

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191650** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.22

(22) Дата подачи заявки
2019.12.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) FLT3 АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/781,213**

(32) **2018.12.18**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2019/001437**

(87) **WO 2020/128638 2020.06.25**

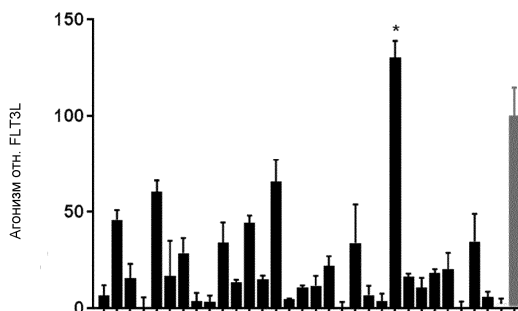
(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ИО
КАНАДА ИНК. (CA)**

(72) Изобретатель:
**Джетха Аффиф, Гобей Фил,
Байльшмидт Мелисса, Метцель
Доротея, Франссон Юхан (CA)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В заявке описаны агонистические антитела к FLT3. Такие агонистические антитела пригодны для распространения дендритных клеток и лечения злокачественного новообразования.

Hu FLT3 STAT5-Luc Анализ



A1

202191650

202191650

A1

FLT3 АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5

Перекрестная ссылка

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/781,213, поданной 18 декабря 2018 г., которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки.

Предпосылки создания изобретения

10 **[0002]** FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), также известная как CD135, представляет собой класс III рецепторных тирозинкиназ, экспрессируемых на гемопоэтических стволовых клетках, зрелых дендритных клетках (DC) и предшественниках DC. FLT3 передача сигналов с помощью его лиганда, FLT3 лиганда (FTL3L), приводит к распространению и дифференциации этих клеток. Мутации в этом
15 рецепторе разобщают пролиферацию клеток от передачи сигналов посредством лиганда и ассоциированы с патологическими новообразованиями, в особенности острым миелолейкозом (AML). В отличие от этого, агонизм FLT3 посредством экзогенного растворимого FLT3L лечения в настоящее время проходит клиническое исследование для лечения солидных опухолей, где его DC-распространяющие свойства
20 служат в качестве адъюванта для пептидной вакцинирующей терапии и для стимуляции противоопухолевых ответных реакций в комбинации с иммуно-онкологией и лучевой терапией. Тем не менее, FLT3L терапия имеет недостатки, такие как ограниченная фармакокинетическая доступность и комплексные дозирующие потребности.

25

Сущность изобретения

[0003] В настоящей заявке описана разработка FLT3 агонистического антитела, которое индуцирует распространение и дифференциацию DC и их предшественников, улучшая презентацию опухолевого антигена, и в то же время, преодолевая ограниченную лигандом биодоступность. Эти антитела пригодны в способах лечения
30 злокачественных новообразований.

[0004] Аспект, описанный в настоящей заявке, включает рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи

(VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); гипервариабельный участок 2 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); гипервариабельный участок 3 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); гипервариабельный участок 1 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 6 - 10 (RASEGIHXGLA); гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10 (NANSLHS); и гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11 (QQYYDYPLT); где X представляет собой любой аминокислотный остаток.

В некоторых вариантах осуществления, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из перечня, включающего: SEQ ID NO: 7 (RASEGIHDGLA); SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA); SEQ ID NO: 9 (RASEGIHTGLA); и SEQ ID NO: 10 (RASEGIHLGLA). В некоторых вариантах осуществления, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, и 23; и последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 27, и 28. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG антитело. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций для уменьшения одной или нескольких эффекторных функций рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, константный участок тяжелой цепи рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит константный участок тяжелой цепи IgG4, содержащий любую из следующих аминокислотных модификаций или набор модификаций, выбранных из: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, делеция G446, делеция K447, и любой их комбинации IgG4 модификаций в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, F(ab)2, однодоменное антитело, или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает количество дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток при контактировании с моноклеарными клетками периферической крови человека и/или клетками костномозгового происхождения. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для

повышения количества дендритных клеток или предшественников гематологических
 дендритных клеток составляет меньше, чем приблизительно 200 пикомоль (пМ). В
 некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его
 антигенсвязывающий фрагмент повышает STAT5 экспрессию в клеточной линии,
 5 экспрессирующей FLT3. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для повышения
 STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей FLT3, равное или меньше,
 чем EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей
 FLT3, индуцируемой лигандом FLT3 человека. В некоторых вариантах осуществления,
 рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит
 10 иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления,
 иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист белка стимулятора
 генов интерферона (STING). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем
 изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное
 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, и
 15 фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых
 вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для
 внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая
 композиция приготовлена для подкожного введения. В некоторых вариантах
 осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для внутриопухолевого
 20 введения. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его
 антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая
 композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для
 лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления,
 злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы,
 25 рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников,
 рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В
 некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его
 антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая
 композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для
 30 лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или
 подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах
 осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак
 поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак
 головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак

предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, включающий введение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитоподобные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ захвата и/или распространения дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи, пораженной опухолью или злокачественным новообразованием, включающий введение эффективного количества рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, пораженной опухолью или злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитоподобные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения

злокачественного новообразования, включающий инкубирование клетки, описанной в настоящей заявке, в культуральной среде в условиях, достаточных для секретирования рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления, способ осуществления лечения злокачественного новообразования дополнительно включает подвергание культуральной среды по меньшей мере одной стадии очистки. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие указанного злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или

фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток

5 включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции,

10 описанной в настоящей заявке, для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные

15 клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемого наполнителя, носителя или разбавителя для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых

20 вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное

25 новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в

30 настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения особи, у которого диагностировано или предполагается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря,

рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или

- 5 фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в
10 настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления,
15 дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего
20 фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления,
25 дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.

[0005] Другой аспект, описанный в настоящей заявке, включает рекомбинантное
30 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит любую из следующих структур гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1

(GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); гипервариабельный участок 2
 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную
 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4
 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); гипервариабельный участок 3 вариабельного участка
 5 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность,
 указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYYFDH); гипервариабельный участок 1
 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную
 последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 6 - 10 (RASEGIHXGLA);
 гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2),
 10 содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10
 (NANSLHS); или гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи
 (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из
 SEQ ID NO: 11 (QQYYDYPLT); где X представляет собой любой аминокислотный
 остаток. В некоторых вариантах осуществления, VL-CDR1 содержит аминокислотную
 15 последовательность, выбранную из перечня, включающего: SEQ ID NO: 7
 (RASEGIHDGLA); SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA); SEQ ID NO: 9 (RASEGIHTGLA); и
 SEQ ID NO: 10 (RASEGIHLGLA). В некоторых вариантах осуществления, VL-CDR1
 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8
 (RASEGIHSGLA). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело
 20 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: последовательность вариабельного
 участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащая аминокислотную
 последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%,
 или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной
 последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, и 23; и
 25 последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL),
 содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на
 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной
 аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22,
 24, 25, 26, 27, и 28. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный участок
 30 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность,
 которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или
 которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в
 SEQ ID NO: 15; и вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит
 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на

90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

5 приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной

10 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG антитело. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или

15 его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций для уменьшения одной или нескольких эффекторных функций рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, константный участок тяжелой цепи рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит константный участок тяжелой цепи IgG4,

20 содержащий любую из следующих аминокислотных модификаций или набор модификаций, выбранных из: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K,

25 S228P/L235E, K370Q, K370E, делеции G446, делеции K447, и любой их комбинации IgG4 модификаций в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или

30 его антигенсвязывающий фрагмент повышает количество дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток при контактировании с мононуклеарными клетками периферической крови человека и/или клетками костномозгового происхождения. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для повышения количества дендритных клеток или предшественников гематологических

дендритных клеток составляет меньше, чем приблизительно 200 пикомоль (пМ). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает STAT5 экспрессию в клеточной линии, экспрессирующей FLT3. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей FLT3 составляет меньше, чем EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей FLT3, индуцируемой лигандом FLT3 человека. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист белка стимулятора генов интерферона (STING). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для внутриопухолевого введения. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления,

рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, включающий введение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи, включающий введение эффективного количества рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию, при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий инкубирование клетки, описанной в настоящей заявке, в культуральной

среде в условиях, достаточных для секретирования рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления, способ осуществления лечения злокачественного новообразования дополнительно включает подвергание культуральной среды по меньшей мере одной стадии очистки. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие указанного злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников

гематологических дендритных клеток у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемого наполнителя, носителя или разбавителя для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения особи, у которого диагностирование или предполагается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в

настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его
 антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или
 фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления
 лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций
 5 дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В
 некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение
 рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в
 настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке,
 для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации
 10 популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных
 клеток у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие
 злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления,
 дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток
 включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных
 15 дендритных клеток cDC2, плазмцитойдные дендритные клетки, или любую их
 комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении
 описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего
 фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции,
 описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для захвата
 20 дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в
 микроокружение опухоли у особи, у которой диагностировано или подозревается
 наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления,
 дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток
 включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных
 25 дендритных клеток cDC2, плазмцитойдные дендритные клетки, или любую их
 комбинацию.

[0006] Другой аспект, описанный в настоящей заявке, включает рекомбинантное
 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) специфически
 связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), содержащее: последовательность
 30 переменного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащая
 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на
 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной
 аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21,
 и 23; и последовательность переменного участка легкой цепи иммуноглобулина (VL),

содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 27, и 28. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG антитело. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций для уменьшения одной или нескольких эффекторных функций рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, константный участок тяжелой цепи рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит константный участок тяжелой цепи IgG4, содержащий любую из следующих аминокислотных модификаций или набор модификаций, выбранных из: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, делеции G446, делеции K447, и любой их комбинации

IgG4 модификаций в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает количество дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток при контактировании с моноклеарными клетками периферической крови человека и/или клетками костномозгового происхождения. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для повышения количества дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток составляет меньше, чем приблизительно 200 пикомоль (пМ). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает STAT5 экспрессию в клеточной линии, экспрессирующей FLT3. В некоторых вариантах осуществления, EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей FLT3 составляет меньше, чем EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клеточной линии, экспрессирующей FLT3, индуцируемой лигандом FLT3 человека. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит иммуномодулирующий компонент. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист белка стимулятора генов интерферона (STING). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция приготовлена для внутриопухолевого введения. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В

некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, предназначена для применения для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ распространения, или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, включающий введение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи, включающий введение эффективного количества рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию, при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем

изобретении описана нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описана клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий инкубирование клетки, описанной в настоящей заявке, в культуральной среде в условиях, достаточных для секретирования рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления, способ осуществления лечения злокачественного новообразования дополнительно включает подвергание культуральной среды по меньшей мере одной стадии очистки. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для лечения злокачественного новообразования у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие указанного злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в

настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемого наполнителя, носителя или разбавителя для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В

некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения особи, у которого

5 диагностирование или предполагается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких. В некоторых вариантах осуществления, в

10 настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток. В

15 некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных

20 клеток у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их

25 комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в

30 микроокружение опухоли у особи, у которой диагностировано или подозревается наличие злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их

комбинацию.

Краткое описание фигур

- 5 [0007] Новые характерные особенности, описанные в настоящей заявке, подробно изложены в пунктах приложенной формулы изобретения. Лучшее понимание характерных особенностей и преимуществ характерных особенностей будет получено со ссылкой на последующее подробное описание, в котором представлены иллюстративные примеры, в которых использованы принципы характерных особенностей, раскрытых в настоящей заявке, и приложенные фигуры, в которых:
- 10 [0008] На **фигуре 1** представлена активность FLT3 антител в однократной дозе в анализе репортерного гена люциферазы STAT5. Значения нормировали к FLT3L, тестированному при 500 нг/мл (серый столбик). Топовый клон (6B2, обозначенный *) отправляли на дальнейший скрининг.
- 15 [0009] На **фигуре 2** представлена кривая зависимости доза-эффект для топового клона (6B2), выделенного на **фигуре 1**, в анализе репортерного гена STAT5-Luc по сравнению с FLT3L человека.
- [0010] На **фигуре 3** представлено отличие активности между бивалентным F(ab)^{'2} (слева) и моновалентным Fab (справа) для топового клона (6B2), выделенного на **фигуре 1**, в анализе пролиферации AML5.
- 20 [0011] На **фигуре 4** представлены кривые зависимости доза-эффект связывания для NB1113 относительно НЕК 293Т клеток, экспрессирующих FLT3 человека или яванской макаки.
- [0012] На **фигуре 5** представлена кривые зависимости доза-эффект для NB1113 в анализах репортерного гена FLT3-STAT5-Luc человека (слева) и яванской макаки (справа)
- 25 [0013] На **фигуре 6** представлена частота HLA-DR+CD1c⁺ клеток, размноженных *in vitro* из первичного костного мозга человека через 12 дней лечения с применением FLT3L, NB1113 или отрицательного контроля. EC50 для FLT3L и NB1113 составляли 0,023 нМ и 0,113 нМ, соответственно.
- 30 [0014] На **фигуре 7** представлен фармакокинетический (ПК) анализ NB1113 в сыворотке самок яванской макаки после однократной внутривенной инъекционной дозы.
- [0015] На **фигуре 8** представлены изменения популяций общих дендритных клеток (DC), классических DC2 (cDC2) и плазмоцитарных DC (pDC) у самок макак после

однократной инъекционной дозы NB1113.

[0016] На **фигуре 9** представлено, что наблюдали отсутствие существенных изменений частоты В- и Т-клеток после однократной дозы NB1113.

[0017] На **фигуре 10** представлено, что наблюдали умеренные изменения количества тромбоцитов после однократной дозы NB1113.

Подробное описание

[0018] В последующем описании, представлены определенные специфические подробности для обеспечения понимания различных вариантов осуществления изобретения. Тем не менее, квалифицированный специалист в данной области техники будет понимать, что представленные варианты осуществления могут быть осуществлены без этих деталей. Если в контексте очевидно не указано иначе, то для всего описания и последующих пунктов формулы изобретения, слово “содержат” и его вариации, такие как, “содержит” и “содержащий” следует рассматривать в открытом, включающем значении, то есть как “включая, но не ограничиваясь только ими.” Как используется в описании и пунктах приложенной формулы изобретения, признаки, изложенные в единственном числе, включают ссылки на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Также следует понимать, что термин “или” в целом применяется в его значении, включая “и/или”, если из контекста очевидно не следует иное. Кроме того, заглавия, представленные в настоящей заявке, указаны только для удобства и не прерывают объем или значения заявленных вариантов осуществления изобретения.

[0019] Как используется в настоящей заявке, термин “приблизительно” относится к количеству, которое близко к указанному количеству на 10% или меньше.

[0020] Как используется в настоящей заявке, термин “особь”, “пациент” или “субъект” относится к особям, у которых диагностировано, подозревается наличие или есть риск развития по меньшей мере одного заболевания, для лечения которого пригодны описанные композиции и способ. В определенных вариантах осуществления, особь представляет собой млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, лошадь, корову, овцу, свинью, козу, ламу, альпаку или яка. В определенных вариантах осуществления, особь представляет собой человека.

[0021] Термин “специфическое связывание” или “связывание”, когда используется в настоящей заявке, относится к связыванию, опосредуемому одним или несколькими аминокислотными остатками CDR указанного антитела или фрагмента, или одним или

несколькими аминокислотными остатками вариабельного участка указанного антитела или фрагмента. Как используется в настоящей заявке, термин “контакт” или “контакты” по отношению к антителу, связывающемуся или которое связано со специфической мишенью, относится к аминокислотному остатку вариабельного участка или CDR, находящемуся в пределах 5, 4, 3 или меньше ангстрем от указанного контактируемого остатка. Контакт включает водородную связь, взаимодействия Ван-дер-Ваальса и образование солевого мостика между аминокислотным остатком вариабельного участка или CDR антитела и указанным остатком.

[0022] Из заявленных антител можно отметить моноклональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и полиреактивные антитела), и фрагменты антител. Антитела включают антитело-конъюгаты и молекулы, содержащие антитела, такие как химерные молекулы. Таким образом, антитело включает, но не ограничиваясь только ими, полноразмерные и нативные антитела, а также их фрагменты и части, сохраняющие их специфичности связывания, такие как их любая специфически связывающаяся часть, включая те, которые имеют любое число из классов и/или изотипов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM); и биологически релевантные (антигенсвязывающие) фрагменты или их специфически связывающиеся части, включая, но не ограничиваясь только ими, Fab, F(ab')₂, Fv, и scFv (одноцепочечная или родственная структура). Моноклональное антитело обычно представляет собой антитело в пределах композиции по существу гомогенных антител; следовательно, любые индивидуальные антитела, содержащиеся в композиции на основе моноклональных антител, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональное антитело может включать константный участок IgG1 человека. Моноклональное антитело может включать константный участок IgG4 человека.

[0023] Термин “антитело” в настоящей заявке используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, исключая интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, исключая фрагмент антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')₂ фрагменты, Fab' фрагменты, Fv фрагменты, рекомбинантные IgG (rIgG) фрагменты, одноцепочечные фрагменты антител, исключая одноцепочечные вариабельные фрагменты (sFv или scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотела). Термин

охватывает генетически сконструированные и/или другим образом модифицированные формы иммуноглобулины, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, tandemные di-scFv, tandemные tri-scFv. Если специально не указано иначе, то термин “антитело” должен пониматься как охватывающий их функциональные фрагменты антител. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, выключая антитела любого класса или подкласса, выключая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA, и IgD. Антитело может включать константный участок IgG1 человека. Антитело может включать константный участок IgG4 человека.

[0024] Термины “участок, определяющий комплементарность,” и “CDR,” которые являются синонимами с “гипервариабельный участок” или “HVR,” известны в данной области техники и относятся к не непрерывным последовательностям аминокислот в пределах вариабельных участков антитела, которые придают антигенную специфичность и/или связывающую аффинность. В целом, существуют три CDR в каждом вариабельном участке тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждом вариабельном участке легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). “Каркасные участки” и “FR” известны в данной области техники и относятся к не-CDR областям вариабельных участков тяжелых и легких цепей. В целом, существует четыре FR в каждом полноразмерном вариабельном участке тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3, и FR-H4), и четыре FR в каждом полноразмерном вариабельном участке легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3, и FR-L4). Точные границы аминокислотных последовательностей данного CDR или FR легко могут быть определены с любой из различных хорошо известных схем, выключая те, которые описаны Кэботом и др. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по Кэботу), Al-Lazikani и др., (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации “Чотиа”); MacCallum и др., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” *J. Mol. Biol.* 262, 732-745.” (схема нумерации “Контакт”); Lefranc MP и др., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации “IMGT”); Honegger A и Plückthun 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, (схема нумерации “Aho”); и Whitelegg NR и Rees AR, “WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB,” *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 (схема нумерации “AbM”.

[0025] Границы данных CDR или FR могут изменяться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Кэбота основана на структурных выравниваниях, в то время как схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем Кэбота и Чотиа основана на длинах наиболее распространенных последовательностей участков антител, со вставками, обеспеченными вставочными буквами, например, “30a,” и делециями, проявляющимися в некоторых антителах. Две схемы помещают определенные вставки и делеции (“вставки-делеции”) в различные положения, что приводит к различной нумерации. Схема Контакт основана на анализе комплексных кристаллических структур и во многих аспектах сходна со схемой нумерации Чотиа.

[0026] Термин “вариабельный участок” или “вариабельный домен” относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который задействован в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела в целом имеют сходные структуры, где каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три CDR (См., например, Kindt и др. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., стр. 91(2007)).

Одного V_H или V_L домена может быть достаточно для придания специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены, используя V_H или V_L домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных V_L или V_H доменов, соответственно (См., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson и др., *Nature* 352:624-628 (1991)).

[0027] Из заявленных антител следует упомянуть фрагменты антител. “Фрагмент антитела” относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которых связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваясь только ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димера; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv или sFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В предпочтительных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи и/или вариабельный участок легкой

цепи, такие как scFv.

[0028] Фрагменты антител могут быть получены с помощью различных методик, включая, но не ограничиваясь только ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение с помощью рекомбинантных клеток хозяев. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой продуцируемые рекомбинантно фрагменты, такие как фрагменты, содержащие расположения, которые не встречаются в природе, например, в которых два или больше участков или цепей антитела соединены с помощью синтетических линкеров, например, полипептидных линкеров, и/или те, которые не продуцируются путем ферментативного расщепления встречающегося в природе интактного антитела. В некоторых аспектах, фрагменты антител представляют собой scFvs.

[0029] “Гуманизированное” антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR имеют происхождение из нечеловеческих CDR и все или по существу все аминокислотные остатки FR имеют происхождение из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константного участка антитела, имеющего происхождение из антитела человека. “Гуманизированная форма” нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который подверглся гуманизации, типично для уменьшения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые FR остатки в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого имеют происхождение CDR остатки), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0030] Из заявленных антител следует упомянуть антитела человека. “Антитело человека” представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей такой последовательности антитела, продуцируемой человеком или клеткой человека, или источником, отличающимся от человека, который использует репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитела человека, включая библиотеки антител человека. Термин исключает гуманизированные формы нечеловеческих антител, содержащие нечеловеческие антигенсвязывающие участки, такие как те, в которых все или по существу все CDR являются нечеловеческими.

[0031] Антитела человека могут быть приготовлены путем введения иммуногена

трансенному животному, которое было модифицировано для продуцирования интактных антител человека или интактных антител с переменными участками человека в ответ на заражение антигеном. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, в котором заменены эндогенные локусы иммуноглобулина, или которые присутствуют экстрахромосомно или интегрированы случайным образом в хромосомы животного. В таких трансгенных животных, эндогенные локусы иммуноглобулина были созданы инактивированными. Антитела человека также могут иметь происхождение из библиотек антител человека, исключая фаг-дисплейные библиотеки и бесклеточные библиотеки, включающие последовательности, кодирующие антитело, имеющие происхождение из репертуара человека.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, переменные домены легкой или тяжелой цепи сконструированной молекулы антитела человека могут быть слиты с константными доменами легкой или тяжелой цепи человека, если это является подходящим. Константные домены человека сконструированной молекулы антитела человека, если они присутствуют, могут быть выбраны, исходя из предполагаемой функции антитела, в частности, отсутствия эффекторных функций, что может быть необходимо. Например, константные домены тяжелой цепи, слитые с переменным участком тяжелой цепи, могут представлять собой домены IgA, IgG или IgM человека. Предпочтительно используют домены IgG человека. В зависимости от выбора константных доменов человека, может быть необходимым изменить специфические аминокислотные остатки для удаления любой нежелательной эффекторной функции для получения антитела нейтрального изотипа, например, путем использования сайт-направленного или олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Константные домены легкой цепи человека, которые могут быть слиты с переменным участком легкой цепи, включают лямбда цепи человека или каппа цепи человека.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, альтернативно благоприятно могут использоваться аналоги константных доменов человека. Они включают те константные домены, которые содержат одну или несколько дополнительных аминокислот, которые соответствуют домену человека, или те константные домены, в которых одна или несколько существующих аминокислот соответствующего домена человека были замены, добавлены, делетированы или удалены. Такие домены могут быть получены, например, путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

[0034] Термины “полипептид” и “белок” используются взаимозаменяемо по

отношению к полимеру аминокислотных остатков, и не ограничены минимальной длиной. Полипептиды, включая заявляемые антитела и цепи антитела и другие пептиды, например, линкеры и связывающие пептиды, могут включать аминокислотные остатки, включая природные и/или неприродные аминокислотные

5 остатки. Термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалилирование, ацетилирование, фосфорилирование и другие. В некоторых аспектах, полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или природной последовательности, до тех пор, пока белок сохраняет желательную активность. Эти модификации могут быть предусмотрены,

10 путем использования сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, вследствие мутаций в хозяевах, которые продуцируют белки, или ошибок при ПЦР амплификации.

[0035] Процент (%) идентичности последовательности относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент

15 аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательности и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности

20 последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые известны для специалиста в данной области, например, используя публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для

25 выравнивания последовательностей, включая алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательности. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы

30 ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранения вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration, № TXU510087. Программа ALIGN-2 является публично доступной от

фирмы Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., или ее можно компилировать из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть компилирована для применения в операционной системе UNIX, включая цифровой UNIX V4.0D. Все параметры для сравнения последовательностей являются заданными в программе ALIGN-2 и не должны изменяться.

[0036] В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности A к, относительно, или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью B (которую альтернативно можно обозначать как данная аминокислотная последовательность A, которая имеет или включает определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, относительно, или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью B), рассчитывают следующим образом: $100 \times \text{частное } X/Y$, где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного выравнивания последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей A и B, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в B. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотной последовательности A относительно аминокислотной последовательности B не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности B относительно аминокислотной последовательности A. Если специально не указано иное, то в контексте настоящей заявки все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих абзацев, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, в настоящей заявке охватывают варианты аминокислотных последовательностей антител. Вариант типично отличается от полипептида, специфически раскрытого в настоящей заявке, одной или несколькими заменами, делециями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут быть встречающимися в природе или могут быть созданы синтетически, например, путем модификации одной или нескольких вышеуказанных полипептидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей полипептида, как описано в настоящей заявке, и/или используя любую из различных известных технологий. Например, может являться желательным улучшать связывающую аффинность и/или другие биологические

свойства антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела могут быть приготовлены путем интродукции подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или инсерции в и/или замены

5 остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела. Любая комбинация делеции, инсерции и замены может приводить к получению конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательными характеристиками, *например*, связыванием антигена.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, обеспечиваются варианты антител, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для мутагенеза путем замены, включают CDR и FR. Аминокислотные замены могут быть интродуцированы в антитело, представляющее интерес, и продукты подвергаться скринингу относительно желательной активности, *например*,

10 сохраненного/улучшенного связывания антигена, снижения иммуногенности, или улучшения ADCC или CDC.

[0039] В некоторых вариантах осуществления, замены, инсерции или делеции могут встречаться в пределах одного или нескольких CDR, где замены, инсерции или делеции существенно не уменьшают связывание антитела с антигеном. Например, консервативные замены, которые существенно не уменьшают связывающую

20 аффинность, могут быть осуществлены в CDR. Такие изменения могут быть проведены за пределами “горячих точек” CDR. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей V_H и V_L , каждый CDR остается неизменным.

[0040] Изменения (*например*, замены) могут быть осуществлены в CDR, *например*, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть осуществлены в

25 CDR кодирующих кодонах с высокой частотой мутаций во время соматического созревания (*См.*, *например*, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и полученный вариант может быть тестирован для определения связывающей аффинности. Созревание аффинности (*например*, используя ПЦР пониженной точности, перестановку цепей, рандомизацию CDR, или олигонуклеотид-направленный мутагенез)

30 можно использовать для улучшения аффинности антитела (*См.*, *например*, Hoogenboom и др. в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). CDR остатки, задействованные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, *например*, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование (*См.*, *например*, Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989)). В особенности часто мишенями

являются CDR-H3 и CDR-L3. Альтернативно, или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенями или элиминированы в качестве кандидатов для замены. Варианты могут подвергаться скринингу для определения того, будут ли они содержать желательные свойства.

[0041] Инсерции и делеции аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбоксил-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или больше остатков, а также инсерции и делеции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерциональные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который повышает время полужизни антитела в сыворотке крови. Примеры вариантов инсерций внутри последовательности молекул антитела включают инсерцию 3 аминокислот в легкую цепь. Примеры концевых делеций включают антитело с делецией 7 или меньше аминокислоты на конце легкой цепи.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, антитела изменяют для повышения или снижения их гликозилирования (например, путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создают или удаляют один или несколько сайтов гликозилирования). Может быть изменен углевод, присоединенный к Fc участку антитела. Нативные антитела из клеток млекопитающих типично содержат разветвленный, биантенарный олигосахарид, присоединенный с помощью N-связи к Asn₂₉₇ CH2 домена Fc участка (См., например, Wright и др. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)). Олигосахарид может представлять собой различные углеводы, например, маннозу, N-ацетил глюкозамин (GlcNAc), галактозу, сиаловую кислоту, фукозу, присоединенную к GlcNAc в стволе биантенарной олигосахаридной структуры. Могут быть осуществлены модификации олигосахарида в антителе, например, для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами. Варианты гликозилирования антитела могут обладать улучшенной ADCC и/или CDC функцией. В некоторых вариантах осуществления, обеспечиваются варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (непосредственно или опосредованно) к Fc-участку. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы

определяют путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи на Asn₂₉₇, относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn₂₉₇ (См., например, WO 08/077546). Asn₂₉₇ относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-участке (EU нумерация остатков Fc-участка; См., например, Edelman и др. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May; 63(1):78–85). Тем не менее, Asn₂₉₇ также может быть расположен приблизительно ± 3 аминокислоты против хода транскрипции или по ходу транскрипции от положения 297, то есть, между положениями 294 и 300, вследствие минорных вариаций последовательностей в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную ADCC функцию (См., например, Okazaki и др. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); и Yamane-Ohnuki и др. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)). Можно использовать клеточные линии, например, ноукаутные клеточные линии и способы их применения для получения дефукозилированных антител, например, Lec13 CHO клетки, дефицитные по белку фукозилирования и гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) нокаутные CHO клетки (См., например, Ripka и др. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane-Ohnuki и др. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. и др., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)). Также включены другие варианты гликозилирования антител (См., например, Патент US № 6,602,684).

[0043] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть интродуцированы в Fc-участок антител, раскрытых в настоящей заявке, таким образом создавая вариант Fc-участка. Fc-участок в контексте настоящего изобретения представляет собой C-концевой участок тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит по меньшей мере часть константного участка. Fc-участок включает нативные последовательности Fc-участков и вариантов Fc-участков. Вариант Fc-участка может включать последовательность Fc-участка человека (например, Fc-участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащий аминокислотную модификацию (например, замену) в одной или нескольких аминокислотных положениях.

[0044] Выражение “эффекторные функции”, как используется в настоящей заявке, охватывает функциональные способности, обеспечиваемые Fc-содержащим белком при связывании с FcγR. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, образование Fc/ FcγR комплекса захватывает различные эффекторные клетки в сайты связывания антигена, что типично приводит к различным сигнальным событиям в клетках и важным последующим иммунным ответным реакциям.

[0045] Выражение “антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность” и “ADCC”, как используется в настоящей заявке, относится к опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcR (например, клетки - естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги),
 5 распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

[0046] Выражение “антитело-зависимый клеточный фагоцитоз” и “ADCP”, как используется в настоящей заявке, относится к процессу, с помощью которого покрытые
 10 антителом клетки интернализируются, либо полностью или частично, путем фагоцитных иммунных клеток (например, макрофагов, нейтрофилов и дендритных клеток), которые связываются с Fc-участком иммуноглобулина.

[0047] Выражение “комплемент-зависимая цитотоксичность” или “CDC” относится к способности Fc-участка антитела запускать активацию комплемента, что приводит к
 15 мембраноатакующему комплексу на поверхности клетки-мишени.

[0048] В некоторых вариантах осуществления, антитела согласно настоящему описанию содержат варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает их благоприятным кандидатом для применений, в которых время полужизни антитела *in vivo* является важным, при этом определенные
 20 эффекторные функции (такие как комплемент- и ADCC) не являются необходимыми или вредными. Могут быть созданы анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения уменьшения /истощения CDC и/или ADCC активностей. Например, могут быть созданы анализы связывания Fc рецептора (FcR) для подтверждения того, что в антителе отсутствует FcγR связывание (следовательно, вероятно отсутствует
 25 ADCC активность), но сохраняется FcRn связывающая способность.

Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC активности молекулы, представляющей интерес, описаны в патентах US № 5,500,362 и 5,821,337.

Альтернативно, можно применять методы нерадиоактивных анализов (*например*, АСТИ™ и CytoTox 96® нерадиоактивные анализы цитотоксичности). Пригодные
 30 эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), моноциты, макрофаги, и клетки - естественные киллеры (NK).

[0049] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, могут модулировать эффекторную функцию по сравнению с антителом,

содержащим Fc дикого типа. Эта модуляция может быть результатом выбора Fc-участка (например, IgG4 обладает присущей более низкой эффекторной функцией по сравнению с IgG1). Эта модуляция может быть результатом интродуцирования одного или нескольких вариантов в Fc-участок (либо Fc-участок IgG1 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой модуляцию ADCC и/или ADCP и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность). В некоторых вариантах осуществления модуляция представляет собой понижающую модуляцию или уменьшение эффекта. В некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой ADCC; и в некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой понижающую модуляцию ADCC. В некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой понижающую модуляцию ADCC и CDC. В некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой понижающую модуляцию, представляет собой только ADCC. В некоторых вариантах осуществления, модуляция представляет собой понижающую модуляцию ADCC и CDC и/или ADCP. В некоторых вариантах осуществления, антитела понижающе модулируют или уменьшают ADCC/CDC и ADCP. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение или понижающая модуляция ADCC или CDC или ADCP, индуцируемая антителом, содержащим Fc вариант, представляет собой уменьшение до 0, 2,5, 5, 10, 20, 50 или 75% значения, наблюдаемого для индукции ADCC, или CDC или ADCP, соответственно, с помощью антитела, содержащего Fc-участок дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, модуляция ADCC, индуцируемая антителами, представляет собой снижение эффективности таким образом, что EC50 указанного Fc варианта составляет приблизительно >10-раз меньше по сравнению с антителом, содержащим Fc-участок дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела лишены любой существенной ADCC и/или CDC и/или ADCP в присутствии эффекторных клеток человека по сравнению с антителом, содержащим Fc-участок дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела проявляют уменьшенную, например, уменьшенную по меньшей мере на 20%, или значительно уменьшенную, например, уменьшенную по меньшей мере на 50%, эффекторную функцию, что может представлять собой уменьшение ADCC (понижающая модуляция), CDC и/или ADCP.

[0050] Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть осуществлены для подтверждения уменьшения /истощения CDC и/или ADCC активностей. Например, анализы связывания Fc рецептора (FcR) можно осуществить для подтверждения того, что в антитела отсутствует FcγR связывание (следовательно, вероятно отсутствует

ADCC активность), но сохраняется FcRn связывающая способность.

[0051] Путь активации комплемента инициируется путем связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой, антителом, например, образующим комплекс с когнатным антигеном. Связывающие свойства различных вариантов к C1q можно анализировать с помощью иммунологического анализа ELISA сэндвич-типа. Концентрация антител при половине максимального ответа определяет значения EC₅₀. Этот регистрируемый показатель описан в виде относительной разности к эталонному стандарту, измеряемому на том же самом планшете совместно с коэффициентом вариации образца и эталона.

[0052] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют сниженные аффинности к C1q по сравнению с соответствующим антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела проявляют аффинности к C1q рецептору, которые являются по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз меньше, чем соответствующее антитело дикого типа.

[0053] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют аффинности для C1q, которые меньше на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 5% меньше чем такие для соответствующего антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют аффинности для C1q, которые находятся в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ, или от приблизительно 100 нМ до приблизительно 10 мкМ, или от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 мкМ, или от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ, или от приблизительно 10 нМ до приблизительно 100 мкМ, или от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 100 мкМ, или от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют аффинности для C1q, которые составляют больше, чем 1 мкМ, больше, чем 5 мкМ, больше, чем 10 мкМ, больше, чем 25 мкМ, больше, чем 50 мкМ, или больше, чем

100 мкМ.

[0054] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют сниженные CDC активности по сравнению с соответствующим Fc антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в
 5 настоящей заявке, проявляют CDC активности, которые являются по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз меньше чем такие для соответствующего антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют CDC активности, которые
 10 уменьшены по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере на 30%), или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200%, или по меньшей мере на 300%, или по меньшей мере на 400%, или по меньшей мере на
 15 500% относительно соответствующего антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, не проявляют обнаруживаемых CDC активностей. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение и/или абляция CDC активности может быть обусловлена уменьшенной аффинностью антител, описанных в настоящей заявке, к Fc лигандам и/или рецепторам.

[0055] В данной области техники подразумевается, что биологические терапии могут иметь неблагоприятные токсические проблемы, связанные с комплексной природой управления иммунной системы для распознавания и атаки на нежелательные клетки и/или мишени. Если распознавание и/или нацеливание для атаки не происходит в месте, где требуется лечение, то вследствие этого может развиваться побочная
 25 токсичность. Например, антитело, окрашивающее нецелевые ткани, может быть индикаторным для потенциальных токсичных проблем. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенное окрашивание нецелевых тканей по сравнению с соответствующим антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке,
 30 проявляют уменьшенное окрашивание нецелевых тканей, которые являются по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере

в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз меньше, чем такое действие для соответствующего антитела дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенное окрашивание нецелевых тканей, которые уменьшены по

5 меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200%, или по меньшей мере на 300%, или по меньшей мере на 400%, или по меньшей мере на 500% относительно
10 соответствующего антитела дикого типа.

[0056] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенную связанную с антителом токсичность по сравнению с соответствующим антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют токсичности, которые являются по
15 меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз меньше чем такие для соответствующего антитела дикого типа. В
20 некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют токсичности, которые уменьшены по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%),
25 или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200%, или по меньшей мере на 300%, или по меньшей мере на 400%, или по меньшей мере на 500% относительно соответствующего антитела дикого типа.

[0057] В данной области техники подразумевается, что биологические терапии
30 могут иметь в качестве побочного действия агрегацию тромбоцитов. Можно использовать анализы *in vitro* и *in vivo* для измерения агрегации тромбоцитов. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенную агрегацию тромбоцитов в анализе *in vitro* по сравнению с соответствующим антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления,

антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенную агрегацию тромбоцитов в анализе *in vitro*, которая по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз меньше, чем такая для соответствующего антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшению агрегацию тромбоцитов в анализе *in vitro*, которая уменьшена по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200%, или по меньшей мере на 300%, или по меньшей мере на 400%, или по меньшей мере на 500%) относительно соответствующего антитела дикого типа.

[0058] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенную агрегацию тромбоцитов *in vivo* по сравнению с соответствующим антителом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшению агрегацию тромбоцитов в анализе *in vivo*, которая по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз меньше, чем такие для соответствующего антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшению агрегацию тромбоцитов в анализе *in vivo*, которая уменьшена по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200%, или по меньшей мере на 300%, или по меньшей мере на 400%, или по меньшей мере на 500% относительно соответствующего антитела дикого

типа.

[0059] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, проявляют уменьшенную активацию тромбоцитов и/или агрегацию тромбоцитов по сравнению с соответствующим антителом дикого типа.

5 **[0060]** В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, нацелены на FLT3. В некоторых вариантах осуществления, в антителах, описанных в настоящей заявке, отсутствует Fc-участок (например, (Fab')₂ фрагмент). В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, содержат мутированные остатки в или близко к сайту N-гликозилирования. В
10 некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, имеют аминокислотную модификацию или набор модификаций, выбранный из: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P,
15 L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, делеции G446, делеции K447, и любой их комбинации IgG4 в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, содержат IgG4. В некоторых вариантах осуществления, антитела содержат модифицированный IgG4, где IgG2 (вплоть до T260) соединенный с концом Fc IgG4.

20 **[0061]** Антитела, которые имеют увеличенные периоды полужизни и улучшенное связывание с неонатальным Fc рецептором (FcRn) (См., например, US 2005/0014934). Такие антитела могут содержать Fc-участок с одной или несколькими заменами в этом месте, которые улучшают связывание Fc-участка с FcRn, и включают те с заменами в одном или нескольких остатках Fc-участка: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311,
25 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 в соответствии с системой нумерации EU (См., например, патент US № 7,371,826). Также охватываются другие примеры вариантов Fc-участка (См., например, Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патенты US №№ 5,648,260 и 5,624,821; и WO94/29351).

[0062] В некоторых вариантах осуществления, может являться желательным
30 создавать цистеиновые сконструированные антитела, например, "thioMAb", в которых один или несколько остатков антитела заменены остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления, замена остатков в достижимых сайтах антитела. Реакционноспособные тиольные группы установлены в сайты для конъюгации с другими компонентами, такими как компоненты лекарственных средств или линкерных

компонентов лекарственных средств, для создания иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, любой один или несколько следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-участка тяжелой цепи.

- 5 **[0063]** В некоторых вариантах осуществления, антитело, раскрытое в настоящей заявке, дополнительно может быть модифицировано для содержания дополнительных небелковоподобных компонентов, которые известны и доступны. Компоненты, подходящие для дериватизации антитела, включают, но не ограничиваясь только ими, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых
- 10 полимеров включают, но не ограничиваясь только ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры или случайные сополимеры), и декстран или поли(н винил
- 15 пирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, со-полимеры полипропиленоксида /этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (*например*, глицерин), поливиниловый спирт, и их смеси. Полиэтиленгликоль пропиональдегид могут иметь преимущество для приготовления вследствие перекрывающей стабильности в воде. Полимер может иметь любой молекулярный вес и может быть
- 20 разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может изменяться, и если присоединено два или больше полимеров, то они могут являться одинаковыми или различными молекулами.
- [0064]** Антитела, описанные в настоящей заявке, могут кодироваться нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота представляет собой тип полинуклеотида, содержащий
- 25 два или больше нуклеотидных оснований. В определенных вариантах осуществления, нуклеиновая кислота является компонентом вектора, который может использоваться для переноса полинуклеотида, кодирующего полипептид, в клетку. Как используется в настоящей заявке, термин “вектор” относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип
- 30 вектора представляет собой геномный интегрированный вектор, или “интегрированный вектор”, который может становиться интегрированным в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора представляет собой “эписомный” вектор, например, нуклеиновую кислоту, способную к экстрахромосомной репликации. Векторы, способные направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны,

обозначаются в настоящей заявке как “экспрессионные векторы”. Подходящие векторы включают плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, вирусные векторы и другие. В экспрессионных векторах регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы

5 полиаденилирования для применения для контроля транскрипции могут иметь происхождение из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Дополнительно может быть инкорпорирована способность реплицироваться в хозяине, обычно придаваемая началом репликации, и селектируемый ген, для облегчения распознавания трансформантов. Могут применяться векторы, имеющие происхождение
10 из вирусов, таких как лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и другие. Плазмидные векторы могут быть линейаризованы для интеграции с хромосомное расположение. Векторы могут содержать последовательности, которые направляют сайт-специфическую интеграцию в желательной расположение или ограничивают набор сайтов в геноме (например, AttP-AttB рекомбинация). Дополнительно, векторы могут содержать последовательности,
15 имеющие происхождение из транспозируемых элементов.

[0065] Как используется в настоящей заявке, термины “гомологичный”, “гомология” или “процент гомологии” при использовании в настоящей заявке для описания аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновых кислот,
20 относительно эталонной последовательности, может быть определена, используя формулу, описанную Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, модифицированную, как описано в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Такая формула включена в программы средств поиска основного локального выравнивания (BLAST) от Altschul и др. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Процент
25 гомологии последовательностей может быть определен, используя самую последнюю версию BLAST, для даты подачи настоящей заявки.

[0066] Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, описанные в настоящей заявке, можно использовать для инфицирования, трансфектирования, трансформирования или придания другим способам подходящей клетке трансгенности
30 по отношению к нуклеиновой кислоты, таким образом предоставляя возможность продукции антител для коммерческих или терапевтических применений. Стандартные клеточные линии и способы для получения антител из клеточных культур в промышленном масштабе известны в данной области техники. См., например, Li и др., “Cell culture processes for monoclonal antibody production.” *Mabs*. 2010 Sep-Oct; 2(5):

466–477. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В определенных вариантах осуществления, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, клетка млекопитающего представляет собой клеточную линию, пригодную для получения антител, представляет собой овариальную клетку китайского хомячка (CHO), клетку NS0 мышинной миеломы или клетку PER.C6®. В определенных вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, интегрирована в геномный локус клетки, пригодной для продукции антител. В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ получения антитела, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в условиях *in vitro*, достаточных для осуществления продукции и секреции указанного антитела.

[0067] В определенных вариантах осуществления, описанных в настоящей заявке, раскрыт главный клеточный банк, включающий: (а) клеточную линию млекопитающих, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, описанное в настоящей заявке, интегрированную в геномное расположение; и (б) криопротектор. В определенных вариантах осуществления, криопротектор включает глицерин или ДМСО. В определенных вариантах осуществления, главный клеточный банк включает: (а) клеточную линию CHO, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело с (I) аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, как указано в любой из SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17 или 19; и (II) аминокислотной последовательностью легкой цепи, как указано в любой из SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18 или 20, интегрированную в геномное расположение; и (б) криопротектор. В определенных вариантах осуществления, криопротектор включает глицерин или ДМСО. В определенных вариантах осуществления, главный клеточный банк содержится в подходящем флаконе или контейнере, способным выдерживать замораживание в жидком азоте.

[0068] Также в настоящей заявке описаны способы получения антитела, раскрытого в настоящей заявке. Такие способы включают инкубирование клетки или клеточной линии, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в клеточной культуральной среде в условиях, достаточных для обеспечения экспрессии и секретирования антитела, и дальнейший сбор антитела из клеточной культуральной среды. Сбор может дополнительно включать содержать одну или несколько стадий очистки для удаления живых клеток, клеточного дебриса, неантительных белков или полипептидов, нежелательных солей, буферов и компонентов среды. В определенных

вариантах осуществления, дополнительная (ые) стадия (и) включают центрифугирование, ультрацентрифугирование, очистку с помощью белка А, белка G, белка A/G, или белка L и/или ионообменную хроматографию.

Агонистические антитела к FLT3

5 **[0069]** В настоящей заявке описаны FLT3 агонистические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты воздействуют путем повышения передачи сигналов через FLT3 рецептор. В определенных вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, активируют STAT5 транскрипцию по меньшей мере на 10 приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз, или в 10 раз по сравнению с изотипным контролем. В определенных вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, повышают количество дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток по меньшей мере на приблизительно в 1,25 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, или в 3 раза 15 при культивировании с мононуклеарными клетками периферической крови человека и/или клетками костного мозга. Дендритные клетки могут быть идентифицированы с помощью CD11c положительных клеток, или комбинации CD11c положительности и высоких уровней экспрессии МНС класса II. В определенных вариантах осуществления, ЕС50 повышенного количества дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток при контактировании с мононуклеарными 20 клетками периферической крови человека и/или клетками костномозгового происхождения составляет меньше, чем приблизительно 200 пикомоль (пМ), 150 пМ, 140 пМ, 130 пМ, 126 пМ, 120 пМ, 110 пМ или 100 пМ.

[0070] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей 25 заявке, связываются с FLT3. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, индуцируют фосфорилирование FLT3 при связывании с FLT3. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, перекрестно связывают или димеризуют два FLT3 рецептора, что приводит к фосфорилированию и активации двух FLT3 рецепторов. В некоторых вариантах 30 осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, индуцируют клетки, экспрессирующие FLT3, относительно интернализации и разложения указанного FLT3 при связывании с указанным FLT3.

[0071] В определенном аспекте, FLT3 антагонистическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный участок тяжелой цепи

иммуноглобулина и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина, содержащие гиперпеременные участки химерного NB 1016, гуманизированного 1063, или дезамидированный вариант NB112, NB113, NB114 или NB115. В определенных вариантах осуществления, FLT3 агонистическое антитело содержит переменный

5 участок тяжелой цепи иммуноглобулина и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина, где переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: (а) гиперпеременный участок 1 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); (б) гиперпеременный участок 2

10 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); и (в) гиперпеременный участок 3 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPGYYFDH); и переменный участок легкой цепи

15 иммуноглобулина содержит: (г) гиперпеременный участок 1 переменного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6 (RASEGIHNGLA); (д) гиперпеременный участок 2 переменного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11 (NANSLHS); и (е) гиперпеременный участок 3

20 переменного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). Существует потенциальный “NG” сайт дезаминирования в VL-CDR1 из NB 1016 и NB1063. Это может приводить к гетерогенному продукту в нижерасположенном процессинге. Следовательно, в настоящей заявке описаны антитела, которые содержат

25 вариант VL-CDR1, который не имеет аспарагина в положении 8 SEQ ID NO: 6 и все еще сохраняет FLT3 связывающую активность. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является

30 гуманизированным.

[0072] Аспарагин в гиперпеременном участке 1 переменного участка легкой цепи химерного NB 1016 и гуманизированного NB 1063 клонов представляет собой потенциальный сайт дезамидирования. Дезамидирование может быть разрушительным для антител, которые применяются в качестве лекарственных средств, поскольку

дезамидирование повышает гетерогенность антител и снижает стабильность антител. Таким образом, в настоящей заявке охватываются мутанты NB1016 и NB1063 CDR участков, в которых аспарагин заменен на другую аминокислоту. В определенных вариантах осуществления, замена на другую аминокислоту приводит к отсутствию или

5 только незначительной потере аффинности или функциональной активности, как определяются путем связывания мишени или индукции STAT5 экспрессии по сравнению с NB1016 или NB1063. В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), содержащее вариабельный участок

10 тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина, где вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: (а) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA) или 29 (GFTFSNYGMA); (б) гипервариабельный участок 2

15 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); (в) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); и вариабельный участок легкой цепи

20 иммуноглобулина содержит: (г) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащая аминокислотную последовательность, как указано в (RASEGIHXGLA); (д) гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11 (NANSLHS); и (е) гипервариабельный участок 3 вариабельного

25 участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). В определенных вариантах осуществления, X из RASEGIHXGLA представляет собой любую аминокислоту, которая приводит к отсутствию уменьшения связывания мишени или индукции STAT5 экспрессии по сравнению с NB1016 или NB1063. В определенных вариантах

30 осуществления, X из RASEGIHXGLA представляет собой любую аминокислоту, которая приводит к меньше, чем приблизительно 25%, 20%, 15%, 10% или 5% уменьшению связывания мишени или индукции STAT5 экспрессии по сравнению с NB1016 или NB1063. В определенных вариантах осуществления, X из RASEGIHXGLA представляет собой аминокислоту, выбранную из аспарагиновой кислоты, серина,

треонина или лейцина. В определенных вариантах осуществления, VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из перечня, включающего SEQ ID NO: 7 (RASEGIHDGLA), SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA), SEQ ID NO: 9 (RASEGIHTGLA), и SEQ ID NO: 10 (RASEGIHLGLA). В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является гуманизированным.

[0073] В определенных вариантах осуществления, FLT3 агонистическое антитело содержит переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина, где переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: (а) гиперпеременный участок 1 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA) или 29 (GFTFSNYGMA); (б) гиперпеременный участок 2 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); и (в) гиперпеременный участок 3 переменного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина содержит: (г) гиперпеременный участок 1 переменного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7 (RASEGIHDGLA); (д) гиперпеременный участок 2 переменного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11 (NANSLHS); и (е) гиперпеременный участок 3 переменного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является гуманизированным.

[0074] В определенных вариантах осуществления, FLT3 агонистическое антитело содержит переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина, где переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: (а) гиперпеременный участок 1 переменного участка

тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); (б) гипервариабельный участок 2 варибельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); и (в) гипервариабельный участок 3 варибельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); и вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина содержит: (г) гипервариабельный участок 1 варибельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA); (д) гипервариабельный участок 2 варибельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11 (NANSLHS); и (е) гипервариабельный участок 3 варибельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является гуманизированным.

[0075] В определенных вариантах осуществления, FLT3 агонистическое антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина, где вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: (а) гипервариабельный участок 1 варибельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); (б) гипервариабельный участок 2 варибельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); и (в) гипервариабельный участок 3 варибельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); и вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина содержит: (г) гипервариабельный участок 1 варибельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 (RASEGIHTGLA); (д) гипервариабельный участок 2 варибельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11

(NANSLHS); и (е) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). В определенных вариантах осуществления,

рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является гуманизированным.

[0076] В определенных вариантах осуществления, FLT3 агонистическое антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина, где вариабельный участок тяжелой цепи

иммуноглобулина содержит: (а) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA); (б)

гипервариабельный участок 2 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3

(HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG); и (в) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH); и вариабельный

участок легкой цепи иммуноглобулина содержит: (г) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10 (RASEGIHLGLA); (д)

гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11

(NANSLHS); и (е) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NO: 12 (QQYYDYPLT). В определенных вариантах осуществления,

рекомбинантное антитело дополнительно содержит константный участок легкой цепи человека и константный участок легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело является гуманизированным.

[0077] Также в настоящей заявке описаны вариабельные участки тяжелых цепей

иммуноглобулина и вариабельные участки легких цепей иммуноглобулина из антител с агонистической активностью по отношению к FLT3.

[0078] В определенных вариантах осуществления, в настоящей заявке описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает FMS подобную

тирозинкиназу 3 (FLT3), содержащее: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15; 17; 19; 21; или 23; и (б) последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16; 18; 20; 22; 24; 25; 26; 27; и 28. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело содержит: (а) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и (б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16. Аспарагин в гипервариабельном участке 1 вариабельного участка легкой цепи VL участка любой из SEQ ID NO: 16; 18; 20; 22; или 24 представляет собой потенциальный сайт дезамидирования. Таким образом, в настоящей заявке охватываются мутанты участков VL- CDR, в которых аспарагин заменен на другую аминокислоту. В определенных вариантах осуществления, замена на другую аминокислоту не приводит к потере или приводит только к незначительной потере аффинности или функциональной активности, как определено путем связывания мишени или индукции STAT5 экспрессии по сравнению с NB1016 или NB1063. В определенных вариантах осуществления, замена на другую аминокислоту приводит к меньше чем приблизительно на 25%, 20%, 15%, 10%, или 5% уменьшению связывания мишени или индукции STAT5 экспрессии по сравнению с NB1016 или NB1063. В определенных вариантах осуществления, VL описанного антитела содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 25; 26; 27; и 28, сохраняя при этом мутацию для уменьшения реакций дезамидирования в VL-CDR1 .

[0079] В определенных вариантах осуществления, в настоящей заявке описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает FMS подобную

тирозинкиназу 3 (FLT3), содержащее: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15 и (б) последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25, 26, 27 или 28. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело содержит: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15 и (б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело содержит: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело содержит: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15 и (б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления,

рекомбинантное антитело содержит: (а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15 и (б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 28.

[0080] В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, приводят к захвату и/или распространению дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, захватывают и/или распространяют дендритные клетки при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, захватывают и/или распространяют дендритные клетки, Дендритные клетки могут быть идентифицированы путем положительности для маркера клеточной поверхности CD11c. В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, захватывают и/или распространяют обычные дендритные клетки поднаборы (cDC)– cDC1 и cDC2 при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, захватывают и/или распространяют плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) при введении особи. В некоторых вариантах осуществления, FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, захватывают дендритные клетки, обычные дендритные клетки поднаборы cDC1, cDC2 плазмоцитоидные дендритные клетки, или любую их комбинацию, при введении особи. cDC1 дендритные клетки могут быть идентифицированы с помощью характерной картины экспрессии на клеточной поверхности, включающей $\text{Lin}^- \text{HLA}^- \text{DR}^+ \text{CD11c}^+ \text{BDCA}^- 3^+$. PDC дендритные клетки могут быть идентифицированы с помощью характерной картины экспрессии на клеточной поверхности, включающей $\text{Lin}^- \text{HLA}^- \text{DR}^+ \text{CD123}^+ \text{BDCA}^- 2^+$.

[0081] FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть дополнительно конъюгированы к иммуномодулирующему компоненту.

Иммуномодулирующий компонент может содержать любой компонент, распространяющий и/или активирующий дендритные клетки или предшественники

гематологических дендритных клеток. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующий компонент содержит STING агонист. Стимулятор генов интерферонов (STING), также известный как трансмембранный белок 173 (TMEM173), представляет собой эффективный активатор путей передачи иммунных сигналов активизирующих транскрипционных факторов, таких как STAT6 и IRF3, что приводит к транскрипции и секреции интерферонов I типа. В определенных вариантах осуществления, STING агонист включает 2',3'-cGAMP (CAS №, 1441190-66-4), 4-[(2-Хлор-6-фторфенил)метил]-N-(фуран-2-илметил)-3-оксо-1,4-бензотиазин-6-карбоксамид, МК-1454, ADU-S100/MIW815, SRCB-0074, SYNB1891, E-7766 или SB11285. STING агонисты могут быть ковалентно связаны с рекомбинантным антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению, используя подходящие методики, известные из уровня техники. STING агонисты могут быть ковалентно связаны с рекомбинантным антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению при подходящем соотношении лекарственного средства к антителу, например, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 или 7:1.

Лечение злокачественного новообразования

[0082] Было показано, что FLT3L приводит к повышению количества дендритных клеток *in vivo* и индуцирует регрессию опухоли и противоопухолевые иммунные ответные реакции *in vivo* на сингенных моделях фибросаркомы, индуцированной метилхолантреном (МСА) у мышей. (См. Lynch, D. H., и др. "Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo." *Nature Medicine*, 3(6), 625–631. (1997)). Тем не менее, недостатками FLT3L терапии является ограниченная фармакокинетическая доступность и комплексные дозирующие требования. Исследования продемонстрировали, что необходимо по меньшей мере 10 ежедневных инъекций FLT3L для существенного снижения скорости роста опухоли и индукции регрессии опухоли, но оптимальным является 14 - 19 дней лечения.

[0083] Было показано, что ежедневное FLT3L лечение вплоть до 7 дней после опухолевого заражения приводит к отторжению на моделях индуцированной МСА фибросаркомы у мышей. (См. Lynch, D. H., и др. 1997).

[0084] В определенных вариантах осуществления, в настоящей заявке описаны антитела, пригодные для лечения злокачественного новообразования или опухоли. Лечение относится к способу, который нацелен на улучшение или облегчение состояния, подвергаемого лечению. По отношению к злокачественному новообразованию, лечение включает, но не ограничиваясь только ими, уменьшение

объема опухоли, уменьшение роста объема опухоли, увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания, или общей продолжительности жизни. В определенных вариантах осуществления, лечение будет вызывать ремиссию злокачественного новообразования, подвергаемого лечению. В определенных вариантах осуществления, лечение охватывает применение в качестве профилактической или поддерживающей дозы, предназначенной для предотвращения повторного развития или прогрессирования ранее леченного злокачественного новообразования или опухоли. Для специалиста в данной области техники будет понятным, что не все индивидуумы отвечают одинаково, или хоть в какой-нибудь степени, на вводимое лечение, хотя все равно эти индивидуумы рассматриваются как подвергаемые лечению.

[0085] В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль представляет собой солидное злокачественное новообразование или опухоль. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль представляет собой злокачественное новообразование или опухоль крови. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль включает опухоли молочной железы, сердца, легких, тонкого кишечника, толстого кишечника, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы, шеи, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек и печени. В определенных вариантах осуществления, опухоли, которые могут подвергаться лечению с применением антител согласно изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланома, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В определенных вариантах осуществления, опухоль/злокачественное новообразование выбирают из группы, включающей акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, аденокарциному, аденокистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, астроцитарные опухоли, карциному бартолиновой железы, базально-клеточную карциному, карциному бронхиальной железы, капиллярный карциноид, карциному, карциносаркому, холангиокарциному, хондросаркому, цистаденому, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, эндометриальную стромальную саркому, эндометриоидную аденокарциному, эпендимальную саркому, саркому Свинга, фокальную нодулярную

гиперплазию, гастроному, опухоли зародышевых линий, глиобластоми, глюкагоному, гемангиобластоми, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденоми печени, аденоматоз печени, гепатоклеточную карциному, инсулит, интраэпителиальное новообразование, интраэпителиальное плоскоклеточное новообразование, инвазивную плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному, липосаркому, карциному легких, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лейомиосаркому, меланому, злокачественную меланому, злокачественную мезотелиальную опухоль, опухоль оболочки нерва, медуллобластоми, медуллоэпителиому, мезотелиому, мукоэпидермоидную карциному, миелоидный лейкоз, нейробластоми, нейроэпителиальную аденокарциному, нодулярную меланому, остеосаркому, карциному яичников, папиллярную серозную аденокарциному, опухоли гипофиза, плазмацитому, псевдосаркому, карциному предстательной железы, легочную бластоми, почечно-клеточную карциному, ретинобластоми, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, карциному мягких тканей, опухоль, секретирующую соматостатин, сквамозную карциному, плоскоклеточную карциному, недифференцированную карциному, увеальную меланому, бородавчатую карциному, карциному влагалища/наружных женских половых органов, ВИПому и опухоль Вильма. В определенных вариантах осуществления, опухоль/злокачественное новообразование, подвергается лечению с применением одного или нескольких антител согласно изобретению, включает рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-В-клеточную острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому степени II, III или IV, глиобластоми, мультиформную глиобластоми, мелкоклеточный рак, и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы, и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак груди, и/или карциному молочной железы. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергается лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает глиобластоми. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергается лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В определенных вариантах

осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак яичников. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак легких. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак ободочной кишки. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак ободочной кишки, рак предстательной железы или рак легких. В определенном варианте осуществления, злокачественное новообразование трудно поддается лечению с применением другой терапии. В определенном варианте осуществления, леченное злокачественное новообразование является рецидивирующим. В определенном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой рецидивирующую / трудно поддающуюся лечению глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак ободочной кишки, рак предстательной железы или рак легких.

Терапевтические способы

[0086] В определенных вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, могут вводиться нуждающемуся субъекту, любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутриопухолевым или внутримозговым и т.д. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят в подходящей схеме дозирования, например, раз в неделю, два раза в неделю, ежемесячно, два раза в месяц, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в месяц и т.д. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят один раз в три недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления, терапевтически приемлемое количество находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически приемлемое количество находится в диапазоне от приблизительно 1

мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически приемлемое количество находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

[0087] FLT3 агонистические антитела, описанные в настоящей заявке, обладают

- 5 более благоприятными PK/PD характеристиками по сравнению с растворимым лигандом, предоставляя возможность для схемы дозирования, которая не требует ежедневного введения. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять от приблизительно 2 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых
- 10 вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 5 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 6 дней, от приблизительно 2 дней до
- 15 приблизительно 7 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 10 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 2 дней до
- 20 приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 5 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 6 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 7 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 3 дней до
- 25 приблизительно 9 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 10 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 5 дней, от приблизительно 4 дней до
- 30 приблизительно 6 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 7 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 10 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 4 дней до
- приблизительно 12 дней, от приблизительно 4 дней до приблизительно 14 дней, от приблизительно 5 дней до приблизительно 6 дней, от приблизительно 5 дней до приблизительно 7 дней, от приблизительно 5 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 5 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 5 дней до

приблизительно 10 дней, от приблизительно 5 дней до приблизительно 11 дней, от
 приблизительно 5 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 5 дней до
 приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 7 дней, от
 приблизительно 6 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 6 дней до
 5 приблизительно 9 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 10 дней, от
 приблизительно 6 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 6 дней до
 приблизительно 12 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 14 дней, от
 приблизительно 7 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 7 дней до
 приблизительно 9 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 10 дней, от
 10 приблизительно 7 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 7 дней до
 приблизительно 12 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 14 дней, от
 приблизительно 8 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 8 дней до
 приблизительно 10 дней, от приблизительно 8 дней до приблизительно 11 дней, от
 приблизительно 8 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 8 дней до
 15 приблизительно 14 дней, от приблизительно 9 дней до приблизительно 10 дней, от
 приблизительно 9 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 9 дней до
 приблизительно 12 дней, от приблизительно 9 дней до приблизительно 14 дней, от
 приблизительно 10 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 10 дней до
 приблизительно 12 дней, от приблизительно 10 дней до приблизительно 14 дней, от
 20 приблизительно 11 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 11 дней до
 приблизительно 14 дней, или от приблизительно 12 дней до приблизительно 14 дней. В
 некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для
 индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять
 приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5
 25 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней,
 приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней,
 приблизительно 12 дней, или приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах
 осуществления, интервал дозирования между дозами индивидууму с применением
 антител, описанных в настоящей заявке, может составлять по меньшей мере
 30 приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5
 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней,
 приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, или
 приблизительно 12 дней. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования
 между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке,

может составлять максимально приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, или приблизительно 14 дней. В

5 некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять от приблизительно 1 недели до приблизительно 5 недель. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять от приблизительно 1 недели

10 до приблизительно 2 недель, от приблизительно 1 недели до приблизительно 3 недель, от приблизительно 1 недели до приблизительно 4 недель, от приблизительно 1 недели до приблизительно 5 недель, от приблизительно 2 недель до приблизительно 3 недель, от приблизительно 2 недель до приблизительно 4 недель, от приблизительно 2 недель до приблизительно 5 недель, от приблизительно 3 недель до приблизительно 4 недель,

15 от приблизительно 3 недель до приблизительно 5 недель, или от приблизительно 4 недель до приблизительно 5 недель. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, или приблизительно 5

20 недель. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением антител, описанных в настоящей заявке, может составлять по меньшей мере приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, или приблизительно 4 недели. В некоторых вариантах осуществления, интервал дозирования между дозами для индивидуума с применением

25 антител, описанных в настоящей заявке, может составлять максимально приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, или приблизительно 5 недель.

[0088] В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, можно вводить индивидууму с риском развития злокачественного

30 новообразования, или индивидууму, который ранее подвергался успешному лечению злокачественного новообразования, исключая злокачественное новообразование, которое лечилось до клинической ремиссии, или злокачественное новообразование, которое имело минимальное остаточное заболевание.

Фармацевтически приемлемые наполнители, носители и разбавители

[0089] В определенных вариантах осуществления, агонистические FLT3 антитела согласно настоящему изобретению включены в фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей или разбавителей. В определенных вариантах осуществления, антитела согласно настоящему изобретению суспендированы в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления, раствор содержит приблизительно 0,9% NaCl или приблизительно 5% декстрозу, глюкозу или сахарозу. В определенных вариантах осуществления, раствор дополнительно содержит один или несколько следующих компонентов: буферы, например, ацетат, цитрат, гистидин, сукцинат, фосфат, бикарбонат и гидроксиметиламинометан (Tris); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 20 (Tween 20), и полоксамер 188; полиол/дисахарид/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин; или хелатообразующие вещества, например, EDTA или EGTA. В определенных вариантах осуществления, антитела согласно настоящему изобретению транспортируются /хранятся лиофилизированными и восстанавливаются перед введением. В определенных вариантах осуществления, лиофилизированные препараты антител содержат объемобразующий агент, такой как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза и декстран 40. Лиофилизированный препарат может содержаться во флаконе, состоящем из стекла. Антитела при приготовлении в виде препарата, независимо от того, восстанавливаются они или нет, могут быть забуферены при определенном значении pH, обычно меньше, чем 7,0. В определенных вариантах осуществления, значение pH может находиться в диапазоне 4,5 и 6,5, 4,5 и 6,0, 4,5 и 5,5, 4,5 и 5,0, или 5,0 и 6,0.

[0090] Также в настоящей заявке описаны наборы, содержащие одно или несколько антител, описанных в настоящей заявке, в подходящем контейнере и один или несколько дополнительных компонентов, выбранных из: инструкций для применения; разбавителя, наполнителя, носителя и устройства для введения.

[0091] В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ приготовления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание одного или нескольких фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей или разбавителей и антитела согласно настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ приготовления лечения злокачественного новообразования для хранения или

транспортировки, включающий лиофилизирование одного или нескольких антител согласно настоящему изобретению.

ПРИМЕРЫ

[0092] Последующие иллюстративные примеры характеризуют варианты осуществления композиций и способов, описанных в настоящей заявке, и никоим образом не должны пониматься как ограничивающие.

Пример 1 – Создание и скрининг FLT3 антагонистического антитела

[0093] Для создания антител для характеристики, осуществляли иммунизацию крыс. Для максимального разнообразия репертуара, для иммунизации использовали различные антигены и штаммы крыс. Таким образом, крыс Wistar и Sprague Dawley иммунизировали либо с применением рекомбинантного FLT3 белка (ECD), ДНК, кодирующей полноразмерный FLT3 или ДНК, кодирующей полноразмерный FLT3 с аминокислотными инсерциями во внутриклеточном домене, которые приводят к его природной димеризации. Крыс, которые имели положительные титры, отбирали для сбора и слияния гибридом. Панели супернатантов гибридом подвергали скринингу относительно связывания с FLT3, и отобранные клоны переносили непосредственно в первичный функциональный скрининг в анализ на основе репортера STAT5-люциферазы.

[0094] Стабильно экспрессируемые FLT3-STAT5-Люцифераза клетки человека высевали в количестве 40 тыс. клеток/лунку в черные полистирольные микропланшеты на 96 лунок с прозрачным дном в DMEM, дополненной 10% FBS. На следующий день, клетки обедыняли по сыворотке в течение 24 часов в DMEM, дополненной 0,1% FBS. После этого клетки обрабатывали либо с применением FLT3L или антител в течение 18 часов при 37°C, и реагент ONE-Glo Люцифераза использовали для количественного определения сигнала люциферазы. При скрининге однократной дозы, представленном на **Фиг. 1**, идентифицировали три клона с наивысшей активностью по отношению к FLT3L, один из которых представлял собой 6B2 (**Фиг. 1**, звездочка). Эти три клона использовали для дополнительного скрининга. Вследствие плохой экспрессии и недостаточных количеств для последующего скрининга, V области из 6B2 секвенировали и создавали в виде химерных молекул крыса / человека (6B2-chim). Затем эти три клона использовали в полных кривых зависимости доза-эффект в аналогичном анализе STAT5-Luc для определения относительных эффективностей. В результате проведения этого скрининга, был выделен клон 6B2 как имеющий наибольшую активность, что показано на **Фиг.**

Пример 2– Создание химерного 6B2 антитела NB1016 и его гуманизированных вариантов

Тяжелые и легкие цепи клона 6B2 в дальнейшем прививали на IgG4PAA человека и
 5 каркас каппа легкой цепи человека для создания второй химерной молекулы NB1016. 'PAA' является сокращением, используемым для обозначения (I) S228P мутации, которая стабилизирует шарнирную область для предотвращения обмена плеча Fab (См. Silva *и др.* "The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological
 10 matrix preparation" *J Biol Chem.* 290(9):5462-9 (2015)) и (II) F234A/L235A мутации, которая приводит к ослабленному связыванию с FcγR и C1q и эффективной ликвидации ADCC и CDC функций (См. Glaesner *и др.* "Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein" *Diabetes Metab Res Rev*; 26: 287–296 (2010)). Также создавали гуманизированные
 15 NB1016 варианты путем прививания CDR, крысиные mAb 6B2 V участки отрабатывали относительно IMGT базы данных и наиболее близкие VH и VL каркасные участки зародышевых линий отбирали в качестве матриц для CDR прививания. CDR идентифицировали на основании схемы нумерации KABAT. В целом, создавали 5 x VH и 5 x VL гуманизированных V участков, создавая 25 гуманизированных вариантов для
 20 скрининга на основе каждой комбинации гуманизированных VH и VL. 25 гуманизированных вариантов подвергали скринингу в анализе STAT5-Luc однократной низкой дозы совместно с NB1016 для определения относительных активностей, как показано в **Таблице 1**.

Таблица 1. Измерения активностей гуманизированных вариантов относительно NB1016 (химерное) при однократной дозе в STAT5-Luc анализе. Все антитела тестировали при концентрации [1 нМ]. Варианты, выделенные жирным шрифтом и курсивом, отбирали для дальнейшего скрининга. н.д., анализ не осуществляли

AML5 при [1 нМ]	Гуманизи- рованный VL1 (SEQ ID NO: 16)	Гуманизи- рованный VL2 (SEQ ID NO: 18)	Гуманизи- рованный VL3 (SEQ ID NO: 20)	Гуманизи- рованный VL4 (SEQ ID NO: 22)	Гуманизи- рованный VL5 (SEQ ID NO: 24)
Гуманизи- рованный VH1 (SEQ ID NO: 15)	117%	72%	94%	91%	99%
Гуманизи- рованный VH2 (SEQ ID NO: 17)	103%	73%	94%	77%	91%

Гуманизи- рованный VH3 (SEQ ID NO: 19)	115%	81%	136%	н.д.	120%
Гуманизи- рованный VH4 (SEQ ID NO: 21)	125%	90%	110%	110%	107%
Гуманизи- рованный VH5 (SEQ ID NO: 23)	83%	53%	31%	77%	75%

[0095] В результате проведенного скрининга, как показано в **Таблице 1**, было отобрано 12 гуманизированных вариантов для тестирования в зависимости доза-эффекта во вторичном функциональном скрининге, анализируя пролиферацию AML5 клеток. AML5 клетки культивировали в альфа -MEM с 20% FBS и 200 нг/мл FLT3L по меньшей мере в течение 1 недели перед осуществлением экспериментов. За сутки до начала анализа, клетки обеслаивали по сыворотке, используя альфа-MEM, дополненную 0,1% FBS без FLT3L. Затем добавляли антитела или FLT3L, и планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37°C, и оценивали пролиферацию, используя CellTiter-Glo реагент (Promega). Представленные в **Таблице 2** 12 вариантов все были высоко эффективными, проявляя сопоставимую активность друг с другом, а также с химерной молекулой NB1016. Таким образом, NB1063, которое представляет собой гуманизированный VH1 x гуманизированный VL1 (SEQ ID NO: 11 и 12), выбирали для дальнейшего анализа на основе выбора использования каркаса и предварительных аналитических характеристик (SEC/HIC; данные не показаны).

Таблица 2. EC50 (нМ) гуманизированных вариантов в анализе пролиферации AML5. EC50 для NB1016 в этом анализе составляло 0,104 нМ.					
AML5 EC50 (нМ)	Гуманизи- рованный VL1 (SEQ ID NO: 16)	Гуманизи- рованный VL2 (SEQ ID NO: 18)	Гуманизи- рованный VL3 (SEQ ID NO: 20)	Гуманизиро- ванный VL4 (SEQ ID NO: 22)	Гуманизи- рованный VL5 (SEQ ID NO: 24)
Гуманизи- рованный VH1 (SEQ ID NO: 15)	0,106	н.д.	0,105	н.д.	0,097
Гуманизи- рованный VH2 (SEQ ID NO: 17)	0,080	н.д.	0,091	н.д.	н.д.
Гуманизи- рованный VH3 (SEQ	0,076	н.д.	0,051	н.д.	0,070

ID NO: 19) Гуманизо ванный VH4 (SEQ ID NO: 21) Гуманизо ванный VH5 (SEQ ID NO: 23)	0,082	н.д.	0,091	0,095	0,098
	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

Пример 3 – Для 6B2 агонизма требуется димеризация рецептора и он является FcR независимым

[0096] Для понимания механизма, с помощью которого топовый клон 6B2

- 5 агонизирует FLT3, были созданы моновалентное 6B2 Fab и бивалентное 6B2 F(ab)'₂ и соответствующую функциональную активность антител измеряли в анализе пролиферации клеток, используя OCI-AML5 клетки, которые, как известно, экспрессируют Fcγ рецепторы, и являются FLT3L независимыми. OCI-AML5 клетки кондиционировали в αMEM + 20% инактивированная нагреванием FBS, и 200 нг/мл
- 10 рекомбинантного FLT3L в течение 2 недель, перед обеднением по сыворотке в αMEM + 0,1% инактивированная нагреванием FBS (без FLT3L) в течение 24 часов. После этого клетки обрабатывали с 6B2, 6B2 Fab, 6B2 F(ab)'₂ или изотипным контролем в течение 3 дней при 37°C, и CellTiter-Glo (Promega) использовали для определения жизнеспособности клеток. Как показано в **Фиг. 3** (слева), бивалентное 6B2 F(ab)'₂
- 15 сохраняет агонистическую функцию, эквивалентную 6B2, указывая на то, что FLT3 агонизм является независимым от задействования FcR. Тем не менее, моновалентный 6B2 Fab не проявляет функциональную активность в этом анализе (**Фиг. 3** справа), указывая на то, что для FLT3 агонизма необходима димеризация FLT3.

20 **Пример 4 – Идентификация подверженности и создание NB1063 варианта**

[0097] CDR1 легкой цепи NB1063 содержит 'NG' аминокислотный мотив. Это мотив представляет собой сайт для дезамидирования, который может способствовать гетерогенности лекарственного продукта при последующем изготовлении.

- Следовательно, создавали серии вариантов легкой цепи для удаления этой
- 25 подверженности и идентифицировали варианты с соизмеримой активностью с NB1063. В целом, создавали 4 варианта (N31D, N31S, N31T, и N31L) и тестировали параллельно к NB1063 в анализе пролиферации AML5 в зависимости доза-эффект, результаты которого представлены в **Таблице 3**. В результате проведения этого скрининга, было

идентифицировано NB1113 как лидерный вариант гуманизированной легкой цепи вариант (N31S) с удаленным сайтом дезамидирования для финального тестирования в анализе на основе эмбриональных клеток.

Таблица 3. EC50 (нМ) для NB1063 и его CDRL1 вариантов с удаленным сайтом дезамидирования в анализе пролиферации AML5

EC50 (нМ)	NB1063 SEQ ID NO: 16	NB1112 SEQ ID NO: 25 (N31D)	NB1113 SEQ ID NO: 26 (N31S)	NB1114 SEQ ID NO: 27 (N31T)	NB1115 SEQ ID NO: 28 (N31L)
AML5 Анализ	0,118	0,270	0,126	0,201	0,135

5

Пример 5– Связывание и функциональная активность NB1113 по отношению к FLT3 человека и яванской макаки

[0098] Поскольку NB1113 связывается с FLT3 человека, но не с мышинным FLT3, то оценивали связывание и функциональную активность NB1113 в обеих системах, экспрессирующих FLT3 человека и яванской макаки (суно). Стабильно экспрессирующие человеческие и суно FLT3-STAT5-Люцифераза клетки использовали для обоих анализов, связывания и функциональной активности. Связывание NB1113 с человеческим или суно FLT3 оценивали с помощью проточной цитометрии, используя различные концентрации NB1113 в PBS + 2% FBS, с последующим обнаружением, используя AF488 античеловеческое IgG (H+L) вторичное антитело. Как показано на **Фиг. 4**, NB1113 связывается сходным образом с обеими FLT3, как человека, так и яванской макаки, с EC50 1,36 нМ (человека) и 0,90 нМ (суно). Эти результаты демонстрируют перекрестную реактивность NB1113 к человеческому и обезьяньему FLT3, при этом также демонстрируют эффективность NB1113.

[0099] Для оценки функциональной активности NB1113, человеческие и суно FLT3-STAT5-Люцифераза клетки высевали при плотности 40 тыс. клеток/ лунку в черный полистирольный микропланшет на 96 лунки с прозрачным дном в DMEM, дополненной 10% FBS. На следующий день, клетки обедыли по сыворотке в течение 24 часов в DMEM, дополненной 0,1% FBS. После этого клетки обрабатывали с NB1113 в течение 18 часов при 37°C, и ONE-Glo Люцифераза реагент (Promega) использовали для количественного определения сигнала люциферазы. Как показано на **Фиг. 5**, NB1113 проявляет сходную активность в обоих анализах человеческих и суно FLT3-STAT5-Люциферазы, с EC50 1,1 нМ (человека) и 1,6 нМ (суно).

Пример 6– Исследование распространения дендритных клеток (DC)

[00100] Поскольку FLT3 агонизм приводит к распространению дендритных клеток, то NB1113 тестировали на релевантной физиологической модели. Костный мозг человека получали из коммерческих источников и лишали эритроцитов путем суспендирования в АСК лизирующем буфере. Полученные RBC-лизированные клетки костного мозга ресуспендировали в RPMI 1640 среде с 10% FBS, 200 нМ L-глутамин, и 50 мМ β -меркаптоэтанол и высевали в культуральные планшеты на 96 лунок в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку. Культуры инкубировали в присутствии FLT3L или NB1113 в зависимости доза-эффект в течение двенадцати дней. После окончания этого периода, клетки анализировали для определения пролиферации дендритных клеток с помощью протоколов окрашивания проточной цитометрии и антитела к CD1c и HLA-DR+, а также окрашивания живые-мертвые. Как показано на **Фиг. 6**, NB1113 проявляет эффективное распространение дендритных клеток, сопоставимым с таким действием FLT3L.

Пример 7 – Фармакокинетический анализ NB1113 и распространения DC у яванских макак

[00101] NB1113 связывается с FLT3 яванской макаки, следовательно, фармакокинетику и способность NB1113 распространять DC оценивали *in vivo* у самок яванских макак. Самки яванских макак (*Macaca fascicularis*) азиатского происхождения разделяли на две группы получали либо 1 мг/кг или 10 мг/кг NB1113, соответственно. Животные получали однократную дозу в день 1 фазы дозирования путем внутривенной болюсной инъекции через подкожную вену в объеме 5 мл/кг. Наполнителем /разбавителем был фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), pH 7,4 (1X). Оценку токсичности проводили на основании летальности, клинических наблюдений, веса тела, количественного потребления пищи и клинической патологии. Однократное внутривенное введение NB1113 в дозе 1 или 10 мг/кг яванским макакам хорошо переносилось, с отсутствием клинических наблюдений, связанных с NB1113. Образцы крови для фармакокинетической оценки собирали через бедренную вену в день 1 до введения препарата и приблизительно через 0,25, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 168, 336, 504 и 672 часов после введения дозы. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки (без антикоагулянта), представляя возможность свернуться при комнатной температуре, центрифугировали в течение 1 часа для сбора и хранили при температуре от -60 до -80°C, до анализа. ЖХ-МС/МС использовали для определения концентраций

NB1113 в образцах сыворотки обезьян, используя методы жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Экспозиция, как оценивали с помощью значений NB1113 средней обратно-экстраполированной концентрации во время 0 (C_0), максимально наблюдаемой концентрации ($C_{\max}$), и площади под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до 672 часов после введения дозы (AUC_{0-672}), увеличивалась при увеличении уровня дозирования от 1 до 10 мг/кг (Фиг. 7).

Повышение средних значений $C_{\max}$ и AUC_{0-672} были приблизительно пропорционально дозе. Уровень дозирования 10 мг/кг NB1113 соответствовал средним значениям сывороточной $C_{\max}$ и AUC_{0-672} 257 мкг/мл и 33300 ч·мкг/мл в день 1, соответственно.

[00102] Образцы крови для иммунофенотипирования собирали через бедренную вену два раза в течение фазы до введения дозы препарата и в дни 5, 8, 15, 22 и 28 фазы дозирования. Кровь собирали с использованием антикоагулянта EDTA калия и сразу анализировали с помощью проточной цитометрии. (См. Таблицу 4)

[00103] Введение 1 или 10 мг/кг NB1113 приводило к повышению общих DC (определенных как Lin⁻CD16⁻HLA⁻DR⁺ клетки), cDC2 (определенных как Lin⁻CD16⁻HLA⁻DR⁺BDCA⁻1⁺), и pDC популяций (определенных как Lin⁻CD16⁻HLA⁻DR⁺CD123⁺/яркий BDCA⁻2⁺) в интервале от дня 5 до дня 22 фазы дозирования (Фиг. 8). Результаты свидетельствуют о том, что однократная в/в доза NB1113 может эффективно распространять DC in vivo.

[00104] Наблюдаемые незначительные изменения популяций общих Т-клеток (CD3⁺), хелперных Т-клеток (Th: CD3⁺CD4⁺CD8⁻), цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), и В-клеток (CD3⁻CD20⁺) были незначительными по величине и в пределах нормального диапазона биологической вариабельности, отмечаемой у этих видов (Фиг. 9). NK клетки незначительно снижались в ответ на лечение с применением NB1113, с уровнями, которые оставались более низкими по сравнению со значениями до введения препарата в течение всей фазы анализа. Незначительные изменения, наблюдаемые в популяции моноцитов, изменялись для животных и дозированных группы (Фиг. 9).

[00105] Для тестирования влияния лечения с применением NB1113 на количество тромбоцитов, образцы для гематологических анализов отбирали в Дни 1, 3, 4, 5, 6, 11 и 18 фазы дозирования. Образцы крови собирали у животных натошак через бедренную или подкожную вену. По сравнению со значениями в фазе до введения препарата, количество тромбоцитов в целом снижалось (от -1,1 до -17,8%) с дня 2 до 6 и повышалось (от +1,1 до +42,8%) с дня 8 до 22, затем оно возвращалось на исходные

значения в день 28 (**Фиг. 10**). Предполагается, что снижение количества тромбоцитов связано с NB1113, сходные данные наблюдали у обезьян, леченных с применением лиганда FLT3 рецептора (Reeves и др. “Systemic dendritic cell mobilization associated with administration of FLT3 ligand to SIV- and SHIV-infected macaques.” *AIDS Res Hum Retroviruses*. Dec; 25(12): 1313-28. (2009)).

Таблица 4	
Тип клеток	Фенотип
Дендритные клетки	Lin-CD16- HLA-DR+
Обычные дендритные клетки 2	Lin-CD16-HLA-DR+BDCA-1+
Плазмодитоидные дендритные клетки	Lin-CD16-HLA-DR+CD123+/яркий BDCA-2+
Общие Т Клетки	CD3+
Хелперные Т Клетки	CD3+ CD4+ CD8-
Цитотоксические Т Клетки	CD3+ CD4- CD8+
В Клетки	CD3- CD20+
Клетки - естественные киллеры (NK)	CD3- CD16+
Моноциты	CD3-CD14+

Примечание: Полный фенотип, представленный Lin-, представляет собой CD3-CD8-CD14-CD20.

[00106] Несмотря на то, что представлены и описаны в настоящей заявке предпочтительные варианты осуществления изобретения, для квалифицированных специалистов в данной области техники будет понятно, что такие варианты изобретения представлены только в качестве примера. Квалифицированными специалистами в данной области техники сейчас могут быть осуществлены различные вариации, изменения и замены без отклонения от сущности изобретения. Следует принять во внимание, что при практической реализации изобретения могут осуществлять различные альтернативы для вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке.

[00107] Все публикации, патентные заявки, выданные патенты и другие документы, на которые приведены ссылки в настоящей заявке, включены в данное описание путем ссылки, как если бы каждая индивидуальная публикация, патентная заявка, выданный патент или другой документ быть специфически и индивидуально указан как включенный полностью путем ссылки. Определения, которые содержатся в тексте, включенному путем ссылки, исключены до той степени, в которой они противоречат определениям в настоящей заявке.

<i>Перечень последовательностей, представленных в настоящей заявке</i>		
SEQ ID NO:	Последовательность	Источники
1	GFTFSNY	
2	NYGMA	
3	HSGGGD	
4	SIHSGGGDTYYRDSVKG	
5	GRTPTGYFDH	
6	RASEGIHNGLA	
7	RASEGIHDGLA	
8	RASEGIHSGLA	
9	RASEGIHTGLA	
10	RASEGIHLGLA	
11	NANSLHS	
12	QYYDYPLT	
13	EVQLVESGGDLVQPGGSLKLSGFTFSNYGMAWIRQAPTMGLEW VASIHSGGGDTYYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMDSLRSEDATYY CARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	
14	AIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEGIHNGLAWYQQKPGKSPQLLIY NANSLHSRVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLSQSEDAVSYFCQQYYDYPLTF GSGTKLEIK	
15	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLEW VSSIHSGGGDTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	
16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHNGLAWYQQKPGKVPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYDYPLTF GQGTKLEIK	
17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLE WVASIHSGGGDTYYRDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	
18	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHNGLAWYQQKPGKAPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTF GQGTKLEIK	
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLV WVSSIHSGGGDTYYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	
20	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHNGLAWYQQKPGKAPKLLIY NANSLHSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYDYPLTF GQGTKLEIK	
21	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLE WVASIHSGGGDTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAT YYCARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHNGLAWYQQKPGKAPKRLIY NANSLHSRVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTF GQGTKLEIK	
23	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLE WVSSIHSGGGDTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALY YCARGRTPTGYFDHWGQGMVTVSS	

24	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEGIHNGLAWYQQKPGQAPRLLIY NANSLHSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYYDYPLTFG QGTKLEIK
25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHDGLAWYQQKPGKVPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYDYPLTF QGTKLEIK
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHSGLAWYQQKPGKVPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYDYPLTF QGTKLEIK
27	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHTGLAWYQQKPGKVPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYDYPLTF QGTKLEIK
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGIHLGLAWYQQKPGKVPKLLIY NANSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYDYPLTF QGTKLEIK
29	GFTFS NYGMA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- а) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA) ;
- б) гипервариабельный участок 2 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG);
- в) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH);
- г) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 6 - 10 (RASEGIIHXGLA);
- д) гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10 (NANSLHS); и
- е) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11 (QQYYDYPLT);

где X представляет собой любой аминокислотный остаток.

2. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит любую одну, две, три, четыре или пять из:

- а) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 (GFTFSNY); 2 (NYGMA); или 29 (GFTFSNYGMA) ;
- б) гипервариабельный участок 2 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 (HSGGGD) или 4 (SIHSGGGDTYYRDSVKG);

- в) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 (GRTPTGYFDH);
- г) гипервариабельный участок 1 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 6 - 10 (RASEGIHXGLA);
- д) гипервариабельный участок 2 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10 (NANSLHS); и
- е) гипервариабельный участок 3 вариабельного участка легкой цепи (VL-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11 (QQYYDYPLT);

где X представляет собой любой аминокислотный остаток.

3. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 1 или пункту 2, где VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из перечня, включающего: SEQ ID NO: 7 (RASEGIHDGLA); SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA); SEQ ID NO: 9 (RASEGIHTGLA); и SEQ ID NO: 10 (RASEGIHLGLA).

4. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 1 или пункту 2, где VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8 (RASEGIHSGLA).

5. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 4, содержащее:

- а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, и 23; и
- б) последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 27, и 28.

6. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 5, где:

а) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и

б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16.

7. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 5, где:

а) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и

б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26.

8. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) специфически связывает FMS подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), содержащее (ий):

а) последовательность вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, и 23; и

б) последовательность вариабельного участка лёгкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 27, и 28.

9. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 8, где:

а) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и

б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 16.

10. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 8, где:

а) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; и

б) вариабельный участок лёгкой цепи иммуноглобулина (VL) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или которая является 100% идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26.

11. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 10, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или гуманизированным.

12. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 11, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG антитело.

13. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 12, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций для уменьшения одной или нескольких эффекторных функций рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

14. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 13, где константный участок тяжелой цепи рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит константный участок тяжелой цепи IgG4, содержащий любую из следующих аминокислотных модификаций или наборов модификаций, выбранных из: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, делеции G446, делеции K447, и любой их комбинации IgG4 модификаций в соответствии с системой нумерации EU.
15. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 14, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
16. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 15, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает количество дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток при контактировании с мононуклеарными клетками периферической крови человека и/или клетками костномозгового происхождения.
17. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 16, где EC50 для повышения количества дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток составляет меньше, чем приблизительно 200 пикомоль (пМ).
18. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 17, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент повышает STAT5 экспрессию в клетке, экспрессирующей FLT3.
19. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 18, где EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клетке, экспрессирующей FLT3, равно или меньше, чем EC50 для повышения STAT5 экспрессии в клетке, экспрессирующей FLT3, индуцируемой лигандом FLT3 человека.
20. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пунктам 1 - 19, содержащее иммуномодулирующий компонент.

21. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 20, где иммуномодулирующий компонент представляет собой агонист белка стимулятора генов интерферона (STING).
- 5 22. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 21 и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель.
23. Фармацевтическая композиция по пункту 22, приготовленная для внутривенного введения.
- 10 24. Фармацевтическая композиция по пункту 22, приготовленная для подкожного введения.
25. Фармацевтическая композиция по пункту 22, приготовленная для внутриопухолевого введения.
- 15 26. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтическая композиция по одному из пунктов 22 - 25 для применения для лечения злокачественного новообразования.
- 20 27. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 26, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.
- 25 28. Способ лечения злокачественного новообразования у особи, включающий введение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 пациенту, пораженному злокачественным новообразованием.
29. Способ по пункту 28, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.
- 30 30. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтическая композиция по одному из пунктов 22 - 25 для применения для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток.
31. Способ распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, включающий

введение особи рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25.

32. Способ по пункту 31, где дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитотидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.
33. Способ захвата или распространения дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружении опухоли у особи, пораженной опухолью или злокачественным новообразованием, включающий введение эффективного количества рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 особи, пораженной опухолью или злокачественным новообразованием.
34. Способ по пункту 33, где дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитотидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.
35. Нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 19.
36. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по пункту 35.
37. Клетка по пункту 36, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.
38. Клетка по пункту 37, где клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).
39. Способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий инкубирование клетки по одному из пунктов 36 - 38 в культуральной среде в условиях, достаточных для секретирования рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 в культуральную среду.
40. Способ по пункту 39, который дополнительно включает подвергание культуральной среды по меньшей мере одной стадии очистки.
41. Способ осуществления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 и фармацевтически приемлемого наполнителя, носителя или разбавителя.

42. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 в способе лечения злокачественного новообразования.

5 43. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 42, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.

10 44. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток.

15 45. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи.

20 46. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 44 или 45, где дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитотидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.

25 47. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для захвата дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи.

30 48. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 47, где дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитотидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.

49. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 и фармацевтически приемлемого наполнителя, носителя или разбавителя для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

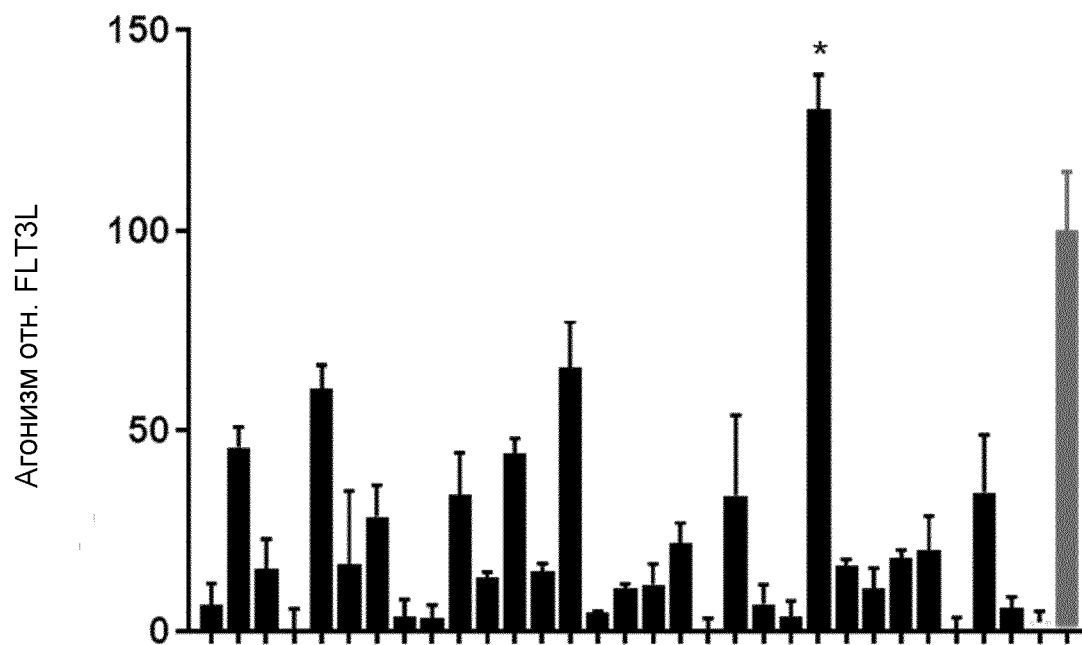
50. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 49, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.
51. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для приготовления лекарственного средства для лечения особи, у которого диагностировано или предполагается наличие злокачественного новообразования.
52. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 51, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.
53. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для приготовления лекарственного средства для распространения или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток.
54. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для приготовления лекарственного средства для распространения, или дифференциации популяций дендритных клеток или предшественников гематологических дендритных клеток у особи, пораженной злокачественным новообразованием.
55. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 54, где дендритные клетки или предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитотидные дендритные клетки, или любую их комбинацию.
56. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 21 или фармацевтической композиции по одному из пунктов 22 - 25 для приготовления лекарственного средства для захвата дендритных клеток или

предшественников гематологических дендритных клеток в микроокружение опухоли у особи, пораженной злокачественным новообразованием.

57. Применение рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по пункту 56, где дендритные клетки или

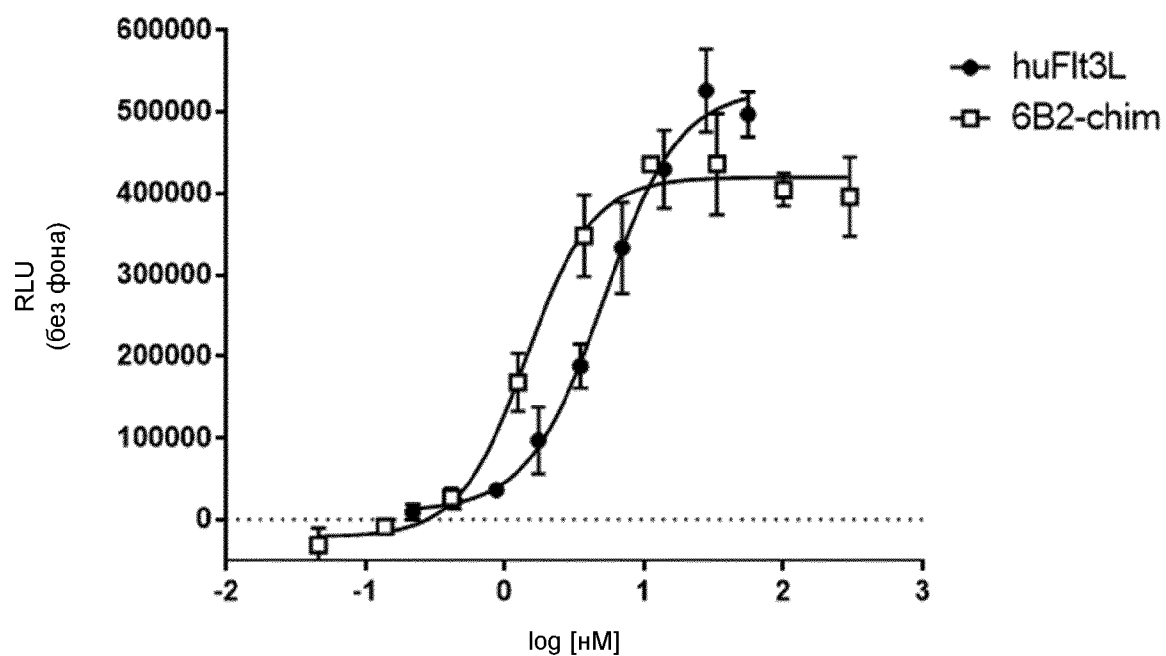
- 5 предшественники гематологических дендритных клеток включают поднабор обычных дендритных клеток cDC1, поднабор обычных дендритных клеток cDC2, плазмцитоподобные дендритные клетки, или любую их комбинацию.

Hu FLT3 STAT5-Luc Анализ



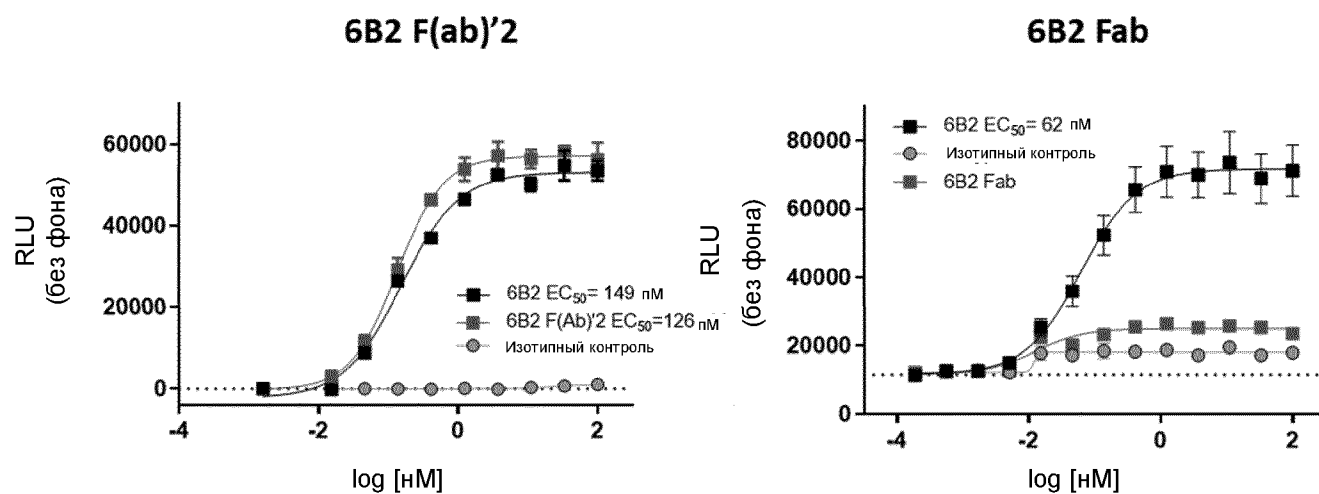
ФИГ. 1

HuFlt3 Stat5-Luc Анализ



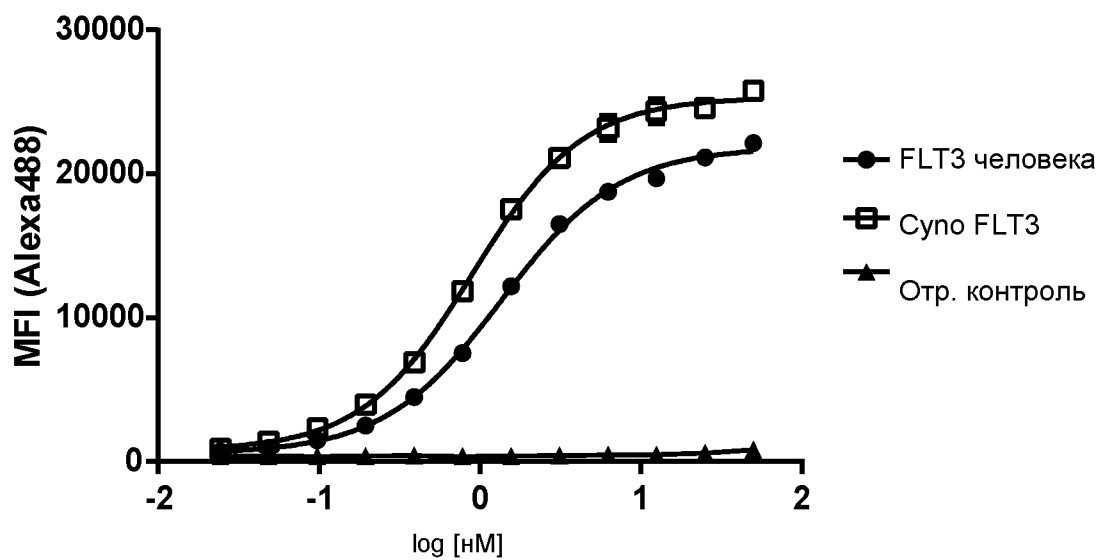
ФИГ. 2

Анализ пролиферации AML5

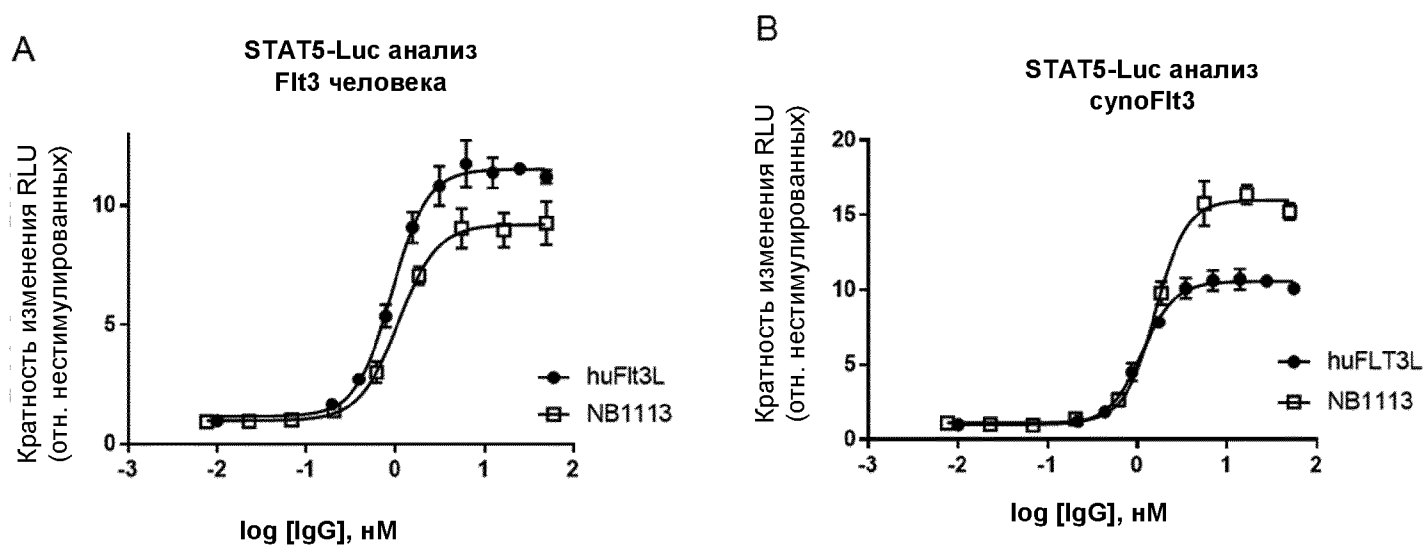


ФИГ. 3

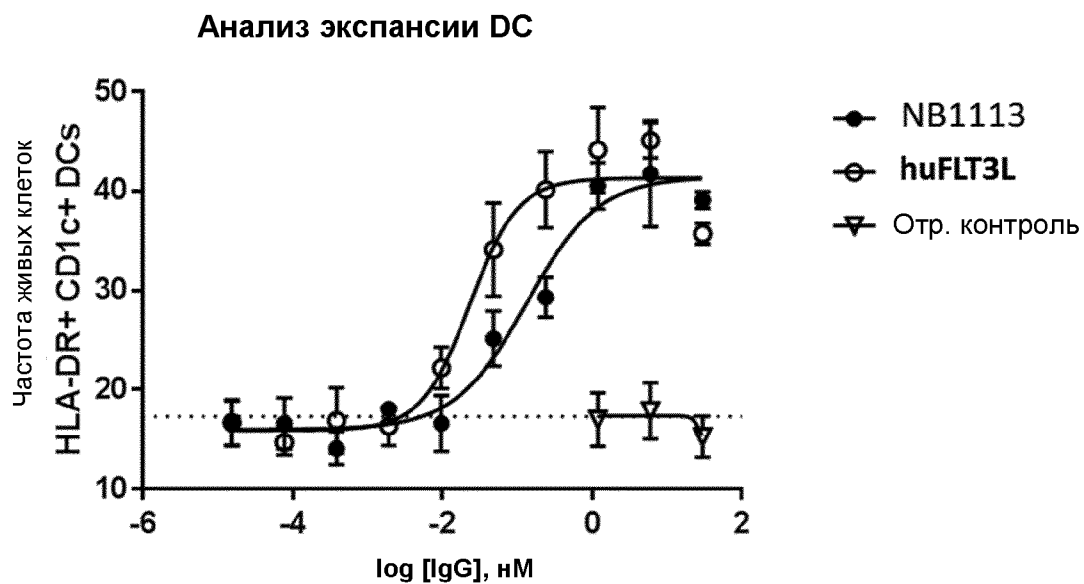
Кривые связывания NB1113



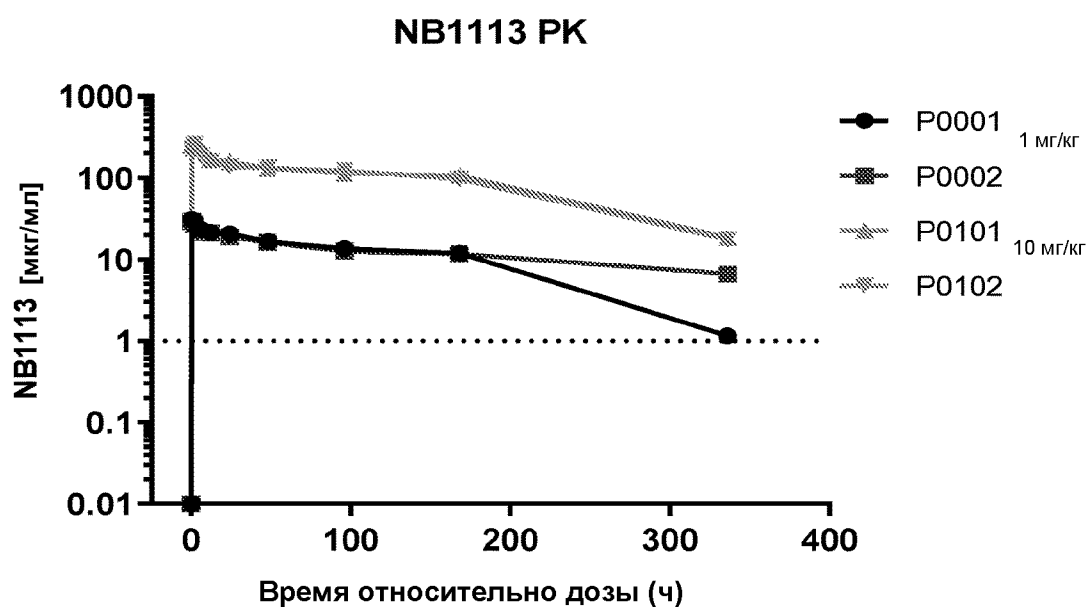
ФИГ. 4



ФИГ. 5

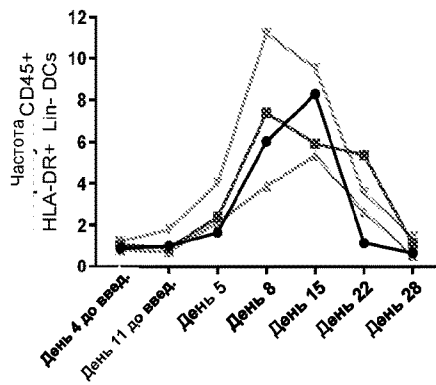


ФИГ. 6

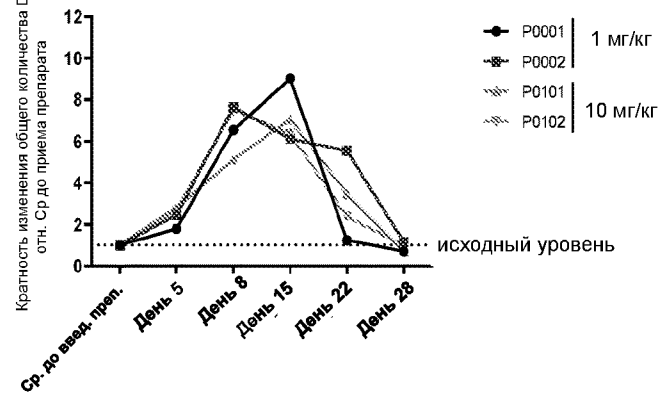


ФИГ. 7

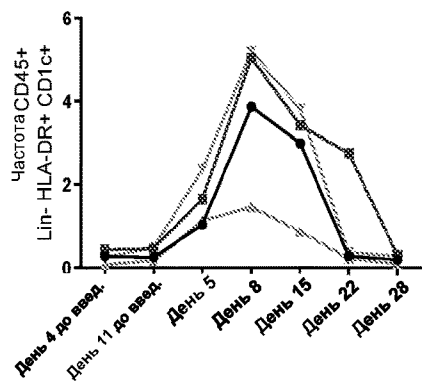
А Частота общего количества DC



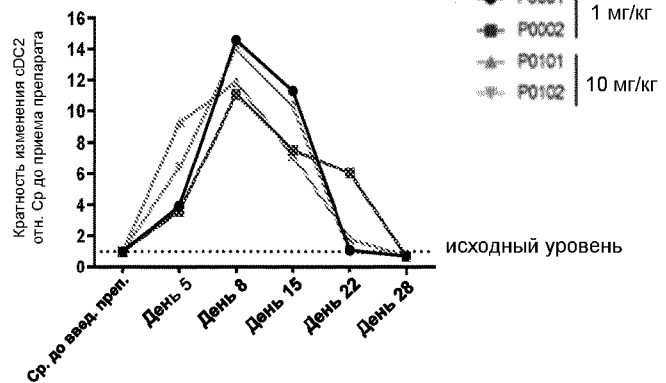
В Кратность изменения общего количества DC



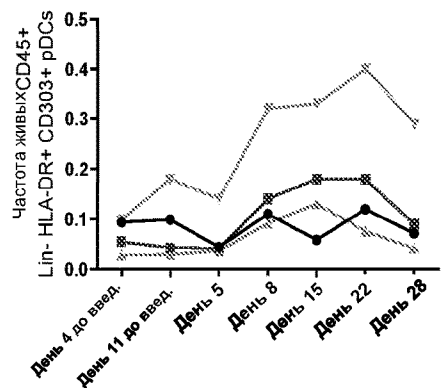
С Частота cDC2s



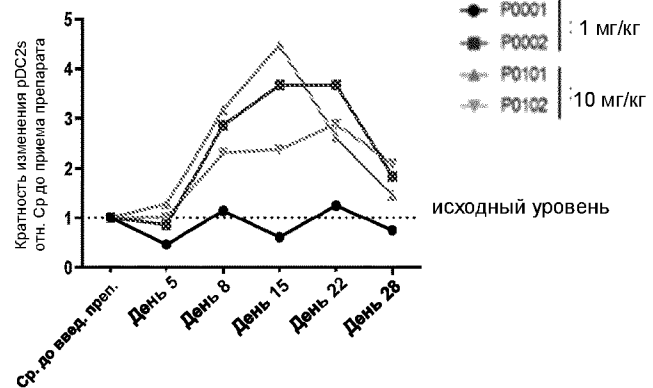
Д Кратность изменения cDC2s



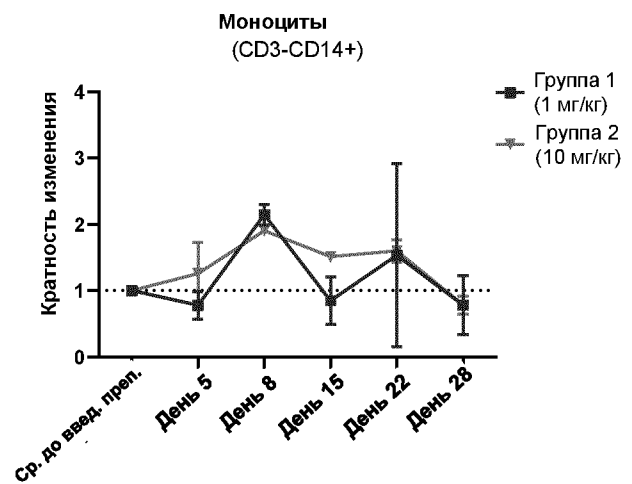
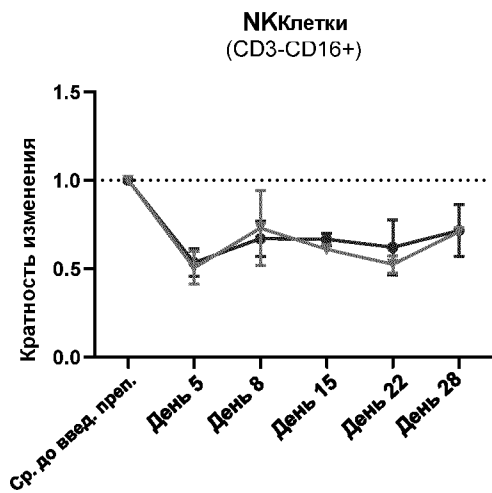
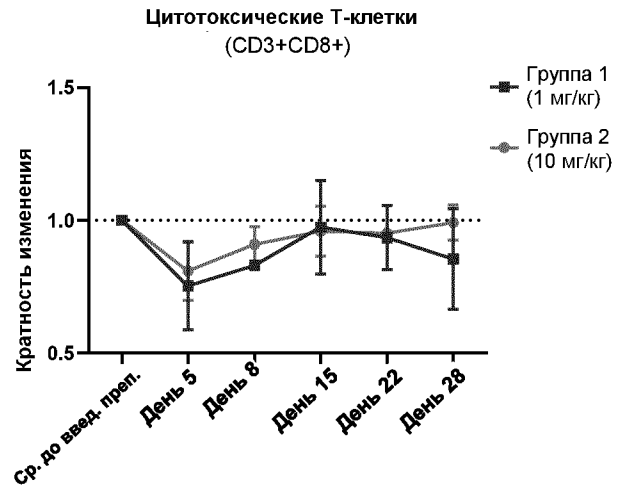
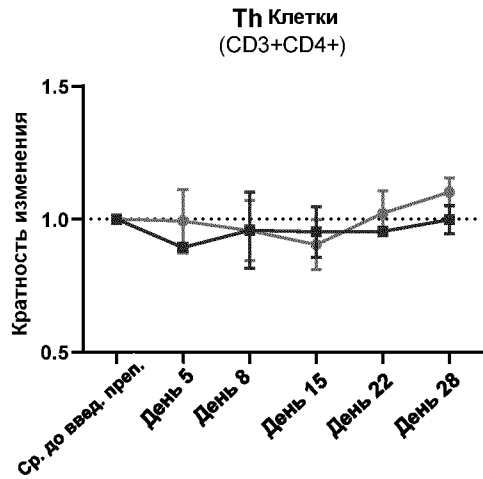
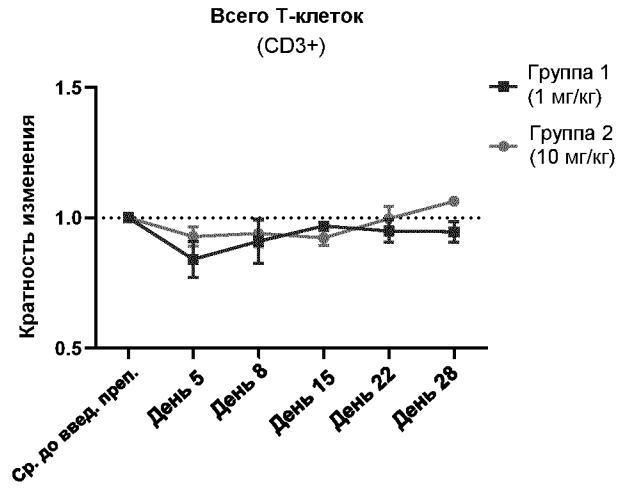
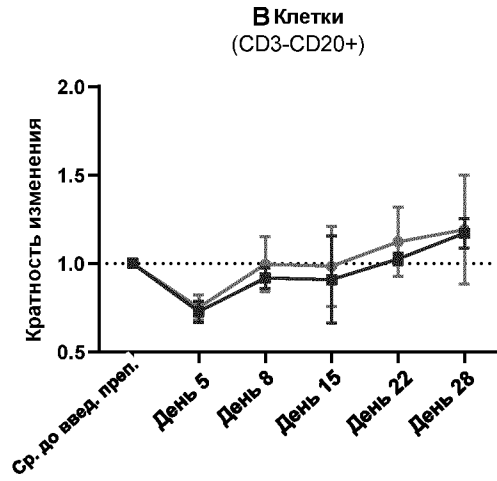
Е Частота pDCs



Ф Кратность изменения pDCs

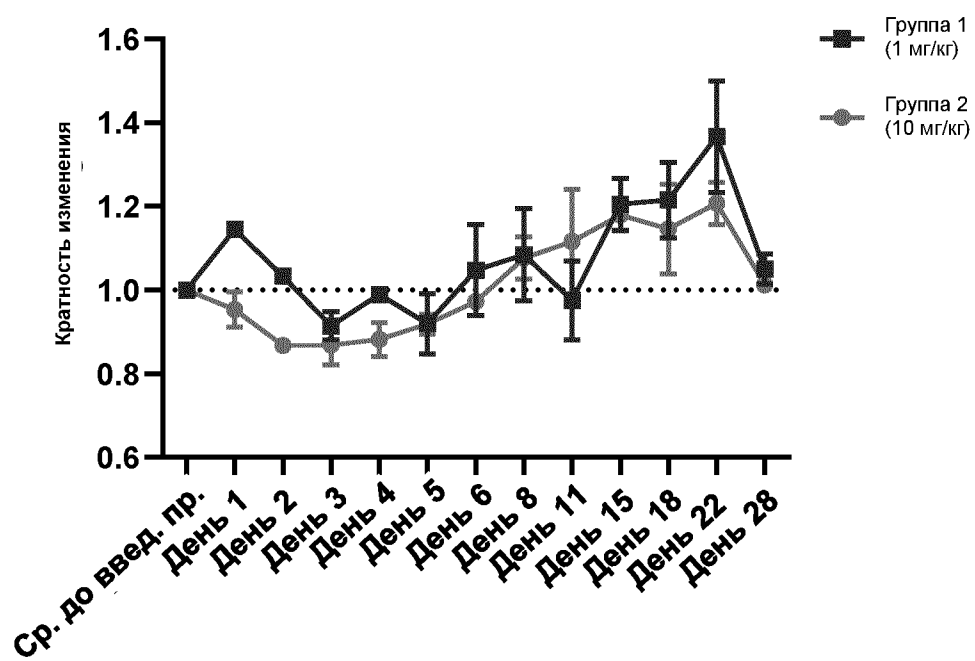


ФИГ. 8



ФИГ. 9

Количество тромбоцитов



ФИГ. 10