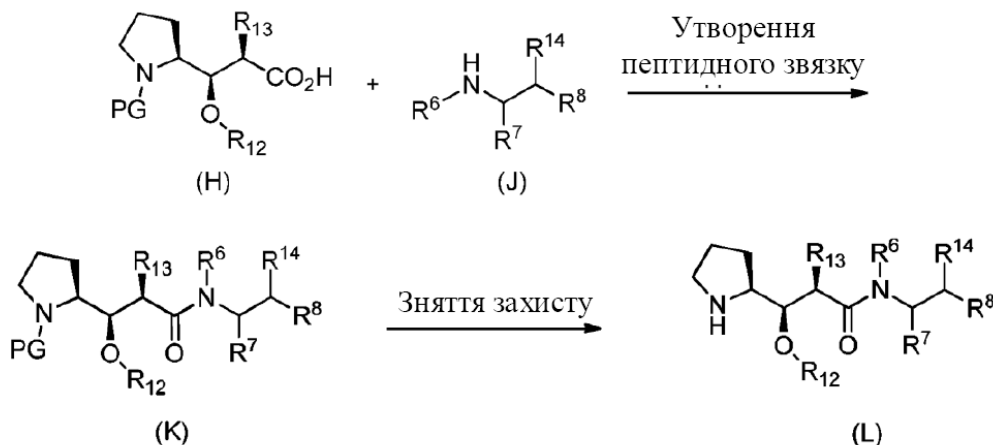
Схема А



[0288] При звертанні до схеми А, одержання сполук формули (I) починається з захищеної форми кислоти долаізолейцину (Dil), позначеної (A) (див. Pettit et al. (1994) J. Org. Chem. 59:1796-1800). Сполука (A) приведена з захисною групою складного трет-бутилового ефіру, але фахівець у даній галузі може вибрати прийнятну заміну. Зв'язування з захищеним по азоту похідним валіну або ізолейцину (B), де PG являє собою прийнятну захисну аміногрупу, таку як група Boc (t-бутоксикарбоніл) або флуоренілметилоксикарбоніл (Fmoc), проводять у стандартних умовах утворення пептидного зв'язку. Наприклад, реакції проводять у присутності діетилянанофосфонату (DEPC), PyBrOP, PyBOP, BOP, діізопропілкарбодііміду (DIC), дициклогексилкарбодііміду (DCC), гідрохлориду 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду (EDCI), 1-гідроксибензотриазолу (HOBT), 1-гідрокси-7-аза-бензотриазолу (HOAt), HBTU (гексафторфосфату О-бензотриазол-1-іл-N,N,N',N'-тетраметилуронію), HATU (гексафторфосфату О-(7-азабензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію) і т. п. або їхнього сполучення. Як правило, реакції проводять у присутності третинної амінової основи, такої як діізопропілетиламін. Прийнятні розчинники включають дихлорметан, N,N-диметилформамід (DMF), диметилсульфоксид (DMSO), етилацетат і т.п. Захисну аміногрупу на отриманому

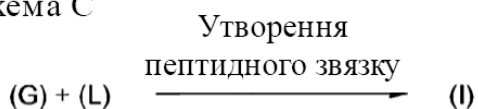
дипептиді (C) видаляють за допомогою зняття захисту в прийнятних умовах. Наприклад, коли PG являє собою групу Boc, сполуку (C) обробляють трифтороцтовою кислотою з формуванням вільного аміну (D). Коли PG являє собою групу Fmoc, сполуку (C) обробляють піперидином або діетиламіном з одержанням сполуки (D). Потім сполуку (D) зв'язують з похідним амінокислоти (E), якщо необхідно в захищеній формі, в умовах утворення пептидного зв'язку, як описано вище, з одержанням трипептиду (F). Обробка кислотою видаляє захисну карбоксигрупу з одержанням вільної кислоти (G).

Схема В



[0289] При звертанні до схеми В, захищений по аміногрупі долапролін (Dap), позначений як (H) (див. Pettit et al. (1994) J. Org. Chem. 59:6287-6295) зв'язують з аміном (J) (який одержують способами, відомими фахівцю в даній галузі) в умовах утворення пептидного зв'язку, як описано вище. В отриманого дипептиду (K) знімають захист, як описано для схеми А, з одержанням сполуки (L).

Схема С



[0290] При звертанні до схеми С, кислоту (G) і амін (L) зв'язують в умовах утворення пептидного зв'язку, як вказано вище, з одержанням сполук формули (I). Коли результатом реакції є захищена форма формули (I), для одержання наміченої сполуки використовують прийнятні умови зняття захисту.

[0291] Також за даним документом надана фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість щонайменше однієї зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі і фармацевтично прийнятний ексципієнт.

[0292] Також за даним документом наданий спосіб лікування індивідуума, який страждає на злоякісну пухлину або з діагностованою злоякісною пухлиною, що включає введення індивідууму, який потребує такого лікування, ефективної кількості щонайменше однієї зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі.

[0293] Також за даним документом надане застосування щонайменше однієї зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для лікування злоякісної пухлини в індивідуума, який потребує такого лікування.

[0294] Також за даним документом надане застосування щонайменше однієї зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі у виробництві лікарського засобу для лікування злоякісної пухлини в індивідуума, який потребує такого лікування.

[0295] Також за даним документом наданий набір, що містить щонайменше одну зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, для застосування в лікуванні злоякісної пухлини в індивідуума, який потребує такого лікування, і інструкції для застосування.

[0296] Також за даним документом наданий промисловий виріб, який містить щонайменше одну зі сполук формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, для застосування в лікуванні злоякісної пухлини в індивідуума, який потребує такого лікування.

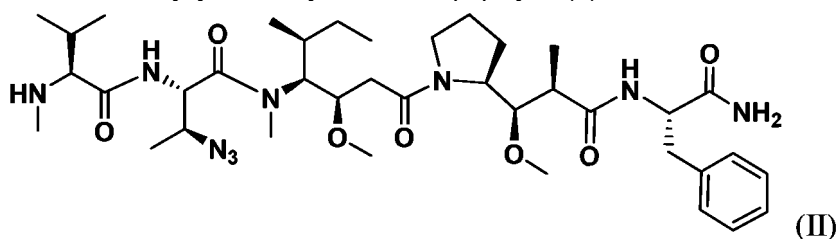
[0297] Також у даному документі надані кон'югати антитіл з лікарськими засобами (ADC), де сполука формули (I) кон'югована з антитілом.

[0298] Ілюстративні ADC, де використана формула (I), мають структури, що нижче приводяться, де "L" або "mAb-s-" представляють MAT до FLT3, що позначається CHv62.21, наведене в даному документі.

[0299] Крім того, додаткові ілюстративні ADC, де використана формула (I), мають структури, що нижче приводяться, де "L" або "mAb-s-" представляють MAT до FLT3, що позначається CHv62.21pAF, що приводиться в даному документі.

[0300] У переважному варіанті здійснення сполуки формули (I) містять групи лікарських засобів, що містять сполуку, позначену (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамід.

[0301] У переважному варіанті здійснення сполуки формули (I) містять групи лікарських засобів, що містять сполуку, вказану нижче як формула (II):



[0302]

IX.) Вміст лікарського засобу

[0303] Вміст лікарського засобу позначений буквою р і являє собою середнє молекул кількість лікарського засобу на антитіло в молекулі. Вміст лікарського засобу може знаходитися в діапазоні від 1 до 20 молекул лікарського засобу (D) на антитіло. ADC за винаходом включають групу антитіл, кон'югованих з діапазоном молекул лікарських засобів від 1 до 20. Середню кількість молекул лікарського засобу на антитіло в препаратах ADC після реакцій кон'югації можна визначати загальноприйнятими способами, такими як аналізи мас-спектроскопія і ELISA. Також можна визначати кількісний розподіл ADC відносно р. У деяких випадках відділення, очищення і характеристику гомогенних ADC, де р являє собою визначене значення, від ADC з іншим вмістом лікарські засоби можна проводити такими способами, як електрофорез.

[0304] Для визначених кон'югатів антитіло-лікарський засіб р може бути обмежений кількістю ділянок зв'язування на антитілі. Наприклад, коли зв'язування відбувається по тіолу цистеїну, антитіло може містити тільки одну або декілька тиольних груп цистеїну або може містити тільки одну або декілька достатньо реакційноздатних тиольних груп, з якими можна зв'язувати лінкер. У певних варіантах здійснення підвищений вміст лікарського засобу, наприклад,  $r > 5$ , може забезпечити певним кон'югатам антитіло-лікарський засіб агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату клітинної проникності. У певних варіантах здійснення вміст лікарського засобу ADC за винаходом знаходиться в діапазоні від 1 до приблизно 8; приблизно від 2 до приблизно 6; приблизно від 3 до приблизно 5; приблизно від 3 до приблизно 4; приблизно від 3,1 до приблизно 3,9; приблизно від 3,2 до приблизно 3,8; приблизно від 3,2 до приблизно 3,7; приблизно від 3,2 до приблизно 3,6; приблизно від 3,3 до приблизно 3,8 або приблизно від 3,3 до приблизно 3,7. Фактично, показано, що для певних ADC оптимальне відношення молекул лікарського засобу й антитіла може складати менше 8 і може складати приблизно від 2 до приблизно 5.

[0305] У певних варіантах здійснення з антитілом при реакції кон'югації кон'югується менше теоретичного максимуму молекул лікарського засобу. Наприклад, антитіло може містити залишки лізину, що не реагують із проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом, як описано нижче. Як правило, антитіла не містять багато вільних і реакційноздатних тиольних груп цистеїну, які можна зв'язувати з молекулою лікарського засобу; фактично більшість тиольних залишків цистеїну в антитілах знаходяться у вигляді дисульфідних містків. У певних варіантах здійснення антитіло можна відновлювати відносником, таким як дитіотреїтол (DTT) або трикарбонілетилфосфін (TCEP) у часткових або повністю відновних умовах з одержанням реакційноздатних тиольних груп цистеїну. У певних варіантах здійснення антитіло піддають дії денатуруючих умов з вивільненням реакційноздатних нуклеофільних груп, таких як лізин або цистеїн.

[0306] Вміст (відношення лікарський засіб/антитіло) у ADC можна контролювати різними способами, наприклад, за допомогою: (i) обмеження молярного надлишку проміжної сполуки

лікарський засіб-лінкер або лінкерного реагенту відносно антитіла, (ii) обмеження часу або температури реакції кон'югації, (iii) часткових або обмежувальних відновних умов для модифікації тіолів цистеїн, (iv) конструювання рекомбінантними способами амінокислотної послідовності антитіла так, щоб кількість і положення залишків цистеїну змінювалося з контролем кількості і/або положення зв'язувань лінкера-лікарського засобу (наприклад, thioMab або thioFab, отримані, як описано в даному документі й у W02006/034488 (повністю включеному в даний документ як посилання)).

[0307] Варто розуміти, що коли з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом з наступним реагентом молекули лікарського засобу реагує більше однієї нуклеофільної групи, то одержуваний продукт являє собою суміш сполук ADC з розподілом однієї або декількох молекул лікарського засобу, зв'язаних з антитілом. Середню кількість лікарських засобів на антитіло можна розраховувати в суміші за допомогою подвійного аналізу ELISA антитіла, що специфічний до антитіла і специфічний до лікарського засобу. Конкретні молекули ADC у суміші можна ідентифікувати за допомогою мас-спектроскопії і розділяти за допомогою ВЕРХ, наприклад, за допомогою хроматографії на основі гідрофобних взаємодій (див., наприклад, Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). У певних варіантах здійснення гомогенні ADC з одним значенням вмісту можна виділяти із суміші після кон'югації за допомогою електрофорезу або хроматографії.

X.) Способи визначення цитотоксичного ефекту ADC

[0308] Способи визначення, чи виявляє лікарський засіб або кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичну і/або цитотоксичну дію на клітини, відомі. Як правило, цитотоксичну або цитостатичну активність кон'югата антитіла з лікарським засобом можна визначати: обробляючи клітини ссавців, експресуючі білок-мішень кон'югата антитіла з лікарським засобом у середовищі для культивування клітин; культивуючи клітини протягом періоду приблизно від 6 годин до приблизно 5 доби і визначаючи життєздатність клітин. Для визначення життєздатності (проліферації), цитотоксичності й індукції апоптозу (активація каспаз) кон'югата антитіла з лікарським засобом можна використовувати основані на клітинах аналізи *in vitro*.

[0309] Для визначення того, чи виявляє кон'югат антитіла з лікарським засобом цитостатичну дію, можна використовувати аналіз убудовування тимідину. Наприклад, злоякісні клітини, експресуючі антиген-мішень, при щільності 5000 клітин/ямку в 96-ямковому планшеті можна культивувати протягом періоду 72 годин і піддавати дії 0,5 мкКі <sup>3</sup>H-тимідину протягом останніх 8 годин періоду 72 годин. Убудовування <sup>3</sup>H-тимідину в клітини культури вимірюють у присутності і відсутності кон'югата антитіла з лікарським засобом.

[0310] Для визначення цитотоксичності можна визначати некроз або апоптоз (програмовану загибель клітин). Як правило, некроз супроводжується збільшенням проникності плазматичної мембрани; набряканням клітин і розривами плазматичної мембрани. Як правило, апоптоз характеризується пузирінням мембрани, конденсацією цитоплазми й активацією ендогенних ендонуклеаз. Визначення будь-якого з цих явищ у злоякісних клітин означає, що кон'югат антитіла з лікарським засобом прийнятний при лікуванні злоякісних пухлин.

[0311] Життєздатність клітин можна вимірювати, визначаючи захоплення клітинами барвників, таких як нейтральний червоний, трипановий синій або ALAMAR<sup>TM</sup> синій (див., наприклад, Page et al, 1993, *Int. J. Oncology* 3:473-476). У такому аналізі клітини інкубують у середовищі, що містить барвник, клітини відмивають і барвник, що залишився, який відбиває захоплення барвника клітинами, вимірюють спектрофотометрично. Для визначення цитотоксичності також можна використовувати барвник, що зв'язується з білками, сульфородамін В (SRB) (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

[0312] Альтернативно, у кількісному колориметричному аналізі життєздатності клітин ссавців і проліферації використовують сіль тетразолію, таку як MTT, детектуючи життєздатні, але не загиблі клітини (див., наприклад, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

[0313] Апоптоз можна кількісно визначати, визначаючи, наприклад, фрагментацію ДНК. Для кількісного визначення фрагментації ДНК *in vitro* Доступні комерційні фотометричні способи. Приклади таких аналізів, включаючи TUNEL (де детектують убудовування мічених нуклеотидів у фрагментовану ДНК) і аналізи на основі ELISA, описані в Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[0314] Також апоптоз можна визначати, визначаючи морфологічні зміни в клітині. Наприклад, як і у випадку некрозу, можна визначати втрату цілісності плазматичної мембрани, виявляючи захоплення визначених барвників (наприклад, флуоресцентний барвник, наприклад, такий як акридиновий жовтогогарячий або бромистий етидій). Спосіб визначення кількості апоптотичних клітин описаний у Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Також клітини можна мітити барвником ДНК (наприклад, акридиновим жовтогогарячим, бромистим етидієм або йодистим пропідієм) і виявляти в клітинах конденсацію і скупчення хроматину у внутрішній ядерній мембрані. Інші морфологічні зміни, які можна визначати для виявлення апоптозу, включають, наприклад, конденсацію цитоплазми, збільшене пузиріння мембрани і стискання клітини.

[0315] Присутність апоптотичних клітин можна визначати в прикріпленому і "вільному" компартментах культур. Наприклад, обидва компартменти можна збирати, видаляючи супернатант, трипсинізуючи прикріплені клітини, комбінуючи препарати після етапу промивання центрифугуванням (наприклад, 10 хвилин при 2000 об./хв.) і детектуючи апоптоз (наприклад, визначаючи фрагментацію ДНК). (див., наприклад, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

[0316] In vivo дія терапевтичної композиції до FLT3 можна оцінювати в прийнятній моделі на тваринах. Наприклад, можна використовувати моделі ксеногенних злоякісних пухлин, де експлантати злоякісних пухлин або культивовані тканини ксенотрансплантатів уводять тваринам з ослабленим імунітетом, таким як "голі" миші або миші SCID (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Наприклад, у патентній заявці PCT W098/16628 і патенті США № 6107540 описані різні моделі ксенотрансплантатів раку передміхурової залози людини, здатні відтворювати розвиток первинних пухлин, мікрометастазування і формування остеобластичних метастазів, характерних для пізньої стадії захворювання. Ефективність можна прогнозувати з використанням аналізів, у яких визначають інгібування формування пухлини, регресу пухлини або метастазування і т.п.

[0317] Для оцінки терапевтичних композицій прийнятні аналізи in vivo, у яких визначають стимуляцію апоптозу. В одному з варіантів здійснення в ксенотрансплантатах мишей з пухлиною, оброблених терапевтичною композицією, можна перевіряти присутність фокусів апоптозу і порівнювати з необробленими контрольними мишами, які несуть ксенотрансплантати. Показником терапевтичної ефективності композиції є рівень виявлюваних в пухлинах оброблених мишей фокусів апоптозу.

[0318] Терапевтичні композиції, використовувані в практичному здійсненні вказаних вище способів, можна формулювати у фармацевтичні композиції, що містять носій, який підходить для бажаного способу доставки. Прийнятні носії включають будь-який матеріал, який при комбінації з терапевтичною композицією зберігає протипухлинну дію терапевтичної композиції і, як правило, вона не реагує з імунною системою пацієнта. Приклади як необмежувальні приклади включають будь-який з ряду стандартних фармацевтичних носіїв, таких як стерильні розчини фосфатно-сольового буфера, бактеріостатичну воду і т.п. (в основному див., Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

[0319] Терапевтичні складки можна розчиняти і вводити будь-яким маршрутом, яким можна доставити терапевтичну композицію в ділянку пухлини. Потенційно ефективні маршрути введення як необмежувальні приклади включають внутрішньовенний, парентеральний, інтраперитонеальний, внутрішньом'язовий, внутрішньопухлинний, інтрадермальний, внутрішньоорганний, ортотопічний і т.п. Переважний склад для внутрішньовенної ін'єкції містить терапевтичну композицію в розчині бактеріостатичної води з додаванням консервантів, стерильної води без додавання консервантів і/або розведену в полівінілхлоридних або поліетиленових мішках, які містять 0,9% стерильний хлорид натрію для ін'єкцій, USP. Терапевтичні препарати білків можна ліофілізувати і зберігати у вигляді стерильних порошків, переважно при зниженому тиску, а потім перед ін'єкцією відновлювати в бактеріостатичній воді (яка містить наприклад, консервант бензиловий спирт) або в стерильній воді.

[0320] Дози і протоколи введення для лікування злоякісних пухлин вказаними вище способами варіюють залежно від способу і злоякісної пухлини-мішені і, як правило, залежать від ряду інших факторів, відомих у даній галузі.

[0321] В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом може містити більше одного різновиду ADC за винаходом внаслідок модифікації MAT CHv62.21 або MAT CHv62.21pAF. Наприклад, даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить ADC за винаходом, де MAT CHv62.21 являє собою антитіло без C-кінцевого лізинового важкого ланцюга, антитіло з N-кінцевою посттрансляційною модифікацією, антитіло без C-



В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом стосується фармацевтичної композиції, яка містить MAT CHv62.21pAF, що містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO:11, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO:10, і MAT CHv62.21pAF, що містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (Q) до залишку 453 (K) SEQ ID NO:11, де С-кінцевий залишок 443 (T) видаляють, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO:10.

В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом стосується фармацевтичної композиції, яка містить MAT CHv62.21pAF, що містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (Q) до залишку 453 (K) SEQ ID NO:11, де С-кінцевий залишок 443 (T) видаляють, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO:10, і MAT CHv62.21pAF, що містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (E) до залишку 453 (K) SEQ ID NO:11, де N-кінцевий залишок 1 (E) перетворений у піроглутамінову кислоту і С-кінцевий залишок 443 (T) видаляють, і легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від залишку 1 (D) до залишку 214 (C) SEQ ID NO:10.

XI.) Лікування злоякісної пухлини/пухлин, які експресують FLT3

[0326] Ідентифікація FLT3 як білка, який у нормі експресований в обмеженій множині тканин або клітин, але який також експресований у злоякісних пухлинах, таких як пухлини, перераховані в таблиці I, відривається ряд терапевтичних способів лікування таких злоякісних пухлин.

[0327] Слід зазначити, що спрямовані протипухлинні засоби прийнятні навіть тоді, коли білок-мішень експресований у нормальних тканинах або клітинах, навіть у тканинах життєво важливих органів. Життєво важливий орган являє собою орган, що необхідний для підтримки життя, наприклад, серце або товста кишка. Не є життєво важливим орган являє собою орган, який можна видалити і при цьому індивідуум усе ще зможе продовжувати жити. Прикладами не є життєво важливими органів є яєчник, молочна залоза і передміхурова залоза.

[0328] Експресія білка-мішені у нормальній тканині, навіть життєво важливій нормальній тканині, не відмінняє прийнятності спрямованого до білка засобу як терапевтичного засобу для визначених пухлин, у яких цей білок також надекспресований. Наприклад, експресія в життєво важливих органах сама по собі не шкідлива. Крім того, органи, розглянуті як необов'язкові, такі як передміхурова залоза і яєчник, можна видалити без впливу на смертність. Нарешті, деякі життєво важливі органи при нормальній експресії в органах не зачіпаються внаслідок імунопривілейованості. Імунопривілейовані органи являють собою органи, які захищені від крові гематоорганними бар'єрами і, таким чином, недоступні для імунотерапії. Прикладами імунопривілейованих органів є головний мозок і сім'яник.

[0329] Таким чином, терапевтичні способи, які інгібують активність білка FLT3 прийнятні для пацієнтів, які страждають на злоякісну пухлину, яка експресує FLT3 (наприклад, такі як злоякісні пухлини, наведені в таблиці I). Як правило, ці терапевтичні способи поділяються на три класи. Перший клас модулює функцію FLT3, тому що вона стосується росту пухлинних клітин, що приведе до інгібування або уповільнення росту пухлинних клітин або індукції їхнього знищення. Другий клас включає різні способи інгібування зв'язування або асоціації білка FLT3 з його партнером по зв'язуванню або з іншими білками. Третій клас включає ряд способів інгібування транскрипції гена FLT3 або трансляції iPHK FLT3.

[0330] Таким чином, пацієнтів зі злоякісними пухлинами можна оцінювати на наявність і рівень експресії FLT3, переважно використовуючи імуногістохімічні оцінки пухлинної тканини, кількісну томографію FLT3 або інші способи, що надійно вказують на наявність і ступінь експресії FLT3. Для цієї мети по можливості переважний імуногістохімічний аналіз біопсій пухлин або хірургічних зразків. Способи імуногістохімічного аналізу пухлинних тканин добре відомі в даній галузі.

XIII.) FLT3 як мішень для терапії на основі антитіл

[0331] FLT3 являє собою привабливу мішень для терапевтичних стратегій на основі антитіл. У даній галузі для спрямованого впливу на позаклітинні і внутрішньоклітинні молекули відомий ряд стратегій на основі антитіл (див., наприклад, опосередковане комплементом і ADCC знищення, а також використання інтраантитіл). Тому що FLT3 експресують злоякісні клітини різних відносно відповідних нормальних клітин ліній диференціювання, проводять системне введення імунореактивних відносно FLT3 композицій, що демонструє чудову чутливість без

токсичної, неспецифічної і/або побічної дії, яка викликається зв'язуванням імунореактивної композиції з органами і тканинами, які не є мішенями. Антитіла специфічно реагуючі з доменами FLT3 прийнятні для системного лікування експресуючих FLT3 злоякісних пухлин, переважно у вигляді кон'югатів антитіл з лікарськими засобами (тобто ADC), де кон'югат отриманий з токсином або терапевтичним засобом.

[0332] Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що антитіла можна використовувати для специфічного напрямку і зв'язування з імуногенними молекулами, такими як імуногенна область послідовності FLT3, представлена на фігурі 1. Крім того, фахівцям у даній галузі зрозуміло, що кон'югація антитіл з цитотоксичними засобами є стандартним способом (див., наприклад, Slevers et al. *Blood* 93:11 3678-3684 (June 1, 1999)). Коли цитотоксичні і/або терапевтичні засоби доставляють безпосередньо в клітини, наприклад, кон'югуючи їх з антитілами, специфічними до молекули, яка експресується цими клітинами (наприклад, FLT3), цитотоксичний засіб чинить свою відому біологічну дію (тобто цитотоксичність) на ці клітини.

[0333] У даній галузі відомий широкий спектр композицій і способів застосування кон'югатів антитіл з цитотоксичними засобами для знищення клітин. У контексті злоякісних пухлин типові способи включають введення ссавцю з пухлиною біологічно ефективною кількістю кон'югата, що містить вибраний цитотоксичний і/або терапевтичний засіб, зв'язаний зі спрямованим засобом (наприклад, МАТ до FLT3, переважно CHv62.21 або CHv62.21pAF), що зв'язується з експресованим, доступним для зв'язування або локалізованим на клітинній поверхні антигеном (наприклад, FLT3). Типовим варіантом здійснення є спосіб доставки цитотоксичного і/або терапевтичного засобу в експресуючу FLT3 клітину, що включає кон'югацію цитотоксичного засобу з антитілом, яке імуноспецифічно зв'язується з епітопом FLT3, і обробку клітини кон'югатом антитіла з лікарським засобом (ADC). Іншим ілюстративним варіантом здійснення є спосіб лікування індивідуума, у якого передбачають наявність метастазуючої злоякісної пухлини, що включає етап парентерального введення вказаному індивідууму фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість антитіла, кон'югованого з цитотоксичним і/або терапевтичним засобом.

[0334] Імунотерапію злоякісних пухлин з використанням антитіл до FLT3 можна проводити різними способами, що успішно застосовували при лікуванні інших типів злоякісних пухлин, включаючи як необмежувальні приклади рак товстого кишечника (Arlen et al., 1998, *Crit. Rev. Immunol.* 18:133-138), множинну мієлому (Ozaki et al., 1997, *Blood* 90:3179-3186, Tsunenari et al., 1997, *Blood* 90:2437-2444), рак шлунка (Kasprzyk et al., 1992, *Cancer Res.* 52:2771-2776), В-клітинну лімфому (Funakoshi et al., 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19:93-101), лейкоз (Zhong et al., 1996, *Leuk. Res.* 20:581-589), колоректальний рак (Moun et al., 1994, *Cancer Res.* 54:6160-6166; Velders et al., 1995, *Cancer Res.* 55:4398-4403) і рак молочної залози (Shepard et al., 1991, *J. Clin. Immunol.* 11:117-127). Визначені терапевтичні способи включають кон'югацію вільного антитіла з токсином або радіоактивним ізотопом, такі як кон'югація  $Y^{91}$  або  $I^{131}$  з антитілами до CD20 (наприклад, зевалін<sup>TM</sup>, IDEC Pharmaceuticals Corp або бексар<sup>TM</sup>, Coulter Pharmaceuticals) відповідно, тоді як інші включають спільне введення антитіл і інших терапевтичних засобів, таких як герцептин<sup>TM</sup> (трастузумаб) з паклітакселом (Genentech, Inc.). У переважному варіанті здійснення антитіла кон'югують з цитотоксичним засобом, вище, переважно похідним ауристатинолу позначеним MMAE (Seattle Genetics).

[0335] Хоча терапія антитілами до FLT3 прийнятна для всіх стадій злоякісних пухлин, терапія антитілами може бути особливо прийнятною при злоякісних пухлинах на пізніх стадіях або метастатичних злоякісних пухлинах. Лікування за допомогою терапії антитілами за винаходом показано пацієнтам, що пройшли один або кілька циклів хіміотерапії. Альтернативно, у пацієнтів, що не одержували хіміотерапевтичного лікування, терапію антитілами за винаходом комбінують зі схемами лікування хіміотерапевтичними засобами або радіацією. Крім того, терапія антитілами може забезпечити використання менших доз супутнього хіміотерапевтичного засобу, зокрема, у пацієнтів, які погано переносять токсичність хіміотерапевтичного засобу. У Fan et al. (*Cancer Res.* 53:4637-4642, 1993), Prewett et al. (*International J. of Onco.* 9:217-224, 1996) і Hancock et al. (*Cancer Res.* 51:4575-4580, 1991) описане використання різних антитіл разом з хіміотерапевтичними засобами.

[0336] Моноклональні антитіла до FLT3, здатні до лікування злоякісних пухлин, наведені в таблиці I, включають антитіла, що ініціюють сильну імунну відповідь проти пухлини, або антитіла, що є безпосередньо цитотоксичними. У цьому відношенні моноклональні антитіла до FLT3 (МАТ) можуть викликати лізис пухлинних клітин за допомогою механізмів опосередкованої комплементом або опосередкованої антитілами клітинної цитотоксичності (ADCC), які обидва вимагають інтактної Fc-частини молекули імуноглобуліну для взаємодії з ділянками взаємодії з рецепторами Fc ефекторних клітин на білках комплементу. Крім того, для лікування злоякісних

пухлин, які експресують FLT3, прийнятні МАТ до FLT3, що виявляють пряму біологічну дію на ріст пухлини. Механізми, якими діють безпосередньо цитотоксичні МАТ, включають: інгібування росту клітин, модуляцію клітинного диференціювання, модуляцію профілю факторів ангіогенезу пухлини й індукцію апоптозу. Механізм(и), за допомогою якого конкретні МАТ до FLT3 виявляють протипухлинну дію, оцінюють з використанням будь-якого ряду аналізів *in vitro*, за допомогою яких можна оцінювати загибель клітин, таких як ADCC, опосередкований комплементом лізис клітин і т.д., як загальновідомо в даній галузі.

[0337] Таким чином, переважні моноклональні антитіла, використовувані в терапевтичних способах за винаходом, являють собою будь-які антитіла, що повністю належать людині і які специфічно зв'язуються з антигеном-мішенню FLT3 з високою афінністю.

#### XIV.) Суміші ADC до FLT3

[0338] Терапевтичні способи за винаходом передбачають введення одних ADC до FLT3, а також комбінацій або сумішей різних МАТ (тобто МАТ до FLT3 або МАТ, що зв'язують інші білки). Такі суміші МАТ можуть мати визначені переваги, оскільки вони містять МАТ, які спрямовані до різних епітопів, експлуатують різні ефекторні механізми або комбінують безпосередньо цитотоксичні МАТ з МАТ, що залежать від функціональності ефекторів. Такі МАТ у комбінації можуть чинити синергічну терапевтичну дію. Крім того, МАТ до FLT3 можна вводити разом з іншими терапевтичними засобами, включаючи як необмежувальні приклади різні хіміотерапевтичні і біологічні засоби, блокатори андрогенів, імуномодулятори (наприклад, IL-2, GM-CSF), хірургію або радіацію. У переважному варіанті здійснення МАТ до FLT3 вводять у кон'югованій формі.

[0339] Склади ADC до FLT3 уводять будь-яким маршрутом, що забезпечує доставку антитіл до пухлинних клітин. Маршрути введення як необмежувальні приклади включають внутрішньовенний, інтраперитонеальний, внутрішньом'язовий, внутрішньопухлинний, інтрадермальний і т.п. Як правило, лікування включає повторне введення препарату ADC до FLT3 прийнятним маршрутом уведення, таким як внутрішньовенна ін'єкція (в/в), як правило, у дозі в діапазоні, який включає як необмежувальні приклади 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 або 25 мг/кг маси тіла. Як правило, дози в діапазоні 10-1000 мг МАТ на тиждень є ефективними і добре переносимими.

[0340] На основі клінічної практики з використанням герцептину® (трастузумабу) при лікуванні метастатичного раку молочної залози прийнятною схемою лікування є вихідна ударна доза приблизно 4 мг/кг маси тіла пацієнта в/в з наступними щотижневими дозами приблизно 2 мг/кг в/в препарату МАТ. Переважно, вихідну ударну дозу вводять у вигляді інфузії тривалістю 90 хвилин або довше. Періодичну підтримуючу дозу вводять у вигляді інфузії тривалістю 30 хвилин або довше за умови, що вихідна доза була добре перенесена. Як зрозуміло фахівцям у даній галузі, у кожному конкретному випадку на ідеальну схему лікування можуть впливати різні фактори. Наприклад, такі фактори включають, афінність зв'язування і час напівжиття використовуваних МАТ, ступінь експресії FLT3 у пацієнта, рівень циркулюючого вільного антигену FLT3, бажаний рівень стабільної концентрації антитіла, частота лікування і вплив хіміотерапевтичних або інших засобів, використовуваних у комбінації зі способом лікування за винаходом, а також стан здоров'я конкретного пацієнта.

[0341] Необов'язково, для допомоги у визначенні найбільш ефективної схеми лікування і т.д, пацієнтів варто оцінювати на рівні FLT3 у даному зразку (наприклад, рівні циркулюючого антигену FLT3 і/або експресуючі FLT3 клітини). Такі оцінки також використовують з метою моніторингу на всьому протязі лікування, і вони прийнятні для визначення терапевтичної успішності в комбінації з оцінкою інших параметрів (наприклад, цитологія сечі і/або рівні імуноцитів при лікуванні раку сечового міхура або, за аналогією, рівні PSA у сироватці при лікуванні раку передміхурової залози).

[0342] Метою даного винаходу є надання ADC до FLT3, що інгібують або затримують ріст пухлинних клітин, які експресують FLT3. Додатковою метою даного винаходу є надання способів інгібування ангіогенезу й інших біологічних функцій і, таким чином, зниження росту пухлин у ссавців, переважно людей, з використанням таких ADC до FLT3, і, зокрема, використанням таких ADC до FLT3 у комбінації з іншими лікарськими засобами або імунологічно активними лікувальними засобами.

#### XV.) Комбіноване лікування

[0343] В одному з варіантів здійснення, коли пухлини, включаючи пухлини людини, обробляють ADC до FLT3 у сполученні з хіміотерапевтичними засобами або радіацією або їхнім сполученням, існує синергія. Іншими словами, при комбінації з хіміотерапевтичними засобами або радіацією або їхніми сполученнями інгібування росту пухлини ADC до FLT3 підсилюється більше, ніж очікувалося. Синергію можна продемонструвати, наприклад, збільшеним

інгібуванням росту пухлини при комбінованому лікуванні, у порівнянні з тим, що можна було б очікувати при лікуванні тільки ADC до FLT3 або адитивною дією лікування ADC до FLT3 і хіміотерапевтичним засобом або радіацією. Переважно, синергію демонструють ремісією злоякісної пухлини, коли ремісії на основі лікування тільки ADC до FLT3 або лікування адитивною комбінацією ADC до FLT3 і хіміотерапевтичного засобу або радіації не очікувалося.

[0344] Спосіб інгібування росту пухлинних клітин з використанням ADC до FLT3 і комбінації хіміотерапії або радіації або обох включає введення ADC до FLT3 перед, протягом або після початку або хіміотерапії променевої терапії, а також будь-якого їхнього сполучення (наприклад, перед і протягом, перед і після, протягом і після або перед, протягом і після початку хіміотерапії і/або променевої терапії). Наприклад, як правило, ADC до FLT3 вводять за 1-60 доби, переважно 3-40 доби, більш переважно 5-12 доби до початку променевої терапії і/або хіміотерапії. Однак залежно від протоколу лікування і конкретних потреб пацієнта, спосіб проводять способом, що забезпечує найбільш ефективне лікування і, в остаточному підсумку, продовжує життя пацієнта.

[0345] Уведення хіміотерапевтичних засобів можна проводити різними способами, включаючи системне парентеральними і ентеральними маршрутами. В одному з варіантів здійснення ADC до FLT3 і хіміотерапевтичний засіб вводять у вигляді окремих молекул. Конкретні приклади хіміотерапевтичних засобів або хіміотерапії включають цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, мехлоретамін (азотистий іприт), стрептозоцин, циклофосфамід, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубіцин (адріаміцин), даунорубіцин, прокарбазин, мітоміцин, цитарабін, етопозид, метотрексат, 5-фторурацил, вінбластин, вінкрестин, блеоміцин, паклітаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), альдеслейкін, аспарагіназа, бусульфан, карбоплатин, кладрибін, дакарбазин, флоксурин, флударабін, гідроксисечовина, іфосфамід, інтерферон альфа, лейпролід, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, плікаміцин, мітотан, пегаспаргазу, пентостатин, піпоброман, плікаміцин, стрептозоцин, тамоксифен, теніпозид, тестолактон, тіоганін, тіотепуа, урамустин, вінорелбін, гемцитабін, хлорамбуцил, таксол і їхнє сполучення.

[0346] Джерело радіації, яке використовується у комбінації з ADC до FLT3, може бути для пацієнта, що піддається лікуванню, зовнішнім або внутрішнім. Коли джерело є для пацієнта зовнішнім, лікування відоме як зовнішня дистанційна променева терапія (EBRT). Коли джерело радіації є для пацієнта внутрішнім, лікування називають брахітерапією (BT).

[0347] Додатково описані вище схеми лікування можна комбінувати з додатковими лікувальними засобами і/або схемами лікування проти злоякісних пухлин, наприклад, додатковими хіміотерапевтичними засобами, вакцинами проти злоякісних пухлин, інгібіторами передачі сигналу, засобами, прийнятими для лікування аномального росту клітин або злоякісних пухлин, антитілами (наприклад, антитілами до CTLA-4, як описано в WO/2005/092380 (Pfizer)) або іншими лігандами, що інгібують ріст пухлини, зв'язуючи с IGF-1R, і цитокінами.

[0348] Коли ссавців піддають додатковій хіміотерапії, можна використовувати хіміотерапевтичні засоби, описані вище. Крім того, можна використовувати інгібітори факторів росту, модифікатори біологічної відповіді, протигормональну терапію, селективні модулятори рецепторів естрогенів (SERM), інгібітори ангіогенезу й антиандрогени. Наприклад, можна використовувати антигормональні засоби, наприклад, антиестрогени, такі як нолвадекс (тамоксифен), або антиандрогени, такі як казодекс (4'-ціано-3-(4-фторфенілсульфоніл)-2-гідрокси-2-метил-3'-(трифторметил)пропіоналід).

[0349] Вказані вище терапевтичні способи можна комбінувати з будь-якою із широкого спектра хірургічних, хіміотерапевтичних або променевих схем лікування. Терапевтичні способи за винаходом можуть забезпечувати використання більш низьких доз хіміотерапевтичних засобів (або інших терапевтичних засобів) і/або менш часте введення, перевагу для всіх пацієнтів, а конкретно особливо для тих, хто погано переносить токсичність хіміотерапевтичного засобу.

#### XVI.) Набори/промислові вироби

[0350] Для застосування в лабораторних, прогностичних, профілактичних, діагностичних і терапевтичних додатках, описуваних у даному документі, в об'єм винаходу входять набори. Такі набори можуть містити носій, упаковку або контейнер, які розділені для вміщення одного або декількох контейнерів, таких як флакони, пробірки і т.п., де кожний з контейнерів містить один з різних елементів використовуваних у способі, разом з ярликом або вкладкою, що містить інструкції з застосування, таке як застосування, описуване в даному документі. Наприклад, контейнер(и) може містити антитіло, яке мічене детектованою міткою або можна мітити детектованою міткою. Набори можуть містити контейнер, що містить молекулу лікарського засобу. Набір можуть містити всю або частину амінокислотної послідовності, вказаної на

фігурах 2A, 2B і/або 2C або фігурах 3A, 3B і/або 3C або її аналоги, або молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує такі амінокислотні послідовності.

[0351] Як правило, набір за винаходом містить контейнер, описаний вище, і один або кілька інших контейнерів, асоційованих з ним, що містять матеріали, необхідні з комерційної і користувальницької точок зору, включаючи буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци; носій, упаковку, контейнер, флакон і/або ярлики пробірок з перерахуванням вмісту і/або інструкції з застосування, і вкладиші в упаковку з інструкціями з застосування.

[0352] На контейнері або при контейнері може знаходитися ярлик, указуючи на те, що композицію використовують для конкретного терапевтичного або нетерапевтичного застосування, такого як прогностичне, профілактичне, діагностичне або лабораторне застосування, а також може вказувати призначення для застосування *in vivo* або *in vitro*, такі як призначення, описувані в даному документі. Призначення і/або інша інформація також можна включати на вкладку(и) або ярлик(и), що включені в набір. Ярлик може знаходитися на контейнері або додаватися до контейнера. Ярлик може знаходитися на контейнері, коли букви, або числа інші символи, що формують ярлик вплавлені або вигравіровані на самому контейнері; ярлик може додаватися до контейнера, коли він знаходиться в тарі або засобі транспортування, що також містять контейнер, наприклад, у вигляді вкладиша в упаковку. Ярлик може вказувати, що композицію використовують для діагностики, лікування, профілактики або прогнозу патологічного стану, такого як злоякісні пухлини тканин, наведені в таблиці I.

[0353] Терміни "набір" і "промисловий виріб" можна використовувати як синоніми.

[0354] В іншому варіанті здійснення винаходу наданий промисловий виріб(и, що містить композиції, такі як антитіло(а) або кон'югати антитіл з лікарськими засобами (ADC), наприклад, матеріали, прийнятні для діагностики, прогнозу, профілактики і/або лікування злоякісних пухлин тканин, таких як наведені в таблиці I. Як правило, промисловий виріб містить щонайменше один контейнер і щонайменше один ярлик. Прийнятні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци і тестові пробірки. Контейнери можна формувати з множини матеріалів, таких як скло, метал або пластик. Контейнер може містити амінокислотну послідовність(и), низькомолекулярну сполуку(и), послідовності нуклеїнових кислот(и), популяцію(ї) клітин і/або антитіло(а). В іншому варіанті здійснення контейнер містить антитіло, його зв'язувальний фрагмент або специфічний зв'язувальний білок для застосування в оцінці експресії білка FLT3 у клітинах і тканинах, або для відповідних лабораторних, прогностичних, діагностичних, профілактичних і терапевтичних цілей; на такий контейнер можна вміщувати або додавати до нього вказівки і/або показання для таких застосувань, що також можна робити для реагентів і інших композицій або засобів, використовуваних для цих цілей.

[0355] Альтернативно контейнер може містити композицію, яка ефективна для лікування, діагностики, прогнозу або профілактики патологічного стану і може містити стерильний отвір (наприклад, контейнер може являти собою мішок для внутрішньовенного розчину або флакон із пробкою, що протикається голкою для підшкірних ін'єкцій). Активні засоби в композиції можуть являти собою антитіло, здатне до специфічного зв'язування з FLT3, або кон'югат антитіла з лікарським засобом, що специфічно зв'язується з FLT3.

[0356] Промисловий виріб може додатково містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як фосфатно-сольовий буфер, розчин Рінгера і/або розчин декстрази. Також він може містити інші матеріали бажані з комерційної і користувальницької точок зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, мішалки, голки, шприци і/або вкладиші в упаковку з вказівками і/або інструкціями з застосування.

[0357] Додаткові варіанти здійснення винаходу, описаного в даному документі, включають варіанти здійснення, описані в пунктах, що нижче приводяться:

[0358] Пункт 1 являє собою варіант здійснення антитіла, де антитіло містить CDRH1 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:23, CDRH2 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:29, CDRH3 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:32, CDRL1 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:14, CDRL2 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:17 і CDRL3 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20. В альтернативному варіанті здійснення антитіло містить CDR, як визначено способом Chothia, як представлено в таблиці V. В іншому альтернативному варіанті здійснення антитіло містить CDR, як визначено способом Contact, як представлено в таблиці V.

[0359] Пункт 2 являє собою додатковий варіант здійснення, де антитіло являє собою антитіло за п. 1, і де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, яка складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S SEQ ID NO:11, і містить варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R SEQ ID NO:10.



[0367] Пункт 10 являє собою додатковий варіант здійснення, де антитіло являє собою антитіло за будь-яким з пп. 1-9, і де 1E варіабельної області важкого ланцюга або важкого ланцюга заміщений піроглутаміном.

[0368] Пункт 11 являє собою додатковий варіант здійснення, де антитіло являє собою антитіло за будь-яким з пп. 1-5, і де антитіло містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 452G SEQ ID NO:11, і де 1E варіабельної області важкого ланцюга або важкого ланцюга модифікований до піроглутаміну, і де антитіло містить легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO:10. Альтернативний варіант здійснення п. 11 являє собою антитіло за будь-яким з пп. 1-6, де антитіло містить важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 452G SEQ ID NO:11, і де 1E варіабельної області важкого ланцюга або важкого ланцюга модифікований до піроглутаміну, і де антитіло містить легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO:10.

[0369] Пункт 12 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою антигензв'язувальний фрагмент, що містить CDR антитіл за будь-яким з пп. 1-11, і де антигензв'язувальний фрагмент зв'язується з FLT3.

[0370] Пункт 13 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою антигензв'язувальний фрагмент за п. 12, де антигензв'язувальний фрагмент вибраний із групи, яка складається з Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, виділеного VH і виділеного VL.

[0371] Пункт 14 являє собою антитіло, яке містить антигензв'язувальний фрагмент за п. 12 або п. 13.

[0372] Пункт 15 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою антитіло з 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовності з антитілом за будь-яким з пп. 1-10 або 14, і де антитіло містить CDR антитіла за будь-яким з пп. 1-14.

[0373] Пункт 16 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою антитіло за п. 15, що зв'язується з FLT3 з тією ж афінністю що і відповідне антитіло за п. 15, і по суті не інгібує зв'язування FL з FLT3.

[0374] Пункт 17 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою одну або декілька виділених нуклеїнових кислот, що кодують антитіло за будь-яким з пп. 1-10 або 14.

[0375] Пункт 18 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою одну або декілька виділених нуклеїнових кислот, що кодують антитіло або їхні фрагменти за пп. 12 або 13.

[0376] Пункт 19 являє собою додатковий варіант здійснення нуклеїнових кислот п. 17 або 18 з 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичністю послідовностей з нуклеїновими кислотами по відповідних пунктах.

[0377] Пункт 20 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою один або декілька експресуючих векторів, що містять одну або декілька виділених нуклеїнових кислот за п. 17, або п. 18, або п. 19. В одному з варіантів здійснення п. 20, наданий один експресуючий вектор, що експресує важкі і легкі ланцюги антитіла за будь-яким з пп. 1-19. У додатковому варіанті здійснення експресуючий вектор за п. 20 містить два промотори. В альтернативному варіанті здійснення експресуючий вектор за п. 20 містить один промотор. В іншому варіанті здійснення п. 20, надані два експресуючих вектори, один із яких експресує важкий ланцюг, а інший експресує легкий ланцюг. У додатковому варіанті здійснення кожен експресуючий вектор за п. 20 містить той самий промотор. У ще одному додатковому варіанті здійснення кожний з експресуючих векторів за п. 20 містить відмінний промотор.

[0378] Пункт 21 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою рекомбінантну клітину-хазяїна, яка містить один або декілька експресуючих векторів за п. 20.

[0379] Пункт 22 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою антитіло, яке продукується за допомогою культивування рекомбінантних клітин-хазяїнів за п. 21.

[0380] Пункт 23 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом, що містить антитіло за п. 22 і терапевтичний засіб.

[0381] Пункт 24 являє собою варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом, що містить антитіло, що зв'язується з FLT3, і терапевтичний засіб, де кон'югат антитіла з лікарським засобом по суті не інгібує зв'язування FLT3 з лігандом FLT3 (FL).

[0382] Пункт 25 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 23 або п. 24, який додатково містить лінкер, що зв'язує антитіло і терапевтичний засіб.

[0383] Пункт 26 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 25, де лінкер являє собою нерозщеплюваний лінкер.

[0384] Пункт 27 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 26, де лінкер являє собою 2-(амінооксі)оцтову кислоту.

5 [0385] Пункт 28 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 23-27, де терапевтичний засіб являє собою цитотоксичний або цитостатичний засіб.

10 [0386] Пункт 29 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 23-28, де терапевтичний засіб являє собою (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамід.

15 [0387] Пункт 30 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом, де кон'югат антитіла з лікарським засобом являє собою будь-який з кон'югатів антитіл з лікарським засобом за пп. 23-29, і де кон'югат антитіло-лікарський засіб має наступну формулу:

антитіло-(лінкер-терапевтичний засіб)<sub>p</sub>,

20 де лінкер являє собою 2-(амінооксі)оцтову кислоту, і де терапевтичний засіб являє собою (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамід, і де p вибраний із групи, яка складається з 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 і 3.

25 [0388] Пункт 31 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 30, де p вибраний із групи, яка складається з 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 і 3.

[0389] Пункт 32 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 31, де p вибраний із групи, яка складається з 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5.

30 [0390] Пункт 33 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 32, де p вибраний із групи, яка складається з 1,8, 1,9 і 2.

[0391] Пункт 34 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою фармацевтичну композицію, де фармацевтична композиція містить терапевтично ефективну кількість кон'югата антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 23-33.

35 [0392] Пункт 35 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою фармацевтичну композицію за п. 34 для застосування в терапії.

[0393] Пункт 36 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою фармацевтичну композицію, де фармацевтична композиція являє собою фармацевтичну композицію за п. 35, де застосування в терапії являє собою лікування злоякісної пухлини.

40 [0394] Пункт 37 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою фармацевтичну композицію, де фармацевтична композиція являє собою фармацевтичну композицію за будь-яким з пп. 34-36, у комбінації з одним або декількома протипухлинними засобами.

45 [0395] Пункт 38 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою спосіб лікування злоякісної пухлини в індивідумі, де спосіб лікування злоякісної пухлини в індивідумі включає введення вказаному індивідуму терапевтично ефективної кількості кон'югата антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 23-33 або його фармацевтичної композиції. Інший варіант здійснення п. 37 являє собою варіант здійснення, який являє собою спосіб лікування злоякісної пухлини в індивідумі, де спосіб лікування злоякісної пухлини в індивідумі включає введення вказаному індивідуму терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 33-37.

50 [0396] Пункт 39 являє собою додатковий варіант здійснення, який являє собою фармацевтичну композицію за будь-яким з пп. 33-37 або спосіб за п. 38, де злоякісна пухлина містить одну або кілька клітин, що експресують FLT3 на підвищеному в порівнянні з незлоякісною клітиною рівні.

55 Приклади

[0397] Різні аспекти винаходу додатково описані і проілюстровані за допомогою декількох прикладів, які приведені нижче, жоден з яких не призначений для обмеження об'єму винаходу.

Приклад 1

Антиген FLT3

[0398] FLT3, рецептор Fms-подібної тирозинкіназа 3, також відомий як Flk2 (кіназа 2 зародкової печінки), STK1 (тирозинкіназа 1 стовбурових клітин) і CD135, є представником сімейства рецепторів типу III тирозинкінази (RTK). FLT3 людини кодує RTK довжиною 993 амінокислот, що містить мембранозв'язаний рецептор з п'ятьма імуноглобуліно-подібними позаклітинними доменами і двома внутрішньоклітинними тирозинкіназними доменами (TKD), зв'язаними за допомогою кіназного домена-вставки (Stirewalt D L et al; Nat Rev Cancer; 650-665(2003). Ген FLT3 людини (ID № гена 2322 (національний центр біотехнологічної інформації)) розташований на хромосомі 13q12 і має 85% гомології амінокислотної послідовності з FLT3 миші (Rosnet O et al; Oncogene 8:173-179 (1993). FLT3 експресований у нормальних мієлоїдних і лімфоїдних клітинах-попередниках і в лейкозних клітинах у 70-90% пацієнтів з ГМЛ (Carow, C.E et al; Blood 87: 1089-1096 (1996); Rosnet O et al; Leukemia 10:238-248 (1996), а також при ГЛЛ. Відомо, що FLT3 залучений у проліферацію, диференціювання й апоптоз гемопоетичних клітин. Ліганд FLT3 (FLT3L), що стимулює димеризацію й активацію рецептора, таким чином, індукуючи сигнальний каскад по шляхах PI3кінази і MAPK (Stirewalt D L et al; Nat. Rev. Cancer; 650-665(2003) продукує множинну гемопоетичних клітин. Приблизно, у 30% пацієнтів з ГМЛ виявлені мутації внутрішньої тандемної дуплікації (ITD) FLT3, що забезпечують конститутивну активацію рецепторів і спадний сигнальний каскад, асоційований з поганим результатом захворювання (Gunawardane R N et al; Mom Cancer Ther 12:438-447 (2013). Для огляду ілюстративних варіантів здійснення антигену FLT3, див. фігуру 1.

## Приклад 2

### Одержання моноклональних антитіл (MAT) до FLT3

[0399] В одному з варіантів здійснення терапевтичні моноклональні антитіла ("MAT") до FLT3 включають MAT, які реагують з епітопами, специфічними для FLT3, що зв'язуються з FLT3, експресованими на клітинах. Імуногени для одержання таких MAT включають імуногени, сконструйовані так, щоб кодувати або містити позаклітинні домени або цілу послідовність білка FLT3, області, теоретично розраховані як місять функціональні мотиви, і області FLT3 теоретично розраховані як антигенні за допомогою комп'ютерного аналізу амінокислотної послідовності. Імуногени включають пептиди, рекомбінантні білки і клітини (які ендogenous експресують FLT3 або які сконструйовані для експресії FLT3).

[0400] MAT до FLT3 одержували з використанням технології VelocImmune® (Regeneron, Tarrytown, NY), де генетично сконструйовані миші генерували антитіла, які мають варіабельні області, які повністю належать людині, і константні області миші. MAT, що позначається v62-1b21 (також відоме як AGS62.21) одержували після імунізації мишей VelocImmune® рекомбінантним білком FLT3 людини. MAT до FLT3, v62-1b21, специфічно зв'язується з білком FLT3 і експресуючими FLT3 клітинами (рекомбінантний і ендogenous).

[0401] Після відбору v62-1b21 (продуктивний природним чином лінією гібридомних клітин) перетворювали в експресоване CHO нативне антитіло, яке повністю належить людині, за допомогою комбінування послідовностей варіабельних областей людини антитіла VelocImmune® (див., приклад 3 - Експресія CHv62.21 способами рекомбінантних ДНК), але з константними областями людини, що включають неприродну амінокислоту в положенні 124 важкого ланцюга технологією ReCODE, розробленою Ambrx (La Jolla, CA) (див., приклад 4 - Експресія CHv62.21pAF людини способами рекомбінантних ДНК).

[0402] ДНК, які кодують послідовності v62-1b21 визначали після виділення іРНК продукуючих v62-1b21 гібридомних клітин. Послідовності нуклеїнових кислот варіабельних областей важких і легких ланцюгів v62-1b21 до Flt3 одержували з гібридомних клітин з використанням протоколу, що нижче приводиться. Секретуючі v62-1b21 гібридомні клітини лізували реагентом тризолом (Life Technologies, Gibco BRL). Виділяли тотальну РНК і з тотальної РНК одержували перший ланцюг кДНК із застосуванням олігопраймерів (dT)12-18, використовуючи систем ампліфікації Gibco-BRL Superscript Pre. Потім перший ланцюг кДНК ампліфікували з використанням праймерів для варіабельної області важкого ланцюга імуноглобуліну людини, і праймери для варіабельної області легкого ланцюга імуноглобуліну людини. Продукти ПЛР секвенували і визначали варіабельні області важкого і легкого ланцюга.

[0403] Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислот варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів приведені на фігурах 2A і/або 2B і фігурах 3A і/або 3B. Вирівнювання MAT CHv62.21 із зародковою лінією Ig людини приведено на фігурах 4A-4B.

## Приклад 3

### Експресія CHv62.21 способами рекомбінантних ДНК

[0404] Для рекомбінантної експресії MAT CHv62.21 у трансфікованих клітинах, послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів MAT гібридами v62.21 клонували вище константних областей важкого ланцюга IgG1 людини і легкого ланцюга IgK людини, відповідно.

Повні касети важкого ланцюга і легкого ланцюга людини MAT CHv62.21 клонували в клонуючий вектор нижче промотора/енхансера CMV. Рекombінантну експресуючу конструкцію MAT CHv62.21 трансфікували в клітини CHO для стабільної експресії в системі Lonza GS (Lonza, Basel, Switzerland). MAT CHv62.21, секретований рекombінантними клітинами CHO, виділяли й оцінювали на зв'язування з FLT3 клітинної поверхні за допомогою проточної цитометрії. Результати демонструють, що рекombінантне антитіло CHv62.21, експресоване в клітинах CHO, зв'язується FLT3 на клітинній поверхні.

[0405] Результати також демонструють, що рекombінантно експресоване CHv62.21, експресоване в клітинах CHO, зв'язується з FLT3 подібно до v62.21, виділеного з гібридами. MAT CHv62.21, секретоване рекombінантними клітинами, також оцінювали на зв'язування з рекombінантним білком FLT3 за допомогою ELISA. Зв'язування CHv62.21 з білком FLT3 у MAT, отриманого з CHO і з гібридомних клітин, було ідентичним.

[0406] Клітини китайського хом'яка (CHO), які продукують антитіло, позначене CHv62.21, були відправлені (через Federal Express) в американську колекцію типових культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 09-грудня-2014, і їм присвоєний номер доступу PTA-121831.

[0407] Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислот варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів приведені на фігурах 2A і/або 2B і фігурах 3A і/або 3B.

[0408] У результаті експериментального аналізу відомими в даній галузі способами (наприклад, розщеплення протеазами, аналізу LCMS і т.д.) модифікації(й) амінокислот MAT CHv62.21, одержуваного з клітин CHO, продемонстровано, що в більшості виділених MATIB CHv62.21 відбувається делеція лізину на С-кінці важкого ланцюга, а в частині виділеного MAT CHv62.21 відбувається піроглутамілування на N-кінці важкого ланцюга і делеція лізину на С-кінці важкого ланцюга.

#### Приклад 4

Експресія CHv62.21pAF людини способами рекombінантних ДНК

[0409] Для рекombінантної експресії CHv62.21pAF у трансфікованих клітинах послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів MAT гібридами v62-1b21 клонували вище константних областей важкого ланцюга IgG1 людини і легкого ланцюга IgK людини, відповідно. Повні касети важкого ланцюга і легкого ланцюга людини MAT CHv62.21 клонували в клонуючий вектор нижче промотора/енхансера CMV. Рекombінантну експресуючу конструкцію MAT CHv62.21 трансфікували в клітини CHO pAFsupl-4E2 (Ambrx, La Jolla, CA), що стабільно експресують супресорну tPHK амбер і специфічну для pAF аміноацил-tPHK-синтетазу, з одержанням стабільних клонів. Стабільні клони продукують CHv62.21pAF при вбудовуванні pAF у MAT. Стабільні клони піддавали ампліфікації генів з наступним субклонуванням. CHv62.21pAF, секретований стабільним субклоном, виділяли й оцінювали на зв'язування FLT3 клітинної поверхні за допомогою проточної цитометрії. Результати демонструють, що рекombінантне антитіло CHv62.21pAF, експресоване клітинами CHO, зв'язується з FLT3 на клітинній поверхні.

[0410] Клітини китайського хом'яка (CHO), які продукують антитіло, позначене CHv62.21pAF, були відправлені (через Federal Express) в американську колекцію типових культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 09-грудня-2014, і їм присвоєний номер доступу PTA-121836.

[0411] Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислот варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів приведені на фігурах 2C і/або 2B і фігурах 3C і/або 3B.

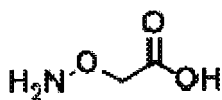
[0412] У результаті експериментального аналізу відомими в даній галузі способами (наприклад, розщеплення протеазами, аналізу LCMS і т.д.) модифікації(й) амінокислот MAT CHv62.21pAF, одержуваного з клітин CHO, продемонстровано, що в більшості виділених MATIB CHv62.21pAF відбувається делеція лізину на С-кінці важкого ланцюга, а в частині виділеного MAT CHv62.21pAF відбувається піроглутамілування на N-кінці важкого ланцюга і делеція лізину на С-кінці важкого ланцюга.

#### Приклад 5

Одержання лінкерної групи AGL

[0413] У переважному варіанті здійснення лінкерна група за даним винаходом, що позначається AGL, використовується для зв'язування MAT до FLT3 за даним винаходом, переважно CHv62.21pAF, із групою лікарського засобу за даним винаходом, переважно AGD-0182, загальновідома як 2-(амінооксі)оцтова кислота (Chem-Impex International, Inc., Wood Dale, IL).

[0414] У додатковому варіанті здійснення лінкерна група AGL за даним винаходом має наступну формулу:



2-(амінооксі)оцтова кислота

Хімічна формула:  $C_2H_6NO_3$

Точна маса: 91,0269

Молекулярна маса: 91,0660

маса/заряд: 91,0269 (100,0%), 92,0303 (2,2%)

Приклад 6

Одержання і синтез групи лікарського засобу AGD-0182

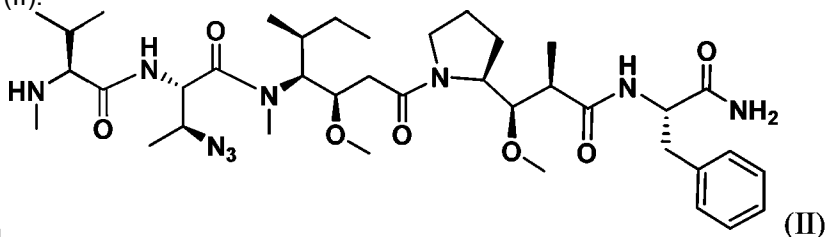
[0415] Групу лікарського засобу, приведену у формулі (II), одержували вказаним далі способом. Спочатку до перемішуваної при 23°C суспензії дициклогексиламіну Вос-Дар-ОН (10,0 г, 21,3 ммоль) і солі HCl H-Phe-NH<sub>2</sub> (6,42 г, 32,0 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20,0 мл) додавали DIEA (11,0 г, 14,9 мл, 85,3 ммоль) з наступним додаванням DEPC (5,19 г, 4,80 мл, 0,032 моль). Через 10 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Неочищену реакційну суміш промивали H<sub>2</sub>O (25 мл×2) з наступним насиченим сольовим розчином (25 мл×2). Органічну фракцію сушили над шаром сульфату магнію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Неочищене жовтогаряче масло очищали за допомогою флеш-хроматографії (силікагель 40  $\mu$ m, 60 Å, розмір) з використанням як елюента метанолу в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> від 2% до 10%. Усього одержували 7,25 г Вос-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> (16,7 ммоль, 78%) у вигляді жовтого масла. LCMS RT=1,28 хвилин (спосіб B); маса/заряд при ESI-MS 434,19 [M+H]<sup>+</sup>.

[0416] Далі до перемішуваної при 23°C суспензії Вос-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> (7,25 г, 16,7 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) додавали TFA (10 мл). Через 5 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Леткі органічні речовини випарювали при зниженому тиску з одержанням неочищеного продукту, який використовували без додаткового очищення. Усього одержували 6,00 г H-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> у вигляді жовтогарячої твердої речовини (13,4 ммоль, 80%). LCMS RT=0,691 хвилин (спосіб B); маса/заряд при ESI-MS 334,17 [M+H]<sup>+</sup>.

[0417] Потім до перемішуваної при 23°C суспензії солі TFA Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-ОН (456 мг, 0,586 ммоль) і солі TFA H-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> (457 мг, 1,02 ммоль) у DMF (10 мл) додавали DIEA (0,350 г, 0,500 мл, 2,74 ммоль) з наступним додаванням HATU (0,520 г, 1,37 ммоль). Через 10 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Неочищену реакційну суміш очищали препаративною 3Ф-ВЕРХ з використанням колонки Phenomenex Gemini NX-C18 10 мкм 110 Å (150×30 мм) з використанням як елюента від 10% до 90% MeCN у 0,1% водяній мурашиній кислоті. Усього одержували 526 мг Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> у вигляді солі мурашиної кислоти (0,513 ммоль, 75%). LCMS RT=1,81 хвилин (спосіб B); маса/заряд при ESI-MS 980,39 [M+H]<sup>+</sup>.

[0418] На закінчення до перемішуваної при 23°C розчину Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Phe-NH<sub>2</sub> (525 мг, 0,513 ммоль) в ацетонітрилі (10 мл) додавали піперидин (5 мл). Через 2 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. До неочищеного розчину реакційної суміші додавали гексан (15 мл×3). Шар ацетонітрилу концентрували при зниженому тиску. Неочищена олія очищали препаративною 3Ф-ВЕРХ з використанням колонки Phenomenex Gemini NX-C18 10 мкм 110 Å (150×30 мм) з використанням як елюента від 5% до 95% MeCN у 0,1% водяному TFA. Усього одержували 354 мг вказаної в заголовку сполуки у вигляді солі TFA (0,406 ммоль, 79%). LCMS RT=1,15 хвилин (спосіб B); маса/заряд при ESI-MS 758,24 [M+H]<sup>+</sup>; маса/заряд при HRMS 758,4915 [C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>+H]<sup>+</sup>.

[0419] Вказаним вище синтезом одержували наступну групу лікарського засобу, що позначається (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамід, що приведена у вигляді формули (II):



[0420]

Приклад 7

Синтез лінкера лікарського засобу AGL і групи лікарського засобу AGD-0182

[0421] Синтез лінкерної групи AGL і групи лікарського засобу AGD-0182 проводили вказаним далі чином.

[0422] Спосіб А описаний з використанням наступних способів і протоколів:

5 [0423] 0-0,50 хвилин: ізократично 80 води/10 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді; 0,50-3,50 хвилин: лінійний градієнт від 80 води/10 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді до 0 води/90 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді; 3,50-3,99 хвилин ізократично 0 води/90 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти в воді; 3,99-4,00 хвилин лінійний градієнт від 0 води/90 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді до 80 води/10 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді.

10 [0424] Спосіб В описаний з використанням наступних способів і протоколів:

[0425] 0-0,50 хвилин: ізократично 85 води/5 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді; 0,50-1,60 хвилин: лінійний градієнт від 85 води/5 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді до 0 води/98 ацетонітрилу/2 1% мурашиної кислоти в воді; 1,60-1,80 хвилин ізократично 0 води/98 ацетонітрилу/2 1% мурашиної кислоти у воді; 1,80-1,90 хвилин лінійний градієнт від 0 води/98 ацетонітрилу/2 1% мурашиної кислоти у воді до 85 води/5 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді; 1,90-2,00 хвилин ізократично 85 води/5 ацетонітрилу/10 1% мурашиної кислоти у воді.

[0426] Вказаними вище способами синтез проводили в такий спосіб:

20 [0427] До перемішуваної при 23°C суспензії дициклогексиламіну Вос-Дар-ОН (10,0 г, 21,3 ммоль) і солі HCl Н-Рхе-NH<sub>2</sub> (6,42 г, 32,0 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20,0 мл) додавали DIEA (11,0 г, 14,9 мл, 85,3 ммоль) з наступним додаванням DEPC (5,19 г, 4,80 мл, 0,032 моль). Через 10 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Неочищену реакційну суміш промивали H<sub>2</sub>O (25 мл×2) з наступним насиченням сольовим розчином (25 мл×2). Органічну фракцію сушили над шаром сульфату магнію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Неочищене жовтогаряче масло очищали за допомогою флеш-хроматографії (силікагель 40 мкм, 60 Å, розмір) з використанням як елюента від 2% до 10% метанолу в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Усього одержували 7,25 г Вос-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> (16,7 ммоль, 78%) у вигляді жовтого масла. LCMS RT=1,28 хвилин (спосіб В); маса/заряд при ESI-MS 434,19 [M+H]<sup>+</sup>.

30 [0428] До перемішуваної при 23°C суспензії Вос-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> (7,25 г, 16,7 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) додавали TFA (10 мл). Через 5 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Леткі органічні сполуки випарювали при зниженому тиску з одержанням неочищеного продукту, що використовували без додаткового очищення. Усього одержували 6,00 г Н-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> у вигляді жовтогарячої твердої речовини (13,4 ммоль, 80%). LCMS RT=0,691 хвилин (спосіб В); маса/заряд при ESI-MS 334,17 [M+H]<sup>+</sup>.

35 [0429] До перемішуваної при 23°C суспензії солі TFA Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-ОН (456 мг, 0,586 ммоль) і солі TFA Н-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> (457 мг, 1,02 ммоль) у DMF (10 мл) додавали DIEA (0,350 г, 0,500 мл, 2,74 ммоль) з наступним додаванням HATU (0,520 г, 1,37 ммоль). Через 10 годин аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. Неочищену реакційну суміш очищали препаративною 3Ф-ВЕРХ з використанням колонки Phenomenex Gemini NX-C18 10 мкм 110 Å (150×30 мм) з використанням як елюента від 10% до 90% MeCN у 0,1% водяної мурашиної кислоти. Усього одержували 526 мг Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> у вигляді солі мурашиної кислоти (0,513 ммоль, 75%). LCMS RT=1,81 хвилин (спосіб В); маса/заряд при ESI-MS 980,39 [M+H]<sup>+</sup>.

45 [0430] До перемішуваної при 23°C розчину Fmoc-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> (525 мг, 0,513 ммоль) в ацетонітрилі (10 мл) додавали піперидин (5 мл). Через 2 години аналіз LCMS демонстрував завершення реакції. До розчину неочищеної реакційної суміші додавали гексан (15 мл×3). Шар ацетонітрилу концентрували при зниженому тиску. Неочищена олія очищали препаративною 3Ф-ВЕРХ з використанням колонки Phenomenex Gemini NX-C18 10 мкм 110 Å (150×30 мм) з використанням як елюента від 5% до 95% MeCN у 0,1% водяному TFA. Усього одержували 354 мг кінцевої сполуки (MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Рхе-NFL) у вигляді солі TFA (0,406 ммоль, 79%). LCMS RT =1,15 хвилин (спосіб В); маса/заряд при ESI-MS 758,24 [M+H]<sup>+</sup>; маса/заряд при HRMS 758,4915 C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>+H]<sup>+</sup>

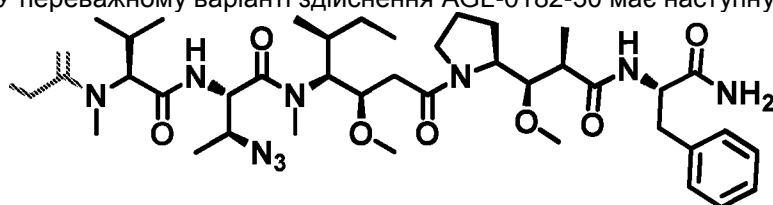
55 [0431] До перемішуваної при 23°C розчину MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Дар-Рхе-NH<sub>2</sub> (2,0 г, 2,64 ммоль) і Вос-Аоа (0,53 г, 2,77 ммоль) у DMF (7,0 мл) і DCM (15,0 мл) додавали HATU (1,05 г, 2,77 ммоль) з наступним додаванням DIPEA (0,51 мл, 2,92 ммоль). Через 1 годину реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням неочищеного розчину в DMF, що додатково розбавляли 150 мл EtOAc. Неочищену реакційну суміш промивали 100 мл насиченого NaHCO<sub>3</sub> з наступним 100 мл насиченого сольового розчину. Органічну фракцію сушили над шаром сульфату магнію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску.

Неочищений Вос-Aoa-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Dap-Phe-NH<sub>2</sub> очищали за допомогою флеш-хроматографії (силікагель 40 мкм, 60Å, розмір) з використанням як елюента від 0% до 5% метанолу в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Усього одержували 2,13 г Вос-Aoa-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Dap-Phe-NH<sub>2</sub> (2,29 ммоль, 87%) у вигляді бежевої твердої речовини. LCMS RT=1,46 хвилин (спосіб А); маса/заряд при ESI-MS 931,46 [M+H]<sup>+</sup>.

[0432] До перемішуваної при 23°C розчину Вос-Aoa-MeVal-Abu(3-N<sub>3</sub>)-Dil-Dap-Phe-NH<sub>2</sub> (2,1 г, 2,26 ммоль) у діоксані (15,0 мл) додавали 4 М HCl у діоксані (10,0 мл, 40,0 ммоль). Через 0,5 години реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням неочищеного блідо-жовтого масла. Неочищене блідо-жовте масло розчиняли в 6 мл метанолу і повільно додавали (крапельно) до розчину, що енергійно перемішується, 150 мл EtOAc. У розчині одержували білий осад. Білий осад з розчину збирали за допомогою фільтрування і супернатант концентрували до твердої речовини. Білий осад і концентрований супернатант очищали декількома порціями за допомогою препаративної ЗФ-ВЕРХ з використанням колонки Phenomenex Gemini 10 мкм, C18 110 Å (150 × 30 мм) з використанням як елюента від 5% до 95% MeCN у 0,001 М соляній кислоті.

[0433] Фракції кінцевого продукту комбінували, концентрували і сушили при зниженому тиску протягом 18 годин з одержанням білої твердої речовини. Усього одержували 1,31 г AGL-0182-30-HCl (1,51 ммоль, 67%). LCMS RT=1,16 хвилин (спосіб А); маса/заряд при ESI-MS 831,27 [M+H]<sup>+</sup> (у цілому див., таблицю IV).

[0434] У переважному варіанті здійснення AGL-0182-30 має наступну формулу:



[0435]

Приклад 8

Кон'югація антитіла MAT CHv62.21pAF з лікарським засобом

[0436] MAT CHv62.21pAF кон'югували з пептидом, який містить долаізолейцин-долапролін, що позначається AGL-0182-30 з використанням алкоксіамінового лінкера, описуваного в даному документі, з одержанням кон'югата антитіла з лікарським засобом (ADC) за винаходом, що позначається CHv62.21pAF-AGL-0182-30, по приведених нижче протоколах.

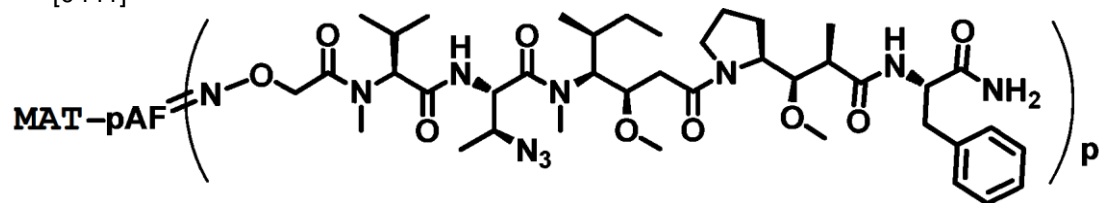
[0437] Синтез лінкер лікарського засобу AGL-0182-30 проводили способами, описаними в прикладі 7, озаглавленому "Синтез лінкера лікарського засобу AGL і групи лікарського засобу AGD-0182".

[0438] Потім одержували кон'югат антитіла з лікарським засобом (ADC) за винаходом, що позначається CHv62.21pAF-AGL-0182-30, по протоколах, що нижче приводяться.

[0439] У короткому викладі, 215,5 мл MAT CHv62.21pAF у концентрації 17,17 мг/мл, сформульованого в 50 мМ цитратному буфері, що містить 500 мМ NaCl при кінцевому pH 4,0, додають у 9,7 мл 50 мМ цитратного буфера, що містить 500 мМ NaCl при кінцевому pH 4,0, 9,1 мл 1,35 М оцтового гідразиду (розчиненого у воді), 7,26 мл DMSO і 5,08 мл 50 мМ розчину AGL-0182-30 (розчиненого в DMSO). Кон'югації дозволяють проходити при 28 °C протягом 16-24 годин. Надлишок AGL-0182-30 і інших низькомолекулярних компонентів реакції видаляють за допомогою ультрафільтрації/діафільтрації з 12 діаб'ємами 20 мМ гістидину pH 6,0, що містить 5% трегалози.

[0440] Кінцевий кон'югат антитіла з лікарським засобом (ADC) позначений CHv62.21pAF-AGL-0182-30 і має наступну формулу:

[0441]



[0442] де MAT являє собою CHv62.21pAF і р складає від 1,8 до 2,0. Середнє значення р кон'югата антитіла з лікарським засобом приведене в цьому прикладі при мас-спектрометричному аналізі складало приблизно 1,9. В одному з варіантів здійснення даного винаходу значення р складає від 1,5 до 2,5.

[0443] Кінцевий ADC за даним винаходом включає в компонент антитіла ADC ппАА, при цьому лінкер лікарського засобу кон'югований за допомогою оксимного зв'язку, і його використовують для терапевтичного лікування злоякісних пухлин, наведених у таблиці I.

Приклад 9

5 Характеристика MAT CHv62.21

[0444] MAT, що зв'язують FLT3 одержували способами, приведеними в прикладі, озаглавленому "Одержання моноклональних антитіл (MAT) до FLT3", і піддавали скринінгу, ідентифікували і характеризували з використанням комбінації аналізів, відомих у даній галузі.

A. Зв'язування FACS

10 [0445] CHv62.21 тестували на зв'язування з лініями клітин ГМЛ і В-ГЛЛ, вирощуваними in vitro. (див., таблицю VII). У короткому викладі CHv62.21 і співпадаюче по ізотипу контрольне антитіло біотинілювали з використанням NHS-LC-біотину. Для всіх експериментів використовували експоненційно зростаючі лінії злоякісних клітин in vitro. Клітини збирали і відмивали за допомогою центрифугування. Клітинам блокували Fc для зниження неспецифічного зв'язування. Антитіла розбавляли до кінцевої концентрації 10 мкг/мл і спільно інкубували з клітинами при 4 °C протягом 1 години. Наприкінці інкубації клітини відмивали і інкубували з вторинним детектуючим антитілом до стрептавідину-PE з кінцевим розведенням 1:200 (2,5 мкг/мл) протягом 1 години при 4 °C. Після відмивання незв'язаного вторинного антитіла клітини аналізували за допомогою FACS і визначали і записували геометричну середню флуоресценцію. Відношення флуоресценції розраховували в такий спосіб: геометричн. середнє CHv62.21/геометричн. середнє ізотипового контролю=MFR, міра кратності експресії в порівнянні з ізотиповим контролем.

20 [0446] Одержували значення геометричного середнього і середні відношення флуоресценції (MFR) (таблиця VI) і приведені гістограми (таблиця VII). Результати демонструють, що CHv62.21 зв'язується з декількома лініями злоякісних клітин людини, експресуючими ГМЛ і В-ГЛЛ.

B. Активність ADCC

25 [0447] CHv62.21 і CHv62.21pAF тестували на активність ADCC in vitro. У короткому викладі, вільні моноклональні антитіла й антитіла в ADC до FLT3, CHv62.21 і CHv62.21pAF, тестували на їхню здатність опосередковувати залежну від антитіл цитотоксичну активність (ADCC) з використанням ліній клітин-мішеней EOL-1 і SEM у присутності ефекторних клітин, нормальних PBMC людини, з використанням нерадіоактивного аналізу цитотоксичності CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1780).

30 [0448] За одну (1) добу до проведення аналізу, три (3) флакони ефекторних клітин, нормальних PBMC людини (Нетасаге, ID донора: 1888), розморожували, промивали і висівали в колби для культивування клітин T-175 у RPMI-1640, доповненому 10% інактивованою нагріванням ембріональною телячою сироваткою. Колби утр в інкубували в інкубаторі при 37 °C з 5% CO<sub>2</sub> протягом ночі. На наступну добу PBMC збирали з флаконів для культивування з використанням 0,25% трипсину-ЕДТА (Gibco) і промивали і висівали в концентрації 1,0×10<sup>6</sup> клітин/ямку в буфері для аналізу (RPMI1640+0,1%FBS). Клітини-мішені SEM і EOL-1 разом з лінією клітин позитивного контролю, Raji, збирали, промивали і висівали в концентрації 2,010<sup>5</sup> клітин/ямку з використанням буфера для аналізу.

40 [0449] Кожний з тестованих зразків розбавляли в буфері для аналізу до кінцевої концентрації 2,5 мкг/мл. У ямки 96-ямоквого круглодонного планшета в трьох повторях додавали однакові об'єми клітин-мішеней, тестованого зразка і ефекторних клітин. Планшет обережно центрифугували і інкубували протягом 4 годин у вологому інкубаторі при 37 °C. Через чотири (4) години інкубації аналізовані планшети центрифугували і збирали об'єм 50 мкл супернатанта і переносили у свіжий 96-ямковий планшет. Визначали активність лактатдегідрогенази в супернатанті і використанням набору для колориметричної детекції LDH; CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) з одержанням показників оптичної густини при 490 нм.

50 [0450] Дані аналізували, віднімаючи спочатку середнє значень оптичної густини фона середовища для культивування ямок із усіх значень оптичної густини експериментальних ямок, ямок тільки з ефекторними клітинами, тільки з мішенню і максимумом мішені. Потім середнє значення показників оптичної густини нормалізували й активність ADCC розраховували з використанням наступної формули:

$$ADCC(\%) = \frac{\text{Експеримент} - \text{тільки ефектори} - \text{тільки мішень}}{\text{Максимум мішені} - \text{тільки мішень}} \times 100$$

[0451] Результати на фігурі 7 демонструють, що MAT CHv62.21 і CHv62.21pAF не виявляють активності ADCC. Однак позитивний контроль, ритуксимаб, підтверджує активність ADCC у лінії клітин Raji.

#### Приклад 10

5 CHv62.21pAF-AGL-0182-30 інгібують ріст пухлин in vivo

[0452] Значна експресія FLT3 у пухлинних клітинах разом з обмеженою експресією в нормальних клітинах робить FLT3 гарною мішенню для терапії антитілами і, подібним чином, терапії за допомогою ADC. Таким чином, оцінюють терапевтичну ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у моделях ксенотрансплантатів злоякісних пухлин ГЛЛ, ГМЛ і В-ЛЛ людини на мишах.

[0453] Досліджують ефективність дії кон'югата антитіла з лікарським засобом на ріст пухлини і формування метастазів у моделях ксенотрансплантатів (наприклад, підшкірних і ортотопічних) злоякісних пухлин на мишах.

[0454] Підшкірні (п/ш) пухлини одержують за допомогою ін'єкції  $5 \times 10^4$ - $10^6$  злоякісних клітин, змішаних при розведенні 1:1 з матригелем (Collaborative Research) у правий бік самців мишей SCID. Для тестування ефективності дії ADC на формування пухлини, тобто ін'єкції ADC починали на ту ж добу, що й ін'єкції пухлинних клітин. Як контроль мишам ін'єктували очищені IgG людини або PBS; або очищені MAT, які розпізнають антиген, який не має значення, неекспресований у клітинах людини. У попередніх дослідженнях розходжень у дії на ріст пухлини між контрольними IgG або PBS не виявлено. Розміри пухлин визначають за допомогою вимірювань циркулем, а об'єми пухлин розраховують як  $\text{ширина}^2 \times \text{довжина} / 2$ , де ширина являє собою найменший розмір, а довжина являє собою найбільший розмір. Мишей з підшкірними пухлинами з діаметром більш 1,5 см умертвляли.

[0455] Перевагою моделей ксенотрансплантатів злоякісних пухлин є можливість досліджувати неоваскуляризацію й ангиогенез. Ріст пухлини частково залежить від розвитку нових кровоносних судин. Хоча капілярна система і кровоносна мережа, що розвивається, походять від хазяїна, ініціацію і конфігурацію новостворених судин регулює ксенотрансплантат пухлини (Davidoff et al., Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik et al., Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295). Дія антитіла і низькомолекулярної сполуки на неоваскуляризацію досліджують способами, відомими в даній галузі, такими як ІНС аналіз пухлинних тканин і їхнього мікрооточення.

[0456] ADC CHv62.21pAF-AGL-0182-30 інгібує формування лінії(й) злоякісних клітин, що позначаються MV4-11, у ксенотрансплантати підшкірних злоякісних пухлин на пізній стадії. Ці результати вказують на прийнятність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 при лікуванні локальних і просунутих стадій злоякісних пухлин і, переважно, злоякісних пухлин, наведених у таблиці I.

#### ADC до FLT3:

[0457] Моноклональні антитіла індукували до FLT3, як описано в прикладі, озаглавленому entitled "Одержання моноклональних антитіл (MAT) до FLT3". Далі MAT кон'югують з токсином, як описано в прикладі, озаглавленому "Кон'югація антитіла MAT CHv62.21pAF з лікарським засобом" з одержанням CHv62.21pAF-AGL-0182-30. CHv62.21pAF і CHv62.21pAF-AGL-0182-30 характеризують за допомогою FACS і інших відомих у даній галузі способів, визначаючи його здатність зв'язуватися з FLT3.

#### Лінії клітин і ксенотрансплантати:

[0458] Клітини підтримують у DMEM, доповнений L-глутаміном і 10% FBS, як відомо в даній галузі. Ксенотрансплантати MV4-11 підтримують за допомогою серійного розмноження в мишей SCID.

Ефективність і титрування дози CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у моделі ксенотрансплантата лінії клітин MV4-11, який розвивається підшкірно, В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, імплантованої мишам CB17/SCID.

[0459] У цьому експерименті клітини MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини ( $3,0 \times 10^6$  клітин на мишу) ін'єктували в боки окремих мишей SCID і дозволяли пухлинам рости. Коли середні об'єми пухлин досягали визначеного розміру ( $200 \text{ мм}^3$ ), тварин підбирали по розміру пухлини і випадково розподіляли в групу обробки і контрольну групу з приблизно однаковим середнім розміром пухлини і відхиленням у кожній групі з використанням програмного забезпечення Study Director Software (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Усім досліджуваним мишам попередньо вводили блокатор Fc (mLYS-Ic3.1-hlgG1) у дозі 20 мг/кг за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції опівдні за добу перед введенням лікарського засобу.

[0460] CHv62.21pAF-AGL-0182-30 дозували на 3 різних рівнях дозування (0,5, 1,0 і 2,0 мг/кг) у вигляді одного болюсного введення за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Як носій і

контроль ADC використовували 20 мМ гістидин/5% трегалозу, pH 6,0 і 91.1-AGL-0182-30, відповідно. Усі засоби вводили залежно від індивідуальної маси кожної тварини, яка визначається безпосередньо перед кожним дозуванням. Ріст пухлини в кожній групі перевіряли двічі на тиждень з використанням вимірювань циркулем до припинення дослідження.

5 Статистичний аналіз даних по об'єму пухлини протягом останньої доби до умертвіння тварин проводили з використанням критерію Крускала-Уолліса. Попарні порівняння проводили з використанням критерію Тьюкі (2-стороннього) зі збереженням експериментальної погрішності.

[0461] У даному дослідженні оцінювали ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 і порівнювали її з контрольним ADC (91.1-AGL-0182-30) у моделі ксенотрансплантата В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини MV4-11, що підшкірно розвивається в мишей CB17/SCID. CHv62.21pAF-AGL-0182-30 вводили на 3 різних рівнях дозування (0,5, 1,0 і 2,0 мг/кг) у вигляді однократної дози за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції. Як контрольний ADC дозували 91.1-AGL-0182-30 на рівні 2 мг/кг за допомогою в/в ін'єкції. І як контроль носія використовували 20 мМ гістидин/5% трегалозу, pH 6,0.

15 [0462] Результати свідчать про відсутність статистичних відмінностей між обробкою носієм і контрольним ACD ( $p > 0,9999$ ). CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на рівні 2,0 мг/кг статистично значимо викликав регресію пухлини на 100% ( $p < 0,0001$ ), у порівнянні з вихідним розміром пухлини на початку дозування. У порівнянні з контролем носія CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на рівні 1,0 мг/кг статистично значимо інгібував ріст пухлини на 78,1% ( $p < 0,0001$ ). CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у цій моделі не продемонстрував ніякої ефективності при дозі 0,5 мг/кг ( $p = 0,5344$ ). (фігура 5).

Ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC1 і CHv62.21pAF (вільне антитіло) у моделі підшкірно розвивається ксенотрансплантата лінії клітин MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, що імплантується мишам CB 17 SCID.

[0463] В іншому експерименті клітини MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини ( $3,0 \times 10^6$  клітин на мишу) ін'єктували в боки окремих мишей SCID і дозволяли пухлинам рости. Коли середні об'єми пухлин досягали визначеного розміру (200 мм<sup>3</sup>), тварин підбирали по розміру пухлини і випадково розподіляли в групу обробки і контрольну групу з приблизно однаковим середнім розміром пухлини і відхиленням у кожній групі з використанням програмного забезпечення Study Director Software (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Усім досліджуваним мишам попередньо вводили блокатор Fc (mLYS-Ic3.1-hlgG1) у дозі 20 мг/кг за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції опівдні за добу перед введенням лікарського засобу. CHv62.21pAF-AGL-0182-30 і контрольне ADC (91.1-AGL-0182-30) дозували на рівні 1 мг/кг у вигляді одного болюсного введення за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. AGS62P (також відоме як CHv62.21pAF) і вільне контрольне антитіло (91.1-pAF) дозували на рівні 2 мг/кг у вигляді одного болюсного введення за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Усі засоби вводили залежно від індивідуальної маси кожної тварини, яка визначається безпосередньо перед кожним дозуванням. Ріст пухлини в кожній групі перевіряли двічі на тиждень з використанням вимірювань циркулем до припинення дослідження. Статистичний аналіз даних по об'єму пухлини протягом останньої доби до умертвіння тварин проводили з використанням критерію Крускала-Уолліса. Попарні порівняння проводили з використанням критерію Тьюкі (2-стороннього) зі збереженням експериментальної погрішності.

[0464] У даному дослідженні оцінювали ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) і CHv62.21pAF (вільного антитіла).

[0465] Результати демонструють, що в порівнянні з контрольним ADC (91.1-AGL-0182,30), CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на рівні 1,0 мг/кг у вигляді однократної дози за допомогою внутрішньовенної ін'єкції статистично значимий інгібував ріст пухлини на 51,4% ( $p = 0,0010$ ). У порівнянні з вільним контрольним антитілом (91.1-pAF), CHv62.21pAF на рівні 2,0 мг/кг у вигляді однократної дози за допомогою внутрішньовенної ін'єкції не продемонструвало статистичного розходження ( $p = 0,6570$ ). Крім того, результати свідчать, що CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на рівні 1,0 мг/кг статистично значимий інгібував ріст пухлини на 54,3%, у порівнянні з CHv62.21pAF на рівні 2,0 мг/кг ( $p = 0,0134$ ). (фігура 6).

Ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) і CHv62.21pAF (вільне антитіло) у модель підшкірно розвивається ксенотрансплантата лінії клітин MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини, імплантованої мишам CB 17 SCID.

55 [0466] В іншому експерименті клітини MV4-11 В-клітинного мієломоноцитарного лейкозу людини ( $3,0 \times 10^6$  клітин на мишу) ін'єктували в боки окремих мишей SCID і дозволяли пухлинам рости. Коли середні об'єми пухлин досягали визначеного розміру (200 мм<sup>3</sup>), тварин підбирали по розміру пухлини і випадково розподіляли в групу обробки і контрольну групу з приблизно однаковим середнім розміром пухлини і відхиленням у кожній групі з використанням програмного забезпечення Study Director Software (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San

Francisco, CA). Усім досліджуємо мишам попередньо вводили блокатор Fc (mLYS-Ic3.1-hlgG1) у дозі 20 мг/кг за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції опівдні за добу перед введенням лікарського засобу. CHv62.21 pAF-AGL-0182-30 і контрольне ADC (91.1-AGL-0182-30) дозували на рівні 2 мг/кг чотири рази на тиждень протягом 2 тижнів за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. AGS62P (також відоме як CHv62.21pAF) і вільне контрольне антитіло (91.1-pAF) дозували на рівні 2 мг/кг чотири рази на тиждень протягом тижня за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Усі засоби вводили в залежності від індивідуальної маси кожної тварини, яка визначається безпосередньо перед кожним дозуванням. Ріст пухлини в кожній групі перевіряли двічі на тиждень з використанням вимірювань циркулем до припинення дослідження. Статистичний аналіз даних по об'єму пухлини протягом останньої доби до умертвіння тварин проводили з використанням критерію Крускала-Уолліса. Попарні порівняння проводили з використанням критерію Тьюкі (2-стороннього) зі збереженням експериментальної погрішності.

[0467] У даному дослідженні оцінювали ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) і CHv62.21pAF (вільного антитіла) з використанням схеми з декількома дозами протягом періоду 2 тижні.

[0468] Результати демонструють, що в порівнянні з контрольним ADC (91.1-AGL-0182,30), CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на рівні 2,0 мг/кг у вигляді декількох доз за допомогою внутрішньовенної ін'єкції статистично значимий інгібував ріст пухлини з 100% регресом пухлини на добу 17 ( $p=0,0001$ ). У порівнянні з вільним контрольним антитілом (91.1-pAF) CHv62.21pAF на рівні 2,0 мг/кг у вигляді декількох доз за допомогою внутрішньовенної ін'єкції не продемонструвало статистичного розходження. (фігура 13).

Ефективність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 у моделі підшкірно розвивається ксенотрансплантата SEM-xcl у мишей CB 17 SCID.

[0469] В іншому експерименті, клітини гострого лімфобластного лейкозу людини SEM-xcl ( $1,0 \times 10^6$  клітин на мишу) ін'єктували в боки окремих мишей SCID і дозволяли пухлинам рости. Коли середні об'єми пухлин досягали визначеного розміру ( $200 \text{ мм}^3$ ), тварин підбирали по розміру пухлини і випадково розподіляли в групу обробки і контрольну групу з приблизно однаковим середнім розміром пухлини і відхиленням у кожній групі з використанням програмного забезпечення Study Director Software (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA).

[0470] CHv62.21pAF-AGL-0182-30 дозували на рівнях 5,0 мг/кг, 2,0 мг/кг або 1,0 мг/кг у вигляді однієї болюсної дози на добу 0 за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Контрольне ADC, AGS91.1-pAF-AGL-0182-30, дозували на рівні 5,0 мг/кг із використанням тих же маршруту і схеми дозування. Як носій використовували 20 мМ гістидин/5% трегалоза, рН 5,2. Усі засоби вводили залежно від індивідуальної маси кожної тварини, яка визначається безпосередньо перед кожним дозуванням. Ріст пухлини в кожній групі перевіряли двічі на тиждень з використанням вимірювань циркулем до припинення дослідження. Статистичний аналіз даних по об'єму пухлини протягом останньої доби до умертвіння тварин проводили з використанням критерію Крускала-Уолліса. Попарні порівняння проводили з використанням критерію Тьюкі (2-стороннього) зі збереженням експериментальної погрішності.

[0471] Результати демонструють, що CHv62.21pAF-AGL-0182-30 на всіх трьох рівнях дозування (5,0, 2,0 і 1,0 мг/кг) продемонстрував сильну протипухлинну активність у порівнянні з контрольним ADC, AGS91.1-pAF-AGL-0182-30, або з контролем носія ( $p<0,0001$ ), у цілому приводячи більше ніж до 75% інгібування росту пухлини. Крім того, при дозуванні на рівні 5,0 мг/кг CHv62.21pAF-AGL-0182-30 приводив до значимого регресу пухлини на 57,3% у порівнянні з вихідним початковим об'ємом пухлини. Спостерігали статистично значима відмінність ефективності між 5,0 мг/кг і 2,0 мг/кг або 1,0 мг/кг. (фігура 14).

#### Висновок

[0472] У підсумку фігури 5, 6, 13 і 14 демонструють, що ADC до FLT3, який називається CHv62.21pAF-AGL-0182-30, значно інгібував ріст пухлинних клітин, які експресують FLT3 у порівнянні з контрольними ADC і вільними антитілами, що зв'язуються з FLT3. Таким чином, CHv62.21pAF-AGL-0182-30 можна використовувати в терапевтичних цілях для лікування і контролю злоякісних пухлин, наведених у таблиці I.

#### Приклад 11

Клінічні випробування в людини для лікування і діагностики карциноми людини з використанням ADC до FLT3

[0473] Використовують ADC до FLT3 за даним винаходом, що специфічно зв'язується з FLT3, і його використовують при лікуванні визначених пухлин, переважно пухлин, наведених у таблиці I. Відносно кожного з цих показань успішно використовують два клінічні підходи.

[0474] I.) Допоміжна терапія: при допоміжній терапії пацієнтів обробляють ADC до FLT3 у комбінації з хіміотерапевтичним або протипухлинним засобом і/або променевою терапією або їхнім сполученням. Первинні злоякісні пухлини-мішені, такі як пухлини, наведені в таблиці I, обробляють по стандартних протоколах за допомогою додавання ADC до FLT3 до стандартної терапії першої і другої лінії. У структурах протоколів аналізують ефективність, оцінювану в прикладах, що нижче приводяться, включаючи як необмежувальні приклади, зниження маси пухлини первинних або метастатичних вогнищ, збільшену виживаність без прогресування, загальну виживаність, поліпшене здоров'я пацієнтів, стабілізацію захворювання, а також здатність знижувати звичайні дози стандартних хіміотерапевтичних засобів і інших біологічних засобів. Ці зниження доз дозволяють проведення додаткової і/або більш тривалої терапії, знижуючи дозозалежну токсичність хіміотерапевтичного або біологічного засобу. ADC до FLT3 використовують у декількох клінічних випробуваннях допоміжної терапії в комбінації з хіміотерапевтичними або протипухлинними засобами.

[0475] II.) Монотерапія: у рамках використання ADC до FLT3 у монотерапії пухлин, ADC до FLT3 вводять пацієнтам без хіміотерапевтичного або протипухлинного засобу. В одному з варіантів здійснення монотерапії проводять клінічно в пацієнтів зі злоякісними пухлинами на останній стадії з великим метастатичним захворюванням. У структурах протоколів аналізують ефективність, оцінювану в прикладах, що нижче приводяться, включаючи як необмежувальні приклади, зниження маси пухлини первинних або метастатичних вогнищ, збільшену виживаність без прогресування, загальну виживаність, поліпшене здоров'я пацієнтів, стабілізацію захворювання, а також здатність знижувати звичайні дози стандартних хіміотерапевтичних засобів і інших біологічних засобів.

#### Дозування

[0476] Для забезпечення оптимальної бажаної відповіді режими дозування можна регулювати. Наприклад, можна проводити одне болюсне введення, можна вводити декілька дробових доз з часом або дозу можна пропорційно знижувати або збільшувати, як показано вимогами терапевтичної ситуації. Особливо переважно формулювати парентеральні композиції в стандартну лікарську форму для простоти введення і сталості дозування. Як використовують у даному документі, стандартна лікарська форма стосується фізично дискретних одиниць, прийнятих як одиничні дози для лікування індивідуальних ссавців; де кожна одиниця містить визначену кількість активної сполуки, розраховану так, щоб забезпечувати необхідну терапевтичну дію, разом з необхідним фармацевтичним носієм. Опис стандартних лікарських форм за винаходом продиктований і безпосередно залежить від (а) унікальних характеристик антитіл і/або ADC і конкретної терапевтичної або профілактичної дії, якої необхідно досягти, і (b) обмежень властивих даній галузі складання такої активної сполуки для лікування чутливості в індивідуумів.

[0477] Ілюстративний необмежувальний діапазон терапевтично ефективної кількості ADC до FLT3, що вводиться в комбінації за винаходом, складає приблизно від 0,5 до приблизно 10 мг/кг, приблизно від 1 до приблизно 5 мг/кг, щонайменше 1 мг/кг, щонайменше 2 мг/кг, щонайменше 3 мг/кг або щонайменше 4 мг/кг. Інші ілюстративні необмежувальні діапазони являють собою, наприклад, приблизно від 0,5 до приблизно 5 мг/кг, або, наприклад, приблизно від 0,8 до приблизно 5 мг/кг, або, наприклад, приблизно від 1 до приблизно 7,5 мг/кг. Варіант здійснення винаходу з високою дозою стосується дози більше 10 мг/кг. Слід зазначити, що значення доз можуть варіювати залежно від типу і тяжкості патологічного стану, що полегшується, і можуть включати одну або кілька доз. Також додатково варто розуміти, що для будь-якого конкретного індивідуума конкретні режими дозування з часом варто коректувати відповідно до потреб індивідуума і професійного рішення особи, яка здійснює введення або контролює введення композицій, і що діапазони доз, що приводяться в даному документі, є винятково ілюстративними і не призначені для обмеження або об'єму практичного застосування заявленої композиції.

#### План клінічного випробування (CDP)

[0478] CDP супроводжує і розкриває лікарські засоби ADC до FLT3 відносно допоміжної терапії або монотерапії. Випробування початково демонструють безпеку, а потім підтверджують ефективність при повторному дозуванні. Випробування є відкритими випробуваннями, де порівнюють стандартну хіміотерапію зі стандартною терапією і ADC до FLT3. Варто розуміти, що одним з необмежувальних критеріїв, який можна використовувати для включення пацієнтів, є рівні експресії FLT3 їхніх пухлин, що визначають за допомогою біопсії.

[0479] Як і для будь-якого основаного на інфузії білка або антитіла терапевтичного засобу, фактори небезпеки пов'язані переважно з (i) синдромом вивільнення цитокінів, наприклад, зниженим тиском, пропасницею, тремором, ознобом; (ii) розвитком імунної відповіді на матеріал

(тобто, утворення в пацієнта антитіл людини на терапевтичне антитіло або відповідь НАМА); і (iii) токсичністю відносно нормальних клітин, які експресують FLT3. Для контролю кожного з цих факторів небезпеки використовують стандартні тести і спостереження. Виявлено, що ADC до FLT3 є безпечним при введенні людині.

#### 5 Приклад 12

Детекція білка FLT3 у зразках норми й отриманих у пацієнтів зі злоякісною пухлиною

[0480] Детекцію білка FLT3 у злоякісній пухлині з використанням антитіл до FLT3 оцінювали в зразках РВМС периферичної крові пацієнтів з гострим лімфоцитарним лейкозом у популяціях мієлоїдних (ГМЛ) клітин.

#### 10 А. Матеріали і способи для зв'язування FACS

[0481] У цьому експерименті зразки інкубували з комбінацією CD45, CD33, CD34, CD3, CD20, CD38 і з МАТ до Flt3-біотином або ізотиповим МАТ-біотином. Вторинну детекцію біотинільованих МАТ проводили з використанням стрептавідину-РЕ. Одержували суміші для контролю флуоресценції без однієї з міток (FMO) з реагентом для детекції стрептавідину-РЕ (SAv-PE) і використовували для установки вікна для популяцій клітин. Для одержання даних використовували проточний цитометр LSRII (BD Biosciences).

[0482] Для лімфоцитів вікно встановлювали по популяції CD45<sup>+</sup>, у якій ідентифікували чотири різні популяції, CD33<sup>+</sup>/3<sup>-</sup>/20<sup>-</sup> (мієлобласти), CD33<sup>+</sup>/3<sup>+</sup>/34<sup>+</sup>/38<sup>-</sup> (стовбурові клітини), CD33<sup>+</sup>/3<sup>+</sup> (Т-клітини) і CD33<sup>+</sup>/20<sup>+</sup> (В-клітини). Аналіз проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo версії 9.5.4 (Tri-Star, Ashland, OR). Значення флуоресценції реєстрували у вигляді геометричного середнього (MFI).

#### 20 В. Результати

[0483] Результати, наведені в таблиці VIII для зразків, отриманих у пацієнтів з ГМЛ, демонструють, що МАТ до FLT3 зв'язується з популяціями мієлоїдних клітин, стовбурових клітин, Т- і В-клітин усіх тестованих зразків.

[0484] Крім того, як представлено в таблиці VIII, діаграми розподілу MFIR для всіх тестованих зразків демонструють невелику варіабельність у популяціях мієлоїдних клітин, стовбурових клітин і В-клітин, тоді як у Т-клітин варіабельність MFIR є меншою. Для ГМЛ середнє MFIR для мієлобластів складало приблизно 963,1, тоді як середнє MFIR для стовбурових клітин складало 318,2, при цьому середнє MFIR для Т-клітин складало 9,842, у той час як MFIR для В-клітин складало 72,60. Середнє MFIR для зразків норми складало 642,4 для мієлоїдних клітин, 68,29 для стовбурових клітин, 11,66 для Т-клітин і 13,73 для В-клітин.

[0485] Уся сукупність результатів, наведених у таблиці VIII, демонструє, що за допомогою МАТ до FLT3, таких як МАТ CHv62.21 і МАТ CHv62.21pAF за винаходом, можна детектувати білок FLT3, надекспресований при ГМЛ.

#### 35 Приклад 13

Клітинна цитотоксичність *in vitro*, опосередковувана CHv62.21pAF і CHv62.21pAF-AGL-0182-30

[0486] Здатність антитіла до FLT3 (CHv62.21pAF) і ADC до FLT3 (CHv62.21pAF-AGF-0182-30) опосередковувати залежну від FLT3 цитотоксичність оцінювали з використанням ліній клітин лейкозу людини MV-4-11 і MOFM-13, що ендегенно експресують FLT3, і лінії клітин лейкозу людини Karpas299, що не експресує FLT3.

[0487] У короткому викладі, клітини MV-4-11, MOFM-13 і Karpas299 висівали в 50 мкл повного середовища при щільності 1500, 2000 і 3000 клітин/ямку, відповідно, у 96-ямковій планшети і поміщали в інкубатор для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. На наступну добу в клітин блокували Fc в об'єму 25 мкл на ямку для зниження неспецифічного зв'язування, і одержували 4× вихідний розчин CHv62.21pAF-AGF-0182-30, ізотипового контрольного антитіла, кон'югованого з AGD-0182 (91.1pAF-AGF-0182-30), CHv62.21pAF і ізотипового контрольного антитіла (91.1pAF) у повних середовищах, і у відповідні ямки додавали 25 мкл серійних розведень ADC і антитіл. Клітини обробляли CHv62.21pAF-AGL-0182-30, 91.1pAF-AGL-0182-30, CHv62.21pAF і 91.1pAF протягом 5 діб в інкубаторі для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. Наприкінці періоду інкубації в кожен ямку додавали 20 мкл Presto Blue і інкубували протягом 2 годин. Планшети зчитували з використанням планшетного спектрофотометра BioTek Synergy H4 з використанням довжини хвилі збудження 540 нм і довжини хвилі випромінювання 590 нм.

[0488] Результати в таблиці IX демонструють, що ADC до FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30) може селективно індукувати цитотоксичність відносно експресуючих FLT3 ліній клітин MOFM-13 і MV-4-11, при цьому він не може індукувати цитотоксичність відносно неекспресуючої FLT3 лінії клітин Karpas299. Антитіло до FLT3 (CHv62.21pAF) не індукує цитотоксичність відносно ліній клітин MOLM-13 і MV-4-11. Таким чином, ці дані демонструють, що саме МАТ до FLT3 CHv62.21pAF не індукує цитотоксичність відносно клітин. Навпроти, тільки ADC до FLT3

CHv62.21pAF-AGF-0182-30 може селективно знищувати експресуючі FLT3 клітини MOFM-13 і MV-4-11, при цьому він не діє на неекспресуючі FLT3 клітини Karpas299.

#### Приклад 14

Переваги CHv62.21pAF у порівнянні з MAT до FLT3 попереднього рівня техніки

[0489] MAT CHv62.21pAF за винаходом в порівнянні з іншими MAT, що зв'язують FLT3, надають кілька переваг. Особливо коли їх розглядають у світлі терапевтичної прийнятності ADC за винаходом. Наприклад, на попередньому рівні техніки відомо, що після лікування пацієнтів з ГМЛ за допомогою хіміотерапії, відбувається підвищення експресії плазматичного ліганду FLT3 ("FL"). див., Takashi, et. al., Blood vol. 117(12) (March 2011). Крім того, показано, що підвищений FL значно знижує активність інгібіторів FLT, там же. Як ADC, що містить антитіло до FLT3 людини, зареєстроване EB10, кон'юговане з монометилауристатином F (EB10-MMAF). (див., Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46, 2005). Показано, що EB10 блокує FL. Див., патент США № 8071099 (Imclone). Таким чином, метою даного винаходу є конструювання MAT, що зв'язують антиген FLT3, але не зв'язують FL.

[0490] В одному з експериментів підтверджено, що MAT CHv62.21 за винаходом не блокує FL. У короткому викладі, рекомбінантний FLT3-Fc людини купували в R and D Systems. Цей білок іммобілізували на поверхні активованих мікросфер Luminex з використанням стандартної хімії сульфо-NHS/EDC способом, наданим Luminex. З мікросферами Luminex, поряд з декількома іншими білками, кон'югували мічену His версію білка, і це служило в цьому способі як контроль.

[0491] Крім того, у R and D Systems також купували ліганд FLT3. Ліганд біотинілювали з використанням Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-LC-біотину, No-Weigh Formula по рекомендаціях виробника. Через дві (2) години реакції білка з Sulfo-NHS-LC-біотином біотин, що не включився, видаляли за допомогою діалізу проти DPBS.

[0492] Оцінювали здатність FLT3, іммобілізованого на поверхні мікросфер, зв'язуватися з його біотинільованим лігандом за допомогою реакції мікросфер з різними концентраціями біотинільованого ліганду, отриманого в буфері, що містить PBS, 2% BSA, 0,05% Tween 20 і 0,1% азид натрію, протягом 120 хвилин при кімнатній температурі зі слабким перемішуванням. Наприкінці інкубації мікросфери аспірували і промивали. Біотинільований ліганд FLT3, зв'язаний з його іммобілізованим рецептором детектували стрептавідином-R-фікоеритрином (Moss, Inc.). Флуоресценцію, асоційовану з мікросферами, визначали на пристрої Luminex. Це визначення виявило, що концентрації біотинільованого ліганду FLT3 5 нг/мл було достатньо для одержання стійкого сигналу, але вона не насичувала FLT3, асоційований з мікросферами.

[0493] Нарешті, для оцінки здатності антитіл до FLT3 у потенціалі блокувати ліганд, одержували суміші, що містять біотинільований ліганд FLT3 у концентрації 5 нг/мл і різних досліджуваних антитіл у концентрації 10 пг/мл. Ці суміші застосовували для FLT3, іммобілізованого на мікросферах, і інкубували протягом 60 хвилин. Наприкінці інкубації мікросфери аспірували і промивали. Біотинільований ліганд FLT3, зв'язаний з його іммобілізованим рецептором детектували стрептавідином-R-фікоеритрином (Moss, Inc.). Флуоресценцію, асоційовану з мікросферами, визначали на пристрої Luminex. Антитіла зі здатністю блокувати ліганд спостерігали по зниженню MFI (середньої інтенсивності флуоресценції).

[0494] Результати на фігурі 8 підтверджують, що MAT до FLT3 CHv62.21 не блокує FL, і інше MAT до FLT3, що позначається v62-1b37.1 (таблиця X) блокує FL, подібно до MAT до FLT3 на попередньому рівні техніки, позначеному EB10 (див., патент США № 8071099).

[0495] Оцінювали здатність антитіл до FLT3 (CHv62.21 і v62-1b37.1) опосередковувати дію ліганду FLT3 людини з використанням лінії клітин лейкозу людини EOL-1, що ендегенно експресує FLT3. Також використовували ізотипове контрольне антитіло (mLys-Ic3.1). Клітини EOL-1 висівали в 50 мкл повного середовища при щільності 2000 клітин на ямку в 96-ямковій планшеті і вміщували в інкубатор для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. На наступну добу клітини обробляли 50, 10 або 5 нг/мл ліганду FLT3 людини (у 25 мкл повного середовища) і 10, 1, 0,1 і 0 пг/мл тестованого антитіла (у 25 мкл повного середовища). Як необроблений контроль використовували тільки середовище. Клітини обробляли протягом 5 діб в інкубаторі для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. Наприкінці періоду інкубації в кожну ямку додавали 100 мкл Cell Titer Glo і інкубували протягом 30 хвилин з перемішуванням при кімнатній температурі. Планшети зчитували з використанням планшетного спектрофотометра BioTek Synergy H4 з використанням люмінесценції і будували графіки з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism.

[0496] Результати на фігурі 9 демонструють, що v62-1b37.1 інгібує ріст при високих концентраціях у присутності ліганду FLT3, а CHv62.21 не чинить ніякого впливу на ріст. Ліганд FLT3 людини окремо впливу на ріст лінії клітин EOL-1 не чинить.

5 [0497] На основі даних, що після хіміотерапії для лікування злоякісних пухлин концентрація FL у плазмі зростає (див., Takashi et. al., вище), показано, що існують переваги, коли МАТ до FLT3 за винаходом не блокує FL. Для підтвердження цієї точки зору показано, що в той час як цитотоксична активність МАТ, що блокують ліганд, у присутності FL знижена, цитотоксична активність МАТ, що не блокують ліганд, у присутності FL не знижена.

10 [0498] Оцінювали здатність ADC до FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30 і v62-1b21.1-AGL-0129-08) опосередковувати залежну від FLT3 цитотоксичність під час відсутності й у присутності ліганду FLT3 людини (hFL) з використанням лінії клітин лейкозу людини RS-4-11, що ендogenно експресує FLT3.

15 [0499] У короткому викладі, клітини RS-4-11 висівали в 50 мкл повного середовища при щільності 3000 клітин на ямку в 96-ямковій планшети і вміщували в інкубатор для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. На наступну добу одержували ADC у повних середовищах у концентрації 10 пг/мл і серійно розводили 1:5 усього в 9 точках. Додавали по 25 мкл серійних розведень ADC у відповідні ямки з лігандом FLT3 людини і без (100 нг/мл додавали в 25 мкл на ямку). Клітини обробляли v62-1b21.1-AGL-0129-08 (таблиця XI, див., WO2015/183978, Agensys, Inc.) і v62-1b37.1-AGL-0129-08 з лігандом FLT3 людини і без протягом 5 діб в інкубаторі для  
20 тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. Наприкінці періоду інкубації в кожен ямку додавали по 20 мкл Presto Blue і інкубували протягом 2 годин. Планшети зчитували з використанням планшетного спектрофотометра BioTek Synergy H4 з використанням довжини хвилі збудження 540 нм і довжини хвилі випромінювання 590 нм і наносили на графіки з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism.

25 [0500] Результати на фігурі 10(A) і 10(B) демонструють, що ADC до FLT3 (v62-1b21.1-AGL-0129-08 і v62-1b37.1-AGL-0129-08) можуть індукувати цитотоксичність відносно експресуючої FLT3 лінії клітин RS-4-11. ADC до FLT3 v62-1b21.1-AGL-0129-08 має подібний рівень цитотоксичності в присутності і відсутності ліганду FLT3 людини. Однак цитотоксична активність ADC до FLT3 v62-1b37.1-AGL-0129-08 у присутності ліганду FLT3 людини у порівнянні з  
30 обробкою ADC без ліганду знижена.

[0501] В іншому експерименті оцінювали здатність антитіл до FLT3 CHv62.21 і v62-1b37.1 зв'язуватися з FLT3, експресованому на поверхні лінії клітин лейкозу людини MOLM-13 у присутності ліганду FLT3 людини (hFL). Як негативний контроль використовували ізотипове контрольне антитіло AGS91.1-pAF.

35 [0502] У короткому викладі, клітини MOLM-13 висівали при щільності 50000 клітин на ямку в круглодонній 96-ямковій планшети. Планшети один раз промивали PBS в об'ємі 150 мкл на ямку. У клітин блокували Fc (20 мкг/мл) в об'ємі 50 мкл на ямку в буфері для FACS (PBS+2% FBS+0,1% азид натрію) для зниження неспецифічного зв'язування. Клітини інкубували при 4 °C протягом 15 хвилин. У відповідні ямки додавали ліганд FLT3 людини у концентрації 100 нг/мл і  
40 серійно розводили 1:2 у планшеті усього в 11 крапках. Клітини інкубували протягом 30 хвилин при 4 °C з наступним додаванням біотинільованих антитіл до FLT3. Після інкубації одержували біотинільовані антитіла до FLT3 і ізотипове контрольне антитіло в буфері для FACS у концентрації 10 мкг/мл і 1 мкг/мл і в ямки додавали по 25 мкл і інкубували протягом 1 години при 4 °C. Клітини два рази промивали буфером для FACS і додавали стрептавідин-PE (Jackson immune) по 100 мкл на ямку і інкубували протягом 1 години при 4 °C. Клітини два рази промивали буфером для FACS і зчитували на Attune Cytometer (Life technologies) і аналізували в програмному забезпеченні FlowJo (Tree Star).

45 [0503] Результати на фігурі 11(A) демонструють, що ліганд FLT3 людини не перешкоджає зв'язуванню антитіла до FLT3 AGS62P із клітинами MOLM-13. Однак ліганд FLT3 людини перешкоджає зв'язуванню антитіла до FLT3 CHv62-1b37.1 із клітинами MOLM-13 залежним від дози способом.

50 [0504] У висновку оцінювали здатність ADC до FLT3 AGS62P1 опосередковувати залежну від FLT3 цитотоксичність під час відсутності і присутності ліганду FLT3 людини (hFL) з використанням лінії клітин лейкозу людини MOLM-13, що ендogenно експресує FLT3. Як негативний контроль використовували ізотиповий контрольний ADC AGS91.1.88-pAF-AGL-0182-30.  
55

[0505] У короткому викладі, клітини MOLM-13 висівали в 50 мкл повного середовища при щільності 2000 клітин на ямку в 96-ямковій планшети і вміщували в інкубатор для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. На наступну добу в клітин блокували Fc в об'ємі 25 мкл на ямку для  
60 зниження неспецифічного зв'язування. Одержували ADC у повних середовищах у кінцевій

концентрації 10 пг/мл і серійно розводили 1:5 усього в 9 точках. 12,5 мкл серійних розведень ADC додавали у відповідні ямки з лігандом FLT3 людини і без (100 нг/мл додавали 12,5 мкл на ямку). Клітини обробляли AGS62P1 і AGS91.1.88-pAF-AGL-0182-30 з лігандом FLT3 людини і без протягом 5 діб в інкубаторі для тканинних культур при 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. Наприкінці періоду інкубації в кожну ямку додавали по 20 мкл Presto Blue і інкубували протягом 2 годин. Планшети зчитували з використанням планшетний спектрофотометр BioTek Synergy H4 з використанням довжини хвилі збудження 540 нм і довжини хвилі випромінювання 590 нм і наносили на графіки з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism.

[0506] Результат на фігурі 11(B) демонструє, що ліганд FLT3 людини не перешкоджає опосередкованій ADC до FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30) цитотоксичності відносно клітин MOLM-13.

[0507] Таким чином, хоча MAT до FLT3 можна використовувати в терапевтичному контексті, не усі MAT до FLT3 є однаковими. Результати на фігурах 8-11 демонструють, що MAT до FLT3, що не зв'язуються з FL, надають помітні переваги в порівнянні з MAT до FLT3, для яких показано, що вони зв'язуються з FL. Крім того, у світлі терапевтичної прийнятності ADC за винаходом, результати демонструють, що ADC, що містять MAT, які не блокують ліганд, до FLT3, такі як CHv62.21pAF-AGL-0182-30, зберігають протипухлинну дію в порівнянні з ADC, що містять MAT, яке блокує ліганд, до FLT3 у присутності FL. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що, як відомо, присутність FL після хемотерапевтичного лікування збільшується. Крім того, відомо, що збільшена присутність FL, як показано, знижує активність інгібіторів FLT3. Таким чином, результати на фігурах 8-11 дозволяють припускати, що ADC, що містять MAT, яке не блокує ліганд, до FLT3, у пацієнтів зі злоякісними пухлинами має кращий терапевтичний індекс і протипухлинну дію в порівнянні з ADC, що містять MAT, яке блокує ліганд до FLT3.

Приклад 15

Тест стабільності CHv62.21pAF-AGL-0182-30

[0508] In vitro оцінювали стабільність ADC до FLT3 CHv62.21pAF-AGL-0182-30 і інших ADC до FLT3 з використанням іншого цитотоксичної сполуки, яка позначається AGL-0301-20 (див., W02014/043403, Agensys, Inc.). У цьому експерименті в сироватку людини (Millipore) додавали 0,4 мг/мл кожного з ADC і фосфат pH 7,3 у кінцевій концентрації 50 мМ і інкубували в зволоженому інкубаторі при 37 °C. Збирали 100 мкл аліквот і заморожували при -80 °C на 5 хвилин, 3 години, 25,25 годин, 51,25 годин і 171,2 годин. Потім усі зразки збирали, проводили ELISA для кількісного визначення компонентів антитіл і лікарських засобів кожного з ADC.

[0509] Результати демонструють, що зв'язок лікарського засобу й антитіла в CHv62.21pAF-AGL-0182-30 є стабільним протягом експерименту, фігура 12(A). Однак на фігурі 12(B) показано, що зв'язок лікарське засіб-антитіло в v62-1b21-AGL-0301-20 є нестійким, приводячи до значної декон'югації протягом експерименту.

[0510] На всьому протязі даної заявки приводяться посилання на зміст веб-сайтів, публікації, патентні заявки і патенти (посилання на веб-сайт приводять по їх уніфікованому локатору або ресурсу URL, адресам у всесвітній комп'ютерній мережі.) Таким чином, описи кожної з цих посилань повністю включені в даний документ як посилання.

[0511] Даний винахід не обмежений в об'ємі описуваними в даному документі варіантами здійснення, які призначені тільки для ілюстрації окремих аспектів винаходу і будь-що, що є їхнім функціональним еквівалентом, знаходиться в об'ємі винаходу. Фахівцям у даній галузі на основі приведенного вище опису і вказівок, на додаток до описуваного в даному документі, очевидні різні модифікації моделей і способів за винаходом, і, подібним чином, вони знаходяться в об'ємі винаходу. Такі модифікації або інші варіанти здійснення можна здійснювати на практиці без відхилення від реального об'єму і суті винаходу.

Таблиці

Таблиця I

Тканини/клітини, які експресують FLT3 при перетворенні в злоякісні

Гострий мієлолейкоз ("ГМЛ");  
Гострий лімфобластний лейкоз ("ГЛЛ")  
В-клітинний лімфобластний лейкоз;  
Лімфобластний лейкоз попередників В-клітин.

Таблиця II

## Скорочення амінокислот

Однобуквене	Трибуквене	Повне найменування
F	Phe	фенілаланін
L	Leu	лейцин
S	Ser	серин
Y	Tyr	тирозин
C	Cys	цистеїн
W	Trp	триптофан
P	Pro	пролін
H	His	гістидин
Q	Gln	глутамін
R	Arg	аргінін
I	Ile	ізолейцин
M	Met	метіонін
T	Thr	треонін
N	Asn	аспарагін
K	Lys	лізин
V	Val	валін
A	Ala	аланін
D	Asp	аспарагінова кислота
E	Glu	глутамінова кислота
G	Gly	гліцин

Таблиця III

## Матриця заміни амінокислот

Адаптовано на основі матриці заміни амінокислот GCG Software 9.0 BLOSUM62 (матриці заміни блоків). Чим більшим є значення, тим з більшою імовірністю виявляється заміна в споріднених природних білках

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	w
																			7	Y

Таблиця IV

Загальний спосіб синтезу AGL-0182-30

Загальний спосіб синтез AGL-0182-30

Де AA1=Амінокислота 1

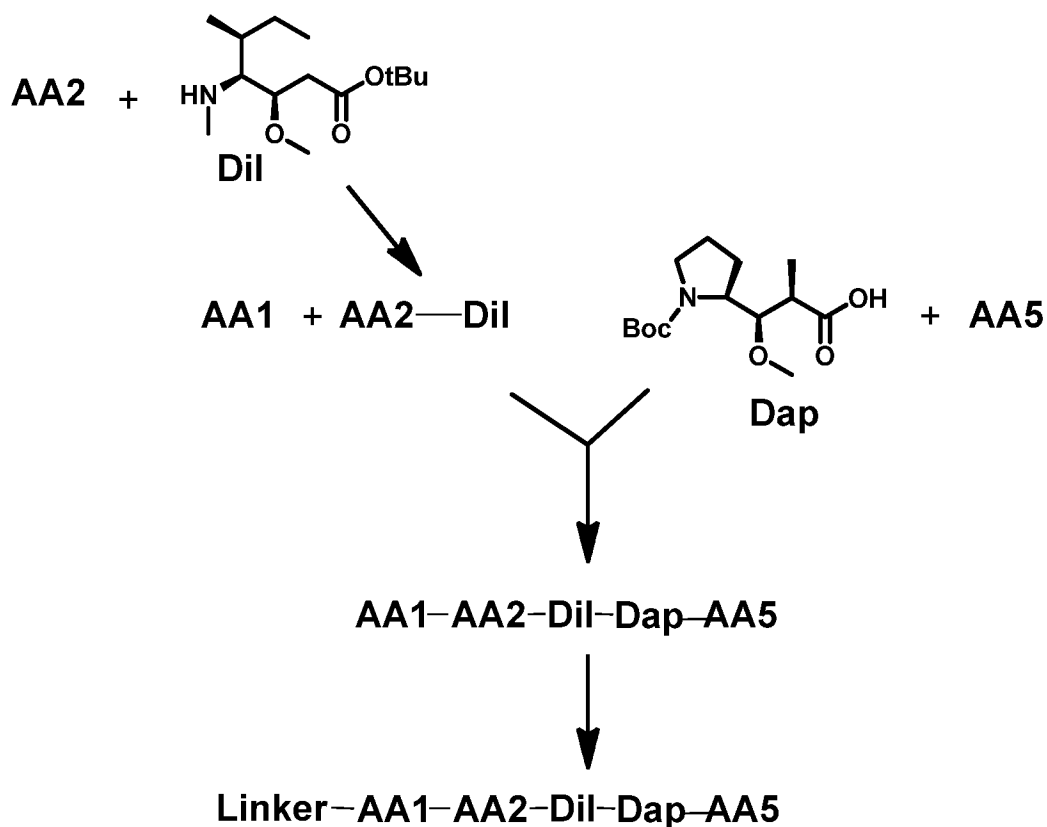
AA2=Амінокислота 2

AA5=Амінокислота 5

Dil=Долаізолейцин

Dap=Долапролін

Лінкер=Амінооксиацетил



Таблиця V

Положення CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 і CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, ідентифіковані по схемах Kabat, Chothia і Contact, відповідно. Для CDR-H1, нумерація залишків наведена з використанням обох систем нумерації Kabat і Chothia

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24-L34 RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:14)	L24-L34 RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:15)	L30-L36 RNDLGWY (SEQ ID NO:16)
CDR-L2	L50-L56 AASSLQS (SEQ ID NO:17)	L50-L56 AASSLQS (SEQ ID NO:18)	L46-L55 RLIYAASSLQ (SEQ ID NO:19)
CDR-L3	L89-L97 LQHNGFPYT (SEQ ID NO:20)	L89-L97 LQHNGFPYT (SEQ ID NO:21)	L89-L96 LQHNGFPYT (SEQ ID NO:22)
CDR-H1*	H31-H35 GYSIN (SEQ ID NO:23)	H26-H32 GFTFSGY (SEQ ID NO:24)	H30-H35 SGYSIN (SEQ ID NO:25)

Таблиця V (продовження)

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1**	H31-H35 GYSIN (SEQ ID NO:26)	H26-H32 GFTFSGY (SEQ ID NO:27)	H30-H35 SGYSIN (SEQ ID NO:28)
CDR-H2	H50-H65 SISSSSNYIYYADSVKG (SEQ ID NO:29)	H52-H56 SSSSN (SEQ ID NO:30)	H47-H58 WVSSISSSSNYI (SEQ ID NO:31)
CDR-H3	H95-H102 EGFIAGTTFDAFDI (SEQ ID NO:32)	H95-H102 EGFIAGTTFDAFDI (SEQ ID NO:33)	H93-H101 AREGFIAGTTFDAFD (SEQ ID NO:34)

\*нумерація по Kabat

\*\*нумерація по Chothia

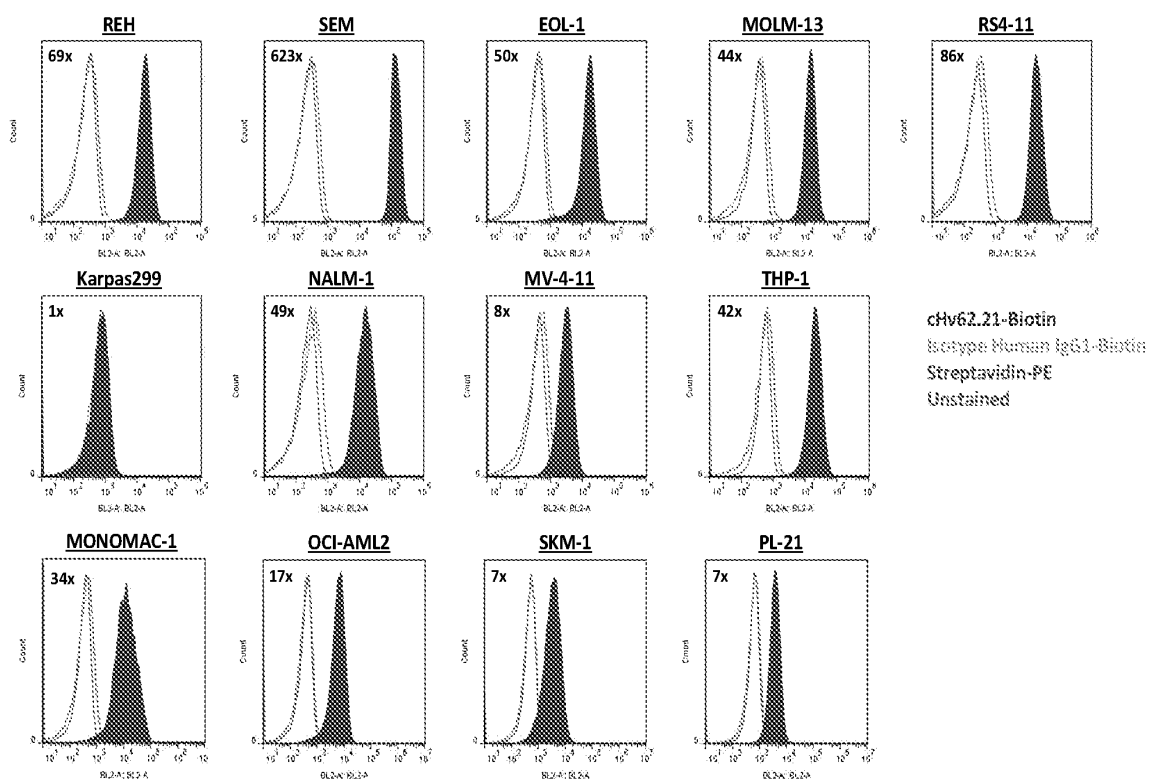
Таблиця VI

Таблиця значень геометричного середніх і значення середніх відносин флуоресценції (MFR) при аналізі FACS

Лінія клітин	Тип злоякісної пухлини	Джерело	Незабарвлені	Вторинна детекція	Ізотип	cHv62-1b21.1	MFR
Karpas-299	ALCL	DSMZ	623	596	569	634	1
REN	ГЛЛ	ATCC	220	236	235	16200	69
EOL-1	ГМЛ	Sigma/HPA	282	292	281	14000	50
MOLM-13	ГМЛ	DSMZ	303	313	320	14000	44
MONOMAC-1	ГМЛ	Creative Bioarray	315	348	338	11400	34
MV-4-11	ГМЛ	ATCC	344	355	366	2875	8
OCI-AML2	ГМЛ	DSMZ	343	337	329	5646	17
PL-21	ГМЛ	DSMZ	598	584	570	3715	7
SKM-1	ГМЛ	DSMZ	465	449	445	3208	7
THP-1	ГМЛ	ATCC	486	475	474	19700	42
RS4;11	В-ГЛЛ	ATCC	184	213	213	18400	86
SEM	В-ГЛЛ	DSMZ	181	207	212	132000	623
NALM-1	ХМЛ	ATCC	197	254	262	12900	49

Таблиця VII

Гістограми, що демонструють результати зв'язування FACS для кожної лінії клітин

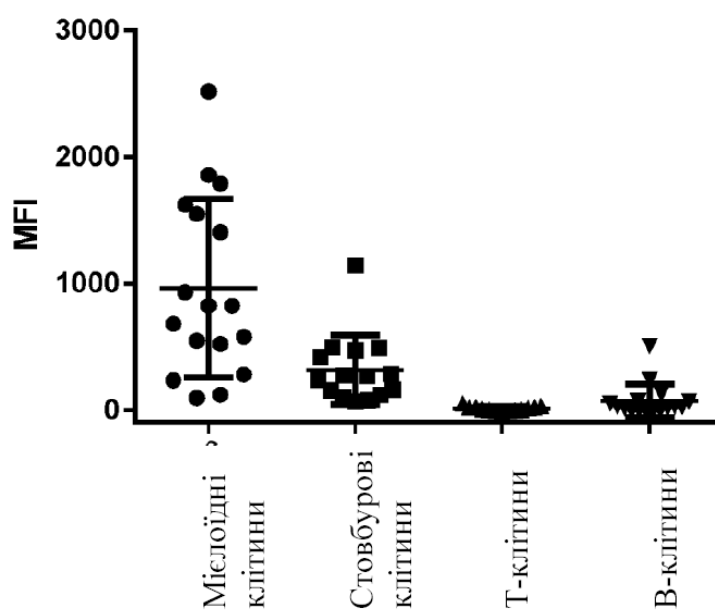


Таблиця VIII.

Експресія FLT3 у зразках первинного ГМЛ і норми

Експресія в зразках ГМЛ

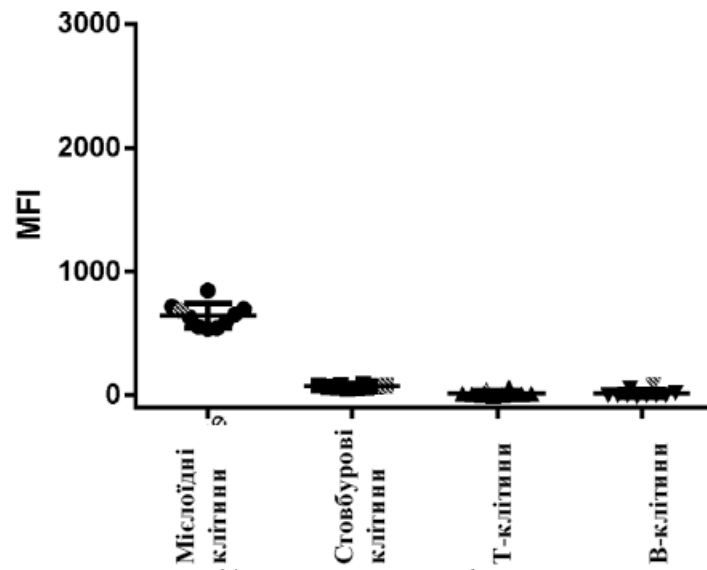
Експресія FLT3 у зразках ГМЛ



Зразки ГМЛ

	Мієлоїдні клітини	Стовбурові клітини	T-клітини	B-клітини
Mean	963,1	318,3	9,842	72,60

Експресія в зразках норми



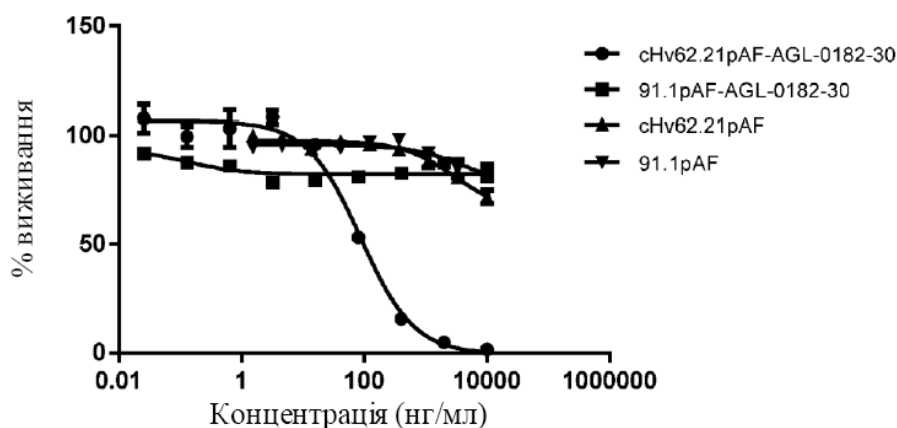
5

9 зразків пуповинної крові/1 нормальний кістковий мозок

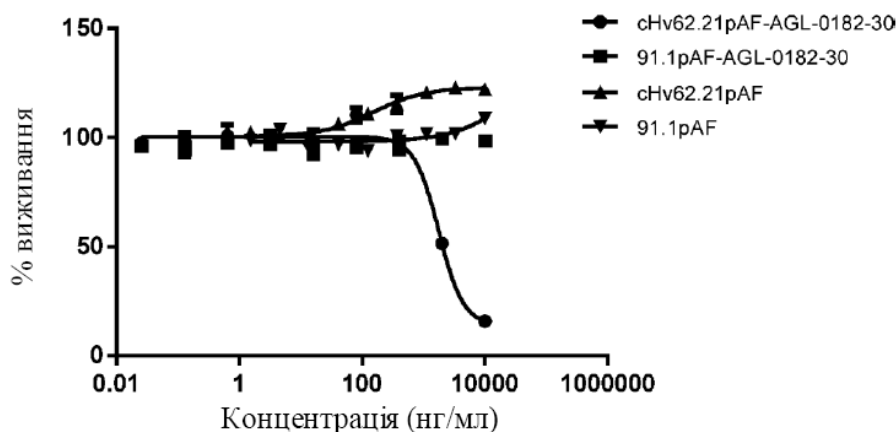
	Мієлоїдні клітини	Стовбурові клітини	T-клітини	B-клітини
Mean	642,4	68,29	11,66	13,73

Таблиця IX.

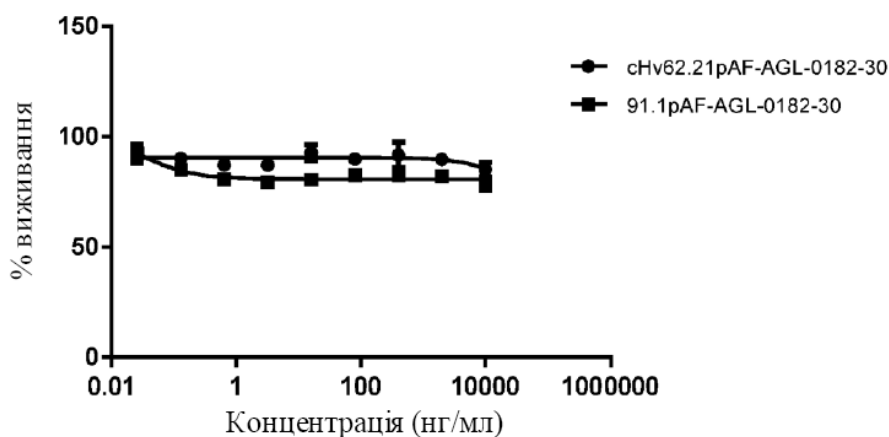
Оцінка цитотоксичності cHv62.21 pAF-AGL-0182-30 і cHv62.21 pAF відносно клітин MOLM-13, MV-4-11 і Karpas299 in vitro



Цитотоксичність відносно MV-4-11



Цитотоксичність відносно Karpas299



5

Таблиця X.

Послідовність антитіла v62-1b37.1.

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга v62-1b37.1 (SEQ ID NO:12).

1 EVQLVESGGGWPRGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSG  
 51 INWNGGSTGYADSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARDG  
 101 YTYGPFNDNWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD  
 151 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTY  
 201 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

10

251 DTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 301 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 351 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  
 401 DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 Амінокислотна послідовність легкого ланцюга v62-1b37.1 (SEQ IS NO: 13).

1 DIQMTQSPSS L SASVGDRVTIT CRAS QGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYA

51 ASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPYTFGQ

101 GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCCLNNFYPREAKVQWKV

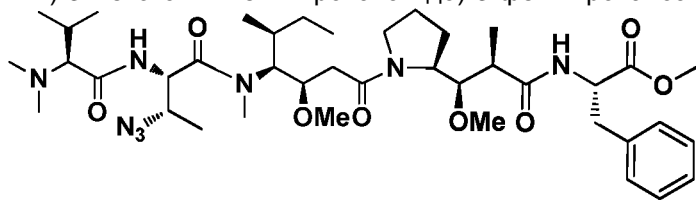
151 DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

10 201 LSSPVTKSFNRGEC

Таблиця XI.

Хімічний склад AGL-0129-08.

0129-08 означає (S)-метил-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-азидо-2-((S)-2-(диметиламіно)-3-метилбутанамідо)-N-метилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат



ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Agensys, Inc.

<120> Кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), які зв'язуються з білками FLT3

<130> 511582009200

<140> Ще не присвоєний

<141> одночасно з цим

<150> US 62/130,476

<151> 2015-03-09

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3307

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3 людини

<400> 1

```
gttttacacg aggcggcatc gcagggctgg gccggcgagg cctggggacc ccgggctccg 60
gaggccatgc cggcggttggc gcgcgacggc ggccagctgc cgctgctcgt tgttttttct 120
gcaatgatata ttgggactat taaaaatcaa gatctgcctg tgatcaagtg tgttttaatc 180
aatcataaga acaatgattc atcagtgagg aagtcacatc catatcccat ggtatcagaa 240
tccccggaag acctcgggtg tgcgttgaga cccagagctc cagggacagt gtacgaagct 300
gccgctgtgg aagtggatgt atctgcttcc atcacactgc aagtgcctgg cgatgcccc 360
gggaacatct cctgtctctg ggtctttaag cacagctccc tgaattgcc 420
gatttacaaa acagaggagt tgtttccatg gtcattttga aaatgacaga aaccaagct 480
ggagaatacc tactttttat tcagagtga gttaccaatt acacaatatt gtttacagt 540
agtataagaa ataccctgct ttacacatta agaagacctt actttagaaa aatggaaaac 600
caggacgccc tggctctgcat atctgagagc gttccagagc cgatcgtgga atgggtgctt 660
tgcgattcac agggggaaag ctgtaaagaa gaaagtcag ctgtgttaa aaaggaggaa 720
aaagtgcctc atgaattatt tgggatggac ataagtgct gtgccagaaa tgaactggg 780
agggaatgca ccaggctgtt cacaatagat ctaaatcaaa ctctcagac cacattgcca 840
caattatttc ttaaagtagg ggaaccctta tggataagg gcaaagctgt tcatgtgaac 900
catggattcg ggctcacctg ggaattagaa aacaaagcac tcgaggagg caactacttt 960
gagatgagta cctattcaac aaacagaact atgatacgga ttctgtttgc tttgtatca 1020
tcagtggcaa gaaacgacac cggatactac actgttccct cttcaaagca tcccagtc 1080
tcagctttgg ttaccatcgt agaaaaggga tttataaatg ctaccaattc aagtgaagat 1140
tatgaaattg accaatatga agagttttgt tttctgtc 1200
atcagatgta cgtggacctt ctctcgaaaa tcatttcctt gtgagcaaaa ggtctctgat 1260
aacggatata gcatatccaa gttttgcaat cataagcacc agccaggaga atatatattc 1320
catgcagaaa atgatgatgc ccaatttacc aaaatgttca cgctgaatat aagaaggaaa 1380
cctcaagtgc tcgcagaagc atcggcaagt caggcgctct gtttctcgga tggatacca 1440
ttaccatctt ggacctggaa gaagtgttca gacaagtctc ccaactgcac agaagagatc 1500
acagaaggag tctggaatag aaaggctaac agaaaagtgt ttggacagtg ggtgtcgagc 1560
agtactctaa acatgagtga agccataaaa ggggttcctg tcaagtgcctg tgcatacaat 1620
tcccttgcca catcttgtga gacgatcctt taaactctc caggccctct ccctttcatc 1680
caagacaaca tctcattcta tgcaacaatt ggtgtttgtc tcctctctat tgtcgtttta 1740
accctgctaa tttgtcaca gtacaaaaag caatttaggt atgaaagcca gctacagatg 1800
gtacaggatg ccggctcctc agataatgag tacttctacg ttgatttcag agaataatga 1860
tatgatctca aatgggaggt tccaagagaa aatttagagt ttgggaagg actaggatca 1920
ggtgcttttg gaaaagtgat gaacgcaaca gcttatgga ttagcaaaac aggagtctca 1980
```

```

atccaggttg ccgtaaaaat gctgaaagaa aaagcagaca gctctgaaag agaggcactc 2040
atgtcagaac tcaagatgat gaccagctg ggaagccacg agaataattgt gaacctgctg 2100
ggggcgtgca cactgtcagg accaattttac ttgatttttg aatactgttg ctatggtgat 2160
cttctcaact atctaagaag taaaagagaa aaatttcaca ggacttggac agagattttc 2220
aaggaacaca atttcagttt ttacccact ttccaatcac atccaaattc cagcatgcct 2280
ggttcaagag aagttcagat acaccggac tcggatcaaa tctcagggct tcatgggaat 2340
tcatttcact ctgaagatga aattgaatat gaaaaccaa aaaggctgga agaagaggag 2400
gacttgaatg tgcttacatt tgaagatctt ctttgctttg catatcaagt tgccaaagga 2460
atggaatttc tggaaatttaa gtcgtgtgtt cacagagacc tggccgccag gaacgtgctt 2520
gtcaccacag ggaagtggt gaagatatgt gactttggat tggctcgaga tatcatgagt 2580
gattccaact atgttgcag gggcaatgcc cgtctgcctg taaaatggat ggccccgaa 2640
agcctgtttg aaggcatcta caccattaag agtgatgtct ggcatatgg aatattactg 2700
tggaatct tctcacttgg tgtgaatcct taccctggca ttcgggttga tgctaacttc 2760
tacaactga ttcaaatgg atttaaatg gatcagccat tttatgtac agaagaaata 2820
tacattataa tgcaatcctg ctgggctttt gactcaagga aacggccatc cttccctaata 2880
ttgacttcgt ttttaggatg tcagctggca gatgcagaag aagcgatgta tcagaatgtg 2940
gatggccgtg ttcggaatg tctcacacc taccaaaaca ggcgacctt cagcagagag 3000
atggatttgg ggctactctc tccgcaggct caggtcgaag attcgtagag gaacaattta 3060
gtttaagga cttcatccct ccacctatcc ctaacaggct gtagattacc aaaacaagat 3120
taatttcac actaaaagaa aatctattat caactgctgc ttcaccagac ttttctctag 3180
aagctgtctg cgtttactct tgttttcaaa gggacttttg taaaatcaaa tcatcctgtc 3240
acaaggcagg aggagctgat aatgaacttt attggagcat tgatctgcat ccaaggcctt 3300
ctcaggc 3307

```

<210> 2  
 <211> 993  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> FLT3 людины

<400> 2  
 Met Pro Ala Leu Ala Arg Asp Gly Gly Gln Leu Pro Leu Leu Val Val  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Ala Met Ile Phe Gly Thr Ile Thr Asn Gln Asp Leu Pro Val  
 20 25 30  
 Ile Lys Cys Val Leu Ile Asn His Lys Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly  
 35 40 45  
 Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly  
 50 55 60  
 Cys Ala Leu Arg Pro Gln Ser Ser Gly Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile Thr Leu Gln Val Leu Val Asp  
 85 90 95  
 Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp Val Phe Lys His Ser Ser Leu  
 100 105 110  
 Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln Asn Arg Gly Val Val Ser Met  
 115 120 125  
 Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe  
 130 135 140  
 Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn Tyr Thr Ile Leu Phe Thr Val Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Arg Asn Thr Leu Leu Tyr Thr Leu Arg Arg Pro Tyr Phe Arg Lys Met  
 165 170 175  
 Glu Asn Gln Asp Ala Leu Val Cys Ile Ser Glu Ser Val Pro Glu Pro  
 180 185 190  
 Ile Val Glu Trp Val Leu Cys Asp Ser Gln Gly Glu Ser Cys Lys Glu  
 195 200 205  
 Glu Ser Pro Ala Val Val Lys Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu  
 210 215 220

Phe	Gly	Met	Asp	Ile	Arg	Cys	Cys	Ala	Arg	Asn	Glu	Leu	Gly	Arg	Glu	225	230	235	240
Cys	Thr	Arg	Leu	Phe	Thr	Ile	Asp	Leu	Asn	Gln	Thr	Pro	Gln	Thr	Thr	245	250	255	
Leu	Pro	Gln	Leu	Phe	Leu	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Leu	Trp	Ile	Arg	Cys	260	265	270	
Lys	Ala	Val	His	Val	Asn	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu	Leu	Glu	275	280	285	
Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Asn	Tyr	Phe	Glu	Met	Ser	Thr	Tyr	Ser	290	295	300	
Thr	Asn	Arg	Thr	Met	Ile	Arg	Ile	Leu	Phe	Ala	Phe	Val	Ser	Ser	Val	305	310	315	320
Ala	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Cys	Ser	Ser	Ser	Lys	His	Pro	325	330	335	
Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Ile	Val	Glu	Lys	Gly	Phe	Ile	Asn	Ala	340	345	350	
Thr	Asn	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Glu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Phe	Cys	355	360	365	
Phe	Ser	Val	Arg	Phe	Lys	Ala	Tyr	Pro	Gln	Ile	Arg	Cys	Thr	Trp	Thr	370	375	380	
Phe	Ser	Arg	Lys	Ser	Phe	Pro	Cys	Glu	Gln	Lys	Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	385	390	395	400
Tyr	Ser	Ile	Ser	Lys	Phe	Cys	Asn	His	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Glu	Tyr	405	410	415	
Ile	Phe	His	Ala	Glu	Asn	Asp	Asp	Ala	Gln	Phe	Thr	Lys	Met	Phe	Thr	420	425	430	
Leu	Asn	Ile	Arg	Arg	Lys	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser	435	440	445	
Gln	Ala	Ser	Cys	Phe	Ser	Asp	Gly	Tyr	Pro	Leu	Pro	Ser	Trp	Thr	Trp	450	455	460	
Lys	Lys	Cys	Ser	Asp	Lys	Ser	Pro	Asn	Cys	Thr	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	465	470	475	480
Gly	Val	Trp	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Arg	Lys	Val	Phe	Gly	Gln	Trp	Val	485	490	495	
Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Asn	Met	Ser	Glu	Ala	Ile	Lys	Gly	Phe	Leu	Val	500	505	510	
Lys	Cys	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Ile	Leu	515	520	525	
Leu	Asn	Ser	Pro	Gly	Pro	Phe	Pro	Phe	Ile	Gln	Asp	Asn	Ile	Ser	Phe	530	535	540	
Tyr	Ala	Thr	Ile	Gly	Val	Cys	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Val	Leu	Thr	Leu	545	550	555	560
Leu	Ile	Cys	His	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gln	Phe	Arg	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	565	570	575	
Gln	Met	Val	Gln	Val	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp	Asn	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Val	580	585	590	
Asp	Phe	Arg	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	595	600	605	
Asn	Leu	Glu	Phe	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	610	615	620	
Met	Asn	Ala	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ile	Ser	Lys	Thr	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	625	630	635	640
Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Glu	Arg	Glu	645	650	655	
Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Leu	Lys	Met	Met	Thr	Gln	Leu	Gly	Ser	His	Glu	660	665	670	
Asn	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Leu	Ser	Gly	Pro	Ile	Tyr	675	680	685	
Leu	Ile	Phe	Glu	Tyr	Cys	Cys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Arg	690	695	700	
Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Phe	His	Arg	Thr	Trp	Thr	Glu	Ile	Phe	Lys	Glu				

705					710					715				720
His	Asn	Phe	Ser	Phe	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gln	Ser	His	Pro	Asn	Ser
				725					730				735	
Met	Pro	Gly	Ser	Arg	Glu	Val	Gln	Ile	His	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln
			740					745				750		
Ser	Gly	Leu	His	Gly	Asn	Ser	Phe	His	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Glu
		755				760					765			Tyr
Glu	Asn	Gln	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Val	Leu
	770				775					780				Thr
Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Cys	Phe	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Lys	Gly	Met
785				790					795					800
Phe	Leu	Glu	Phe	Lys	Ser	Cys	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg
			805					810					815	Asn
Val	Leu	Val	Thr	His	Gly	Lys	Val	Val	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly
		820					825					830		Leu
Ala	Arg	Asp	Ile	Met	Ser	Asp	Ser	Asn	Tyr	Val	Val	Arg	Gly	Asn
	835					840					845			Ala
Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Leu	Phe	Glu	Gly
	850				855					860				Ile
Tyr	Thr	Ile	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp
865			870						875					880
Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Val	Asn	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Asp
			885					890						895
Asn	Phe	Tyr	Lys	Leu	Ile	Gln	Asn	Gly	Phe	Lys	Met	Asp	Gln	Pro
		900				905						910		Phe
Tyr	Ala	Thr	Glu	Glu	Ile	Tyr	Ile	Ile	Met	Gln	Ser	Cys	Trp	Ala
	915				920						925			Phe
Asp	Ser	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Ser	Phe	Leu
	930				935					940				Gly
Cys	Gln	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Ala	Met	Tyr	Gln	Asn	Val	Asp
945			950					955						960
Arg	Val	Ser	Glu	Cys	Pro	His	Thr	Tyr	Gln	Asn	Arg	Arg	Pro	Phe
			965				970						975	Ser
Arg	Glu	Met	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Val	Glu
		980				985						990		Asp
Ser														

<210> 3  
 <211> 1362  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> важный ланцюг СНv62.21

<400> 3  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaggc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt ggctatagca taaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg ggctggaatg ggtctcatcc attagtagta gtagtaatta catatactac 180  
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagg 300  
 tttatagctg gaactacttt tgatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360  
 gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480  
 acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggg ggacaagaaa 660  
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720  
 ctgggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780

```

cggaccacctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aacaaaagcc gcgggaggag 900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtaaccctt gccccatcc 1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aa 1362

```

<210> 4

<211> 453

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

<223> важкий ланцюг СНv62.21

<400> 4

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20     25     30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35     40     45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50     55     60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65     70     75     80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
100    105    110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115    120    125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130    135    140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145    150    155    160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165    170    175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180    185    190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195    200    205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210    215    220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225    230    235    240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245    250    255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260    265    270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275    280    285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290    295    300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305    310    315    320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

```

```

          325          330          335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          340          345          350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
          355          360          365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
          370          375          380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
          385          390          395          400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          405          410          415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          420          425          430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          435          440          445
Leu Ser Pro Gly Lys
          450

```

<210> 5  
 <211> 645  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> легкий ланцюг СНv62.21  
 <400> 5  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120  
 gggaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatggtt tcccgtacac ttttgccag 300  
 gggaccaagc tggagatcaa acggactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccacagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 6  
 <211> 214  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> легкий ланцюг СНv62.21

```

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20          25          30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35          40          45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr
85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

```

			100					105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
			115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
			130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
145					150					155					160		
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
				165					170					175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
			180					185					190				
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser		
			195				200						205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												
			210														

<210> 7  
 <211> 1362  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> важкий ланцюг СНv62.21

<400> 7  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ctgggtcaggc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt ggctatagca taaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg ggctggaatg ggtctcatcc attagtagta gtagtaatta catatactac 180  
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg 300  
 ttatatgctg gaactacttt tgatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatgggtcacc 360  
 gtctcttcat agtccaccaaa gggcccctcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480  
 acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540  
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660  
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc 720  
 ctgggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 780  
 cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840  
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900  
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960  
 aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1080  
 cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200  
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag 1260  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320  
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aa 1362

<210> 8  
 <211> 453  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> важкий ланцюг СНv62.21

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 124

<223> Хаа = пара-ацетилфенілаланін (pAF)

 $\langle 400 \rangle$  8[illegible]

<210> 9  
 <211> 453  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> важкий ланцюг CHv62.21

<400> 9  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

```

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      405                      410          415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      420                      425          430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      435                      440          445
Leu Ser Pro Gly Lys
      450

```

<210> 10  
 <211> 214  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> легкий ланцюг CHv62.21

```

<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20      25      30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 11  
 <211> 453  
 <212> Білок  
 <213> homo sapiens

<220>  
 <223> важкий ланцюг CHv62.21

<220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 124  
 <223> Хаа = пара-ацетилфенілаланін (pAF)

<400> 11

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
          20          25          30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
          100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly
          115          120          125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
          130          135          140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145          150          155          160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
          165          170          175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
          180          185          190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
          195          200          205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210          215          220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225          230          235          240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          245          250          255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          260          265          270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275          280          285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290          295          300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305          310          315          320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
          325          330          335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          340          345          350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
          355          360          365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
          370          375          380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385          390          395          400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          405          410          415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          420          425          430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          435          440          445
Leu Ser Pro Gly Lys
          450

```

<210> 12  
 <211> 449  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> важкий ланцюг v62-1b37.1

<400> 12  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Gly Tyr Thr Tyr Gly Pro Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

				405					410				415				
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
			435				440					445					

Lys

<210> 13  
 <211> 214  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> легкий ланцюг v62-1b37.1

<400> 13

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp		
			20					25					30				
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile		
		35				40						45					
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50				55					60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65				70					75					80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Tyr		
			85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala		
			100				105						110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
	115					120						125					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala			
	130				135					140							
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
145				150					155					160			
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			165					170						175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
	180					185						190					
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser		
	195					200						205					

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp	Leu	Gly							
1				5					10								

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> Білок

```

<213> Homo sapiens

<400> 15
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1              5              10

<210> 16
<211> 7
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 16
Arg Asn Asp Leu Gly Trp Tyr
 1              5

<210> 17
<211> 7
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1              5

<210> 18
<211> 7
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1              5

<210> 19
<211> 10
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 19
Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
 1              5              10

<210> 20
<211> 9
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 20
Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr
 1              5

<210> 21
<211> 9
<212> Білок
<213> Homo sapiens

```

<400> 21  
 Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 5  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 Gly Tyr Ser Ile Asn  
 1 5

<210> 24  
 <211> 7  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
 1 5

<210> 25  
 <211> 6  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Asn  
 1 5

<210> 26  
 <211> 5  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Gly Tyr Ser Ile Asn  
 1 5

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
1 5

<210> 28  
<211> 6  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Ser Gly Tyr Ser Ile Asn  
1 5

<210> 29  
<211> 17  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 30  
<211> 5  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Ser Ser Ser Ser Asn  
1 5

<210> 31  
<211> 12  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile  
1 5 10

<210> 32  
<211> 14  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 33  
<211> 14  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
 Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 15  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 34  
 Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp  
 1 5 10 15

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з FLT3, що містить:  
 CDRH1 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:23,  
 CDRH2 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:29,  
 CDRH3 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:32,  
 10 CDRL1 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:14,  
 CDRL2 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:17 і  
 CDRL3 з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20,  
 де антигензв'язувальний фрагмент, необов'язково, вибраний з групи, яка складається з Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, виділеного VH і виділеного VL;  
 15 де необов'язково антитіло містить Fc-область, яка належить підтипу IgG; і  
 де необов'язково антитіло містить Fc-область, яка містить заміну неприродною амінокислотою в амінокислотному положенні 124 важкого ланцюга,  
 і  
 де неприродна амінокислота являє собою пара-ацетилфенілаланін (pAF).
- 20 2. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, що містить:  
 (i) варіабельну область важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 123S SEQ ID NO:11, і  
 варіабельну область легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 108R SEQ ID NO:10;  
 25 (ii) важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 452G SEQ ID NO:11, і  
 легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO:10;  
 (iii) важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1E до 453K  
 30 SEQ ID NO:11, і  
 легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO:10;  
 (iv) важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 2V до 452G SEQ ID NO:11, і де 1 амінокислота важкого ланцюга являє собою піроглутамінат, і  
 35 легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності в діапазоні від 1D до 214C SEQ ID NO:10;  
 (v) важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності важкого ланцюга антитіла, що продукується клітиною китайського хом'яка (CHO), яка депонована під номером доступу ATCC PTA-121836, і  
 40 легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності легкого ланцюга антитіла, що продукується клітиною китайського хом'яка (CHO), яка депонована під номером доступу ATCC PTA-121836;  
 (vi) важкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності важкого ланцюга антитіла, що продукується клітиною китайського хом'яка (CHO), яка депонована під номером доступу ATCC PTA-121836, і  
 45 легкий ланцюг, який складається з амінокислотної послідовності легкого ланцюга антитіла, що продукується клітиною китайського хом'яка (CHO), яка депонована під номером доступу ATCC PTA-121836.

3. Одна або декілька виділених нуклеїнових кислот, що кодують антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 або п. 2.
4. Один або декілька експресуючих векторів, що містять одну або декілька виділених нуклеїнових кислот за п. 3.
- 5 5. Рекombінантна клітина-хазяїн, яка містить один або декілька експресуючих векторів за п. 4.
6. Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент, які продукуються рекombінантними клітинами-хазяїнами, що культивуються за п. 5.
7. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1, 2 і 6, кон'юговане з терапевтичним засобом за допомогою лінкера,
- 10 (i) де необов'язково антитіло або антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з FLT3, але по суті не інгібує зв'язування FLT3 з лігандом FLT3 (FL);  
(ii) де необов'язково лінкер являє собою нерозщеплюваний лінкер, який необов'язково являє собою 2-(амінооксі)оцтову кислоту;  
(iii) де необов'язково терапевтичний засіб являє собою (2S, 3S)-N-((3R, 4S, 5S)-1-((S)-2-((1R, 2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-  
15 (метиламіно)бутанамідо)бутанамід; і  
(iv) де необов'язково кон'югат антитіло-лікарський засіб має наступну формулу:  
антитіло-(лінкер-терапевтичний засіб)<sub>p</sub>,
- 20 де лінкер являє собою 2-(амінооксі)оцтову кислоту, і де терапевтичний засіб являє собою (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-аміно-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-3-азидо-N-метил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанамід, і  
де р вибраний з групи, яка складається з 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3,  
25 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 і 3.
8. Фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість кон'югата антитіло-лікарський засіб за п. 7 і фармацевтично прийнятний носій,  
(i) де необов'язково фармацевтична композиція призначена для застосування в терапії, включаючи лікування злоякісної пухлини, де необов'язково:
- 30 (a) злоякісна пухлина містить одну або декілька клітин, які експресують FLT3 на підвищеному рівні порівняно з клітиною, яка не є злоякісною;  
(b) злоякісна пухлина вибрана з групи, яка складається з гострого мієлолейкозу (ГМЛ), гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ), В-клітинного лімфобластного лейкозу і лімфобластного лейкозу попередників В-клітин, і
- 35 (ii) де необов'язково фармацевтична композиція додатково містить один або декілька протипухлинних засобів.
9. Спосіб лікування злоякісної пухлини у індивідуума, який включає введення вказаному індивідууму терапевтично ефективної кількості кон'югата антитіло-лікарський засіб за п. 7 або фармацевтичної композиції за п. 8,
- 40 де необов'язково індивідуум являє собою людину; і  
де необов'язково злоякісна пухлина вибрана з групи, яка складається з гострого мієлолейкозу (ГМЛ), гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ), В-клітинного лімфобластного лейкозу і лімфобластного лейкозу попередників В-клітин.

Послідовність κДНК (SEQ ID N0:1) і амінокислотна послідовність (SEQ ID N0: 2) FLT3 людини. Стартовий метіонін підкреслений. Відкрита рамка зчитування розташована між нуклеїновими кислотами 67-3048, включаючи стоп-кодон

```

1  GTTTTACACGAGGCGGCATCGCAGGGCTGGGCGGCGCGGCCTGGGGACCCCGGGCTCCG
    M P A L A R D G G Q L P L L V V F S
61  GAGGCCATGCCGGCGTTGGCGCGCGACGGCGGCCAGCTGCCGCTGCTCGTTGTTTTTCT
    A M I F G T I T N Q D L P V I K C V L I
121 GCAATGATATTTGGGACTATTACAAATCAAGATCTGCCTGTGATCAAGTGTGTTTAATC
    N H K N N D S S V G K S S S Y P M V S E
181 AATCATAAGAACAATGATTCATCAGTGGGGAAGTCATCATCATATCCCATGGTATCAGAA
    S P E D L G C A L R P Q S S G T V Y E A
241 TCCCCGGAAGACCTCGGGTGTGCGTTGAGACCCAGAGCTCAGGGACAGTGTACGAAGCT
    A A V E V D V S A S I T L Q V L V D A P
301 GCCGCTGTGGAAGTGGATGTATCTGCTTCCATCACACTGCAAGTGTGTCGATGCCCCCA
    G N I S C L W V F K H S S L N C Q P H F
361 GGGAAACATTTCTGTCTCTGGGTCTTTAAGCACAGCTCCCTGAATTGCCAGCCACATTTT
    D L Q N R G V V S M V I L K M T E T Q A
421 GATTTACAAAACAGAGGAGTTGTTTCCATGGTCATTTTGAAAATGACAGAAACCCAGCT
    G E Y L L F I Q S E A T N Y T I L F T V
481 GGAGAATACCTACTTTTTATTACAGAGTGAAGCTACCAATTACACAATATTGTTTACAGTG
    S I R N T L L Y T L R R P Y F R K M E N
541 AGTATAAGAAATACCCCTGCTTTACACATTAAGAAGACCTTACTTTAGAAAAATGGAAAC
    Q D A L V C I S E S V P E P I V E W V L
601 CAGGACGCCCTGGTCTGCATATCTGAGAGCGTTCAGAGCCGATCGTGGGAATGGGTGCTT
    C D S Q G E S C K E E S P A V V K K E E
661 TGCATTACAGGGGGAAAGCTGTAAAGAAGAAAGTCCAGCTGTTGTTAAAAAGGAGGAA
    K V L H E L F G M D I R C C A R N E L G
721 AAAGTGCTTCATGAATTATTTGGGATGGACATAAGGTGCTGTGCCAGAAATGAAGTGGGC
    R E C T R L F T I D L N Q T P Q T T L P
781 AGGGAATGCACCAGGCTGTTCACAATAGATCTAAATCAAACCTCCTCAGACCACATTGCCA
    Q L F L K V G E P L W I R C K A V H V N
841 CAATTATTTCTTAAAGTAGGGGAACCCCTTATGGATAAGGTGCAAAGCTGTTTCATGTGAAC
    H G F G L T W E L E N K A L E E G N Y F
901 CATGGATTCGGGCTCACCTGGGAATTAGAAAACAAAGCACTCGAGGAGGGCAACTACTTT
    E M S T Y S T N R T M I R I L F A F V S
961 GAGATGAGTACCTATTCAACAAACAGAACTATGATACGGATTCTGTTTGCTTTTGTATCA
    S V A R N D T G Y Y T C S S S K H P S Q
1021 TCAGTGGCAAGAAACGACACCCGATACTACACTTGTTCCTCTCAAAGCATCCAGTCAA
    S A L V T I V E K G F I N A T N S S E D
1081 TCAGCTTTGGTTACCATCGTAGAAAAGGGATTTATAAATGCTACCAATTCAAGTGAAGAT
    Y E I D Q Y E E F C F S V R F K A Y P Q
1141 TATGAAATTGACCAATATGAAGAGTTTGTTTTTCTGTGAGGTTTAAAGCCTACCCACAA
    I R C T W T F S R K S F P C E Q K G L D
1201 ATCAGATGTACGTGGACCTTCTCTCGAAAATCATTTTCCTTGTGAGCAAAAGGGTCTTGAT
    N G Y S I S K F C N H K H Q P G E Y I F
1261 AACGGATACAGCATATCCAAGTTTTGCAATCATAAGCACCAGCCAGGAGAATATATATTC

```

Fig. 1

```

      H A E N D D A Q F T K M F T L N I R R K
1321 CATGCAGAAAATGATGATGCCCAATTTACCAAAATGTTACAGCTGAATATAAGAAGGAAA
      P Q V L A E A S A S Q A S C F S D G Y P
1381 CCTCAAGTGCTCGCAGAAGCATCGGCAAGTCAGGCGTCCTGTTTCTCGGATGGATACCCA
      L P S W T W K K C S D K S P N C T E E I
1441 TTACCATCTTGGACCTGGAAGAAGTGTTACAGACAAGTCTCCCACTGCACAGAAGAGATC
      T E G V W N R K A N R K V F G Q W V S S
1501 ACAGAAGGAGTCTGGAATAGAAAGGCTAACAGAAAAGTGTGGACAGTGGGTGTCGAGC
      S T L N M S E A I K G F L V K C C A Y N
1561 AGTACTCTAAACATGAGTGAAGCCATAAAAGGGTTCCTGGTCAAGTGTGTGCATACAAT
      S L G T S C E T I L L N S P G P F P F I
1621 TCCCTTGGCACATCTTGTGAGACGATCCTTTTAACTCTCCAGGCCCTTCCCTTTCATC
      Q D N I S F Y A T I G V C L L F I V V L
1681 CAAGACAACATCTCATTCTATGCAACAATTGGTGTTTGTCTCCTCTTCATTGTCGTTTTA
      T L L I C H K Y K K Q F R Y E S Q L Q M
1741 ACCCTGCTAATTTGTGACAAGTACAAAAAGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATG
      V Q V T G S S D N E Y F Y V D F R E Y E
1801 GTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAGAGAATATGAA
      Y D L K W E F P R E N L E F G K V L G S
1861 TATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTTGGGAAGGTACTAGGATCA
      G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V S
1921 GGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTCA
      I Q V A V K M L K E K A D S S E R E A L
1981 ATCCAGGTGCGCGTCAAAATGCTGAAAGAAAAAGCAGACAGCTCTGAAAGAGAGGCACTC
      M S E L K M M T Q L G S H E N I V N L L
2041 ATGTCAGAACTCAAGATGATGACCCAGCTGGGAAGCCACGAGAATATTGTGAACCTGCTG
      G A C T L S G P I Y L I F E Y C C Y G D
2101 GGGGCGTGCACTGTGAGGACCAATTTACTTGATTTTTGAATACTGTTGCTATGGTGAT
      L L N Y L R S K R E K F H R T W T E I F
2161 CTTCTCACTATCTAAGAAGTAAAAGAGAAAAATTTACAGGACTTGGACAGAGATTTTC
      K E H N F S F Y P T F Q S H P N S S M P
2221 AAGGAACACAATTTAGTTTTTACCCCACTTTCCAATCACATCCAAATCCAGCATGCCT
      G S R E V Q I H P D S D Q I S G L H G N
2281 GGTTCAGAGAAGTTTCAGATACACCCGGACTCGGATCAAATCTCAGGGCTTCATGGGAAT
      S F H S E D E I E Y E N Q K R L E E E E
2341 TCATTTCACTCTGAAGATGAAATTGAATATGAAAACCAAAAAAGGCTGGAAGAAGAGGAG
      D L N V L T F E D L L C F A Y Q V A K G
2401 GACTTGAATGTGCTTACATTTGAAGATCTTCTTTGCTTTGCATATCAAGTTGCCAAAGGA
      M E F L E F K S C V H R D L A A R N V L
2461 ATGGAATTTCTGGAATTTAAGTCGTGTGTTACAGAGACCTGGCCGCCAGGAACGTGCTT
      V T H G K V V K I C D F G L A R D I M S
2521 GTCACCCACGGGAAAGTGGTGAAGATATGTGACTTTGGATTGGCTCGAGATATCATGAGT
      D S N Y V V R G N A R L P V K W M A P E
2581 GATTCCAACATATGTTGTGAGGGGCAATGCCCGTCTGCCTGTAAAATGGATGGCCCCCGAA
      S L F E G I Y T I K S D V W S Y G I L L
2641 AGCCTGTTTGAAGGCATCTACACCATTAAAGAGTGATGTCTGGTCATATGGAATATTACTG

```

Фіг. 1 (продовження)

```

      W E I F S L G V N P Y P G I P V D A N F
2701 TGGGAAATCTTCTCACTTGGTGTGAATCCTTACCCTGGCATTCCGGTTGATGCTAACTTC
      Y K L I Q N G F K M D Q P F Y A T E E I
2761 TACAAACTGATTCAAAATGGATTTAAAATGGATCAGCCATTTTATGCTACAGAAGAAATA
      Y I I M Q S C W A F D S R K R P S F P N
2821 TACATTATAATGCAATCCTGCTGGGCTTTTGACTCAAGGAAACGGCCATCCTTCCCTAAT
      L T S F L G C Q L A D A E E A M Y Q N V
2881 TTGACTTCGTTTTTAGGATGTCAGCTGGCAGATGCAGAAGAAGCGATGTATCAGAATGTG
      D G R V S E C P H T Y Q N R R P F S R E
2941 GATGGCCGTGTTTCGGAATGTCCTCACACCTACCAAACAGGCGACCTTTCAGCAGAGAG
      M D L G L L S P Q A Q V E D S *
3001 ATGGATTTGGGGCTACTCTCTCCGCAGGCTCAGGTCGAAGATTTCGTAGAGGAACAATTTA
3061 GTTTTAAGGACTTCATCCCTCCACCTATCCCTAACAGGCTGTAGATTACCAAAACAAGAT
3121 TAATTTCACTACTAAAAGAAAAATCTATTATCAACTGCTGCTTCACCAGACTTTTCTCTAG
3181 AAGCTGTCTGCGTTTACTCTTGTTCCTTCAAAGGGACTTTTGTAATAATCAAATCATCCTGTC
3241 ACAAGGCAGGAGGAGCTGATAATGAACTTTATTGGAGCATTGATCTGCATCCAAGGCCTT
3301 CTCAGGC

```

Фіг. 1 (продовження)

Послідовність кДНК (SEQ ID N0: 3) і амінокислотна послідовність (SEQ ID N0: 4) важкого ланцюга CHv62.21. Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область важкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область важкого ланцюга IgG1 людини

```

      E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L
1  GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
      S C A A S G F T F S G Y S I N W V R Q A
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGGCTATAGCATAAACTGGGTCCGCCAGGCT
      P G K G L E W V S S I S S S S N Y I Y Y
121 CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTAATTACATATACTAC
      A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
181 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCBAGAACTCACTGTAT
      L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G
241 CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGG
      F I A G T T F D A F D I W G Q G T M V T
301 TTTATAGCTGGAACACTCTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
      V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
361 GTCTCTTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
      T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
421 ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
      T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
481 ACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTA
      Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
541 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
      T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
601 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
      V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
661 GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACTCACTC
      L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
721 CTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
      R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
781 CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
      F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
841 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
      Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
901 CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG
      N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
961 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
      T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1021 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCC
      R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1081 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
      S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1141 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACCACTACAAGACCACG
      P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K
1201 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
      S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N

```

Fig. 2A

1261 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC  
H Y T Q K S L S L S P G K \*  
 1321 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Фіг. 2А (продовження)

Послідовність кДНК (SEQ ID N0: 5) і амінокислотна послідовність (SEQ ID N0: 6) легкого ланцюга СНv62.21. Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область легкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область ланцюга каппа людини

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T  
 1 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
 I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K P  
 61 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
 G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S  
 121 GGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
 R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P  
 181 AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
 E D F A T Y Y C L Q H N G F P Y T F G Q  
 241 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAG  
 G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P  
 301 GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA  
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y  
 361 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT  
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
 421 CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG  
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T  
 481 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG  
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
 541 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC  
 L S S P V T K S F N R G E C \*  
 601 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

Фіг. 2В

Послідовність κДНК (SEQ ID N0: 7) і амінокислотна послідовність (SEQ ID N0: 8) важкого ланцюга CHv62.21, модифікована вставкою неприродної амінокислоти. За допомогою X відмічене положення амбер-кодона для вставки неприродної амінокислоти пара-ацетилфенілаланіну (pAF) по залишку нуклеїнової кислоти 371. Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область важкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область важкого ланцюга IgG1 людини

```

      E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L
1   GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
      S C A A S G F T F S G Y S I N W V R Q A
61  TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGGCTATAGCATAAACTGGGTCCGCCAGGCT
      P G K G L E W V S S I S S S S N Y I Y Y
121 CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTAATACATATACTAC
      A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
181 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACBACGCCAAGBACTCACTGTAT
      L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G
241 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTCCGAGAGAAGGG
      F I A G T T F D A F D I W G Q G T M V T
301 TTTATAGCTGGAACTACTTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
      V S S X S T K G P S V F P L A P S S K S
361 GTCTCTTCATAGTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
      T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
421 ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
      T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
481 ACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
      Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
541 CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
      T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
601 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAATA
      V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
661 GTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCACAGCCTGAACTC
      L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
721 CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
      R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
781 CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAG
      F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
841 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAG
      Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
901 CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTG
      N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
961 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
      T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1021 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
      R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1081 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
      S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1141 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAGACACAG

```

Фіг. 2С

```

      P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K
1201 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
      S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N
1261 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
      H Y T Q K S L S L S P G K *
1321 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

```

### Фіг. 2С (продовження)

Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 9) важкого ланцюга CHv62.21.

Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область важкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область IgG1 людини

```

1  EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSGYSINWVRQAPGKGLEWVSS
51  ISSSSNYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
101 FIAGTTFDADFINGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
401 PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
451 PGK

```

### Фіг. 3А

Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:10) легкого ланцюга CHv62.21. Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область легкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область ланцюга каппа людини

```

1   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQOKPGKAPKRLIYA
51  ASSLQSGVPSRFSSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNGFPYTFGQ
101 GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFNRGEC

```

Фіг. 3B

Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:11) важкого ланцюга CHv62.21. Положення амінокислоти 124, відмічене X, являє собою положення амбер-кодона для вставки неприродної амінокислоти («nnAA»)/пара-ацетилфеніланіну (pAF). Подвійним підкресленням підкреслена варіабельна область важкого ланцюга, а одинарним підкресленням підкреслена константна область IgG1 людини

```

1   EVQLVESGGGLVRPGGSLRLSCAASGFTFSGYSINWVRQAPGKGLEWVSS
51  ISSSSNYIYYADSVKGRFTISRNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
101 FIAGTTFDAFDINGQGTMVTVSSXSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
401 PFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
451 PGK

```

Фіг. 3C

## Вирівнювання важкого ланцюга СНv62.21 з Іg зародкової лінії людини

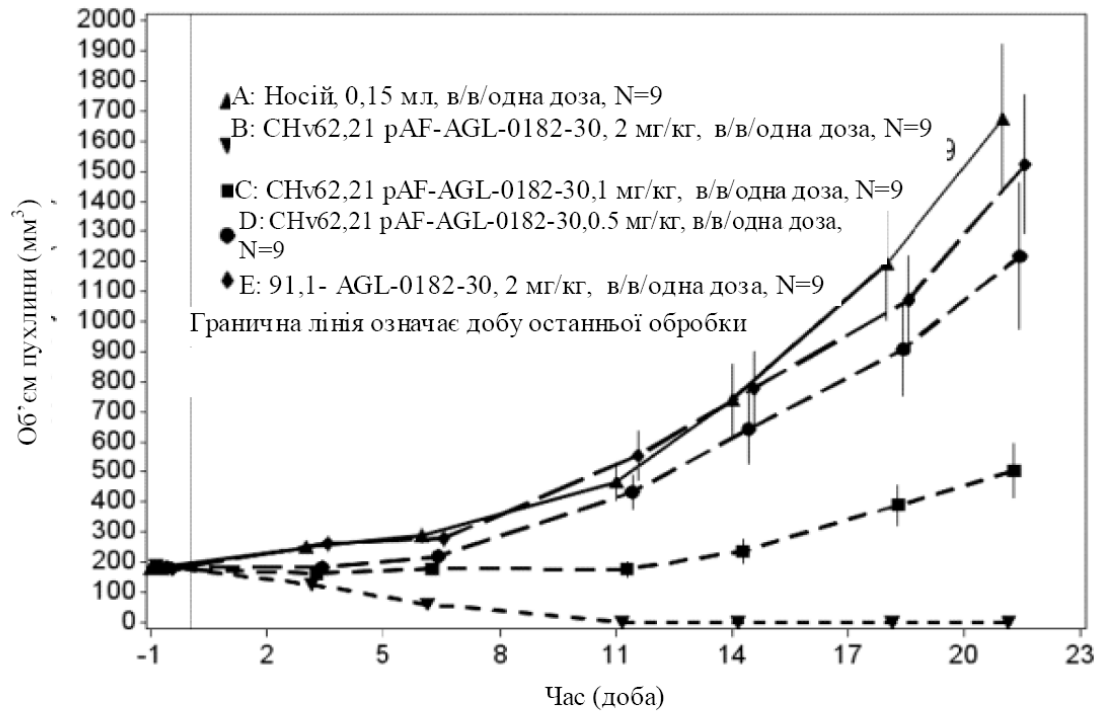
				<-----FR1----->			
V 98.3% (291/296)	Query_1	1		E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L S C A A S G F T F S			
	IGHV3-21*01	1		GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGGCTGGTCAGGGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGT	90		
				.....A.....	90		
				<-----CDR1-----><-----FR2-----><-----CDR2----->			
V 98.3% (291/296)	Query_1	91		G Y S I N W V R Q A P G K G L E W V S S I S S S S S N Y I Y Y			
	IGHV3-21*01	91		GGCTATAGCATAAACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAGAGGGCTGGAATGGGTCTCATTCATTAGTAGTAGTAGTAATTACATATACTAC	180		
				A.....G.....G.....G.....	180		
				<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->			
V 98.3% (291/296)	Query_1	181		A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D			
	IGHV3-21*01	181		GCAGACTCAGTGAAGGGCGGATTCCACATCTCCAGAGACAAAGCCAGAACTCACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC	270		
				.....	270		
V 98.3% (291/296)	Query_1	271		T A V Y Y C A R E G F I A G T T F D A F D I W G Q G T M V T			
	IGHV3-21*01	271		ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGTTATAGCTGGAACTACTTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGACATGGTCACC	360		
				.....	296		
D 100.0% (10/10)	IGHD1-7*01	8		.....	17		
J 100.0% (49/49)	IGHJ3*02	1		.....	40		
J 98.0% (48/49)	IGHJ3*01	1		.....G.....	40		
				----->			
J 100.0% (49/49)	Query_1	361		V S S			
	IGHJ3*02	41		GTCTCTTCA	369		
				.....	49		

Фіг. 4А

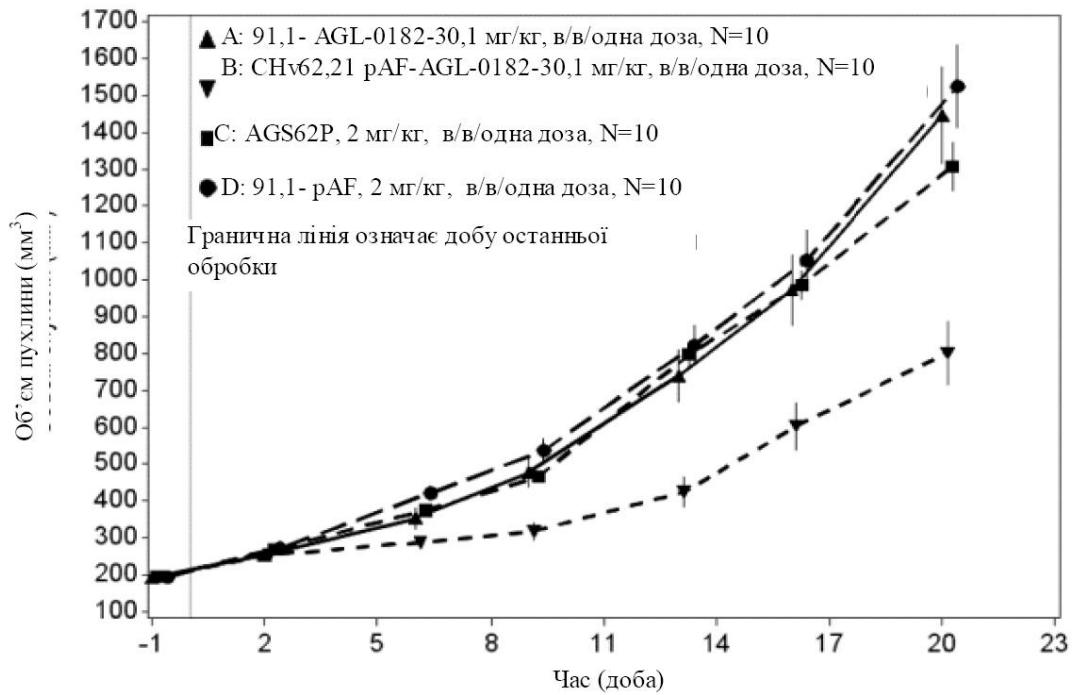
## Вирівнювання легкого ланцюга СНv62.21 з Іg зародкової лінії людини

				<-----FR1-----><-----CDR1----->			
V 99.3% (282/284)	Query_1	1		D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R			
	IGKV1-17*01	1		GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGA	90		
				.....	90		
				<-----FR2-----><-----CDR2-----><-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->			
V 99.3% (282/284)	Query_1	91		N D L G W Y Q Q K P G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S			
	IGKV1-17*01	91		AATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGGGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTGGGGTCCCATCA	180		
				.....	180		
V 99.3% (282/284)	Query_1	181		R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q			
	IGKV1-17*01	181		AGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACAATCAGAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAG	270		
				.....	270		
V 99.3% (282/284)	Query_1	271		H N G F P Y T F G Q G T K L E I K			
	IGKV1-17*01	271		CATAATGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAC	322		
				.....A.....	284		
J 100.0% (38/38)	IGKJ2*01	2		H N S Y P	39		

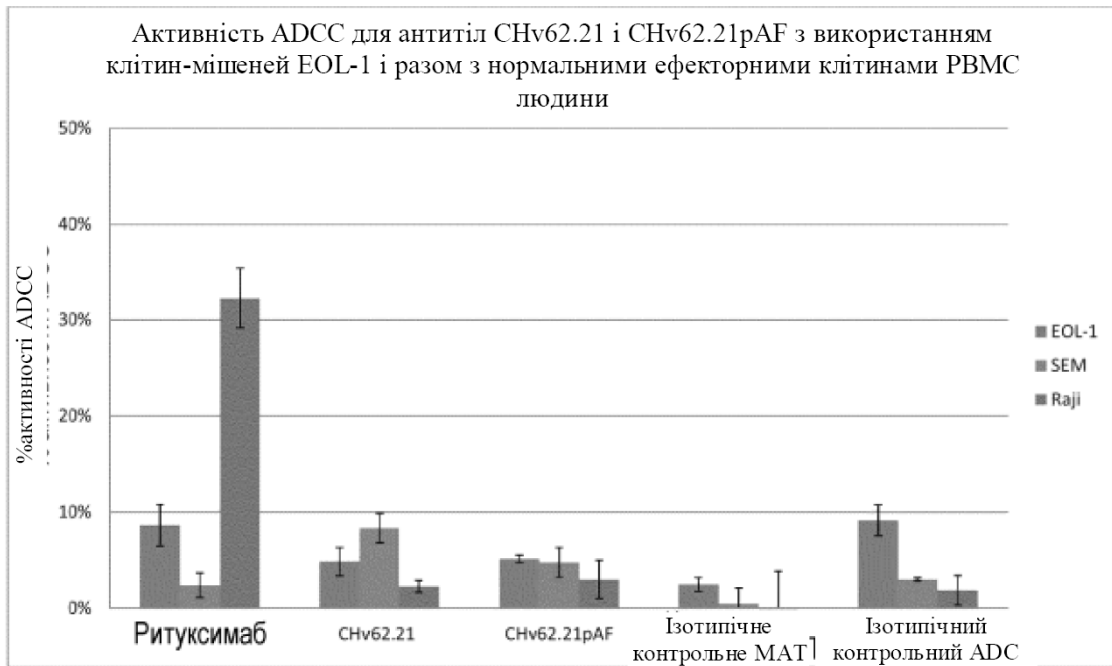
Фіг. 4В



Фіг. 5



Фіг. 6

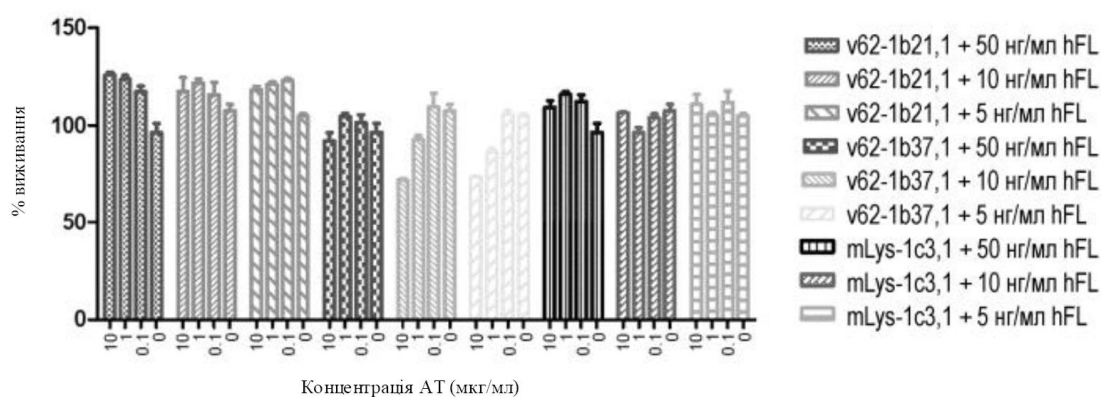


Фіг. 7



Фіг. 8

Ріст EOL1 + hFL

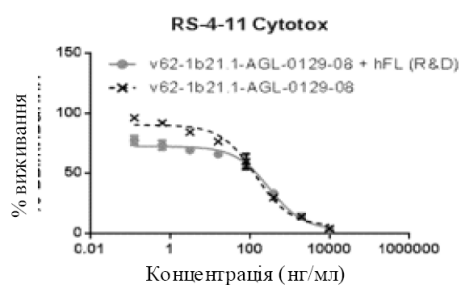


Фіг. 9

Цитотоксична активність блокуючого ліганд МАТ 1637.1 в присутності FL знижена

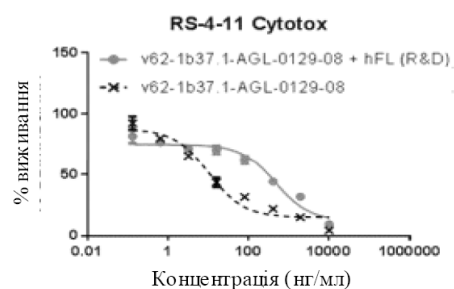
ФІГ 10А

CHv62.21 (не блокує ліганд)



ФІГ 10В

1637.1 (блокує ліганд)

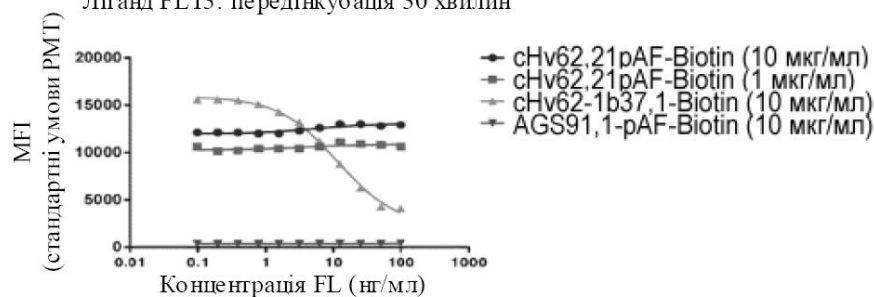


ADC	Ліганд	DAR	RS411		
			IC50(нг/мл)	значення R <sup>2</sup>	Кратність відмінності
v62 1b21,1-AGL-0129-08	hFLT3(R&D)	5,3	304	0,984	2,2
	н.п.		138,6	0,9865	н.п.
1b37,1-AGL-0129-08	hFLT3(R&D)	3,9	472,3	0,9506	45,5
	н.п.		10,37	0,9573	н.п.

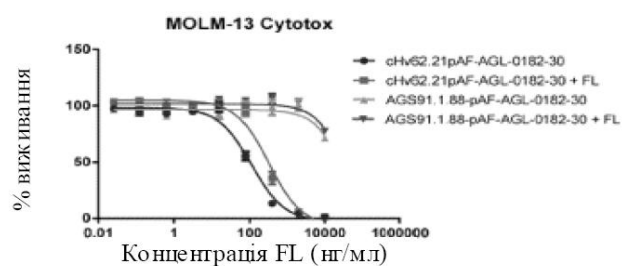
Фіг. 10

Ліганд FLT3 не перешкоджає опосередкованій CHv62.21 pAF-AGL-0182-30 цитотоксичності відносно клітин MOLM-13

Фіг. 11А  
Зв'язування MOLM-13  
Ліганд FLT3: передінкубація 30 хвилин



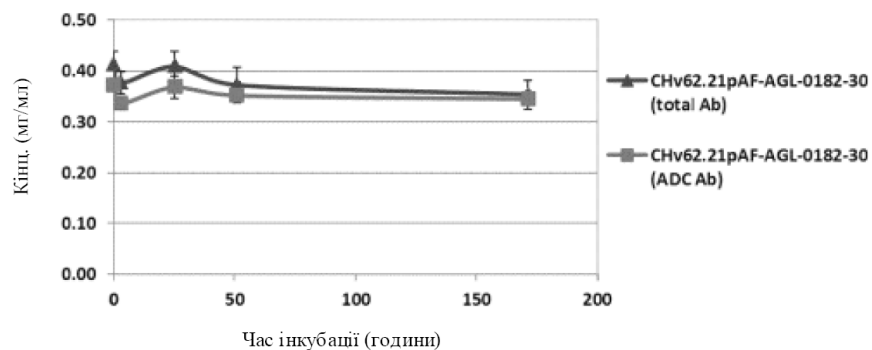
Фіг. 11В



Фіг. 11

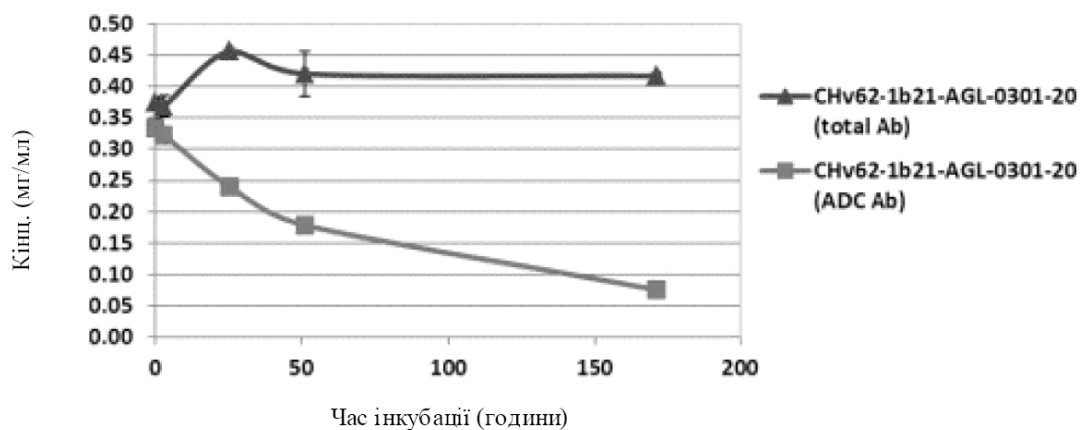
Порівняння стабільності CHv62.21 pAF-AGL-0182-30 і FLT3 ADC CHv62-1 b21 -AGL-0301 -20 in vitro

Стабільність CHv62.21pAF-AGL-0182-30 в сироватці людини

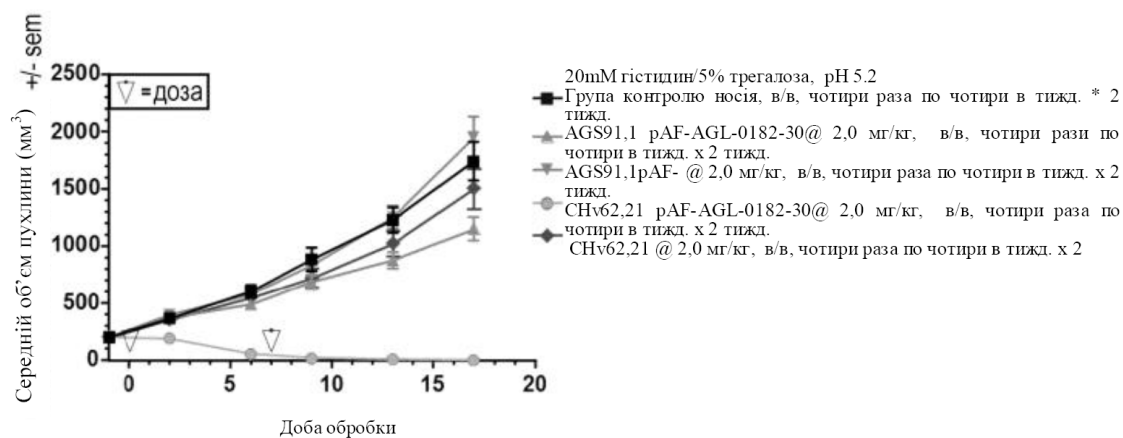


Фіг. 12А

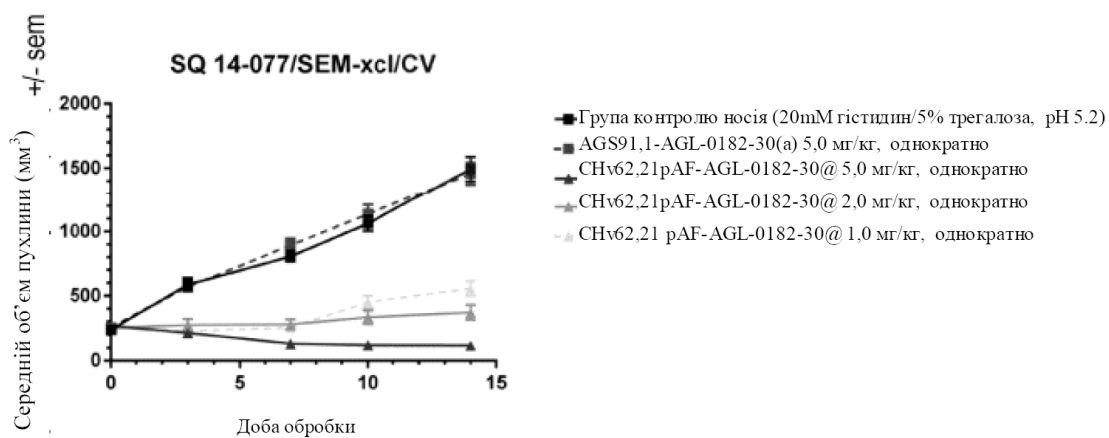
# Стабільність CHv62-1b21-AGL-0301 -20 в сироватці людини



Фіг. 12В



Фіг. 13



Фіг. 14

