

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292873 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.17

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.14

(54) АНТИТЕЛА И КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ FLT3

(31) 63/009,578

(32) 2020.04.14

(33) US

(86) PCT/EP2021/059646

(87) WO 2021/209495 2021.10.21

(71) Заявитель:
ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ (FR)

(72) Изобретатель:

Линдстед Трине (DK), Меландер Эва
Мария Карльсен, Рива Маттео (SE),
Педерсен Миккель Вандаль, Хансен
Ранди Вест (DK)

(74) Представитель:

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) Изобретение относится к антителам против FTL3 и способам их применения для усиления иммунитета пациента, который в этом нуждается, и для лечения рака.

A1

202292873

202292873

A1

АНТИТЕЛА И КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ FLT3

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет для Предварительной патентной заявки США 63/009,578, поданной 14 апреля 2020 г. Содержание это приоритетной заявки включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

10 СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронной форме в формате ASCII и, таким образом, включен путем ссылки в его полном объеме. Электронная копия Списка последовательностей, созданная 9 апреля 2021 г., имеет название
15 022675_WO047_SL.txt и размер 53 293 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3) или CD135 представляет собой рецепторную тирозинкиназу класса III, экспрессируемую на поверхности ранних гематопозитических клеток-предшественников, играя важную роль в
20 развитии иммунной системы. После связывания с лигандом цитокина FLT3 (FLT3L) FLT3 димеризует и активирует множественные сигнальные пути, контролирующие дифференциацию, пролиферацию и выживание клеток.

[0004] Также было обнаружено, что FLT3 экспрессируется дендритными клетками (ДК) – классом профессиональных антиген-презентирующих клеток.
25 После контакта с антигеном дендритные клетки поглощают и обрабатывают антиген и презентуют его в сочетании с комплексом КТС класса II Т-клеткам, что ведет к активации Т-клеток. Сигнал FLT3 играет ключевую роль в дифференциации и росте дендритных клеток. Мыши с дефицитом FLT3 или лиганда FLT3 (FLT3L) демонстрируют сниженное количество ДК, тогда как
30 мыши, получающие FLT3L, демонстрируют повышенное количество ДК. Эти наблюдения указывают на существенную роль FLT3 в развитии ДК в устойчивом состоянии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение обеспечивает антитела против FTL3, способные стимулировать активность дендритных клеток. Существует возможность применения антител для усиления иммунного ответа пациента, который в этом нуждается, например, пациента, страдающего от рака или иммунодефицита. Также обеспечиваются фармацевтические композиции, включающие одно или несколько из этих антител, и применение антител и фармацевтических композиций для лечения рака. Предусмотрена возможность применения описываемых авторами антител и композиций согласно способу лечения рака у пациента; возможность их применения для производства медикамента для лечения рака у пациента; или возможность их применения в лечении рака у пациента. Предполагается, что по сравнению с имеющимися в настоящее время способами лечения таких видов рака, включая лечение антителами, описываемые авторами антитела и композиции способны обеспечить превосходный клинический ответ, по отдельности или в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами.

[0006] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, которая конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом человеческого FLT3, что и антитело 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающую часть определяют по аминокислотным последовательностям шести CDR, переменным доменам тяжелой и легкой цепи, или тяжелой и легкой цепям вышеупомянутого антитела.

[0007] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

1) гиперпеременные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 - 7, соответственно;

II) переменный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) гиперпеременные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 - 10, соответственно;

II) переменный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76.

[0008] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 - 17, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18 - 20, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76.

[0009] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 - 27, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 - 30, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76.

[0010] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35 - 37, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38 - 40, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76.

[0011] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45 - 47, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48 - 50, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76.

[0012] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55 - 57, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58 - 60, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

5 I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65 - 67, соответственно;

II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63;

10 III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

15 I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 - 70, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64;

20 III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76.

[0014] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение
25 обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем:

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) H-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 - 27, соответственно;

30 II) VH, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; или

IV) HC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела включает:

I) L-CDR-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 - 30, соответственно;

II) VL, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

IV) LC, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76.

[0015] Настоящее изобретение также обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, векторы и клетки-хозяева, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и те, и другие, антитела против FLT3 или описываемой авторами антигенсвязывающей части. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы производства антитела против FLT3 или описываемой авторами антигенсвязывающей части путем культивирования вышеупомянутых клеток-хозяев, а также способы производства композиции антитела путем примешивания антител или описываемых авторами антигенсвязывающих частей.

[0016] Другие особенности, цели и преимущества изобретения станут очевидны по ознакомлении с представленным ниже подробным описанием. При этом следует понимать, что подробное описание, хотя и указывает на варианты осуществления и аспекты изобретения, представлено только для пояснения и не является ограничивающим. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники по ознакомлении с подробным описанием.

30 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0017] ФИГУРА 1 представляет собой график, на котором показана пролиферация клеток EOL-1 после обработки указанными антителами против FLT3. Данные приведены к необработанному контрольному образцу, и каждый столбик представляет среднее значение $\pm$ SEM (n=3).

[0018] ФИГУРА 2 представляет собой набор графиков, показывающих связывание указанных антител против FLT3 или контрольных образцов с FLT3 человека (вверху слева), яванского макака (внизу слева) или мыши (вверху справа), экспрессируемой на клетках CHO-S. Ложно трансфицированные клетки CHO-S (внизу справа) применяли в качестве отрицательного контроля. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM.

[0019] ФИГУРА 3 представляет собой сенсограмму, показывающую свойства блокирования FLT3L указанных антител против FLT3. His-меченную FLT3 (FLT3-his) иммобилизовали на биодатчике penta-his (“penta-his” раскрывается как SEQ ID NO: 79) и антитела против FLT3 (mAb) были ассоциированы до связывания FLT3L и антител (FLT3L+mAb). Параллельно измеряли общее связывание FLT3L с FLT3 (только FLT3L).

[0020] ФИГУРА 4 представляет собой набор графиков, показывающих способность указанных антител против FLT3 к блокированию связывания FLT3L-Fc с FLT3 человека (вверху слева), яванского макака (вверху справа) или мыши (внизу), экспрессируемой на клетках CHO-S. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM.

[0021] ФИГУРА 5 представляет собой график, на котором показана пролиферация клеток EOL-1, обработанных указанными антителами или лигандом FLT3. “Контрольное mAb” является антителом против постороннего белка в формате IgG₁-LALA. Данные приведены к необработанному контрольному образцу, и каждая точка данных на кривых представляет среднее значение $\pm$ SEM (n=3).

[0022] ФИГУРЫ 6А и 6В представляют собой графики, показывающие пролиферацию клеток EOL-1 (**ФИГУРА 6А**) или клеток OCI-AML5 (**ФИГУРА 6В**), обработанных указанными антителами. Данные приведены к необработанному контрольному образцу, и каждая точка данных на кривых представляет среднее значение $\pm$ SEM (n=3).

[0023] ФИГУРА 7 представляет собой график, на котором показана пролиферация человеческих первичных CD34⁺ стволовых клеток, обработанных указанными антителами или лигандом FLT3. Левый график показывает эффект указанных антител в формате IgG₁-LALA, а правый график показывает эффект указанных антител в формате IgG₁-LALA или IgG₂. “Контрольное mAb”

представляет собой антитело против постороннего белка в формате IgG₁-LALA. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM (n=4).

[0024] ФИГУРЫ 8А - 8С представляют собой набор графиков, показывающих дифференциацию человеческих первичных стволовых клеток CD34⁺ от двух доноров, получавших указанные антитела или лиганд FLT3. Данные представлены как частота субпопуляций клеток CD14⁺ (**ФИГУРА 8А**) и CD1c⁺ (**ФИГУРА 8В**) и дендритных клеток (**ФИГУРА 8С**) по сравнению с необработанным контрольным образцом.

[0025] ФИГУРЫ 9А и 9В представляют собой набор графиков, показывающих кратное увеличение абсолютного числа клеток из подмножества селезеночных дендритных клеток у мышей Balb/c после обработки указанным антителом или FLT3L по сравнению с индифферентной основой. **ФИГУРА 9А**, левый график: кДК; правый график: кДК1. **ФИГУРА 9В**, левый график: кДК2; правый график: пДК. Для лечения антитела вводили в дозе 0,1 мг/кг, 1 мг/кг или 10 мг/кг для каждого антитела (n=5/группу). Применяли критерий Краскела-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, * p<0,05.

[0026] ФИГУРЫ 10А - 10D представляют собой наборы графиков, показывающих воздействие на подмножества ДК селезенки (**ФИГУРЫ 10А и 10В**) и костного мозга (**ФИГУРЫ 10С и 10D**) как кратное увеличение абсолютного числа клеток после обработки антителом против FLT3 в формате IgG₁-LALA или IgG₂ или FLT3L по сравнению с индифферентной основой у CD34 гуманизированных мышей NCG. Для лечения антитела вводили в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг для каждого антитела (n=5-6/группу).

[0027] ФИГУРА 11 представляет собой пару графиков, показывающих корреляцию между изменениями в экспрессии генов в человеческих первичных стволовых клетках CD34⁺, обработанных указанным антителом, в формате IgG₁-LALA (левый график) или формате IgG₂ (правый график), или лигандом FLT3. Данные представлены как log₂-кратное изменение экспрессии генов по сравнению с отрицательным контрольным антителом.

[0028] ФИГУРА 12 представляет собой схему, показывающую модели конкуренции и семейства эпитопов для указанных антител против FLT3. Черные соединительные линии указывают на перекрестную конкурентную активность. Круги представляют антитела, испытанные в обоих направлениях, а квадраты

представляют испытание в одном направлении. Антитела группируют в соответствии с моделями конкуренции с другими антителами против FLT3.

[0029] ФИГУРА 13 представляет ряд структур, показывающих связывание эпитопов антител 17566 (Рисунок А) и 17497 (Рисунок В), которые отображаются на структуру комплекса лиганда FLT3 - рецептора (входящий номер PDB: 3QS9). Два рецептора FLT3 (светло-серые) и лиганд FLT3 (белый) представлены в виде графического изображения. Домен 1 FLT3 показан как представление поверхности (темно-серый). Линейные эпитопы показаны белым, а контактные остатки – черным. Структуры показаны в различных ориентациях, как указано. Наблюдаемые с N-концевого верха рецепторов FLT3, расстояния между эпитопами составляют приблизительно 90 Å (17566) и 120 Å (17497).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0030] Настоящее изобретение обеспечивает новые агонистические антитела против FLT3 человека, которые применяют для стимуляции активности FLT3 у пациента, такого как пациент, страдающий от рака. Если не указано иного, в контексте данного описания “FLT3” означает FLT3 человека. Полипептидная последовательность FLT3 человека доступна под номером доступа UniProt P36888 (FLT3_HUMAN) (SEQ ID NO: 77), как показано ниже:

```

10 20 30 40 50
MPALARDGGQ LPLLVVFSAM IFGTITNQDL PVIKCVLINH KNNDSSVGKS
60 70 80 90 100
SSYPMVSESP EDLGCALRPQ SSGTVYEAAA VEVDVSASIT LQVLVDAPGN
110 120 130 140 150
ISCLWVFKHS SLNCQPHFDL QNRGVVSMVI LKMTETQAGE YLLFIQSEAT
160 170 180 190 200
NYTILFTVSI RNTLLYTLRR PYFRKMENQD ALVCISESVP EPIVEWVLCD
210 220 230 240 250
SQGESCKEES PAVVKKEEKV LHELFGTDIR CCARNELGRE CTRLFTIDLN
260 270 280 290 300
QTPQTTLQPQL FLKVGEPLWI RCKAVHVNHG FGLTWELNKA ALEEGNYFEM
310 320 330 340 350
STYSTNRTMI RILFAFVSSV ARNDTGYYTC SSKHPSQSA LVTIVEKGFV
360 370 380 390 400
NATNSSSEDYE IDQYEEFCFS VRFKAYPQIR CTWTFSRKSF PCEQKGLDNG
410 420 430 440 450

```

YSISKFCNHHK HQPGEYIFHA ENDDAQFTKM FTLNIRRKPO VLAEASASQA
 460 470 480 490 500
 SCFSDGYPLP SWTWKKCSK SPNCTEEITE GVWNRKANRK VFGQWVSSST
 510 520 530 540 550
 5 LNMSEAIKGF LVKCCAYNSL GTSCETILLN SPGPFPIQD NISFYATIGV
 560 570 580 590 600
 CLLFIVVLTLL LICHKYKKQF RYESQLQMVQ VTGSSDNEYF YVDFREYEYD
 610 620 630 640 650
 LKWEFPRENLL EFGKVLGSGA FGKVMNATAY GISKTGVSIQ VAVKMLKEKA
 10 660 670 680 690 700
 DSSEREALMS ELKMMTQLGS HENIVNLLGA CTLSGPIYLI FEYCCYGDLL
 710 720 730 740 750
 NYLRSKREKF HRTWTEIFKE HNFSEFYPTFQ SHPNSSMPGS REVQIHPDSD
 760 770 780 790 800
 15 QISGLHGNSF HSEDEIEYEN QKRLEEEEDL NVLTFEDLLC FAYQVAKGME
 810 820 830 840 850
 FLEFKSCVHR DLAARNVLVT HGKVVKICDF GLARDIMSDS NYVVRGNARL
 860 870 880 890 900
 PVKWMAPESL FEGIYTIKSD VWSYGILLWE IFSLGVNPYP GIPVDANFYK
 20 910 920 930 940 950
 LIQNGFKMDQ PFYATEEIIYI IMQSCWAFDS RKRPSFPNLT SFLGCQLADA
 960 970 980 990
 EEAMYQNVDG RVSECPHTYQ NRRPFSREMD LGLLSPQAQV EDS

- 25 **[0031]** Термин “антитело” (Ab) или “иммуноглобулин” (Ig) в контексте
 данного описания относится к тетрамеру, включающему две тяжелых (H) цепи
 (около 50 - 70 кДа) и две легких (L) цепи (около 25 кДа), связанных между собой
 дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена
 тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая
 30 цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константной области
 легкой цепи (CL). Домены VH и VL, в свою очередь, подразделяются на участки
 гипервариабельности, называемые “гипервариабельными участками” (CDR),
 перемежаемые участками, которые являются более консервативными и
 называются “каркасными участками” (FR). Каждый VH и VL состоит из трех
 35 CDR (H-CDR в контексте данного описания означает CDR из тяжелой цепи; и L-
 CDR в контексте данного описания означает CDR из легкой цепи) и четырех FR,
 расположенных от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке:

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Присвоение номеров аминокислот и участков FR и CDR в тяжелой или легкой цепи возможно в соответствии с определениями IMGT® (нумерация EC; Lefranc et al., *Dev Comp Immunol* (2003) **27(1)**: 55 - 77); или определениями Кэбата, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* (1987) **196**: 901 - 17; Chothia et al., *Nature* (1989) **342**: 878 - 83; MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* (1996) **262**: 732 - 45; или Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.* (2001) **309(3)**: 657 - 70.

[0032] Термин “рекомбинантное антитело” относится к антителу, которое экспрессируется из клетки или линии клеток, которые включают нуклеотидную(ые) последовательность(и), кодирующую(ие) антитело, причем вышеупомянутая(ые) нуклеотидная(ые) последовательность(и) в природе не ассоциированы с клеткой.

[0033] Термин “выделенный белок”, “выделенный полипептид” или “выделенное антитело” означает белок, полипептид или антитело, которые в силу своего происхождения или источника (1) не ассоциированы с естественно ассоциированными компонентами, сопровождающими его в его естественном состоянии, (2) не имеют других белков из того же вида, (3) экспрессируются клеткой из другого вида и/или (4) не встречаются в природе. Таким образом, полипептид, химически синтезированный или синтезированный в клеточной системе, отличной от клетки его природного происхождения, является “выделенным” из его естественно ассоциированных компонентов. Белок также практически освобождают от естественно ассоциированных компонентов путем выделения, применяя технологии очистки белков, общеизвестные среди специалистов в данной области техники.

[0034] Термин “аффинность” означает меру притяжения между антигеном и антителом. Собственная привлекательность антитела для антигена, как правило, выражается в форме константы равновесия аффинности связывания (K_D) конкретного взаимодействия антитела-антигена. Антитело называют специфически связывающимся с антигеном, если K_D составляет ≤ 1 мМ, например, ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ. Константу аффинности связывания K_D измеряют, например, при помощи поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore™) с применением, например, системы IBIS MX96 SPR от IBIS Technologies или платформы Catterra LSA SPR, или при помощи

биослойной интерферометрии, например, с применением системы OctetTM от ForteBio.

[0035] Термин “эпитоп” в контексте данного описания означает часть (детерминанту) антигена, которая специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифически связывающаяся молекула. Эпитопные детерминанты в целом состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углевода или сахара, и обычно обладают конкретными трехмерными структурными характеристиками, а также конкретными зарядными характеристиками. Существуют эпитопы “линейные” или “конформационные”. В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия располагаются по аминокислотным остаткам на белке, которые отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. Сразу после определения нужного эпитопа на антигене возникает возможность генерирования антител к этому эпитопу с применением общеизвестных среди специалистов в данной области технологий. Например, существует возможность генерирования антитела к линейному эпитопу путем иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу генерируют, например, путем иммунизации животного минидоменом, содержащим соответствующие аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Также существует возможность генерирования антитела к конкретному эпитопу, например, путем иммунизации животного нужной молекулой-мишенью (например, FLT3) или соответствующей ее частью, с последующим скринингом для связывания с эпитопом.

[0036] Существует возможность определения связывания антитела с тем же эпитопом или его конкуренции за связывание с антителом против FLT3 согласно настоящему изобретению путем применения способов, известных специалистам в данной области техники, включая, помимо прочих, анализы конкуренции, связывание с эпитопом и сканирование аланином. В некоторых вариантах осуществления антителу против FLT3 согласно настоящему изобретению позволяют связаться с FLT3 в условиях насыщения, а затем измеряют

способность испытуемого антитела к связыванию с FLT3. Если испытуемое антитело способно связываться с FLT3 в то же время, что и контрольное антитело против FLT3, то испытуемое антитело связывается с эпитопом, отличным от того, с которым связывается контрольное антитело против FLT3.

5 Однако, если испытуемое антитело не способно связываться с FLT3 в то же время, то испытуемое антитело связывается с тем же эпитопом, частично совпадающим эпитопом или эпитопом, находящимся в непосредственной близости от эпитопа, связанного антителом против FLT3 согласно настоящему изобретению. Этот эксперимент выполняют с применением, например, анализов
10 ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Для того, чтобы определить наличие перекрестной конкуренции антитела против FLT3 с другим антителом против FLT3, применяют описанный выше конкурентный способ в двух направлениях, т. е., определяя, блокирует ли известное антитело испытуемое антитело, и наоборот. Такие эксперименты
15 перекрестной конкуренции выполняют, например, применяя систему IBIS MX96 или инструмент Catterra LSA SPR или систему Octet™.

[0037] Термин “человеческое антитело” относится к антителу, в котором последовательности переменного домена и константной области получены из человеческих последовательностей. Термин охватывает антитела с
20 последовательностями, производными от человеческих генов, но подвергнутых модификации, например, для снижения иммуногенности, повышения аффинности и/или повышения устойчивости. Кроме того, термин охватывает антитела, вырабатываемые рекомбинантно в отличных от человеческих клетках, с возможным гликозилированием, нетипичным для человеческих клеток. Термин
25 также охватывает антитела, вырабатываемые в трансгенных отличных от человека организмах с генами человеческих антител (например, у крыс OmniRat®).

[0038] Термин “антигенсвязывающая часть” антитела (или просто “часть антитела”) в контексте данного описания означает одну или несколько частей
30 или фрагментов антитела, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с антигеном (например, человеческим FLT3 или его частью). Было продемонстрировано, что определенные фрагменты антитела полной длины способны выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примерами связывающих фрагментов, охватываемых термином “антигенсвязывающая

часть”, являются (I) Fab фрагмент: одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (II) F(ab')₂ фрагмент: двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (III) Fd фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (IV) Fv фрагмент, состоящий из доменов VL и VH отдельного фрагмента антитела, (V) dAb фрагмент, состоящий из домена VH; и (VI) выделенный гипервариабельный участок (CDR), способный специфически связываться с антигеном. Кроме того, хотя два домена Fv фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, существует возможность их соединения с применением рекомбинантных способов, синтетическим линкером, позволяющим делать из них отдельную белковую цепочку, в которой домены VL и VH образуют пару для образования одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv)). Также данное описание охватывает антигенсвязывающие молекулы, включающие VH и/или VL. В случае VH молекула также включает один или несколько фрагментов, к которым относятся CH1, шарнир, CH2 или участок CH3. предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином “антигенсвязывающая часть” антитела. Также охватываются и другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с применением линкера, слишком короткого для возможности образования пары между двумя доменами на одной и той же цепи, таким образом, обеспечивая принудительное образование пар доменов с комплементарными доменами другой цепи и создание двух антигенсвязывающих центров.

[0039] Части антител, такие как Fab и F(ab')₂ фрагменты, получают из целых антител, используя полные антитела с применением традиционных технологий, таких как папаиновое или пепсиновое расщепление полных антител. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезина получают, применяя стандартные технологии рекомбинантных ДНК, например, как описывается авторами.

[0040] Класс (изотип) и подкласс антител против FLT3 определяют любым способом, известным специалистам в данной области техники. В целом класс и подкласс антитела определяют, используя антитела, специфичные к конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела находятся в серийном

промышленном производстве. Класс и подкласс определяют путем анализа ELISA или вестерн-блоттинга, а также с применением других технологий. В альтернативном варианте класс и подкласс определяют путем секвенирования всей или части константной области тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями разных классов и подклассов иммуноглобулинов и определения класса и подкласса антител.

[0041] Если не указано иного, все номера аминокислотных остатков антител, упомянутые в этом описании, соответствуют номерам в соответствии с системой нумерации IMGT[®] (нумерации EC).

Антитела против FLT3

[0042] Настоящее изобретение обеспечивает антитела, направленные против FLT3, и их антигенсвязывающие части. В конкретном варианте осуществления описанные авторами антитела являются человеческими антителами, генерируемыми трансгенными животными (например, крысами), способными вырабатывать антитела, кодируемые перестроенными генами человеческих антител. В некоторых вариантах осуществления человеческие антитела содержат определенные мутации, например, для изменения вызванных праймером мутаций обратно в последовательность зародышевой линии (см., например, “симплекс-скорректированные” вариантные последовательности в Таблице 1).

[0043] В некоторых вариантах осуществления антитела против FLT3 согласно настоящему изобретению имеют мутации “LALA” (L234A/L235A) в Fc области. Эти мутации препятствуют связыванию антител с человеческим FcγR (гамма-рецепторами Fc). Такие антитела обладают преимуществом, поскольку они имеют низкий уровень вторичных эффекторных функций и, таким образом, не истощают эффекторные Т-клетки и не направлены на другие незлокачественные клетки.

[0044] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с человеческой FLT3 с антителом, включающим:

а) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75 и легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76;

б) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76;

5 в) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76;

г) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76;

10 д) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76;

е) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76;

ж) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76; или

20 з) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76,

или связывается с тем же эпитопом человеческого FLT3, что и это антитело.

25 **[0045]** В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3) SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57 или 67.

[0046] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 тяжелой цепи (H-CDR1-3), включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 - 7, 15 - 17, 25
30 - 27, 35 - 37, 45 - 47, 55 - 57 или 65 - 67, соответственно.

[0047] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична

(например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 или 73.

[0048] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 или 73.

[0049] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична (например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 или 73; и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична (например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75.

[0050] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 включает аминокислотную последовательность VH SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, или 73 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 75.

[0051] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (L-CDR3) SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70.

[0052] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 легкой цепи (L-CDR1-3), включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 - 10, 18 - 20, 28 - 30, 38 - 40, 48 - 50, 58 - 60 или 68 - 70, соответственно.

[0053] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична (например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64 или 74.

[0054] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть имеет VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64 или 74.

[0055] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 имеет аминокислотную последовательность VL, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична (например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, или 74; и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентична (например, по меньшей мере на 90 % идентична) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76.

[0056] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 включает аминокислотную последовательность VL SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, или 74 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 76.

[0057] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 включает одну из вышеописанных тяжелых цепей и одну из вышеописанных легких цепей.

[0058] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- а) SEQ ID NO: 5 - 10, соответственно;
- б) SEQ ID NO: 15 - 20, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 25 - 30, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 35 - 40, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 45 - 50, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 55 - 60, соответственно; или
- ж) SEQ ID NO: 65 - 70, соответственно.

[0059] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает VH и VL, которые по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичны (например, по меньшей мере на 90 % идентичны) аминокислотным последовательностям:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;

- г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно;
- ж) SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно; или
- 5 з) SEQ ID NO: 73 и 74, соответственно.

[0060] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает VH и VL, которые включают аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- 10 б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно;
- 15 ж) SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно; или
- з) SEQ ID NO: 73 и 74, соответственно.

[0061] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 согласно настоящему изобретению включает:

- а) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76;
- 20 б) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76;
- 25 в) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76;
- г) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76;
- 30 д) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76;

е) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76;

ж) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76; или

з) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76.

10 **[0062]** Настоящее изобретение также обеспечивает антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, которая конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и антитело 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497.

15 **[0063]** В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497.

20 **[0064]** В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает VH и VL которые по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичны (например, по меньшей мере на 90 % идентичны) в аминокислотной последовательности VH и VL, соответственно, антитела 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497.

25 **[0065]** В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению включает VH и VL, которые представляют VH и VL, соответственно, антитела 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497.

30 **[0066]** В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497, или антитело с теми же аминокислотными последовательностями, что и вышеупомянутое антитело.

[0067] Существует возможность смены класса антитела против FLT3, получаемого описанными авторами способами, или переключения на другой класс или подкласс. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с применением способов, общеизвестных среди специалистов в данной области техники, таким образом, чтобы она не включала нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие CL или CH, соответственно. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VL или VH затем функционально связывают с нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей CL или CH, соответственно, из другого класса молекулы иммуноглобулина. Этого достигают, применяя вектор или молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность CL или CH, как описано выше. Например, существует возможность переключения класса антитела против FLT3, которое первоначально представляло собой IgM, на IgG. Кроме того, переключение класса применяют для преобразования одного подкласса IgG в другой, например, IgG₁ на IgG₂. Константную область легкой цепи к меняют, например, на константную область легкой цепи λ , или наоборот.

Типичный способ получения антитела согласно настоящему изобретению с нужным изотипом Ig включает этапы выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против FLT3, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против FLT3, получения переменного домена тяжелой цепи, сшивания кодирующей последовательности для переменного домена тяжелой цепи с кодирующей последовательностью для константной области тяжелой цепи нужного изотипа, экспрессии легкой цепи и тяжелой цепи, кодируемых сшитой последовательностью в клетке, и сбора антитела против FLT3 с нужным изотипом.

[0068] Антитело против FLT3 согласно настоящему изобретению может быть молекулой IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но, как правило, относится к изотипу IgG, например, IgG подкласса IgG₁, IgG_{2a} или IgG_{2b}, IgG₃ или IgG₄. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу подкласса IgG₁.

[0069] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 включает по меньшей мере одну мутацию в Fc области. Известно много разных мутаций в Fc, причем эти мутации изменяют эффекторную функцию антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 включает по меньшей мере одну мутацию в Fc области, которая снижает

эффекторную функцию, например, мутации в одной или нескольких из позиций 228, 233, 234 и 235, причем аминокислотные позиции пронумерованы в соответствии с системой нумерации IMGT®.

5 [0070] В некоторых вариантах осуществления, например, в которых антитело относится к подклассу IgG₁, возможна мутация одного или обоих аминокислотных остатков в позициях 234 и 235, например, с Leu на Ala (L234A/L235A). Эти мутации снижают эффекторную функцию Fc области антител IgG₁. Аминокислотные позиции пронумерованы в соответствии с системой нумерации IMGT®.

10 [0071] В некоторых вариантах осуществления, например, в которых антитело относится к подклассу IgG₄, оно включает мутацию S228P, в которой аминокислотная позиция пронумерована в соответствии с системой нумерации IMGT®. Известно, что эта мутация уменьшает нежелательный обмен фрагментов Fab.

15 [0072] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению является агонистическим.

[0073] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть стимулирует пролиферацию клеток EOL-1 *in vitro* (например, в концентрации 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкг/мл или менее, например, в концентрации 25 мкг/мл или менее).

20 [0074] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть стимулирует пролиферацию клеток OCI-AML5 *in vitro* (например, в концентрации 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкг/мл или менее, например, в концентрации 25 мкг/мл или менее).

25 [0075] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть специфически связывается с FLT3 человека и FLT3 яванского макака (например, экспрессируемой на клетках CHO-S). В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть специфически связывается с FLT3 человека, FLT3 яванского макака и FLT3 мыши (например, экспрессируемой на клетках CHO-S).

30 [0076] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть не блокирует связывание FLT3L с FLT3 человека *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или

антигенсвязывающая часть не блокирует связывание FLT3L с иммобилизованной FLT3 в условиях насыщения.

[0077] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть не блокирует связывание FLT3L-Fc с воспроизводимым клетками белка FLT3 человека, яванского макака и/или мыши *in vitro* (например, в концентрации по меньшей мере 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 30, 50 или 100 мкг/мл, например, в концентрации по меньшей мере 30 мкг/мл).

[0078] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть стимулирует пролиферацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека (например, в концентрации 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 мкг/мл или менее, например, в концентрации 25 мкг/мл или менее).

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть стимулирует дифференциацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека (например, в концентрации 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 мкг/мл или менее, например, в концентрации 25 мкг/мл или менее).

[0080] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть увеличивает субпопуляцию дендритных клеток, таких как CD14⁺, CD1c⁺, пДК, кДК, кДК1 или кДК2, или любой их комбинации (например, в концентрации 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 мкг/мл или менее, например, в концентрации 25 мкг/мл или менее).

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть вызывает размножение и/или мобилизацию дендритных клеток у иммунокомпетентных мышей, таких как мыши Balb/c (например, в дозе 0,1, 1 или 10 мг/кг или менее два раза в неделю).

[0082] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть вызывает размножение и/или мобилизацию дендритных клеток у мышей с ослабленным иммунитетом, восстановленных стволовыми клетками CD34⁺ человека (например, в дозе 1 или 10 мг/кг или менее два раза в неделю). В некоторых вариантах осуществления размножение и/или мобилизацию дендритных клеток вызывают у мышей в селезенке, костном мозге или в обоих этих органах.

[0083] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть связывается с FLT3 человека с показателем K_D

приблизительно 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 нМ или менее (например, 9 нМ или менее).

[0084] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть связывается с доменом 1 (D1) внеклеточного домена (ВКД) FLT3 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связывается с остатками на С-конце D1 (например, на внутренней поверхности D1 относительно лиганда FLT3). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связывается с остатками на внешней поверхности D1 относительно лиганда FLT3. В конкретных вариантах осуществления расстояние между двумя эпитопами на каждом D1 в комплексе лиганд / рецептор FLT3 составляет 90 - 120 Å.

[0085] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть связывается с линейным эпитопом, включающим остатки 78 - 87, 78 - 97 или 138 - 147 аминокислотной последовательности FLT3 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом, который включает остаток A79, в комбинации с остатками A80 и/или V81, аминокислотной последовательности FLT3 человека. В конкретных вариантах осуществления антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом, включающим следующие остатки аминокислотной последовательности FLT3 человека:

- а) 79, A80, V81, T157, R161;
- б) 79, A80, V81, I89, T90, R161;
- в) 79, V81;
- г) 79, V81, V83, A87, I89, V125, T157; или
- д) 100, L104-V106, H109-S111, E140, L142, N151, T153.

В возможном варианте антитело или антигенсвязывающая часть связывается, например, с эпитопом, как показано для антитела 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 или 17497 в Таблице 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть не связывается с тем же эпитопом, что и антитело IMC-EB10.

[0086] Настоящее изобретение также предусматривает антитело против FLT3 или описываемую авторами антигенсвязывающую часть с любой комбинацией вышеупомянутых свойств.

[0087] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере одним (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или всеми 11) из следующих свойств:

- а) стимулирует пролиферацию клеток EOL-1 *in vitro*;
- 5 б) стимулирует пролиферацию клеток OCI-AML5 *in vitro*;
- в) связывается с FLT3 человека с показателем K_D 20 нМ или менее;
- г) специфически связывается с FLT3 яванского макака;
- д) специфически связывается с FLT3 мыши;
- е) не блокирует связывание лиганда FLT3 с FLT3 человека *in vitro*;
- 10 ж) не блокирует связывание FLT3L-Fc с воспроизводимым клетками белком FLT3 человека, яванского макака или мыши *in vitro*;
- з) стимулирует пролиферацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека;
- и) стимулирует дифференциацию первичных стволовых клеток CD34⁺
- 15 человека;
- к) вызывает мобилизацию дендритных клеток *in vivo* у мышей Balb/c;
- и
- л) вызывает мобилизацию дендритных клеток *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом, восстановленных стволовыми клетками CD34⁺
- 20 человека.

Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть обладает свойствами а) и в) - з); а), в), г) и е) - и); а), в), г) и е) - з); а), в) и е) - з); а) - в), з), и) и л); а) - в), з) и и); или а) - в) и к).

[0088] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть повышает пролиферацию и/или активацию дендритных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть повышает способность дендритных клеток к

30 поглощению антигенов опухоли.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть ингибирует рост опухоли и/или вызывает регрессию роста опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами

антигенсвязывающая часть замедляет или инвертирует метастазирование у страдающего от рака пациента. В некоторых вариантах осуществления антитело против FLT3 или описываемая авторами антигенсвязывающая часть продлевает выживание страдающего от рака пациента. Также предусматривается любая комбинация вышеупомянутых свойств.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению является частью большей молекулы иммуноадгезина, образованной путем ковалентной или нековалентной связи антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезина включают применение коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* (1995) **6**: 93 - 101) и применение цистеинового остатка, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.* (1994) **31**: 1047 - 58). В других примерах один или несколько CDR из антитела включены в молекулу ковалентно или нековалентно для образования из нее иммуноадгезина, который специфически связывается с нужным антигеном. В таких вариантах осуществления CDR включают как часть большей полипептидной цепи, ковалентно связывают с другой полипептидной цепью или включают нековалентно.

[0091] В еще одном варианте осуществления возможно создание слитого антитела или иммуноадгезина, включающего полное антитело или часть антитела против FLT3 согласно настоящему изобретению, связанные с другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления только переменные домены антитела против FLT3 связаны с полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домен VH антитела против FLT3 связан с первым полипептидом, а домен VL антитела против FLT3 связан со вторым полипептидом, который ассоциирован с первым полипептидом таким образом, что домены VH и VL способны взаимодействовать друг с другом для образования антигенсвязывающего центра. В некоторых вариантах осуществления домен VH отделен от домена VL линкером таким образом, что домены VH и VL способны взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связывают с нужным полипептидом. Кроме того,

существует возможность создания слитых антител, в которых два (или более) одноцепочечных антител соединены друг с другом. Это может быть целесообразным в случае потребности в создании двухвалентного или поливалентного антитела на одной полипептидной цепи или в случае

5 [0092] Для создания одноцепочечного антитела (scFv) кодирующие VH и VL фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly₄ -Ser)₃ (SEQ ID NO: 78), таким образом, чтобы

10 последовательности VH и VL были экспрессированы как непрерывный одноцепочечный белок, с доменами VL и VH, соединенными гибким линкером. См., например, Bird et al., *Science* (1988) **242**: 423 - 6; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) **85**: 5879 - 83; и McCafferty et al., *Nature* (1990) **348**: 552 - 4. Одноцепочечное антитело является одновалентным, если используют только

15 единичные VH и VL; двухвалентным, если используют два VH и VL; или поливалентным, если используют более двух VH и VL. Существует возможность генерирования биспецифических или поливалентных антител, специфически связывающихся, например, с FLT3 человека и другой молекулой.

[0093] В других вариантах осуществления модифицированные антитела

20 получают, используя кодирующие антитело против FLT3 молекулы нуклеиновых кислот. Например, “каппа-тела” (Ill et al., *Protein Eng.* (1997) **10**: 949 - 57), “минителя” (Martin et al., *EMBO J.* (1994) **13**: 5303 - 9), “диателя” (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) **90**: 6444 - 8) или “янусины” (Traunecker et al., *EMBO J.* (1991) **10**: 3655 - 9 и Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Suppl.) (1992) **7**: 51

25 - 2) получают, применяя стандартные молекулярные биологические технологии согласно указаниям технических требований.

[0094] Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению дериватизируют или связывают с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). В целом антитела или их части

30 дериватизируют таким образом, чтобы связывание с FLT3 не подвергалось отрицательному влиянию дериватизации или мечения. Соответственно, предполагается, что антитела и части антител согласно настоящему изобретению включают как интактные, так и модифицированные формы описываемых авторами человеческих антител против FLT3. Например, предусмотрена

возможность функционального связывания (путем химического соединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) антитела или части антитела согласно настоящему изобретению с одной или несколькими другими молекулярными субстанциями, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диатело), агент обнаружения, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, способные опосредовать ассоциацию антитела или части антитела с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

[0095] Один из типов дериватизированного антитела получают путем перекрестного связывания двух или нескольких антител (одного типа или разных типов, например, для создания биспецифических антител). К подходящим кросслинкерам относятся те, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отдельно реагирующих группы, разделенные соответствующим спейсером (например, m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры выпускаются компанией Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0096] Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть также дериватизируют химической группой, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильная или этильная группа или углеводная группа. Эти группы применяют для улучшения биологических характеристик антитела, например, для продления периода полувыведения из сыворотки.

[0097] Также существует возможность мечения антитела или антигенсвязывающей части согласно настоящему изобретению. В контексте данного описания термины “метка” или “меченный” относятся к включению другой молекулы в антитело. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой обнаружимый маркер, например, включение радиоактивно меченной аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных компонентов, обнаружимых при помощи меченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или ферментной активности, обнаружимой оптическими или колориметрическими способами). В некоторых вариантах осуществления возможны терапевтические метка или маркер, например, лекарственный конъюгат или токсин. Различные применимые способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны специалистам в

данной области техники. Примерами меток для полипептидов являются, помимо прочих, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанид-фосфор), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная люцифераза фосфатаза), хемилюминесцентные метки, биотинильные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как гадолиниевые хелаты, токсины, такие как токсин коклюша, таксол, цитохаластин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, олхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления, метки прикрепляют спейсерными ножками различной длины для уменьшения возможного стерического препятствия.

[0098] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению конъюгируют с цитотоксическим средством для образования иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению конъюгируют с радиоизотопом.

[0099] В некоторых возможных вариантах осуществления антитела согласно настоящему изобретению присутствуют в нейтральной форме (включая цвиттерионные формы) или как положительно или отрицательно заряженные виды. В некоторых возможных вариантах осуществления антитела образуют комплекс с противоионом для образования фармацевтически приемлемой соли.

Композиции антитела против FLT3

[0100] Настоящее изобретение также обеспечивает средство комбинированной терапии (например, композицию), которая включает одно, два, три, четыре или более антител против FLT3 или их антигенсвязывающих частей, как описано авторами. В некоторых вариантах осуществления средство комбинированной терапии (например, композиция) включает два из антител против FLT3 или антигенсвязывающих частей. Комбинированная терапия

возможна, например, в форме способа лечения с применением вышеупомянутых антител или антигенсвязывающих частей или фармацевтической композиции, включающей вышеупомянутые антитела или антигенсвязывающие части.

[0101] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую первое антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть и второе антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, причем первое и второе антитела представляют собой:

- антитела 17566 и 17526, соответственно;
- 10 - антитела 17566 и 17667 (или 17667-0), соответственно;
- антитела 17566 и 17679, соответственно;
- антитела 17566 и 17494, соответственно;
- антитела 17566 и 17543, соответственно;
- антитела 17566 и 17497, соответственно;
- 15 - антитела 17526 и 17667 (или 17667-0), соответственно;
- антитела 17526 и 17679, соответственно;
- антитела 17526 и 17494, соответственно;
- антитела 17526 и 17543, соответственно;
- антитела 17526 и 17497, соответственно;
- 20 - антитела 17667 (или 17667-0) и 17679, соответственно;
- антитела 17667 (или 17667-0) и 17494, соответственно;
- антитела 17667 (или 17667-0) и 17543, соответственно;
- антитела 17667 (или 17667-0) и 17497, соответственно;
- антитела 17679 и 17494, соответственно;
- 25 - антитела 17679 и 17543, соответственно;
- антитела 17679 и 17497, соответственно;
- антитела 17494 и 17543, соответственно;
- антитела 17494 и 17497, соответственно;
- антитела 17543 и 17497, соответственно; или
- 30 - антитела 17667 и 17667-0, соответственно.

[0102] В некоторых вариантах осуществления композиция включает антитела или их антигенсвязывающие части, связывающиеся с тем же эпитопом, что и вышеупомянутые первое и второе антитела, или конкурирующие за связывание с ним.

[0103] В некоторых вариантах осуществления композиция включает антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 вышеупомянутого первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая
5 включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 вышеупомянутого второго антитела.

[0104] В некоторых вариантах осуществления композиция включает антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 80 %, 85
10 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичны (например, по меньшей мере на 90 % идентичны аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, вышеупомянутого первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на
15 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичны (например, по меньшей мере на 90 % идентичны) аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, вышеупомянутого второго антитела.

[0105] В некоторых вариантах осуществления композиция включает
20 антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает аминокислотные последовательности VH и VL вышеупомянутого первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает аминокислотные последовательности VH и VL вышеупомянутого второго антитела.

[0106] В некоторых вариантах осуществления композиция включает
25 антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает аминокислотные последовательности HC и LC вышеупомянутого первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает аминокислотные последовательности HC и LC вышеупомянутого второго
30 антитела.

[0107] В некоторых возможных вариантах осуществления вышеупомянутая композиция включает одно, два или более антител или их антигенсвязывающих частей, выбранных из группы, к которой относятся:

а) антитело, включающее H-CDR1-3, который включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 - 7, 15 - 17, 25 - 27, 35 - 37, 45 - 47, 55 - 57 или 65 - 67, соответственно;

5 б) антитело, VH последовательность которого по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 или 73;

в) антитело, VH которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 или 73;

10 г) антитело, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75, 13 и 75, 23 и 75, 33 и 75, 43 и 75, 53 и 75, 63 и 75 или 73 и 75;

д) антитело, включающее L-CDR1-3, который включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, 18-20, 28-30, 38-40, 48-50, 58-60 или 68-70, соответственно;

15 е) антитело, последовательность VL которого по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64 или 74;

ж) антитело, VL которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64 или 74;

20 з) антитело, LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76, 14 и 76, 24 и 76, 34 и 76, 44 и 76, 54 и 76, 64 и 76 или 74 и 76;

и) антитело, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 - 10, 15 - 20, 25 - 30, 35 - 40, 25 45 - 50, 55 - 60 или 65 - 70, соответственно;

к) антитело, включающее VH и VL, которые включают аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90 % идентичные аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44, 53 и 54, 63 и 64 или 73 и 74, соответственно;

30 л) антитело, включающее VH и VL, которые включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44, 53 и 54, 63 и 64 или 73 и 74, соответственно; и

м) антитело, включающее HC и LC, которые включают аминокислотные последовательности 3 и 75, 4 и 76; 13 и 75, 14 и 76; 23 и 75, 24

и 76; 33 и 75, 34 и 76; 43 и 75, 44 и 76; 53 и 75, 54 и 76; 63 и 75, 64 и 76; или 73 и 75, и 74 и 76; соответственно.

[0108] В некоторых возможных вариантах осуществления, описанная авторами композиция антитела против FLT3 ингибирует рост опухоли и/или вызывает регрессию роста опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления описанная авторами композиция антитела против FLT3 замедляет или инвертирует метастазирование у страдающего от рака пациента. В некоторых вариантах осуществления описанная авторами композиция антитела против FLT3 продлевает выживание страдающего от рака пациента.

[0109] Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения описанной авторами композиции антитела против FLT3, включающий обеспечение первого антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части и второго антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части и примешивание двух антител или частей.

Биспецифически связывающиеся молекулы

[0110] Настоящее изобретение также обеспечивает биспецифически связывающуюся молекулу, имеющую специфичность связывания (например, включающую антигенсвязывающие части, например, шесть CDR или VH и VL) антитела против FLT3, как описано авторами. В некоторых вариантах осуществления биспецифически связывающаяся молекула дополнительно обладает специфичностью связывания с другим, отдельным антителом против FLT3 (например, другим антителом против FLT3, описанным авторами) или антителом, направленным на другой белок, такой как раковый антиген или другая молекула поверхности клетки, активность которой опосредует болезненное состояние, такое как рак. Такие биспецифически связывающиеся молекулы известны специалистам в данной области техники, и примеры различных типов биспецифически связывающихся молекул представлены в других разделах этого документа.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

[0111] Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот и последовательности, кодирующие антитела против FLT3 или их антигенсвязывающие части, описываемые авторами. В некоторых вариантах осуществления различные молекулы нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела

против FLT3 или антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части.

5 **[0112]** Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает ее комплемент если не указано иного. Таким образом, ссылку на нуклеиновую кислоту, имеющую конкретную последовательность, следует понимать как охватывающую и ее комплементарную цепь, с ее комплементарной последовательностью. Термин “полинуклеотид” в контексте данного описания
10 означает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов, или модифицированную форму каждого типа нуклеотида. Термин включает одно- и двухцепочечные формы.

15 **[0113]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и ту, и другую, антитела против FLT3 или ее антигенсвязывающей части, как описано авторами.

20 **[0114]** Настоящее изобретение также обеспечивает нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичны (например, по меньшей мере на 90 % идентичны) одной или нескольким приведенным авторами нуклеотидным последовательностям, например, нуклеотидной последовательности, выбранной
25 из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51, 52, 61, 62, 71 и 72, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 3, 4, 13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 44, 53, 54, 63, 64, 73 и 74. Термин “процент идентичности последовательностей” в контексте
30 нуклеиновокислотных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при сопоставлении на максимальное соответствие. Возможная длина сравнения идентичности последовательностей охватывает по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 18 нуклеотидов, еще чаще – по меньшей мере

около 24 нуклеотидов, как правило, по меньшей мере около 28 нуклеотидов, еще чаще – по меньшей мере около 32 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере около 36, 48 или более нуклеотидов. Существует множество известных специалистам в данной области техники различных алгоритмов, которые применяют для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей. Например, полинуклеотидные последовательности сравнивают с применением программ FASTA, Gap или Bestfit, входящих в пакет Wisconsin Package версии 10.0 от Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, Висконсин. FASTA, включающая, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и определение процента идентичности последовательностей на участках наибольшего перекрытия между запрашиваемой и искомой последовательностями (см., например, публикации Pearson, *Methods Enzymol.* (1990) **183**: 63 - 98; Pearson, *Methods Mol. Biol.* (2000) **132**: 185 - 219; Pearson, *Methods Enzymol.* (1996) **266**: 227 - 58; и Pearson, *J. Mol. Biol.* (1998) **276**: 71 - 84; включенные в данное описание путем ссылки). Если не указано иного, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между нуклеиновокислотными последовательностями определяют с применением FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы замен) или с применением Gap с параметрами по умолчанию, как предусмотрено в GCG, версии 6.1, включенных в данное описание путем ссылки.

[0115] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51, 52, 61, 62, 71 и 72. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, 11 и 12, 21 и 22, 31 и 32, 41 и 42, 51 и 52, 61 и 62 или 71 и 72.

[0116] В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления молекулы предусмотрена возможность выделения нуклеиновых кислот. Молекулы нуклеиновых кислот, указанные авторами как “выделенные” или “очищенные”, являются нуклеиновыми кислотами, которые (1) были отделены от нуклеиновых кислот геномной ДНК или клеточной РНК источника их происхождения; и/или (2) не встречаются в природе.

[0117] В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает вектор, подходящий для экспрессии одной или обеих цепей антитела или его антигенсвязывающей части, как описывается авторами. Термин “вектор” в контексте данного описания означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, т. е., круговой двухцепочечный фрагмент ДНК, в который могут быть вшиты дополнительные сегменты ДНК. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в контексте данного описания называют “рекомбинантными векторами экспрессии” (или просто “векторами экспрессии”).

[0118] Настоящее изобретение обеспечивает векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую цепь, легкую цепь, или и тяжелую, и легкую цепи, антитела против FLT3, как описывается авторами, или их антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления вектор согласно настоящему изобретению включает описанную авторами молекулу нуклеиновой кислоты. Настоящее изобретение также обеспечивает векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды. В возможном варианте вектор также включает последовательность контроля экспрессии.

[0119] Термин “последовательность контроля экспрессии” в контексте данного описания означает полинуклеотидные последовательности, необходимые для осуществления экспрессии и обработки кодирующих последовательностей, с которыми они сшиты. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, промоторов и энхансеров; сигналы эффективной обработки РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматические мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (т. е., консенсусную последовательность Козака); последовательности, повышающие устойчивость белка; и, в случае потребности, последовательности, повышающие секрецию белка. Характер таких контрольных последовательностей может быть разным, в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контрольные

последовательности, как правило, включают промотор, сайт рибосомного связывания и последовательность терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин “контрольные последовательности” включают как минимум все компоненты, присутствие которых является существенным для экспрессии и обработки, и также охватывают дополнительные компоненты, присутствие которых обеспечивает преимущества, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию.

[0120] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, как описывается авторами, включает нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH из антитела против FLT3 или антигенсвязывающую часть, как описывается авторами, соединенную внутри рамки с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Подобным образом в возможном варианте молекула нуклеиновой кислоты, как описывается авторами, включает нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL из антитела против FLT3, или антигенсвязывающую часть, как описывается авторами, соединенную внутри рамки с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

[0121] В еще одном возможном варианте осуществления согласно настоящему изобретению молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VH и/или VL “преобразуются” гены антитела полной длины. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие домены VH или VL, преобразуют в гены антитела полной длины путем вставки в вектор экспрессии, уже кодирующий константную область тяжелой цепи (CH) или константную область легкой цепи (CL), соответственно, таким образом, чтобы сегмент VH был функционально связан с сегментом(ами) CH в пределах вектора и/или сегмент VL был функционально связан с сегментом CL в пределах вектора. В еще одном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие домены VH и/или VL, преобразуют в гены антитела полной длины путем связывания, например, сшивания, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей участок CH и/или CL, с применением стандартных технологий молекулярной биологии.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелые и/или легкие цепи полной длины, затем экспрессируются из клетки, в которую они были включены, и антитело против FLT3 выделяют.

[0122] В некоторых вариантах осуществления каркасный(е) участок (участки) мутируют таким образом, чтобы образованный(е) в результате каркасный(е) участок (участки) имел(и) аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Возможно осуществление мутации в каркасном участке или константной области, например, для продления периода полувыведения антитела против FLT3. См., например, Публикацию PCT WO 00/09560. Также возможна мутация в каркасном участке или константной области для изменения иммуногенности антитела и/или для обеспечения центра для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. Согласно настоящему изобретению, возможны мутации антитела в одном или нескольких CDR или каркасных участках вариабельного домена или в константной области.

Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител

[0123] Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения композиций антител и антител и их антигенсвязывающих частей, описываемых авторами. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение касается способа получения антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части, как описывается авторами, который включает обеспечение клетки-хозяина (например, рекомбинантной клетки-хозяина), включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против FLT3 или описываемой авторами антигенсвязывающей части; культивирование вышеупомянутой клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или антигенсвязывающей части; и выделение полученного в результате антитела или антигенсвязывающей части. Антитела или антигенсвязывающие части, полученные путем такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, в контексте данного описания называются “рекомбинантными” антителами или антигенсвязывающими частями. Настоящее изобретение также обеспечивает клетки потомства таких клеток-хозяев и антитела или антигенсвязывающие части, вырабатываемые ими.

[0124] Термин “рекомбинантная клетка-хозяин” (или просто “клетка-хозяин”) в контексте данного описания означает клетку, в которую был включен рекомбинантный вектор экспрессии. По определению, рекомбинантная клетка-хозяин не встречается в природе. Настоящее изобретение обеспечивает клетки-хозяева, способные включать, например, вектор, как описывается авторами. Настоящее изобретение также обеспечивает клетки-хозяева, включающие, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и ту, и другую, антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, как описывается авторами. Следует понимать, что “рекомбинантная клетка-хозяин” и “клетка-хозяин” означают не только клетку конкретного субъекта, но и потомство такой клетки. Поскольку возможны определенные модификации в последующих поколениях из-за мутации или воздействия среды, ни одно потомство фактически не является идентичным родительской клетке, но такие клетки все равно охватываются термином “клетка-хозяин” в контексте данного описания.

[0125] Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела против FLT3 и их антигенсвязывающие части и векторы, включающие эти молекулы нуклеиновых кислот, применяют для трансфекции соответствующей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей. Трансформацию осуществляют любым известным способом включения полинуклеотидов в клетку-хозяин. Способы включения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих общеизвестны среди специалистов в данной области техники и включают декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот вводят в клетки млекопитающих вирусными векторами.

[0126] Вероятно, антитела, экспрессируемые разными линиями клеток или в организмах трансгенных животных, имеют отличные друг от друга профили гликозилирования. Однако все антитела, кодируемые приводимыми в данном документе молекулами нуклеиновых кислот или включающие приводимые в данном документе аминокислотные последовательности, составляют часть настоящего изобретения, независимо от состояния гликозилирования антител и в

целом независимо от наличия или отсутствия посттрансляционной(ых) модификации(й).

Фармацевтические композиции

5 [0127] Еще один вариант осуществления настоящего изобретения касается фармацевтической композиции, включающей в качестве активного ингредиента (или представляющей в качестве единственного активного ингредиента) антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, композиции антитела или биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению. В возможном варианте фармацевтическая композиция включает 10 фармацевтически приемлемое формообразующее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предназначены для ослабления, профилактики и/или лечения рака, например, описанного авторами рака. В некоторых вариантах осуществления рак находится в ткани, такой как кожа, легкое, кишечник, толстая кишка, яичник, головной мозг, предстательная 15 железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, кость, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка и поджелудочная железа.

[0128] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают одно или несколько антител против FLT3, антигенсвязывающие части, 20 композиции антител или биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению, например, одно или два антитела против FLT3, антигенсвязывающие части или биспецифически связывающиеся молекулы. В некоторых вариантах осуществления композиция включает одно антитело против FLT3 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающую 25 часть. В еще одном варианте осуществления композиция включает два отдельных антитела против FLT3 согласно настоящему изобретению или их антигенсвязывающие части.

[0129] В некоторых возможных вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает по меньшей мере одно антитело против 30 FLT3 или его антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению, например, одно антитело против FLT3 или его часть и одно или несколько дополнительных антител, нацеленных на один или несколько соответствующих рецепторов поверхности клетки, например, один или несколько связанных с раком рецепторов.

[0130] В некоторых возможных вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает по меньшей мере одно антитело против FLT3 или его антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению, например, одно антитело против FLT3 или его часть и один или несколько дополнительных агентов, выбранных, например, из иммуностимулирующих средств, вакцин, химиотерапевтических средств, противоопухолевых средств, антиангиогенных средств и ингибиторов тирозинкиназы.

[0131] В целом антитела, антигенсвязывающие части и биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению являются подходящими для введения в качестве композиции в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми формообразующими, например, как описано ниже.

[0132] Термин “формообразующее” применен для описания любого ингредиента, отличного от соединения(й) согласно настоящему изобретению. Выбор формообразующего(их) в значительной степени зависит от таких факторов, как конкретный режим введения, влияние формообразующего на растворимость и устойчивость и характер дозированной формы. В контексте данного описания “фармацевтически приемлемое формообразующее” включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и другие подобные физиологически совместимые средства. Примерами некоторых фармацевтически приемлемых формообразующих являются вода, солевой раствор, фосфатно-буферный раствор, декстроза, глицерин, этанол и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтение отдают включению в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие агенты или малое количество вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгаторы, консерванты или буферы, продлевающие срок хранения или эффективность антитела.

[0133] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению и способы их получения станут легко очевидны специалистам в данной области техники. Такие композиции и способы их получения описаны, например, в публикации *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing

Company, 1995). Фармацевтические композиции предпочтительно производят согласно условиям НПП (надлежащей производственной практики).

[0134] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению производят, упаковывают или реализуют без упаковки, в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз. В контексте данного описания “стандартная доза” представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, включающей заданное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента в целом равняется дозе активного ингредиента, которая подлежит введению субъекту, или желательной фракции такой дозы, например, половине или трети такой дозы.

[0135] Рецептуры фармацевтической композиции, подходящей для парентерального введения, как правило, включают активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие композиции производят, упаковывают или реализуют на рынке в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Подходящие для инъекций композиции производят, упаковывают или реализуют на рынке в форме стандартной дозы, например, в ампулах или многодозовых контейнерах, содержащих консервант. К композициям для парентерального введения относятся, помимо прочих, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных индифферентных основах, пасты и т. п. Такие композиции также включают один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, помимо прочих, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В некоторых вариантах осуществления композиции для парентерального введения активный ингредиент предусмотрен в сухой (т. е., порошковой или гранулированной) форме для восстановления влагосодержания подходящей индифферентной основой (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. К композициям парентерального назначения также относятся водные растворы, содержащие формообразующие, такие как соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно обеспечивающие уровень pH от 3 до 9), однако для некоторых случаев применения более подходящей рецептурой является стерильный неводный раствор или высушенная форма в сочетании с подходящей индифферентной основой, такой как стерильная апиrogenная вода. К типичным

формам для парентерального введения относятся растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, растворы в пропиленгликоле или декстрозе. Такие дозированные формы в случае потребности соответствующим образом буферируют. К другим парентерально вводимым пригодным к применению композициям относятся те, которые включают активный ингредиент в микрокристаллической форме или липосомный препарат.

Терапевтическое применение антител и композиций согласно настоящему изобретению

[0136] В некоторых вариантах осуществления антитела против FLT3 и их антигенсвязывающие части, композиции антител против FLT3 и биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению применяют для усиления или активизации иммунной системы пациента (например, млекопитающего, такого как человек), который в этом нуждается, например, путем стимуляции активности FLT3. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет ослабленный иммунитет. В некоторых возможных вариантах осуществления врач повышает противораковую активность собственной иммунной системы пациента путем введения антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, композиции или биспецифически связывающейся молекулы, как описывается авторами. Например, врач повышает противораковую активность у пациента путем введения антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, композиции антитела или биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению, по отдельности или в комбинации с другими терапевтическими агентами (последовательно или одновременно).

[0137] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, композиции и биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению предназначены для применения в лечении рака, например, FLT3-положительного рака. Рак может находиться в одной или нескольких тканях, таких как кожа, легкое, кишечник, толстая кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, кость, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка и поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, композиции или биспецифически связывающиеся молекулы согласно

настоящему изобретению предназначены для применения в лечении опухолей с низкой инфильтрацией иммунных клеток (например, инфильтрацией дендритных клеток).

[0138] В некоторых вариантах осуществления к видам рака, поддающимся лечению антителами против FLT3, антигенсвязывающими частями, композициями и биспецифически связывающимися молекулами согласно настоящему изобретению, относятся, например, меланома (например, меланома кожи, слизистых оболочек или глаза; меланома поздней стадии или метастатическая меланома), базальноклеточный рак кожи, глиобластома, глиома, глиосаркома, астроцитома, менингиома, нейробластома, аденокортикальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак ротовой полости, рак слюнной железы, носоглоточная карцинома, рак молочной железы, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак пищевода, рак желудочно-пищеводного соединения, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, первичный рак брюшной полости, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальная карцинома, карцинома яичника, рак фаллопиевой трубы, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевыводящих путей, рак уретера, почечноклеточная карцинома, рак почки, уrogenитальный рак, рак шейки матки, рак предстательной железы, фибросаркома, липосаркома, рабдомиосаркома, остеосаркома, гистиоцитома, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, рак аппендикса, рак клеток Меркеля поздней стадии, множественная миелома, саркомы, хориокарцинома, эритролейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, тучноклеточный лейкоз, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, моноцитарная лимфома, ЧТЛВ-ассоциированный Т-клеточный лейкоз / лимфома, мезотелиома и солидные опухоли. Рак может быть, например, на ранней, промежуточной, поздней, местнораспространенной или метастатической стадии и может быть рецидивирующим или невосприимчивым к другим средствам терапии (например, другим средствам терапии против FLT3

или контрольным ингибиторам), или возможно отсутствие стандартных средств терапии.

[0139] В некоторых вариантах осуществления состояния, поддающиеся лечению антителами против FLT3, антигенсвязывающими частями, композициями и биспецифически связывающимися молекулами согласно настоящему изобретению, включают, например, меланому (например, меланому кожи, меланому слизистых оболочек или меланому глаза), глиому, мультиформную глиобластому, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, почечноклеточная карцинома, рак почки, лимфому (например, В-клеточную лимфому или неходжкинскую лимфому), лейкоз (например, острый миелоидный лейкоз), множественную миелому, плазмоклеточное новообразование и миелодиспластические и/или миелопролиферативные заболевания.

[0140] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, композиции или биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению предназначены для применения в лечении иммунологического нарушения.

[0141] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифически связывающуюся молекулу применяют для лечения пациента с наличием или с риском ослабления иммунитета (например, вследствие химиотерапии или лучевой терапии). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифически связывающуюся молекулу применяют для размножения стволовых клеток у пациента после трансплантации стволовых клеток.

[0142] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифически связывающаяся молекула предназначены для применения в лечении вирусных и/или паразитарных инфекций, например, при которых патогены ингибируют иммунный ответ хозяина. Патогеном является, например, ВИЧ, гепатит (А, В, или С), вирус папилломы человека (ВРЧ), вирус лимфоцитарного хориоменингита (ВЛХМ), аденовирус, флавивирус, эховирус, риновирус, коксаки-вирус, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус,

вирус вакцины, человеческий Т-клеточный лимфотропный вирус (ЧТЛВ), человеческий цитомегаловирус (ЧЦМВ), вирус денге, вирус моллюска, вирус полиомиелита, вирус бешенства, вирус Джона Каннингема (ДК), вирус арбовирусного энцефалита, вирус иммунодефицита обезьян (ВИО), грипп, герпес, лямблия, малярия, лейшмания, золотистый стафилококк, микобактерия туберкулеза или синегнойная палочка.

[0143] Термины “лечить” и “лечение” касаются способа облегчения или устранения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из сопровождающих его симптомов. В контексте данного описания “облегчение” болезни, нарушения или состояния означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов болезни, нарушения или состояния. Кроме того, в данном описании ссылки на “лечение” включают ссылки на лечебный, паллиативный и профилактический эффект.

[0144] “Терапевтически эффективное количество” касается количества вводимого терапевтического агента, которое в определенной мере должно ослаблять один или несколько симптомов поддающегося лечению нарушения. Результатом применения терапевтически эффективного количества противоракового терапевтического средства является, например, задержка роста опухоли, уменьшение размеров опухоли, продление выживания, удаление раковых клеток, замедление или снижение прогрессирования, реверсирование метастазов или другие клинические конечные точки, которые являются желательными с точки зрения профессиональных медиков.

[0145] Описываемые авторами антитела против FLT3 или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифически связывающиеся молекулы вводят по отдельности или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в форме любой их комбинации). Таким образом, описываемые авторами фармацевтические композиции, способы и варианты применения также охватывают варианты осуществления комбинаций (совместного введения) с другими активными средствами, как описывается ниже.

[0146] В контексте данного описания термины “совместное введение” “введенный вместе с” и “в комбинации с” в отношении антител против FLT3 и их антигенсвязывающих частей, композиций антитела и биспецифически связывающихся молекул согласно настоящему изобретению с одним или

несколькими другими терапевтическими средствами означают, и имеют отношение и включают следующее:

- а) одновременное введение такой комбинации антитела / антигенсвязывающей части / композиции антитела / биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического(их) средства (средств) пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты рецептируют вместе в единую дозированную форму, которая высвобождает вышеупомянутые компоненты по сути одновременно в организме вышеупомянутого пациента,
- б) по сути одновременное введение такой комбинации антитела / антигенсвязывающей части / композиции антитела / биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического(их) средства (средств) пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты рецептируют по отдельности в отдельные дозированные формы, которые принимаются вышеупомянутым пациентом по сути одновременно, после чего вышеупомянутые компоненты высвобождаются по сути одновременно в организме вышеупомянутого пациента,
- в) последовательное введение такой комбинации антитела / антигенсвязывающей части / композиции антитела / биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического(их) средства (средств) пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты рецептируют по отдельности в отдельные дозированные формы, принимаемые последовательно вышеупомянутым пациентом со значительным интервалом времени между их введением, после чего вышеупомянутые компоненты высвобождаются в разное время со значительным интервалом в организме вышеупомянутого пациента; и
- г) последовательное введение такой комбинации антитела / антигенсвязывающей части / композиции антитела / биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического(их) средства (средств) пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты рецептируют вместе в единую дозированную форму, которая контролируемым образом высвобождает вышеупомянутые компоненты, после чего они одновременно, последовательно и/или с частичным совпадением по времени высвобождаются в одно и/или разное время в

организме вышеупомянутого пациента, причем каждую часть вводят одинаковым или разными путями.

5 **[0147]** Антитела против FLT3 или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифически связывающиеся молекулы согласно
настоящему изобретению вводят без дополнительного терапевтического
лечения, т. е., в качестве отдельной терапии (монотерапии). В альтернативном
варианте лечение антителами против FLT3 или их антигенсвязывающими
частями, композициями антител или биспецифически связывающимися
молекулами согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере одно
10 дополнительное терапевтическое лечение (в качестве комбинированной
терапии), например, другое иммуностимулирующее средство, противораковое
средство (например, химиотерапевтическое средство, противоопухолевое
средство, антиангиогенное средство или ингибитор тирозинкиназы) или вакцину
(например, противоопухолевую вакцину).

15 **[0148]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его
антигенсвязывающую часть, композицию антитела или биспецифически
связывающуюся молекулу вводят совместно или рецептируют с другим
медикаментом/лекарством для лечения рака. В возможном варианте
дополнительное терапевтическое лечение включает, например,
20 иммуностимулирующее средство, вакцину, химиотерапевтическое,
противоопухолевое или антиангиогенное средство, ингибитор тирозинкиназы,
и/или лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительное
терапевтическое лечение включает другое противораковое антитело.

25 **[0149]** Фармацевтические изделия, включающие антитело против FLT3 или
его антигенсвязывающую часть, композицию антитела или биспецифически
связывающуюся молекулу, как описано авторами, и по меньшей мере один
другой агент (например, химиотерапевтическое, противоопухолевое или
антиангиогенное средство) применяют в качестве комбинированного лечения
для одновременного, отдельного или последовательного введения в рамках
30 противораковой терапии. В возможном варианте другим агентом является любой
агент, подходящий для лечения конкретного вида рака, например, агент,
выбранный из группы, к которой относятся алкилирующие агенты, например,
производные платины, такие как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин;
растительные алкалоиды, например, паклитаксел, доцетаксел и/или иринотекан;

противоопухолевые антибиотики, например, доксорубин (адриамицин), даунорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон, дактиномицин, блеомицин, актиномицин, лютеомицин и/или митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан; антиметаболиты, например, фтороурацил и/или другие фторопиримидины; FOLFOX; осимертиниб; циклофосфамид; антрациклин; дакарбазин; гемцитабин или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления описываемые авторами антитела против FLT3 или его антигенсвязывающая часть, композиция антитела или биспецифически связывающуюся молекулу восстанавливают восприимчивость к другому агенту.

[0150] Антитело против FLT3 или его антигенсвязывающая часть, композицию антитела или биспецифически связывающуюся молекулу согласно настоящему изобретению также применяют в комбинации с другими видами противораковой терапии, такими как терапия с применением вакцин, цитокинов, ингибиторов ферментов, иммуностимулирующих соединений и Т-клеток. К возможным вакцинам относятся вакцины, например, на основе белка, пептида или ДНК, содержащие один или несколько антигенов, соответствующим поддающимся лечению видам рака, или вакцины, включающие дендритные клетки вместе с антигеном. К подходящим цитокинам относятся, например, IL-2, IFN-гамма и GM-CSF. Примером типа ингибитора ферментов, обладающего противораковой активностью, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Также предусмотрена адоптивная Т-клеточная терапия, касающаяся различных технологий иммунотерапии, включающих размножение или инженерию собственных Т-клеток пациентов для распознавания и атаки на их опухоли.

[0151] Также предусмотрена возможность применения антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, композиции антитела или биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению в смежной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Они представляют собой синтетические, главным образом производные от хиназолина молекулы малой молекулярной массы, взаимодействующие с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецепторов и ингибируют вызванное лигандом фосфорилирование рецептора, например, путем конкуренции за внутриклеточный сайт связывания Mg-АТФ.

[0152] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, композицию антитела или биспецифически связывающуюся молекулу применяют в комбинации с медикаментом / лекарством, опосредующим активацию иммунной системы, включая, помимо
 5 прочих, агент, модулирующий экспрессию или активность A2AR, A1AR, A2BR, A3AR, ADA, ALP, AXL, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD116, CD123, CD27, CD28, CD39, CD40, CD47, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), EGFR, FLT3, FLT3L, GAL9, GITR, HVEM, LAG-3, LILRB1, LY108, LAIR1, ICOS,
 10 IDO, IL2R, IL4R, KIR, LAIR1, MET, NKG2A, PAP, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, STING, TIGIT, TIM-3, TGFR-бета, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR10, TNFR2, VEGF, VEGFR, VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В некоторых вариантах осуществления агент усиливает активность, дифференциацию, пролиферацию или мобилизацию дендритных клеток. В
 15 некоторых вариантах осуществления агент представляет собой маломолекулярный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления агент является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с одной из вышеупомянутых молекул. Также предусмотрена возможность применения антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, композиции антитела или биспецифически связывающейся молекулы согласно
 20 настоящему изобретению в комбинации с цитокином (например, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 или IL-21), ингибитором EGFR, ингибитором VEGF и т. п.

[0153] В конкретных вариантах осуществления предусмотрена возможность применения антитела или его антигенсвязывающей части, композиции антитела
 25 или биспецифически связывающейся молекулы в комбинации с агентом, модулирующим экспрессию или активность FLT3L, CD40, AXL, TLR или PD-1.

[0154] Настоящее изобретение также предусматривает применение последовательностей (например, шести последовательностей CDR или VH и VL) антитела против FLT3 или описываемой авторами антигенсвязывающей части
 30 при получении рецептора химерного антигена, применимого согласно технологии CAR-T.

[0155] Следует понимать, что существует возможность применения антител и их антигенсвязывающих частей, композиций антител и биспецифически связывающихся молекул согласно настоящему изобретению согласно

описываемому авторами способу лечения при описываемом авторами лечении, и/или при производстве медикамента для описываемого авторами лечения.

Доза и путь введения

5 [0156] Антитела или их антигенсвязывающие части, композиция антител или биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению вводят в эффективном количестве для лечения соответствующего состояния, т. е., в таких дозах и в течение такого периода времени, которые необходимы для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество меняется в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, поддающееся лечению, возраст, пол и масса тела 10 пациента, и от того, вводят ли эти антитела в качестве отдельной терапии или в комбинации с одним или несколькими дополнительными видами лечения от рака.

15 [0157] Режимы дозирования регулируют для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, предусмотрена возможность введения единичной болюсной дозы, нескольких отдельных доз в течение определенного периода времени, или пропорциональное снижение или повышение дозы, диктуемое потребностями данной терапевтической ситуации. Особенное предпочтение 20 отдают рецептированию парентеральных композиций в форме дозированных единиц для облегчения введения и однородности доз. Форма дозированной единицы в контексте данного описания относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для пациентов / субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы создавать желаемый 25 терапевтический эффект, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Технические требования к формам дозированных единиц согласно настоящему изобретению в целом диктуются (а) уникальными характеристиками терапевтического средства и конкретным терапевтическим или профилактическим эффектом, который должен быть достигнут, и (б) 30 ограничениями, изначально присутствующими в области приготовления такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов, и находятся в прямой зависимости от этих факторов.

[0158] Таким образом, специалист в данной области техники на основе представленного авторами описания станет понятно, что дозу и режим

дозирования регулируют в соответствии со способами, общеизвестными среди специалистов в области терапии. То есть, максимальная переносимая доза легко поддается установлению, и эффективное количество, обеспечивающее обнаружимое терапевтическую полезность для пациента, определяют так же, как и временные требования к введению каждого агента для обеспечения обнаружимой терапевтической полезности для пациента. Соответственно, хотя в данном описании приведены определенные дозы и режимы введения, этими примерами никоим образом не ограничиваются дозы режимы введения, которые обеспечивают для пациента при практическом осуществлении настоящего изобретения.

[0159] Следует заметить, что значения доз меняются в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению, и включают единичные или множественные дозы. Также следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования подлежат регулированию со временем в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением лица, занимающегося введением или наблюдением за введением композиций, и указанные авторами диапазоны доз являются лишь примерами и не ограничивают объем изобретения или практическое воплощение композиции. Кроме того, режим дозирования композиций согласно настоящему изобретению основывается на разных факторах, включая тип заболевания, возраст, массу тела, пол, медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретное применяемое антитело. Таким образом, режимы дозирования разнятся в широких пределах, но поддаются определению в установленном порядке с применением стандартных способов. Например, дозы регулируют на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, включающих клинические эффекты, такие как эффекты токсичного воздействия и/или данные лабораторных анализов. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное увеличение дозы, определяемое специалистом в данной области техники. Способы определения подходящих доз и режимов являются общеизвестными в данной области техники и станут понятны специалистам в данной области техники по ознакомлении с изложенными авторами идеями.

[0160] Эффективное количество для противоопухолевой терапии измеряют по способности к стабилизации прогрессирования болезни и/или облегчению

симптомов у пациента, предпочтительно для реверсирования прогрессирования болезни, например, путем уменьшения размера опухоли. Способность антитела, антигенсвязывающей части, композиции антитела или биспецифически связывающейся молекулы согласно настоящему изобретению к ингибированию рака оценивают путем *in vitro* анализов, например, как описывается в примерах, а также на соответствующих животных моделях, которые являются прогностическими в отношении эффективности для опухолей человека. Подходящие режимы дозирования выбирают с целью обеспечения оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, например, после введения в форме единой болюсной дозы или непрерывной инфузии, с возможностью регулирования дозировки согласно потребности в каждом отдельном случае.

[0161] Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифически связывающиеся молекулы согласно настоящему изобретению вводят любым способом введения пептидов, белков или антител, приемлемым для специалистов в данной области техники и, как правило, подходящим для парентерального введения. В контексте данного описания “парентеральное введение” включает любой путь введения, характеризующийся физическим прорывом ткани субъекта и введением через прорыв в ткани, что в целом приводит к прямому введению в кровоток, в мышцы или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает, помимо прочего, введение путем инъекции, путем внесения через хирургический разрез, путем внесения через проникающую сквозь ткань нехирургическую рану и т. п. В частности, парентеральное введение предполагает включение, помимо прочего, подкожной, внутрибрюшинной, внутримышечной, интрастеральной, интракостеральной, внутривенной, внутриартериальной, интратекальной, интрауретральной, интракраниальной, внутриопухолевой и внутрисуставной инъекции или инфузии. Конкретные варианты осуществления включают внутривенный и подкожный пути введения.

Диагностическое применение и композиции

[0162] Антитела и антигенсвязывающие части согласно настоящему изобретению также применимы в диагностических процессах (например, *in vitro* или *ex vivo*). Например, антитела и антигенсвязывающие части применимы для обнаружения и/или измерения уровня FLT3 в образце из организма пациента

(например, образце ткани или жидкости организма, такой как воспалительный выпот, кровь, сыворотка, кишечный сок, слюна или моча). Подходящими способами обнаружения и измерения являются иммунологические способы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), хемилюминесцентные анализы, радиоиммунные анализы и иммуногистология. Раскрытие настоящего изобретения также охватывает комплекты (например, диагностические комплекты) включающие антитела и описываемые авторами антигенсвязывающие части.

Изделия промышленного производства и комплекты

[0163] Настоящее изобретение также обеспечивает изделия промышленного производства, например, комплекты, включающие один или несколько контейнеров (например, контейнеры одноразового или многоразового использования), включающих фармацевтическую композицию антитела против FLT3 или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифически связывающуюся молекулу, которая описана авторами, необязательно дополнительную биологически активную молекулу (например, другое терапевтическое средство) и инструкции к применению. В возможном варианте антитело или антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифически связывающуюся молекулу и необязательную дополнительную биологически активную молекулу упаковывают отдельно в подходящую тару, например, флакон или ампулу, выполненные из инертного стекла или пластика. В некоторых вариантах осуществления флакон или ампула содержит концентрированный запас (например, 2х, 5х, 10х или более) антитела или антигенсвязывающей части, композиции или биспецифически связывающейся молекулы и необязательно биологически активной молекулы. В некоторых вариантах осуществления изделия промышленного производства, такие как комплекты, включают медицинское устройство для введения антитела или антигенсвязывающей части, композиции или биспецифически связывающейся молекулы и/или биологически активной молекулы (например, шприц и иглу); и/или соответствующий разбавитель (например, стерильную воду и нормальный солевой раствор). Настоящее изобретение также включает способы производства вышеупомянутых изделий.

[0164] Если в данном описании нет иного определения, научные и технические термины, применяемые в связи с раскрытием настоящего

изобретения, имеют значения в общем понимании для специалистов в данной области техники. Типичные способы и материалы описываются ниже, хотя в практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения также предусмотрена возможность применения способов и материалов, подобных или эквивалентных тем, которые описаны авторами. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, имеет преимущественную силу.

[0165] В целом номенклатура и технологии, применяемые в связи с описываемыми авторами культивированием клеток и культур, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой, аналитической химией, синтетической органической химией, медицинской и фармацевтической химией и химией и гибридизацией белков и нуклеиновых кислот, являются хорошо известными и общеприменимыми среди специалистов в данной области техники. Ферментные реакции и технологии очистки осуществляют в соответствии с техническими условиями производителей, согласно общепринятым в данной области техники способам выполнения, или как описывается авторами.

[0166] Кроме того, если контекст не требует иного, термины, употребляемые в единственном числе, охватывают и форму множественного числа, а термины, употребляемые во множественном числе, охватывают и форму единственного числа. Во всех технических условиях и вариантах осуществления слова “иметь” и “включать” или их варианты, такие как “имеет”, “имеющий”, “включает” или “включающий”, следует понимать как предполагающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, а не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

[0167] Все упомянутые авторами публикации и другие источники включены путем ссылки в их полном объеме. Хотя авторами было упомянуто много документов, это упоминание не означает признание того, что любой из этих документов составляет часть общедоступных сведений в данной области техники.

[0168] Для лучшего понимания раскрытия настоящего изобретения ниже представлены примеры. Эти примеры имеют лишь пояснительное предназначение, и их никоим образом не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Клонирование антител против FLT3 из В-клеток крысы

Материалы и способы

5 [0169] Антитела против FLT3 человека выделяли из репертуара антител, полученного от крыс OmniRat[®] (Osborn et al., *J Immunol.* **190(4)**: 1481 - 90 (2013)), трансгенной породы крыс от Ligand Pharmaceuticals Inc., вырабатывающих антитела с полностью человеческими идиотипами. Клонирование полученных от крыс генов антител из отобранных из отдельных клеток секретирующих антитела В-клеток (ASC) выполняли при помощи 10 технологии обнаружения антител Symplex[™] (Meijer et al., *J Mol Biol* **358(3)**: 764 - 72 (2006)).

[0170] Конструкции репертуара антител, кодирующие полностью человеческие иммуноглобулины в формате IgG₁-LALA (см. ниже), трансфицировали в клетки НЕК293. Супернатанты клеток отбирали на 15 связывание с FLT3, экспрессируемой на поверхности клеток CHO, применяя проточную цитометрию в формате высокой пропускной способности. Реагирующие с FLT3 клоны анализировали путем секвенирования ДНК и извлекали кодирующие антитело последовательности ДНК. Выбранные клоны антитела экспрессировали и функционально испытывали, как описывается ниже.

20 [0171] Миссенс-мутации на аминоконцах тяжелой и легкой цепей, которые включали путем применения вырожденных праймеров в выполняемом при помощи Symplex[™] клонировании кодирующих антитело фрагментов кДНК, корректировали обратно до последовательности зародышевой линии. В Таблице 1 показаны нуклеотидные последовательности вариабельного домена тяжелой и 25 легкой цепи зародышевых антител, которые обозначены как 17566, 17526, 17667, 17679, 17494, 17543 и 17497. Процесс коррекции включает коррекцию последовательности аминоконца до зародышевой линии, а также оптимизацию использования кодона. Мишени для подбора к человеческим последовательностям зародышевой линии распознавали путем поиска гомологии 30 blastов для вариабельных участков тяжелой цепи и легкой цепи. Таблица 1 также включает последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи для версии антитела 17667, которая не была подвергнута коррекции зародышевой линии (17667.0).

[0172] Белковые последовательности переменных доменов, константных областей и гиперпеременных участков (CDR) антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497 показаны в Таблице 2, Таблице 3 и Таблице 4, соответственно.

5 Результаты

[0173] В Таблице 1 показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497.

Таблица 1: Нуклеотидные последовательности переменных доменов антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497

Ab	Последовательность (от 5' до 3')	SEQ
17566 VH	CAAGTGACACTGAAGGAGTCCGGCCCAAGTGCTGGTGAAGCCCACCG AGACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCTGGCTTCTCCTTTAACAAT GCCAGGATGGGAGTGAAGTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCC TGGAGTGGCTGGCTCACATCTTCAGCAATGACGAGAAGTCCTACAGC ACATCTCTGAAGAGCAGGCTGACCATCTCTAAGGATATCTCCAAGAG CCAGGTGGTGTGCTGACAATGACCAACATGGACCCCGTGGATACAGCC ACCTACTATTGTGCTAGAATCGTGGGATACGGATCTGGATGGAGGCT GCTGGGCGACTATTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT	1
17526 VH	CAAGTGACACTGAAGGAGTCTGGCCCAAGTGCTGGTGAAGCCCACCG AGACACTGACCCTGACATGCACCATCTCTGGCTTCTCCCTGGGCAAC GCCAGGATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCC TGGAGTGGCTGGCTCACATCTTTAGCAATGACGAGAAGTCCTACAGC ACCTCTCTGAAGAGCAGACTGACAATCTCTAAGGATACCTCCAAGAG CCAGGTGGTGTGCTGACAATGACCAACATGGACCCCTGTGGATACAGCC ACCTACTATTGTGCTCGCATCGTGGGCTACGTGGACTGGCTGTGCTGCC ATTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT	11
17667 VH	CAAGTGACACTGAAGGAGTCTGGCCCAAGTGCTGGTGAAGCCCACCG AGACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGAGCAAC GCCAGGATGGGCGTGAAGTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCC TGGAGTGGCTGGCTCACATCTTTCCAATGACGAGAGACTTTACTCC CCCAGCCTGAAGAGCCGCTGACAATCTCTAAGGGCACCTCTAAGTC CCAGGTGGTGTGCTGACAATGACCAACATGGACCCCTGTGGATACAGCC ACCTACTATTGTGCTAGGATCGTGGGCTACGTGGACTGGCTGTGCTGCC ATTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT	21
17679 VH	CAAGTGACAGCTGCAGGAGTCCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTTCTC AGACCCTGTCCCTGACCTGCACAGTGAGCGGAGGATCTATCTCCAGC GGAGGATACTATTGGTCTTGGATCAGACAGCACCCAGGCAAGGGCC TGGAGTGGATCGGCTACATCTACTATAGCGGCAGGACAACTATAAT CCCTCCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGAGGACACATCTAAGA ACCAGTTCTCTCTGAAGGTGTCTTCCGTGACCGCCGCTGATACAGCC GTGTACTATTGTGCTCGCGACCAGGATGGCTCCGGCTGGTACTTTGA CTATTGGGGCCAGGGCGCCCTGGTGACCGTCTCGAGT	31
17494 VH	CAAGTGACAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCC AGACCCTGTCTCTGACCTGCACTGTGTCCGGAGGAAGCATCTCCAGC GGAGGATACTATTGGTCTTGGATCAGGCAGCACCCAGGCAAGGGCC TGGAGTGGATCGGCTACATCTACTATAGCGGCTCTACATACTATAAC CCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGACACAAGCAAGAA TCAGTTCTCTCTGAAGGTGTCTTCCGTGACCGCCGCTGATACAGCCGT GTACTATTGTGCTAGGGACCTGGATGGCTCCGGCTGGTACTTTGACT ATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGT	41

Ab	Последовательность (от 5' до 3')	SEQ
17543 VH	CAAGTGACCCTGAAGGAGTCCGGCCAGTGCTGGTGAAGCCCACCG AGACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCTGGCTTCTCCCTGATCAAC GCCAGAATGGGAGTGACATGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCC TGGAGTGGCTGGCTCACATCTTTAGCAATGACGAGAAGTCCTACAGC ACCTCTCTGAAGAGCAGGCTGACAATCTCTAAGGATACCTCCAAGAG CCAGGTGGTGTGACAATGACCAACATGGACCCTGTGGATACAGCC ACCTACTATTGTGCTAGGATCCCAGGCTATTCTCGGGGCTGGGACTA CTATTACTATGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCG TCTCGAGT	51
17497 VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCAGGACTGGTGAAGCCATCTG GCACCCTGTCCCTGACATGCGCCGTGAGCGGAGGATCTATCTCCAGC ACCAACTGGTGGTCTTGGGTGAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGG AGTGGATCGGCGAGATCAGCCACAGGGGCTCTACCAACTACAATCCT TCCCTGAAGAGCCGGGTGACAATCTCCGTGGACAAGAGCAAGAATC AGTTCTCCCTGAAGCTGTCTTCCGTGACCGCCGCTGACACAGCCGTG TACTATTGTGCTCGCGATCCAGAGATGACCCTGTACTATTACTATGG CATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCAAGTGCAGTCTCGAGT	61
17667-0 VH	CAGGTGCAGCTACAGGAGTCTGGTCTGTGCTGGTGAACCCACAGA GACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTCTCACTCAGCAATG CTAGAATGGGTGTTAGCTGGATCCGTGAGCCCCAGGGAAGGCCCTG GAGTGGCTTGACACACATTTTTTCAAATGACGAAAGATCCTACAGTCC ATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGGCACCTCCAAAAGCC AGGTGGTCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACA TATTACTGTGCACGGATAGTAGGATATGTTGACTGGTTATTACCCTTT GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACGGTCTCGAGT	71
17566 VL	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGG CGACAGGGTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGGGCATCACAAAC GATCTGGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCTAAGCTGCT GATCTATGCCGCTTCTTCCCTGCAATCTGGCGTGCCATCCAGGTTCTC TGGATCCGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCTCTGC AACCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGTCTGCAAGATTACAATTAT CCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	2
17526 VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACACTGAGCGTGTCTCCAGG AGAGAGGGCCACCCTGTCTGCAGAGCTTCCCAGAGCGTGTCCAGCA ACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGGCTGCTG ATCTATGGCGCCAGCACAGAGCTACAGGAATCCCTGCTCGCTTCTC TGGATCCGGAAGCGGCACAGAGTTTACCCTGACAATCTCTTCCCTGC AATCTGAGGACTTCGCCGTGTACTATTGTCAGCAATACAATCACTGG CCAATGTATACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	12
17667 VL	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACACTGAGCGTGTCTCCAGG AGAGAGGGCCACCCTGTCTGCAGAGCTTCCCAGAGCGTGTCCAGCA ACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGGCTGCTG ATCTATGGCGCCAGCACAGAGCTACAGGAATCCCTGCTCGCTTCTC TGGATCCGGAAGCGGCACAGAGTTTACCCTGACAATCTCTTCCCTGC AATCTGAGGACTTCGCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACAACAATTGG CCAATGTATACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	22
17679 VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCCGG AGAGAGGGCCACCCTGAGCTGCAGGGCCTCCCAGTCCGTGTCTCCT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGGCTGCTG ATCTACGACGCCAGCAACAGAGCTACCGGAATCCCTGCTCGCTTCTC CGGAAGCGGATCTGGCACAGACTTTACCCTGACAATCAGGTCTCTGG AGCCAGAGGATTTGCCCGTGTACTATTGTCAGCAGAGATCCAATTGG TGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	32

Ab	Последовательность (от 5' до 3')	SEQ
17494 VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGCCTGTCTCCAGG AGAGAGGGCCACCCTGTCTGCAGAGCTTCCCAGAGCGTGTCCAGCT ACCTGGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGGCTGCTG ATCTACGACGCCAGCAACAGAGCTACCGGAATCCCAGCTCGCTTCTC TGGATCCGGAAGCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCTTCCCTGG AGCCTGAGGATTTTCGCCGTGTACTATTGTCTCAGCAGAGATCTAATTGG CCCCCTCTGACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	42
17543 VL	GACATCCAGATGACACAGTCCCCTTCCAGCCTGAGCGCCTCTGTGGG CGACAGGGTGACCATCACATGCCGGGCCTCCCAGGGCATCAGAAAC GATCTGGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCGCC TGATCTATGCTGCTTCCACCCTGCAGAGCGGAGTGCCATCTAGGTTC TCCGGCAGCGGCTCTGGCACAGAGTTTACCCTGACAATCTCTTCCCT GCAGCCAGAGGATTTTCGCTACCTACTATTGTCTGCAGCACAATTCTT ACCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	52
17497 VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCCAGCGTGGG CGACAGAGTGACCATCACATGCAGGGCTTCTCGGGGCATCAGAAAC GATCTGGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCGCC TGATCTATGCCGCTTCTTCCCTGCAATCTGGCGTGCCATCCAGATTCT CTGGATCCGGAAGCGGAACCGAGTTTACCCTGACAATCAGCTCTCTG CAGCCAGAGGATTTTCGCTACATACTATTGTCTGCAGCACAATTCTTA CCCCCTGACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	62
17667-0 VL	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCGTTAGCAGC AACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTCAGCAGTATAATAACTG GCCCATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATTAAG	72

SEQ: SEQ ID NO.

5 [0174] В Таблице 2 показаны установленные аминокислотные последовательности антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497. CDR выделены полужирным шрифтом / подчеркиванием.

Таблица 2: Аминокислотные последовательности вариабельного домена антител 17566, 17526, 17667, 17679, 17494, 17543 и 17497

Ab	Последовательность (от N-конца до C-конца)	SEQ
17566 VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS <u>GFSENNARMG</u> VNWIRQPPGKALEWLAH <u>IF</u> <u>SNDEK</u> SYSTSLKSRLTISKDISKSQVVLMTNMDPVDATATYY <u>CARIVGYGSGWR</u> <u>LLGDYWGQGLVTVSS</u>	3
17526 VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTIS <u>GFSLGNARMG</u> VSWIRQPPGKALEWLAH <u>IFS</u> <u>NDEK</u> SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYY <u>CARIVGYVDWLL</u> <u>PFDYWGQGLVTVSS</u>	13
17667 VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS <u>GFSLSNARMG</u> VSWIRQPPGKALEWLAH <u>IF</u> <u>SNDEK</u> SYSPSLKSRLTISKGTSKSQVVLMTNMDPVDATATYY <u>CARIVGYVDWL</u> <u>LPDFYWGQGLVTVSS</u>	23
17679 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <u>GGSISSGGYY</u> WSWIRQHPGKGLEWIGY <u>IY</u> <u>YSGRT</u> NYNPSLKSRTISEDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYY <u>CARDQDGS GWY</u> <u>FDYWGQGLVTVSS</u>	33
17494 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <u>GGSISSGGYY</u> WSWIRQHPGKGLEWIGY <u>IY</u> <u>YSGST</u> YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY <u>CARDLDGS GWYF</u> <u>DYWGQGLVTVSS</u>	43
17543 VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS <u>GFSLINARMG</u> VTWIRQPPGKALEWLAH <u>IFS</u> <u>NDEK</u> SYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYY <u>CARIPGYSRGWD</u> <u>YYYYGMDVWGQGMTVTVSS</u>	53

Ab	Последовательность (от N-конца до C-конца)	SEQ
17497 VH	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVS GGSSISSTN WSWVRQPPGKGLEWIGE ISHRGST NYNPSLKSRLTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVVY CARDPEMTLYYY YGMDEVWGQGT TVTVSS	63
17667-0 VH	QVQLQESGPVLVKPTETLTCTCTVS GFSLSNARMG VSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDR SYSPSLKSRLTISKGTSKSQVVLMTMTNMDPVDATATYY CARIVGYVDWL LPFDYW GQGT	73
17566 VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS OGITND LGWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLODYNYPWTF GQGTKVEIK	4
17526 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVVY COQYNHWPMYTF GQGTKLEIK	14
17667 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVVY COQYNHWPMYTF GQGTKLEIK	24
17679 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTIRSLPEPDAVYY COORSNWWTF GQGTKVEIK	34
17494 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEPDAVYY COORSNWPPLTF GGGKVEIK	44
17543 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIY AASLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLOHNSYPWTF GQGTKVEIK	54
17497 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS RGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIY AASLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLOHNSYPLTF GGGKVEIK	64
17667-0 VL	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVVY COQYNHWPMYTF GQGTKLEIK	74

SEQ: SEQ ID NO.

[0175] В Таблице 3 показаны аминокислотные последовательности константной области тяжелой и легкой цепи (CH и CL, соответственно). “IgG₁-LALA” означает присутствие мутаций “LALA” в тяжелой цепи (L234A/L235A, пронумерованных в соответствии с системой нумерации IMGT[®]), о которых известно, что они снижают эффекторную функцию Fc области антител IgG₁ (Hezareh et al., *J Virol.* (2001) **75(24)**: 12161 - 8; Hessel et al., *Nature* (2007) **449(7158)**: 101 - 4).

Таблица 3: Аминокислотные последовательности константной области антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497

Фрагмент	Последовательность (от N-конца до C-конца)	SEQ
IgG ₁ -LALA CH, добавленный к VH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	75
Каппа CL, добавленный к VL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	76

SEQ: SEQ ID NO.

[0176] В Таблице 4 показаны аминокислотные последовательности CDR тяжелой и легкой цепи антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497, причем CDR определены в соответствии с системой IMGT®.

5 **Таблица 4:** Аминокислотные последовательности CDR антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497

Ab	Последовательность (от N-конца до C-конца)					
	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
17566	GFSFNAR MG SEQ: 5	IFSNDK SEQ: 6	CARIVGYGSGWRLLGDY W SEQ: 7	QGITND SEQ: 8	AAS SEQ: 9	CLQDYNYPWT F SEQ: 10
17526	GFSLGAR MG SEQ: 15	IFSNDK SEQ: 16	CARIVGYVDWLLPFDYW SEQ: 17	QSVSSN SEQ: 18	GAS SEQ: 19	CQQYNHWPMY TF SEQ: 20
17667, 17667-0	GFSLSNARM G SEQ: 25	IFSNDER SEQ: 26	CARIVGYVDWLLPFDYW SEQ: 27	QSVSSN SEQ: 28	GAS SEQ: 29	CQQYNNWPMY TF SEQ: 30
17679	GGSISSGGY Y SEQ: 35	IYYSGR SEQ: 36	CARDQDGS GWYFDYW SEQ: 37	QSVSSY SEQ: 38	DAS SEQ: 39	CQQRSNWWTF SEQ: 40
17494	GGSISSGGY Y SEQ: 45	IYYSGR SEQ: 46	CARDLDGS GWYFDYW SEQ: 47	QSVSSY SEQ: 48	DAS SEQ: 49	CQQRSNWPPLT F SEQ: 50
17543	GFSLINARM G SEQ: 55	IFSNDK SEQ: 56	CARIPGYSRGWDY YYYG MDVW SEQ: 57	QGIRND SEQ: 58	AAS SEQ: 59	CLQHNSYPWT F SEQ: 60
17497	GGSISSTNW SEQ: 65	ISHRGST SEQ: 66	CARDPEMTLYYYGMD VW SEQ: 67	RGIRND SEQ: 68	AAS SEQ: 69	CLQHNSYPLTF SEQ: 70

SEQ: SEQ ID NO:

10 **[0177]** В Таблице 5 показана информация о SEQ ID NO для антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497. Если не указано иного, последовательности являются аминокислотными последовательностями.

Таблица 5: SEQ ID NO для антител 17566, 17526, 17667, 17667-0, 17679, 17494, 17543 и 17497

Название	VH nt	VL nt	VH aa	VL aa	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
17566	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
17526	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
17667	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
17679	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
17494	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
17543	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
17497	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
17667-0	71	72	73	74	25	26	27	28	29	30

nt: нуклеотид

aa: аминокислота

Пример 2. *In vitro* функциональный скрининг антител против FLT3 в анализе пролиферации EOL-1

[0178] В этом примере описана *in vitro* функциональная оценка ряда
 5 моноклональных антител против FLT3 с целью распознавания лидерных
 кандидатов с агонистической активностью. Антитела оценивали на их
 способность к стимуляции пролиферации экспрессирующей FLT3 линии
 раковых клеток EOL-1.

Материалы и способы

[0179] Группу антител против FLT3 оценивали *in vitro* на их способность к
 10 вызыванию пролиферации экспрессирующей FLT3 линии раковых клеток EOL-1.
 Клетки EOL-1 высевали в среду RPMI 1640 Glutamax, дополненную 0,5 % FBS и
 1 % P/S, и инкубировали в течение 5 дней с указанными антителами в конечной
 концентрации 25 мкг/мл. Пролиферацию клеток количественно определяли,
 15 используя реагент для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с
 инструкциями производителя.

Результаты

Пролиферация клеток EOL-1 после обработки антителами против FLT3
 показана на **ФИГУРЕ 1**. Способность к вызыванию пролиферации клеток EOL-1
 20 у разных испытуемых антител колебалась в широких пределах. Некоторые
 антитела в этом анализе не демонстрировали никакого эффекта, тогда как другие
 антитела обладали стимулирующей способностью, о чем свидетельствовала их
 способность к вызыванию пролиферации клеток EOL-1.

Пример 3. Клонирование аналогов контрольного антитела против 25 FLT3

Материалы и способы

[0180] Аминокислотные последовательности, кодирующие переменные
 домены тяжелой и легкой цепи аналога антитела в Таблице 6, получали из
 упомянутой патентной заявки. Белковые последовательности подвергали
 30 обратной трансляции в последовательности ДНК с использованием
 человеческого кодона. Соответствующие последовательности ДНК подвергали
 синтезированию генов и клонировали в векторы экспрессии, содержащие
 константную область тяжелой или легкой цепи человека, результатом чего была
 экспрессия цепей антитела полной длины. Изотип человеческого антитела,

выбранный для экспрессии, представлен в колонке формата антитела. Клетки СНО трансфицировали полученными в результате экспрессионными плазмидами с применением стандартной системы экспрессии белка. Супернатанты соответствующего антитела очищали с применением стандартной колоночной хроматографии для очистки с протеином А.

Таблица 6: Список ген-синтезированных аналогов антитела и соответствующий формат антитела

Антитело	Формат антитела	Источник
Аналог IMC-EB10	IgG ₁ /каппа	Патентная заявка США 2011/0091470 A1 (SEQ ID NO: 25 и 28)

ПРИМЕР 4. ПРЯМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3 С КЛЕТКАМИ СНО-S, ТРАНСФИЦИРОВАННЫМИ БЕЛКОМ FLT3 ЧЕЛОВЕКА, ЯВАНСКОГО МАКАКА ИЛИ МЫШИ

[0181] Этот пример демонстрирует связывание антител против FLT3 с белком FLT3 человека, мыши и яванского макака, временно экспрессируемым на клетках.

Материалы и способы

[0182] Связывание семи антител против FLT3 с белком FLT3 человека, яванского макака или мыши, экспрессируемым на клетках СНО-S, оценивали и сравнивали с показателем аналога IMC-EB10.

[0183] Антитела против FLT3 инкубировали с линией клеток хомяка СНО-S, временно экспрессирующих FLT3 человека, яванского макака или мыши, в течение 30 минут при 4 °C. Клетки дважды промывали, а затем инкубировали в течение дополнительных 20 минут с AF647-конъюгированным вторичным антителом против IgG человека (H+L). После этапа промывания связывание антитела обнаруживали с применением проточного цитометра iQue Screener PLUS (Sartorius) с высокой пропускной способностью, измеряя среднее геометрическое сигнала AF647 в каждой лунке. Каждый показатель концентрации анализировали на трех образцах, и 12-точечную кривую титрования генерировали для каждого антитела.

Результаты

Кривые связывания антител к FLT3 человека, яванского макака или мыши, экспрессируемых на клетках, показаны на **ФИГУРЕ 2**. Анализируемые антитела

связываются с воспроизводимым клетками FLT3 человека, яванского макака или мыши белком с разной силой и эффективностью.

ПРИМЕР 5. БЛОКИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА FLT3 С FLT3 ЧЕЛОВЕКА СЕМЬЮ АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ FLT3

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

[0184] Связывание антител против FLT3 с His-меченным слитым рецептором ECD рекомбинантной FLT3 человека (Sino Biological) и их блокирование / отсутствие блокирования FLT3L измеряли путем биослойной интерферометрии (BLI) на устройстве Octet QK384 (ForteBio). His-меченную FLT3 иммобилизовали на предварительно уравновешенном Anti-Penta-HIS (HIS1K) Biosensor (ForteBio) в течение 600 секунд, с последующей 600-секундной ассоциацией 500 нМ антител против FLT3 и 300-секундной ассоциацией 100 нМ FLT3L и 500 нМ mAb. Параллельно измеряли общий ответ связывания FLT3L с иммобилизованной FLT3. Данные анализировали в программе анализа данных FortéBio (8.2).

Результаты

[0185] Профили блокирования антител 17543, 17494, 17679, 17667, 17526, 17566, 17497 и контрольного mAb показаны на **ФИГУРЕ 3**. Ни одно из mAb против FLT3 не блокировало связывание FLT3L с FLT3 в условиях насыщения, за исключением аналога IMC-EB10, который полностью блокировал связывание лиганда с FLT3.

Пример 6. Блокирование связывания лиганда-Fc FLT3 с клетками CHO-S, трансфицированными FLT3 человека, яванского макака или мыши белок, семью антителами против FLT3

[0186] В этом примере описывается блокирование связывания белка лиганда-Fc FLT3 с белком FLT3 человека, яванского макака или мыши, экспрессируемым на клетках CHO-S, антителами против FLT3.

Материалы и способы

[0187] Связывание семи антител против FLT3 с белком FLT3 человека, яванского макака или мыши, экспрессируемым на клетках CHO-S, оценивали и сравнивали с показателем аналога IMC-EB10 в присутствии белка лиганда-Fc FLT3.

[0188] Антитела против FLT3 инкубировали с линией клеток хомяка CHO-S, временно экспрессирующих FLT3 человека, яванского макака или мыши, в

течение 30 минут при 4 °С. Клетки дважды промывали, а затем инкубировали в течение дополнительных 20 минут с AF647-конъюгированным Лиганд FLT3-Fc. После этапа промывания остаточное связывание AF647-конъюгированного белка лиганда-Fc FLT3 обнаруживали с применением проточного цитометра iQue
 5 Screener PLUS (Sartorius) с высокой пропускной способностью, измеряя среднее геометрическое сигнала AF647 в каждой лунке. Каждый показатель концентрации анализировали на трех образцах, и 12-точечную кривую титрования генерировали для каждого антитела.

Результаты

10 **[0189]** Кривые блокирования антител к FLT3 человека, яванского макака или мыши, экспрессируемых на клетках показаны на **ФИГУРЕ 4**. Анализируемые антитела не блокировали связывание AF647-конъюгированного белка FLT3L-Fc с воспроизводимым клетками FLT3 человека, яванского макака или мыши белком в любой испытываемой концентрации. Антитело-аналог IMC-
 15 EB10 частично блокировало связывание AF647-конъюгированного белка лиганда-Fc FLT3 с воспроизводимым клетками FLT3 человека, яванского макака или мыши белком.

ПРИМЕР 7. *IN VITRO* ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3 В АНАЛИЗЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ EOL-1

20 **[0190]** В этом примере описывается *in vitro* функциональная оценка семи моноклональных антител против FLT3 с целью демонстрации дозозависимой агонистической активности. Антитела оценивали на их способность к стимуляции пролиферации экспрессирующей FLT3 линии раковых клеток EOL-1. Лиганд FLT3 включали для сравнения.

Материалы и способы

25 **[0191]** Семь антител против FLT3 оценивали более подробно *in vitro* на их способность к вызыванию пролиферации экспрессирующей FLT3 линии раковых клеток EOL-1. Клетки EOL-1 высевали в среде RPMI 1640 Glutamax, дополненной 0,5 % FBS и 1 % P/S, и инкубировали в течение 5 дней с
 30 двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл. Двукратное титрование лиганда FLT3, начиная с 1 мкг/мл, включали для сравнения. Пролиферацию клеток количественно определяли, используя реагент для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

[0192] Пролиферация клеток EOL-1 после обработки антителами против FLT3 показана на **ФИГУРЕ 5**. Все семь испытанных антител демонстрировали дозозависимую стимулирующую способность, о чем свидетельствовала их способность к вызыванию пролиферации клеток EOL-1.

Пример 8. *In vitro* функциональная активность антител против FLT3 в разных форматах IgG в анализе пролиферации клеток

[0193] В этом примере описывается *in vitro* функциональная оценка моноклональных антител против FLT3 в формате IgG₁-LALA или IgG₂ с целью демонстрации дозозависимой агонистической активности. Антитела оценивали на их способность к стимуляции пролиферации экспрессирующей FLT3 линии раковых клеток EOL-1 и OCI-AML5.

Материалы и способы

[0194] Клетки EOL-1 и OCI-AML5 высевали в среде RPMI 1640 Glutamax, дополненной 0,5 % FBS и 1 % P/S, и инкубировали в течение 5 дней с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл. Пролиферацию клеток количественно определяли, используя реагент для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Пролиферация клеток EOL-1 и OCI-AML5 после обработки антителами против FLT3 показана на **ФИГУРАХ 6А и 6В**, соответственно. Оба изотипа, IgG₁-LALA и IgG₂, выбранных антител продемонстрировали дозозависимую стимулирующую способность, о чем свидетельствовала их способность к вызыванию пролиферации линий клеток EOL-1 и OCI-AML5.

ПРИМЕР 9. ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПЕРВИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD34⁺ ЧЕЛОВЕКА

[0195] В этом примере описывается *in vitro* функциональная оценка семи моноклональных антител против FLT3, а также выбранных антител в формате IgG₁-LALA или IgG₂, с целью подтверждения агонистической активности в первичных стволовых клетках CD34⁺ человека. Антитела оценивали на их способность к стимуляции пролиферации первичных стволовых клеток CD34⁺ человека. Лиганд FLT3 включали для сравнения.

Материалы и способы

[0196] Взятые из костного мозга человека первичные стволовые клетки CD34⁺ получали от Американской коллекции типовых культур (ATCC). Стволовые клетки CD34⁺ высевали в среде для размножения гематopoэтических клеток-предшественником (HPC) DXF (PromoCell), дополненной 50 нг/мл тромбопоэтина (TPO) и 25 нг/мл IL-3, и инкубировали в течение 7 дней с указанными антителами (25 мкг/мл) или лигандом FLT3 (250 нг/мл). Проллиферацию клеток количественно определяли, используя реагент для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

[0197] Проллиферация первичных стволовых клеток CD34⁺ человека после обработки антителами против FLT3 показана на **ФИГУРЕ 7**. Очевидно, что все семь испытанных антител против FLT3 вызывали пролиферацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека, что подтверждает их стимулирующую способность (левый график). Выбранные антитела в формате IgG₁-LALA и IgG₂ также вызывали пролиферацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека (правый график). Лиганд FLT3 включали в качестве положительного контроля.

ПРИМЕР 10. ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3 НА ДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ПЕРВИЧНЫХ CD34⁺ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

[0198] В этом примере описывается *in vitro* функциональная оценка двух моноклональных антител против FLT3 в формате IgG₁-LALA и IgG₂ с целью подтверждения агонистической активности в первичных стволовых клетках CD34⁺ человека. Антитела оценивали на их способность к вызыванию дифференциации первичных стволовых клеток CD34⁺ человека. Лиганд FLT3 включали для сравнения.

Материалы и способы

[0199] Взятые из костного мозга первичные стволовые клетки CD34⁺ получали от Американской коллекции типовых культур (ATCC). Стволовые клетки CD34⁺ высевали в среде IMDM, содержащем 10 % FBS, 1 % PenStrep, 10 mM HEPES, 20 мкМ 2-меркаптоэтанола, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Затем к культуре добавляли антитело против FLT3 (25 мкг/мл) или лиганд FLT3 (250 нг/мл) и клетки инкубировали в течение двух недель. Свежую

среду, содержащую добавки и антитело против FLT3 или лиганд FLT3, добавляли дважды в течение двухнедельного культивирования. Клетки собирали и экспрессию CD14 и CD1c анализировали путем проточной цитометрии. В
 5 общих чертах, клетки дважды промывали в PBS и окрашивали красителем Human BD Fc Block и Zombie Aqua Fixable Viability (маркер мертвых клеток) в течение 20 минут при 4 °C. Затем клетки промывали и окрашивали антителами против маркеров поверхности клеток (анти-CD14-FITC, анти-CD1c-PE-CF594, анти-CD11c-BV421, анти-CD123-PE, анти-CD141-PerCPy5.5) в течение 30
 10 минут при 4 °C в темноте. После двух окончательных промываний клетки анализировали с применением проточного цитометра BD FACSCelesta и программы FACS Diva. Анализы данных выполняли с применением GraphPad Prism 5.0.

Результаты

[0200] Агонистическую активность двух антител против FLT3 оценивали по
 15 их способности к вызыванию дифференциации первичных стволовых клеток CD34⁺ человека. Оба из испытанных антител против FLT3 были способны вызывать дифференциацию первичных стволовых клеток CD34⁺ человека, о чем свидетельствует их способность к увеличению частоты клеток CD14⁺ (**ФИГУРА 8А**) и CD1c⁺ (**ФИГУРА 8В**), а также субпопуляций дендритных клеток (пДК, кДК1 и кДК2) (**ФИГУРА 8С**) по сравнению с необработанным контрольным
 20 образцом. Лиганд FLT3 включали в качестве положительного контроля.

ПРИМЕР 11. *IN VIVO* ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FLT3 У МЫШЕЙ BALB/C

[0201] В этом примере описывается *in vivo* функциональная оценка
 25 моноклонального антитела против FLT3 в формате IgG₁-LALA или IgG₂ с целью подтверждения его способности к вызыванию размножения дендритных клеток и мобилизации у иммунокомпетентных мышей. Лиганд FLT3 включали для сравнения.

Материалы и способы

[0202] Сорок самцов мышей Balb/c делили на восемь экспериментальных
 30 групп по пять животных в каждой. Лечение начинали в 0-й день и заканчивали на 13-й день. Мыши получали внутрибрюшинную инъекцию индифферентной основы; антитела против FLT3 в дозе 0,1 мг/кг, 1 мг/кг или 10 мг/кг два раза в неделю; или внутрибрюшинную инъекцию 10 мкг FLT3L пять раз в неделю. По

окончании селезенку всех мышей собирали и анализировали путем проточной цитометрии. Клетки окрашивали антителами против CD3-FITC, против CD370-PE, против CD8-PerCP-Cy5.5, против CD11b-PE-Cy7, против I-A/I-E-APC-Cy, против CD11c-BV421, против Ly6C-FITC, против CD3-PerCP-Cy5.5 и против CD45R-APC. Zombie Aqua применяли для различения живых/мертвых клеток. Клетки анализировали с применением проточного цитометра BD FACSVerse и программы FACS Diva. Анализы данных выполняли с применением GraphPad Prism 5.0.

Результаты

[0203] *In vivo* агонистическую активность антитела против FLT3 в формате IgG₁-LALA или IgG₂ оценивали по его способности к вызыванию мобилизации дендритных клеток (ДК) у иммунокомпетентных мышей в трех разных дозах. Наиболее эффективная доза антитела против FLT3 в формате IgG₁-LALA и IgG₂ для вызывания мобилизации ДК в большинстве субпопуляций составляла 10 мг/кг, о чем свидетельствовало кратное увеличение количества клеток по сравнению с индифферентной основой (**ФИГУРЫ 9А и 9В**). Лиганд FLT3 включали в качестве положительного контроля.

ПРИМЕР 12. *IN VIVO* ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FLT3 У CD34 ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

[0204] В этом примере описывается *in vivo* функциональная оценка моноклонального антитела против FLT3 с целью подтверждения его способности к вызыванию мобилизации дендритных клеток у мышей с ослабленным иммунитетом, восстановленных стволовыми клетками CD34⁺ человека (“CD34 гуманизированные мыши”). Лиганд FLT3 включали для сравнения.

Материалы и способы

[0205] Тридцать шесть самок мышей NOD/Shi-SCID/IL-2R γ null (NCG) гуманизировали, используя гематопоетические стволовые клетки (CD34⁺), выделенные из пуповинной крови человека. Для исследования использовали только мышей с показателем гуманизации (hCD45/всего CD45) более 25 %. Мышей рандомизированно распределяли по шести экспериментальным группам, по шесть животных в каждой группе, на основе показателя гуманизации и донорства CD34. Лечение начинали в 0-й день и заканчивали на 11-й день. Мыши получали внутрибрюшинные инъекции индифферентной основы,

антитела против FLT3 в дозе 1 или 10 мг/кг два раза в неделю, или внутривенные инъекции 10 мкг FLT3L пять раз в неделю. По окончании селезенку и костный мозг каждой мыши собирали и анализировали путем проточной цитометрии. Клетки окрашивали антителами против CD11c-BV421, против CD11c-BV510, против CD14-BV650, против CD123-FITC, против CD3-PerCPVio700, против CD20-PerCPVio700, против CD56-PerCPVio700, против CD301-PE, против CD141-PE-Vio615, против hCD45-PE-Vio770, против CD370-APC и против HLA-DR-APC-Cy7. Fixable Yellow применяли для различения живых / мертвых клеток. Клетки анализировали, используя проточный цитометр Attune NxT и программу FACS Diva. Анализы данных выполняли с применением GraphPad Prism 5.0.

Результаты

[0206] *In vivo* агонистическую активность антитела против FLT3 в формате IgG₁-LALA или IgG₂ оценивали по его способности к вызыванию мобилизации ДК у CD34 гуманизированных мышей в двух разных дозах. В обоих форматах при обеих дозах антитело было способно вызывать мобилизацию ДК в большинстве подгрупп в селезенке (**ФИГУРЫ 10А и 10В**) и костном мозге (**ФИГУРЫ 10С и 10D**), о чем свидетельствовало кратное увеличение по сравнению с индифферентной основой. Лиганд FLT3 включали в качестве положительного контроля.

ПРИМЕР 13. ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FLT3 И ЛИГАНДА FLT3 НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ПЕРВИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ CD34⁺ ЧЕЛОВЕКА

[0207] Этот пример демонстрирует, что *in vitro* стимуляция человеческих первичных стволовых клеток CD34⁺ агонистическим антителом против FLT3 вызывает изменения в экспрессии генов, подобные вызываемым лигандом FLT3, что свидетельствует о подобных путях стимуляции.

Материалы и способы

[0208] Взятые из костного мозга первичные стволовые клетки CD34⁺ человека получали от Американской коллекции типовых культур (ATCC). Стволовые клетки CD34⁺ высевали в среде IMDM, содержащей 10 % FBS, 1 % PenStrep, 10 мМ HEPES, 20 мкМ 2-меркаптоэтанола, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Затем антитело против FLT3 (25 мкг/мл) или лиганд FLT3 (250 нг/мл) добавляли к культуре и клетки инкубировали в течение двух недель.

Свежую среду, содержащую добавки и антитело против FLT3 или лиганд FLT3, добавляли дважды в течение двухнедельного культивирования. Клетки собирали и РНК извлекали, применяя комплект RNeasy Micro (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. 100 нг РНК использовали в качестве исходного материала для анализа экспрессии генов на nCounter SPRINT Profiler. Экспрессию генов анализировали, применяя nCounter Myeloid Innate Immunity Panel (XT_PGX_huV2_Myeloid, NanoString Technologies), а программу nSolver Analysis применяли для контроля качества данных, нормализации и анализа дифференциальной экспрессии генов. Применяли корреляционный анализ по Спирману для анализа связи между исследуемыми генами.

Результаты

[0209] Как показано на **ФИГУРЕ 11**, испытываемое антитело в форматах IgG₁-LALA (левый график) и IgG₂ (правый график) вызывало изменения в экспрессии генов, подобные вызываемым лигандом FLT3. Сильная корреляция между наблюдаемыми изменениями в экспрессии генов, вызываемыми агонистическими антителами против FLT3 и лигандом FLT3, указывает на то, что они стимулируют первичные стволовые клетки CD34⁺ человека подобным образом.

ПРИМЕР 14. КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ FАВ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛА ПРОТИВ FLT3 С FLT3 ЧЕЛОВЕКА

[0210] В этом примере представлена оценка связывания Fab фрагментов антитела против FLT3 с доменом 1 FLT3 человека согласно измерению путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Материалы и способы

[0211] КДНК (номер доступа UniProt P36888), кодирующую домен 1 FLT3 человека, синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и Fc последовательность Ig человека (остатки P101-K330), результатом чего стало слияние Ig Fc с C-концом, и временно экспрессировали в экспрессирующей системе ExpiCHO™. После сбора супернатанты испытывали на связывание с Fab антитела против FLT3 путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением Cathera LSA. Чип HC200M (Cathera) функционализировали при помощи Fc Ig козы против человека (Southern Biotech) с применением аминного связывания. Чип активировали свежеприготовленным 0,4 М ЕДК, 0,1 М сульфохидридом NHS и 0,1 М MES, pH 5,5 (1:1:1 (объем/объем/объем)) в течение 5 мин,

соединяли с 75 мкг/мл Fc Ig против человека в 10 mM ацетата натрия, pH 4,5, в течение 10 мин и избыток реакционноспособных сложных эфиров гасили в течение 3 мин путем инъекции 1 M этаноламина, pH 8,5. Инструмент примировали в подвижном буфере (PBS pH 7,4, 0,01 % Tween-20, 0,5 мг/мл BSA). После примирования и промывания слитые белки FLT3 в супернатантах культуры фиксировали на отдельных точках чипа в течение 12 минут в двух образцах. Каждый из анализов Fab приготавливали в подвижном буфере. Кинетический анализ выполняли путем применения серии кинетических титрований Fab с повышением концентрации. Ассоциацию Fab выполняли в течение 5 минут и диссоциацию антигена записывали в течение 5 минут. После каждого цикла инъекций Fab поверхность регенерировали, применяя 0,45 % H₃PO₄ в течение 2x20 с и промывали в течение 5 мин в подвижном буфере. Данные связывающего ответа обрабатывали и анализировали с применением программного средства Carterra KIT. Обработанные данные приводили в соответствие с простой моделью связывания по Ленгмюру 1:1 для расчета констант скорости ассоциации (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты

[0212] Кинетика связывания Fab фрагментов антител 17566, 17526, 17667, 17543 и 17497 с доменом 1 FLT3 человека показаны ниже в Таблице 7. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, $n = 4$.

Таблица 7: Кинетика связывания Fab фрагментов антитела против FLT3 с доменом 1 FLT3 человека согласно измерениям путем SPR

Fab	k_{on} ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K_D (нМ)
17566	8,9 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,4
17526	11,5 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,4
17667	16,5 $\pm$ 0,6	14,5 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 0,3
17543	5,2 $\pm$ 0,9	9,9 $\pm$ 0,6	19,3 $\pm$ 1,4
17497	9,8 $\pm$ 0,9	3 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,4

ПРИМЕР 15. СВЯЗЫВАНИЕ С ЭПИТОПОМ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3

[0213] В этом примере описывается группирование антител против FLT3 в семейства эпитопов на основе моделей парной конкуренции, измеряемых путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Антитела, относящиеся к разным семействам эпитопов, распознают разные эпитопы на FLT3 ECD.

Материалы и способы

[0214] Исследование парной конкуренции антител выполняли путем SPR с применением устройства IBIS-MX96 (IBIS, Нидерланды). Антитела против FLT3 разводили до 3 мкг/мл в PBS и точно наносили на G-a-hu-IgG Fc SensEye®
 5 путем задержки на 15 минут с применением устройства Continuous Flow Microspotter, с последующим блокированием сайтов остаточного связывания Герцептином (трастузумабом) и химическим сшиванием с использованием комплекта SensEye FixIt (IBIS, Нидерланды). После приготовления сенсора анализ конкуренции антитела выполняли с применением классического сэндвич-
 10 анализа. Рекомбинантный антиген FLT3-his ECD (Sino Biological Inc) разводили в PBS, 0,05 % Tween 20, 200 нМ Герцептина в качестве подвижного буфера, вводили путем инъекции в концентрации 100 нМ и фиксировали массивом конъюгированных антител против FLT3. Затем выполняли отдельные инъекции каждого из антител против FLT3, разведенных до 100 нМ в подвижном буфере,
 15 для установления модели конкуренции антитела. Рекомбинантный лиганд FLT3 (100 нМ) включали в качестве аналита для характеристики блокирующих лиганд антител. Данные анализировали при помощи программы Epitope Binning 2.0 (Wasatch, США).

Результаты

20 [0215] **ФИГУРА 12** показывает узловой график mAb против FLT3 17667, 17566, 17526, и 17543, аналога IMC-EB10 и лиганда FLT3 (FLT3L), полученный на основе анализа связывания с эпитопом. Антитела против FLT3 распределяли по трем отдельным группам или корзинам. Корзина 1 (светло-серая) включала антитела 17526, 17543, 17566 и 17667, которые перекрестно блокировали друг
 25 друга, указывая на то, что эти антитела связываются с подобным эпитопом внеклеточного домена FLT3. Корзина 2 (серая) состояла из аналога IMC-EB10, который блокирует FLT3L в соответствии с опубликованными данными (Публикация Патента США 2011/0091470). Корзина 3 (белая) состояла только из антитела 17497, демонстрируя, что это антитело распознает эпитоп, отличный от
 30 других антител в анализе.

[0216] Таким образом, ни одно из испытанных антител не блокировало FLT3L, за исключением аналога IMC-EB10. Антитела 17526, 17543, 17566 и 17667 связываются с частично перекрывающимися эпитопами, тогда как 17497 связывается с отдельным эпитопом.

ПРИМЕР 16. КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FLT3 ПУТЕМ МУТАГЕНЕЗА И ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

[0217] Этот пример поясняет, каким образом эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами против FLT3 17566, 17526, 17667, 17543 и 17497, распределяются на внеклеточном домене (ВКД) FLT3. Линейные и конформационные эпитопы характеризовались подходом к мутагенезу и поверхностным плазмонным резонансом (SPR).

Материалы и способы

[0218] Белковые последовательности FLT3 человека и крысы (*Rattus norvegicus*) загружали с UniProt (номера доступа P36888 и A0A0G2JW59, соответственно) и выравнивали. Для картирования линейных эпитопов генерировали слитые белки Fc домена 1 ВКД FLT3 человека, имеющие 10 аминокислот, последовательно замененных на соответствующую последовательность FLT3 крысы в сегментах с совпадающими 5 аминокислотами. Конформационные эпитопы характеризовались сканирующим аланином мутагенезом домена 1 FLT3.

[0219] КДНК, кодирующую домен 1 FLT3 человека синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и Fc последовательность Ig человека (остатки P101-K330), результатом чего стало слияние Ig Fc с C-концом. Слитые Fc последовательности домена 1 FLT3 человека, дикого типа (wt) и мутированные, генерировали с применением стандартных технологий синтеза генов и белки временно экспрессировали в экспрессирующей системе ExpiCHO™. После сбора супернатанты испытывали на связывание с Fab антитела против FLT3 путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением Cathera LSA. Чип An HC200M (Cathera, Inc) функционализировали при помощи Fc Ig козы против человека (Southern Biotech) с применением аминного связывания. Чип активировали свежеприготовленным 0,4 М ЕДК, 0,1 М сульфо-NHS и 0,1 М MES, pH 5,5 (1:1:1 (объем/объем/объем)) в течение 5 мин, соединяли с 75 мкг/мл Fc Ig против человека в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5, в течение 10 мин и избыток реакционноспособных сложных эфиров гасили в течение 3 мин путем инъекции 1 М этаноламина, pH 8,5. Инструмент праймировали в подвижном буфере (PBS pH 7,4, 0,01 % Tween-20, 0,5 мг/мл BSA). После праймирования и промывания слитые белки FLT3 в супернатантах культуры фиксировали на отдельных точках

чипа в течение 12 минут в двух образцах. Каждый из анализов Fab приготавливали в подвижном буфере. Кинетический анализ выполняли путем применения серии кинетических титрований Fab с повышением концентрации. Ассоциацию Fab выполняли в течение 5 минут и диссоциацию антигена записывали в течение 5 минут. После каждого цикла инъекций Fab поверхность регенерировали, применяя 0,45 % H_3PO_4 в течение 2x20 с и промывали в течение 5 мин в подвижном буфере. Данные связывающего ответа обрабатывали и анализировали с применением программного средства Carterra KIT. Обработанные данные приводили в соответствие с простой моделью связывания по Ленгмюру 1:1 для расчета констант скорости ассоциации (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (KD). Обнаруживали мутации, генерирующие неактивные белки, общие для всех Fab фрагментов. Для распознавания аминокислот, вызывающих значительную потерю связывания, использовали пределы по меньшей мере 5-кратного снижения аффинности связывания по сравнению с FLT3 человека дикого типа и/или z-показателя свыше 3 для определения эпитопов.

Результаты

[0220] Линейные и конформационные эпитопы антител против FLT3 17566, 17526, 17667, 17543 и 17497 показаны в Таблице 8.

Таблица 8: Эпитопы антитела против FLT-3

Антитело	Линейный эпитоп	Контактные остатки
17566	A78-A87	A79, A80, V81, T157, R161
17526	A78-A87	A79, A80, V81, I89, T90, R161
17667	A78-A87	A79, V81
17543	A78-A97	A79, V81, V83, A87, I89, V125, T157
17497	A138-S147	N100, L104-V106, H109-S111, E140, L142, N151, T153

[0221] Внеклеточный домен FLT3 состоит из пяти подобных иммуноглобулину (Ig) доменов (D1-D5). Все антитела против FLT3 в этом примере связываются с FLT3 D1. Как показано в Таблице 8, антитела 17566, 17526, 17667 и 17543 связываются с подобными эпитопами, тогда как перекрестно реагирующее антитело 17497 мыши связывается с отдельным эпитопом, что можно спрогнозировать по связыванию с эпитопом (Пример 15).

[0222] Эпитопы отображали на комплекс лиганда FLT3 - рецептора (входящий номер PDB: 3QS9, **ФИГУРА 13**). Кристаллическая структура состоит из двух рецепторных молекул, двухвалентно связывающихся с лигандом FLT3 (FLT3L) с поверхностью связывания на конце FLT3 D3. Комплекс образует

5 структуру типа разомкнутого кольца, в которой N-концевой D1 обладает высокой гибкостью, имеет по меньшей мере две разных ориентации вокруг линкерного участка между D1 и D2, и без взаимодействия с остальной частью белкового комплекса (Verstrate et al., *Blood* (2011) **1**: 60 - 68).

[0223] Общий отрезок в эпитопах 17566, 17526, 17667 и 17543 находился на

10 С-конце D1 перед самым началом D2. Этот общий отрезок находился на внутренней поверхности D1, тогда как эпитоп 17497 находился на внешней поверхности D1 относительно FLT3L. Расстояние между эпитопами на каждом D1 в комплексе лиганд-рецептор составляло приблизительно от 90 Å до 120 Å для каждого из эпитопов (**ФИГУРА 13**), что находится в пределах оптимального

15 расстояния связывания молекулы IgG с двумя эпитопами (Zhang et al., *Nature Communication* (2020) **11**: 3114 и Zhang et al., *Scientific Reports* (2015) **5**: 9803). С учетом того, что D1 обладает высокой гибкостью и способен приспосабливаться под разные ориентации (Verstrate et al., *выше*), существует вероятность того, что антитела, связывающиеся с этими эпитопами, способны димеризировать FLT3 и

20 активировать сигнал рецептора независимо от лиганда FLT3.

[0224] Таким образом, анализ картирования эпитопов показал, что эпитопы антител 17566, 17526, 17667 и 17543 имеют общие остатки на внутренней поверхности FLT3 D1, тогда как антитело 17497 связывалось с отдельным эпитопом на внешней поверхности D1. Эпитопы, находящиеся на FLT3 D1,

25 рассматривают как оптимальные для агонистических антител против FLT3 и активации рецептора.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против FLT3 или его антигенсвязывающая часть, причем антитело связывается с тем же эпитопом человеческой FLT3, что и антитело, включающее:

а) тяжелую цепь (НС), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75, и легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76;

б) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76;

в) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76;

г) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76;

д) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76;

е) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76;

ж) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76; или

з) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76.

2. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 - 7, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 - 10, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76.

3. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 - 17, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18 - 20, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76.

4. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 - 27, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 - 30, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76.

5. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

5 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35 - 37, соответственно;

10 II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75; и

15 б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38 - 40, соответственно;

20 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76.

25 6. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

30 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45 - 47, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75; и

5 б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48 - 50, соответственно;

10 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76.

15

7. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

20 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55 - 57, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

25 III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

30 I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58 - 60, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76.

5

8. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

10 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 65 - 67, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63;

15 III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

20 I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 - 70, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64;

25 III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76.

30 9. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 1, причем

а) тяжелая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25 - 27, соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73;

III) VH, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; или

IV) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75; и

б) легкая цепь вышеупомянутого антитела против FLT3 включает:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 - 30, соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74;

III) VL, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

IV) легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76.

10. Антитело против FLT3 или его антигенсвязывающая часть, причем вышеупомянутое антитело включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- а) SEQ ID NO: 5 - 10, соответственно;
- б) SEQ ID NO: 15 - 20, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 25 - 30, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 35 - 40, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 45 - 50, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 55 - 60, соответственно; или
- ж) SEQ ID NO: 65 - 70, соответственно.

11. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 10, причем вышеупомянутое антитело включает аминокислотную

последовательность переменного домена тяжелой цепи и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которые по меньшей мере на 90 % идентичны аминокислотным последовательностям:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- 5 б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
- г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно;
- 10 ж) SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно; или
- з) SEQ ID NO: 73 и 74, соответственно.

12. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 10, причем вышеупомянутое антитело включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые включают аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
- б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
- в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
- 20 г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
- д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
- е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно;
- ж) SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно; или
- з) SEQ ID NO: 73 и 74, соответственно.

25 13. Антитело против FLT3 по одному из пунктов 1 - 12, причем антитело представляет собой IgG.

14. Антитело против FLT3 по п. 13, причем антитело представляет собой IgG₁.

15. Антитело против FLT3 по одному из пунктов 1 - 14, причем антитело включает по меньшей мере одну мутацию в Fc области.

16. Антитело против FLT3 по одному из пунктов 1 - 12, причем антитело представляет собой IgG₁ и включает мутации в одной или нескольких из позиций 234 и 235 аминокислоты тяжелой цепи, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации IMGT®.

5

17. Антитело против FLT3 по п. 16, причем присутствует мутация одного или обоих аминокислотных остатков в позициях 234 и 235 с Leu на Ala.

18. Антитело против FLT3, включающее:

10 а) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 75, и легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 76;

15 б) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 76;

в) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 76;

20 г) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 76;

д) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 76;

25 е) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 76;

30 ж) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64 и 76; или

з) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 73 и 75 и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74 и 76.

19. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по одному из пунктов 1 - 18, причем антитело или антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере одним свойством из нижеперечисленных:

- а) стимулирует пролиферацию клеток EOL-1 *in vitro*;
- 5 б) стимулирует пролиферацию клеток OCI-AML5 *in vitro*;
- в) связывается с FLT3 человека с показателем K_D 20 нМ или менее;
- г) специфически связывается с FLT3 яванского макака;
- д) специфически связывается с FLT3 мыши;
- е) не блокирует связывание лиганда FLT3 с FLT3 человека *in vitro*;
- 10 ж) не блокирует связывание FLT3L-Fc с воспроизводимым клетками белка FLT3 человека, яванского макака и/или мыши *in vitro*;
- з) стимулирует пролиферацию первичных стволовых клеток $CD34^+$ человека;
- и) стимулирует дифференциацию первичных стволовых клеток $CD34^+$
- 15 человека;
- й) вызывает мобилизацию дендритных клеток *in vivo* у мышей Balb/c;
- и
- к) вызывает мобилизацию дендритных клеток *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом, восстановленных стволовыми клетками $CD34^+$
- 20 человека.

20. Антитело против FLT3 или антигенсвязывающая часть по п. 19, причем антитело или антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или

25 всеми вышеупомянутыми свойствами.

21. Фармацевтическая композиция, включающая антитело против FLT3 или антигенсвязывающую часть по одному из пунктов 1 - 20 и фармацевтически приемлемое формообразующее.

30

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, также включающая иммуностимулирующее средство, вакцину, химиотерапевтическое средство, противоопухолевое средство, антиангиогенное средство или ингибитор тирозинкиназы.

23. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и ту, и другую, антитела против FLT3 по одному из пунктов 1 - 20.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 23, причем вышеупомянутая молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51, 52, 61, 62, 71 и 72.

25. Вектор, включающий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 23 или п. 24, причем вышеупомянутый вектор также включает последовательность контроля экспрессии.

26. Клетка-хозяин, включающая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против FLT3 по одному из пунктов 1 - 20.

27. Способ получения антитела против FLT3 или его антигенсвязывающей части, включающий обеспечение клетки-хозяина по п. 26, культивирование вышеупомянутой клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или антигенсвязывающей части, и выделение полученного в результате антитела или антигенсвязывающей части.

28. Биспецифически связывающаяся молекула, включающая антигенсвязывающий домен одного или двоих отдельных антител против FLT3 по одному из пунктов 1 - 20.

29. Способ применения антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтической

композиции по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающейся молекулы по п. 28 в диагностическом процессе.

30. Способ усиления иммунитета пациента, который в этом нуждается, включающий введение вышеупомянутому пациенту терапевтически эффективного количества антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтической композиции по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающейся молекулы по п. 28.

31. Способ лечения рака у пациента, включающий введение вышеупомянутому пациенту терапевтически эффективного количества антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтической композиции по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающейся молекулы по п. 28.

32. Способ по п. 31, причем рак находится в ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легкого, кишечника, толстой кишки, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, гематопозитической системы, головы и шеи, печени, кости, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки, шейки и поджелудочной железы.

33. Способ по одному из пунктов 30 - 32, причем у пациента присутствует меланома, глиома, мультиформная глиобластома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, почечноклеточная карцинома, рак почки, лимфома, лейкоз, множественная миелома, плазмоклеточное новообразование, миелодиспластическое заболевание или миелопролиферативное заболевание.

34. Способ по одному из пунктов 30 - 33, также включающий введение пациенту иммуностимулирующего средства, вакцины, химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы или лучевую терапию.

35. Способ лечения иммунологического нарушения у пациента, который в этом нуждается, включающий введение вышеупомянутому пациенту терапевтически эффективного количества антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтической композиции по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающейся молекулы по п. 28.

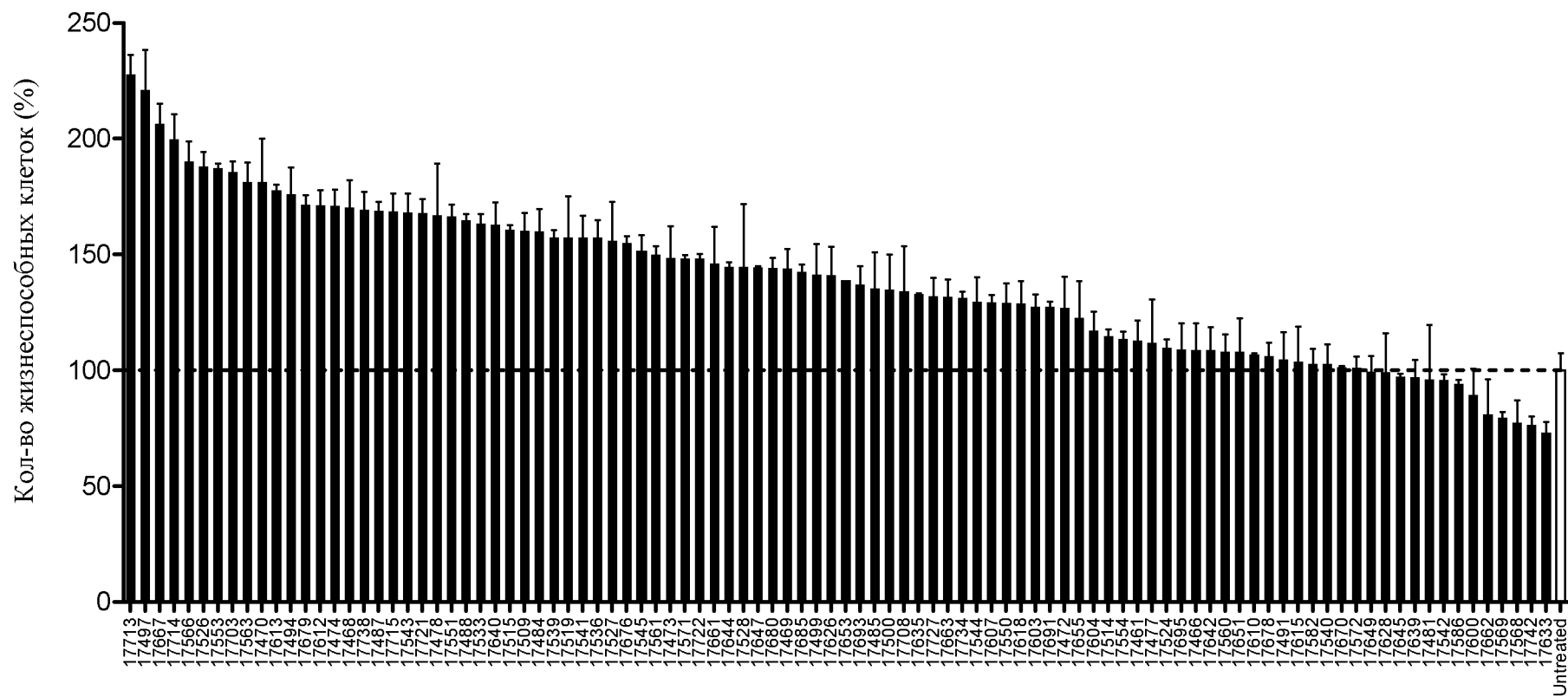
36. Применение антитела против FLT3 или антигенсвязывающей части по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтической композиции по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающейся молекулы по п. 28 при производстве медикамента для:

- а) усиления иммунитета пациента;
 - б) лечения рака у пациента; или
 - в) лечения иммунологического нарушения у пациента
- в соответствии со способом по одному из пунктов 30 - 35.

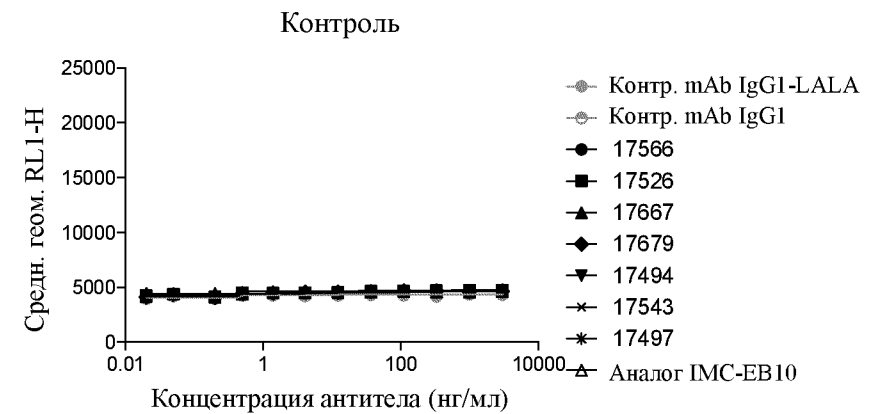
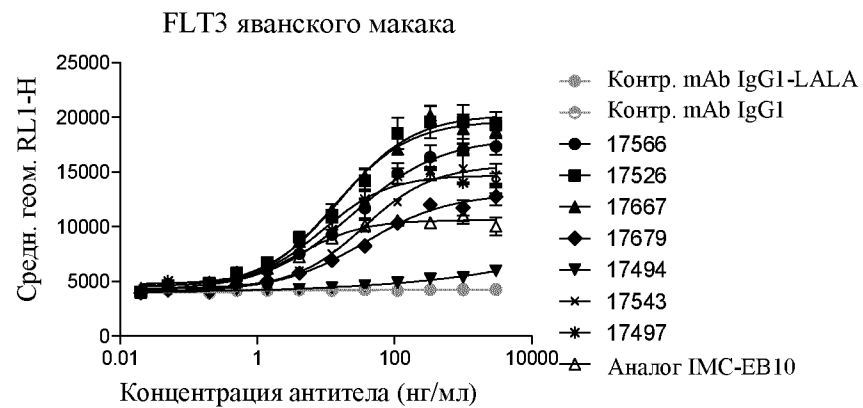
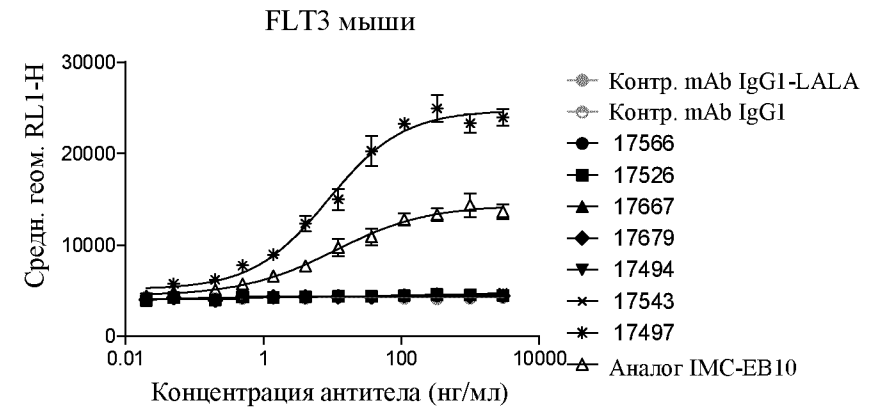
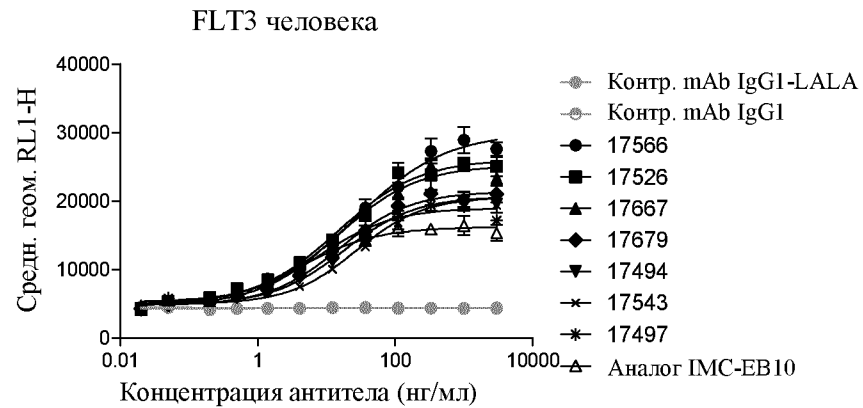
37. Антитело или антигенсвязывающая часть по одному из пунктов 1 - 20, фармацевтическая композиция по п. 21 или п. 22, или биспецифически связывающаяся молекула по п. 28 для применения в:

- а) усилении иммунитета пациента;
 - б) лечении рака у пациента; или
 - в) лечении иммунологического нарушения у пациента
- в соответствии со способом по одному из пунктов 30 - 35.

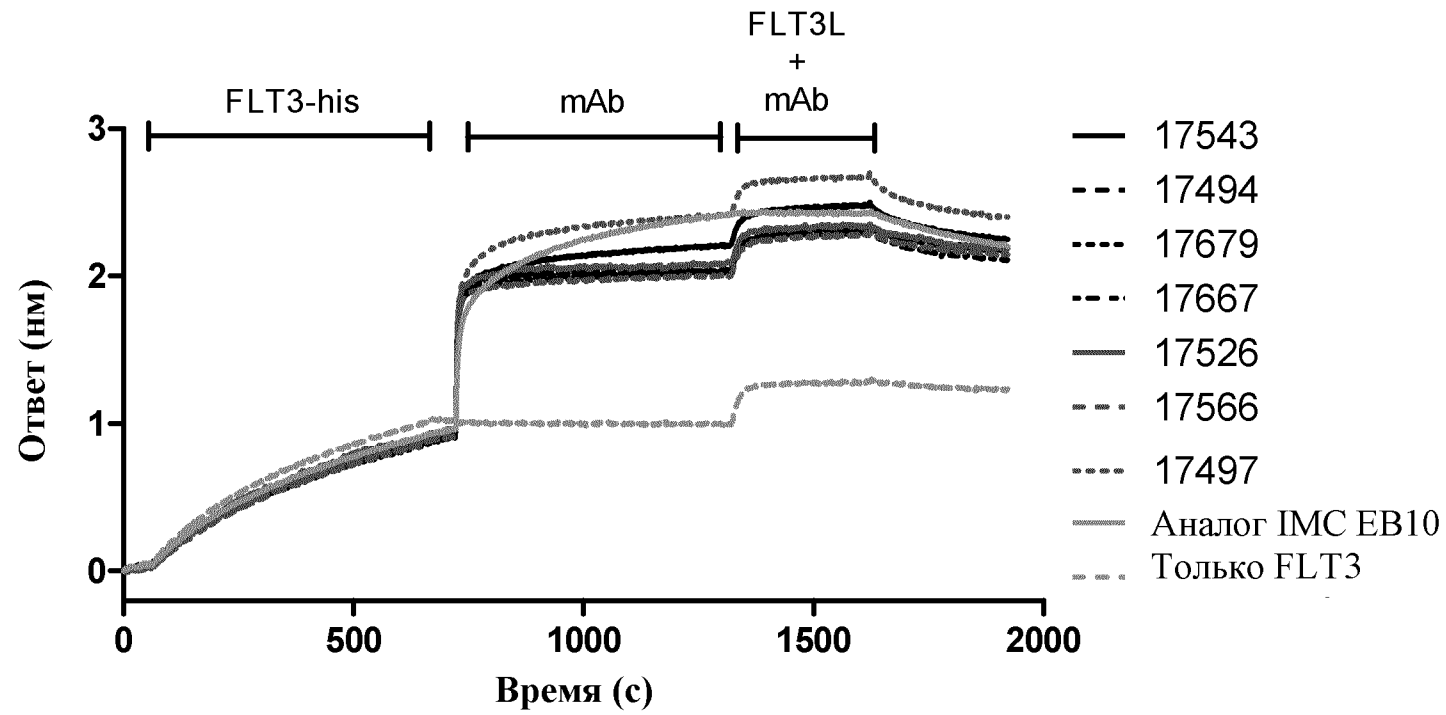
38. Способ по одному из пунктов 30 - 35, применение по п. 36 или антитело или антигенсвязывающая часть для применения, фармацевтическая композиция для применения, или биспецифически связывающаяся молекула для применения по п. 37, причем пациент является человеком.



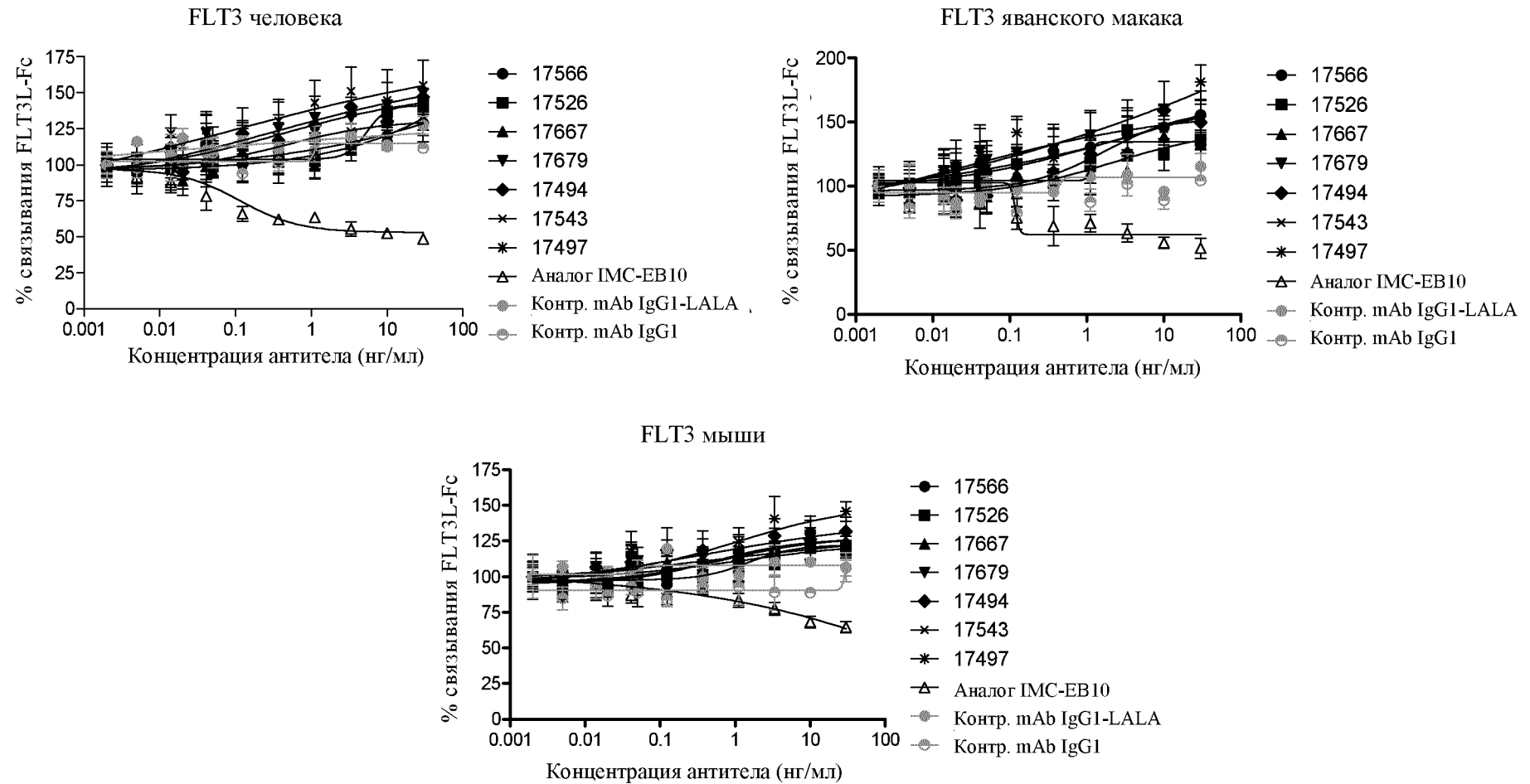
ФИГ. 1



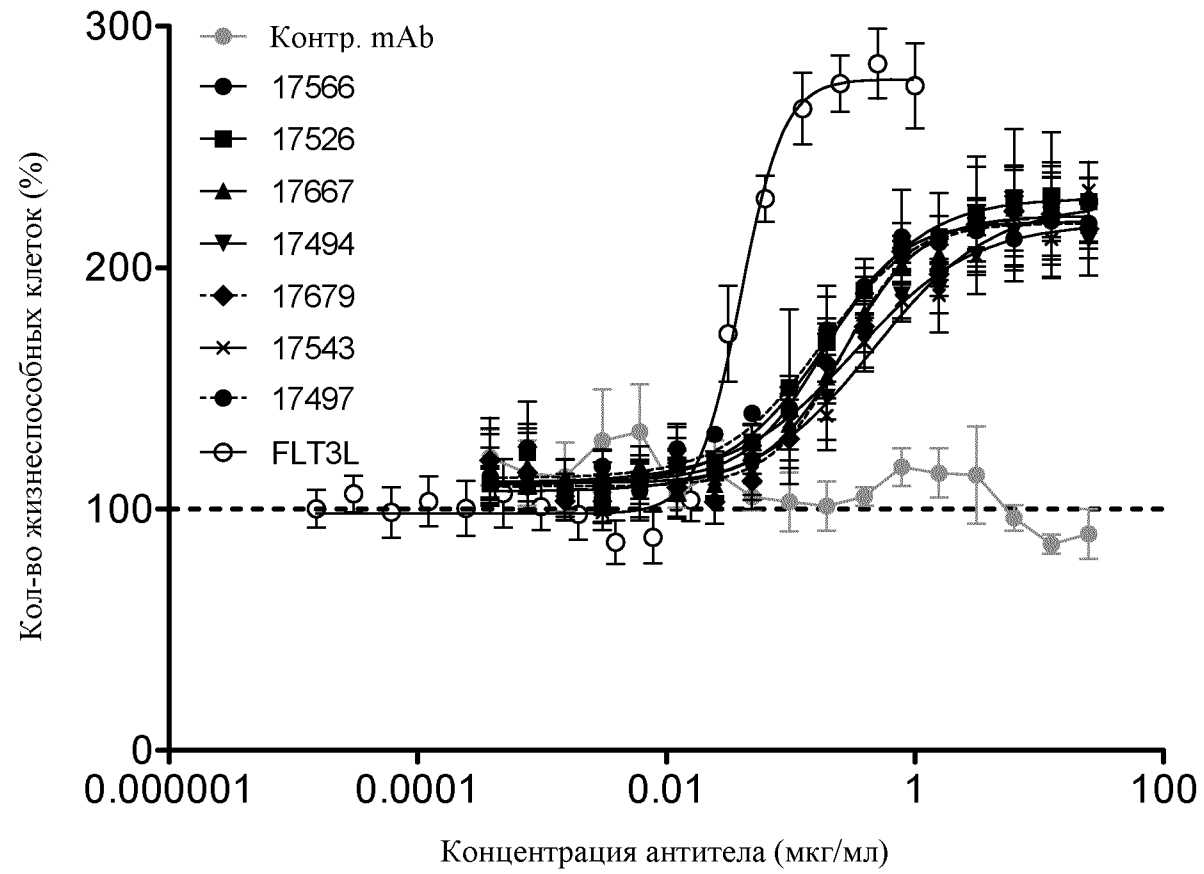
ФИГ. 2



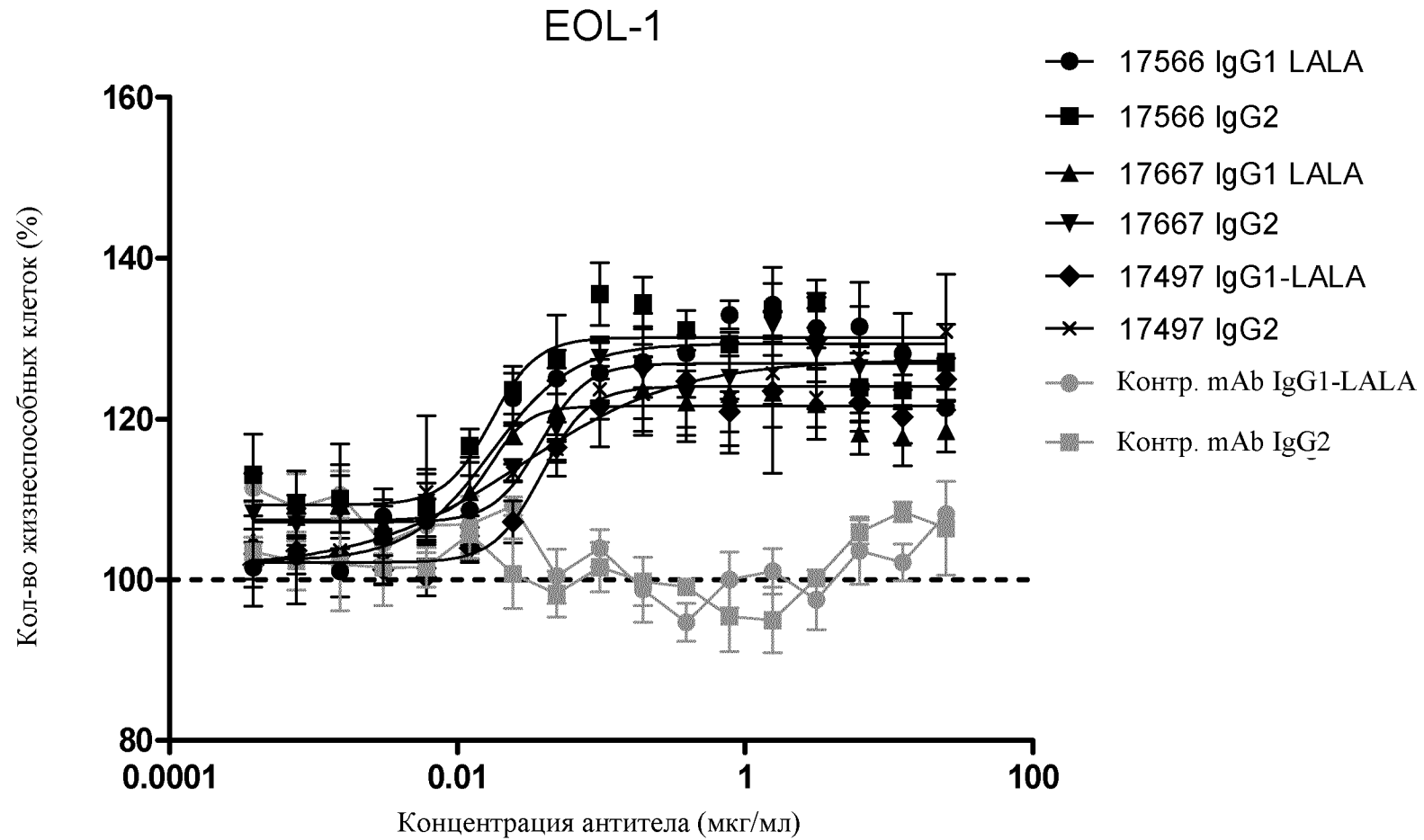
ФИГ. 3



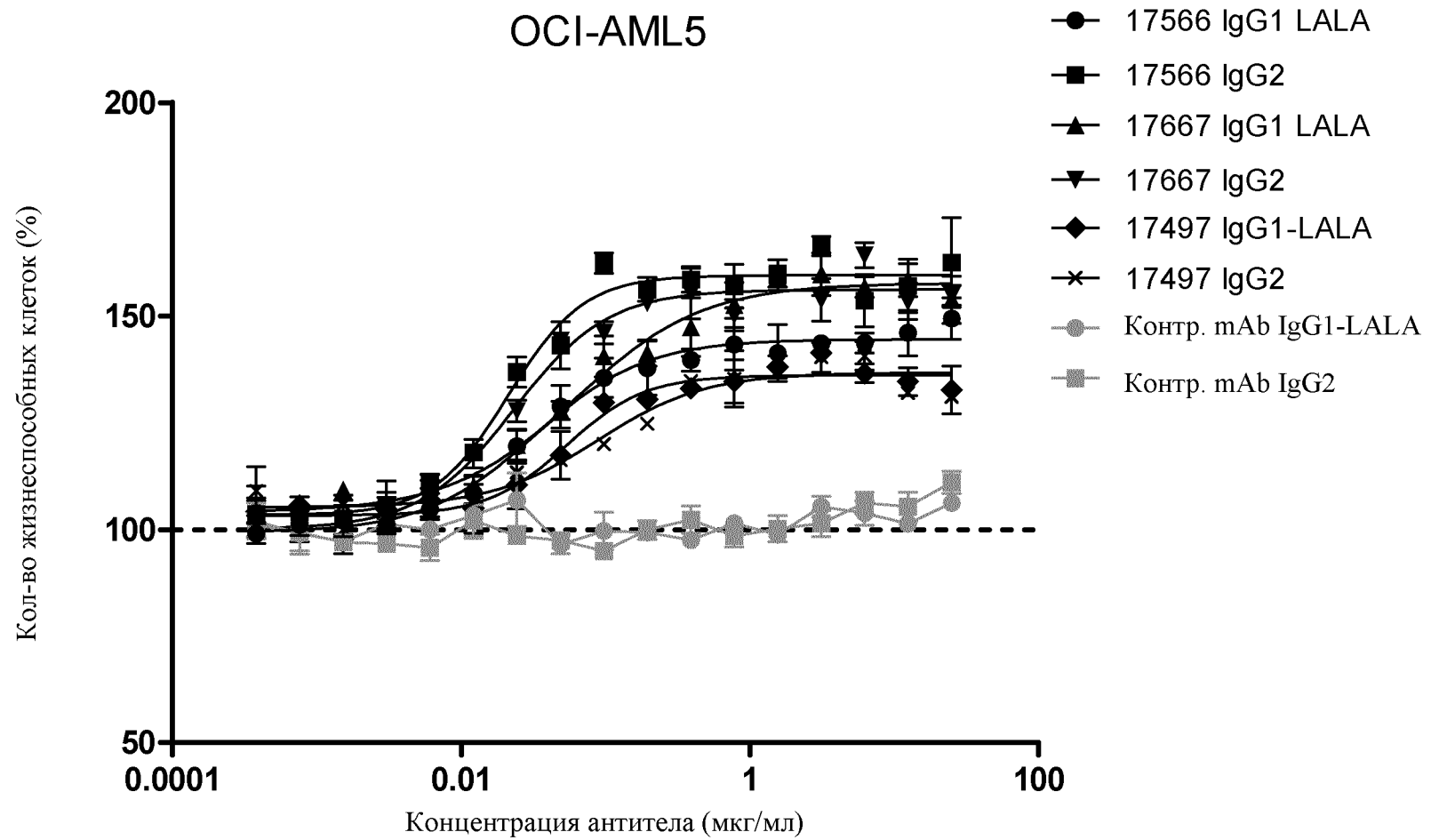
ФИГ. 4



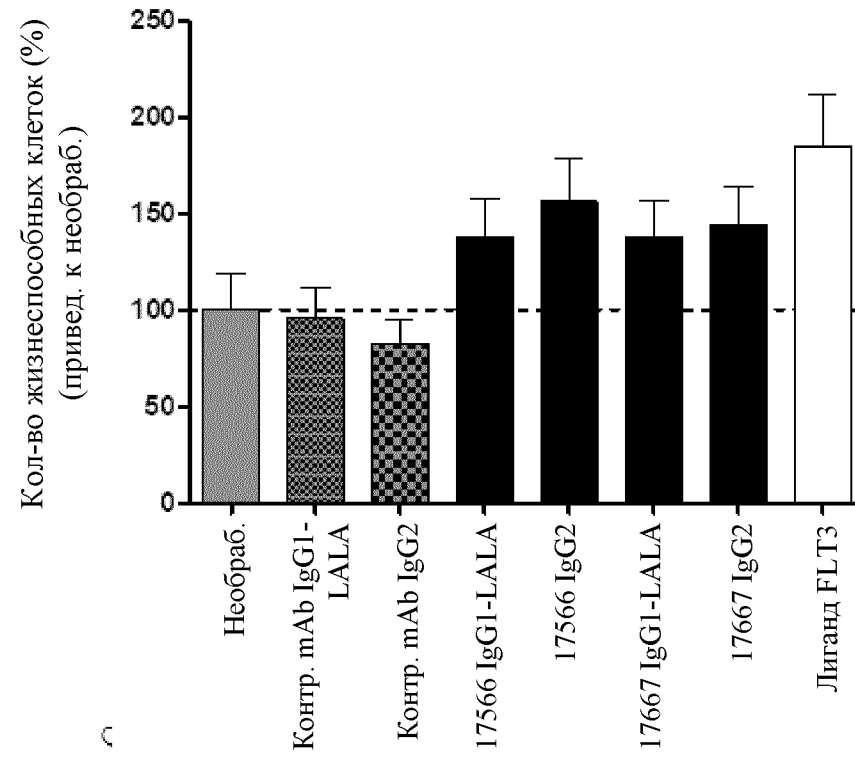
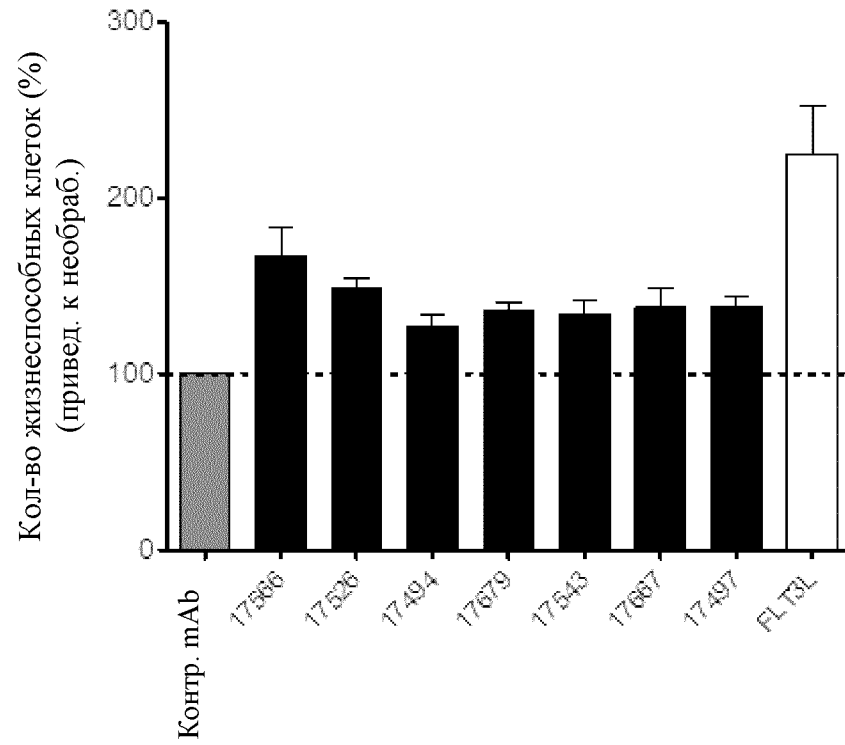
ФИГ. 5



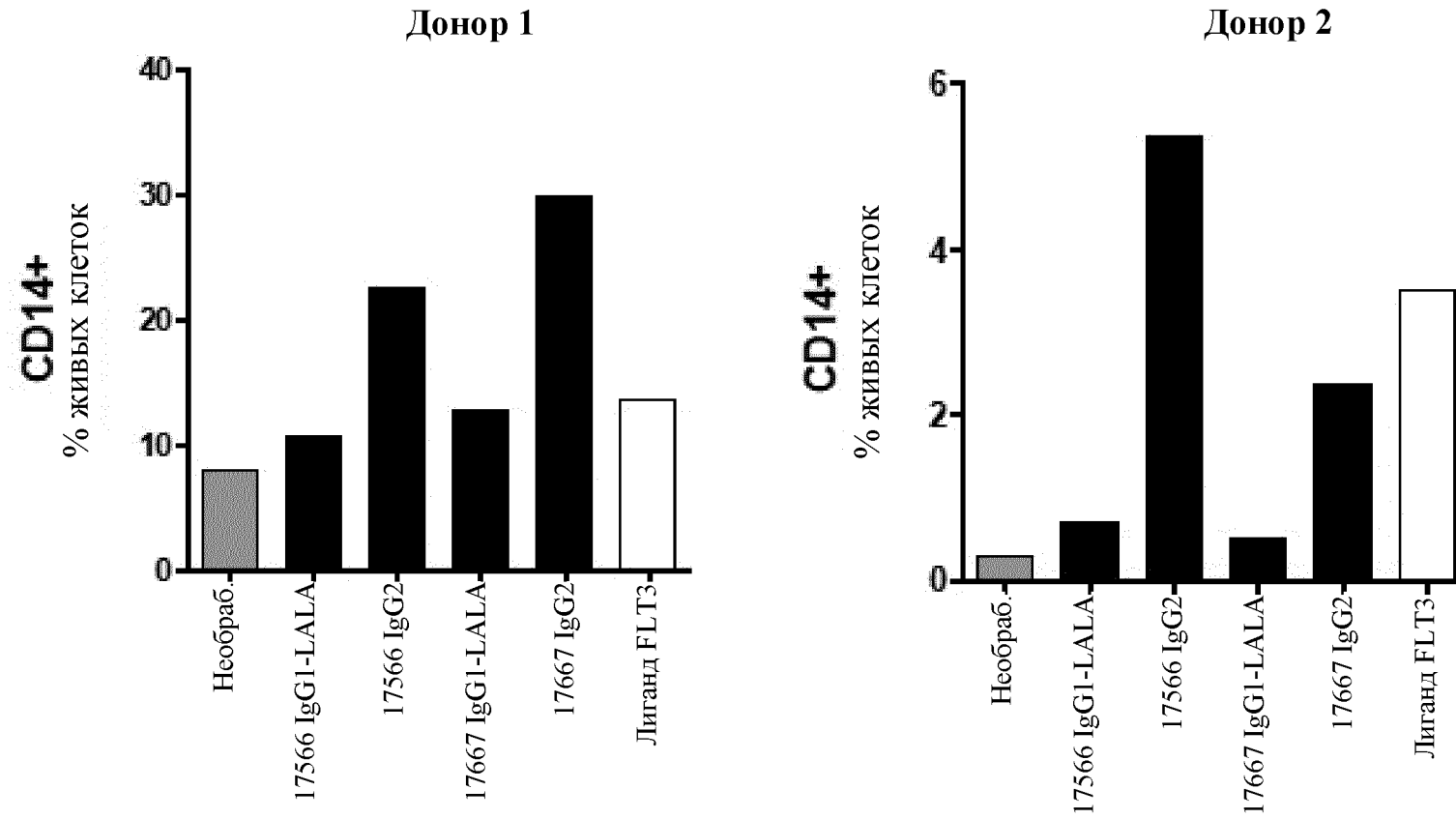
ФИГ. 6А



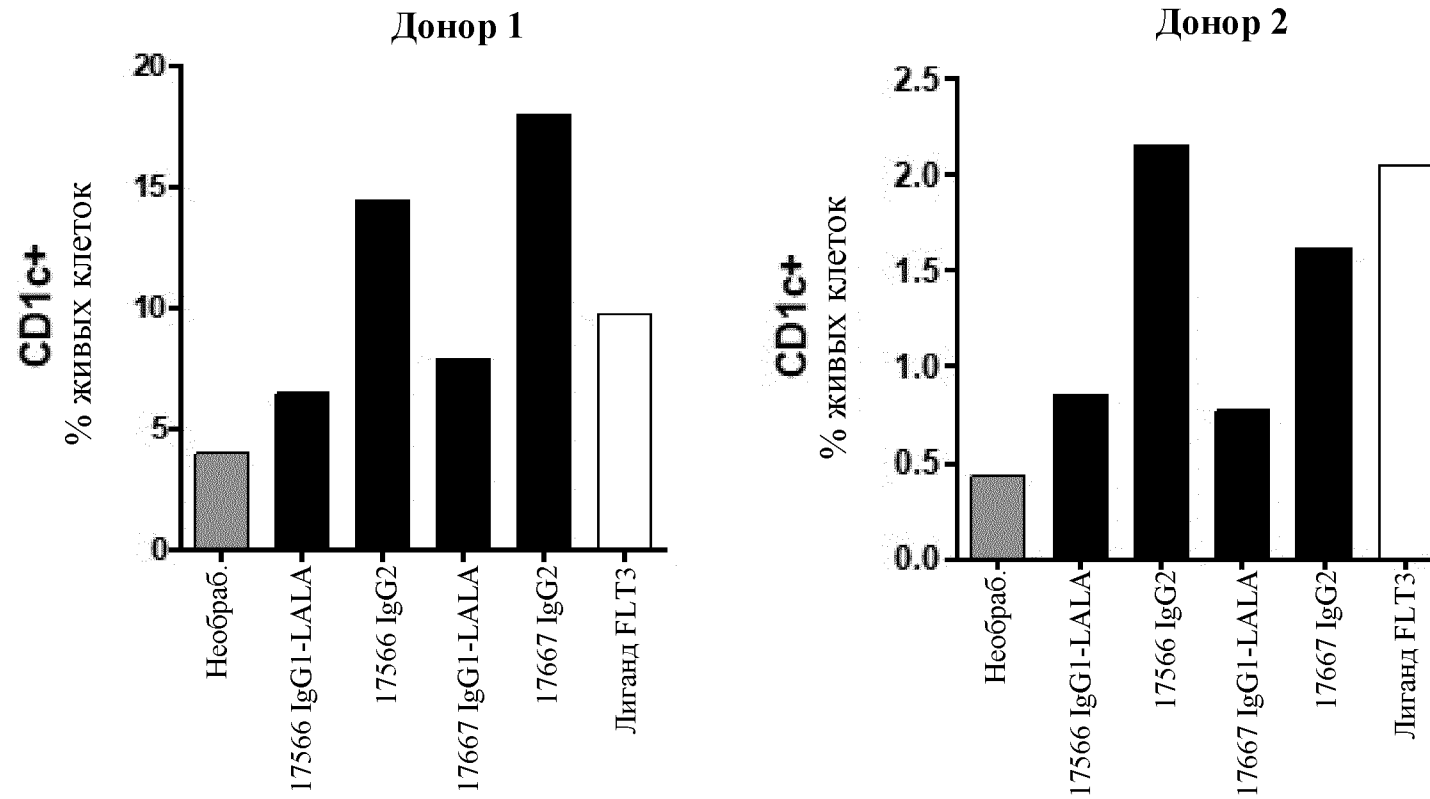
ФИГ. 6В



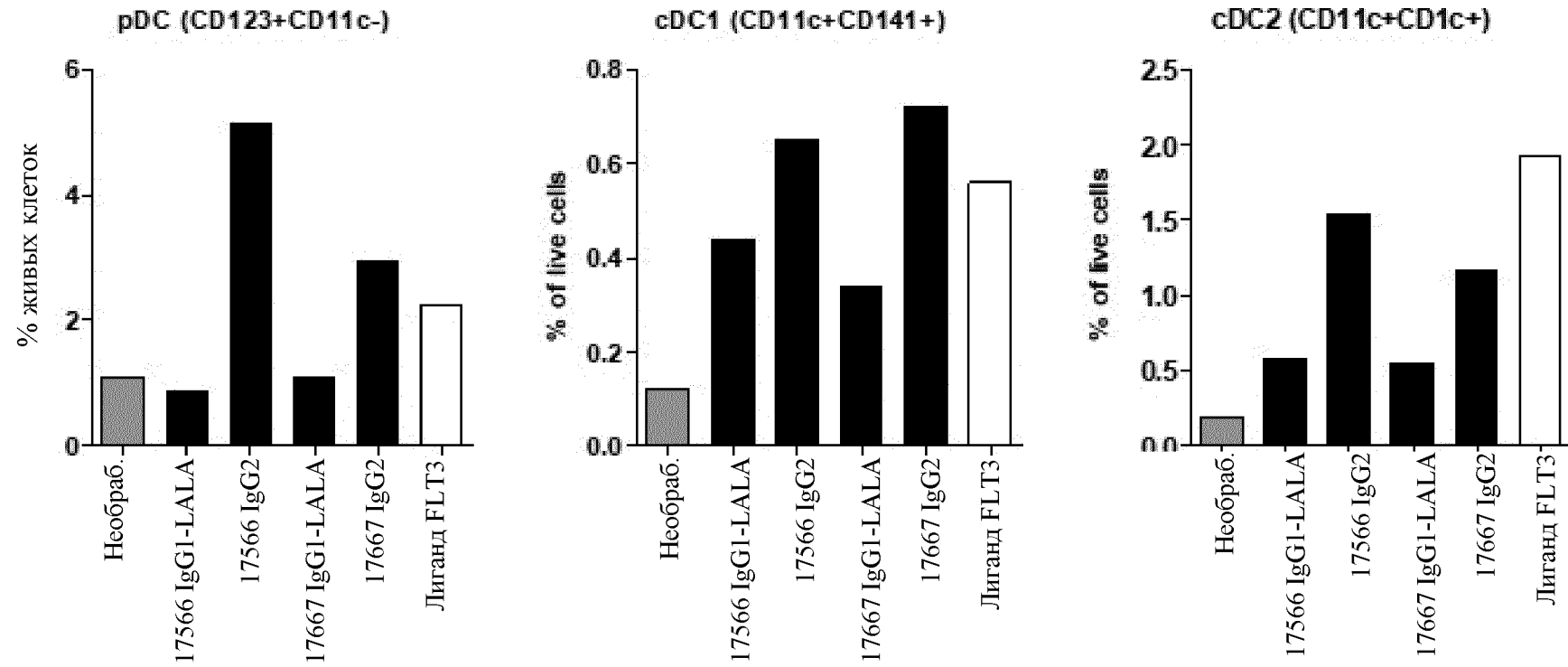
ФИГ. 7



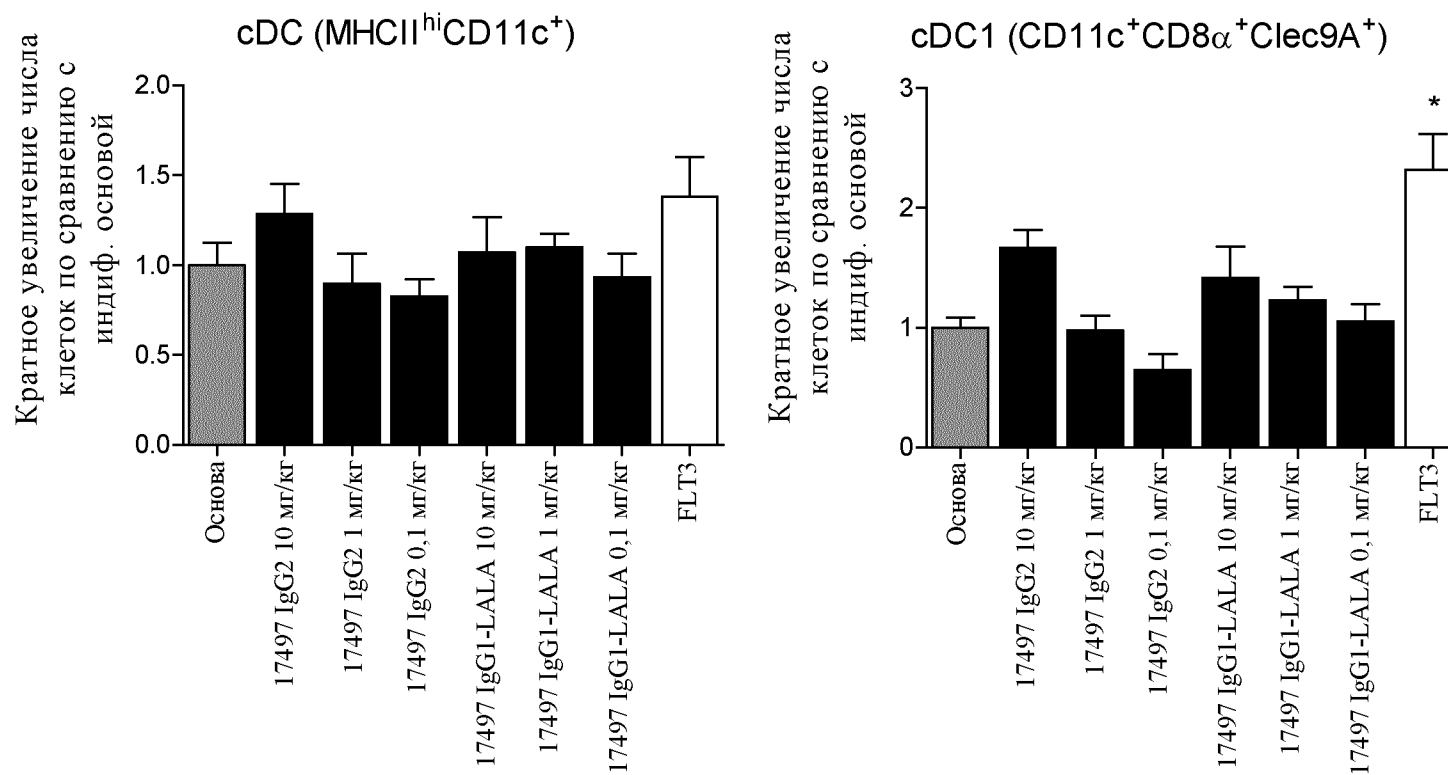
ФИГ. 8А



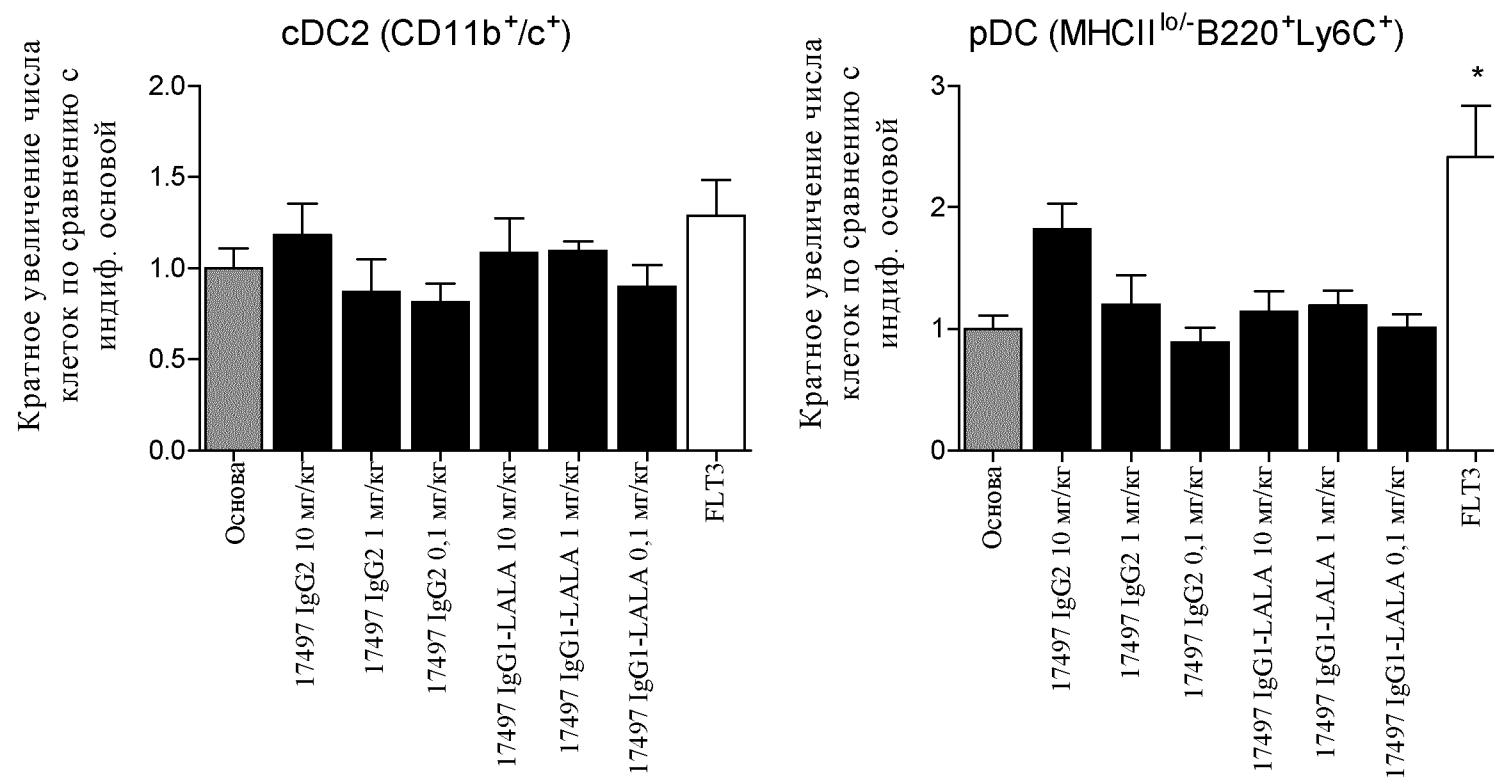
ФИГ. 8В



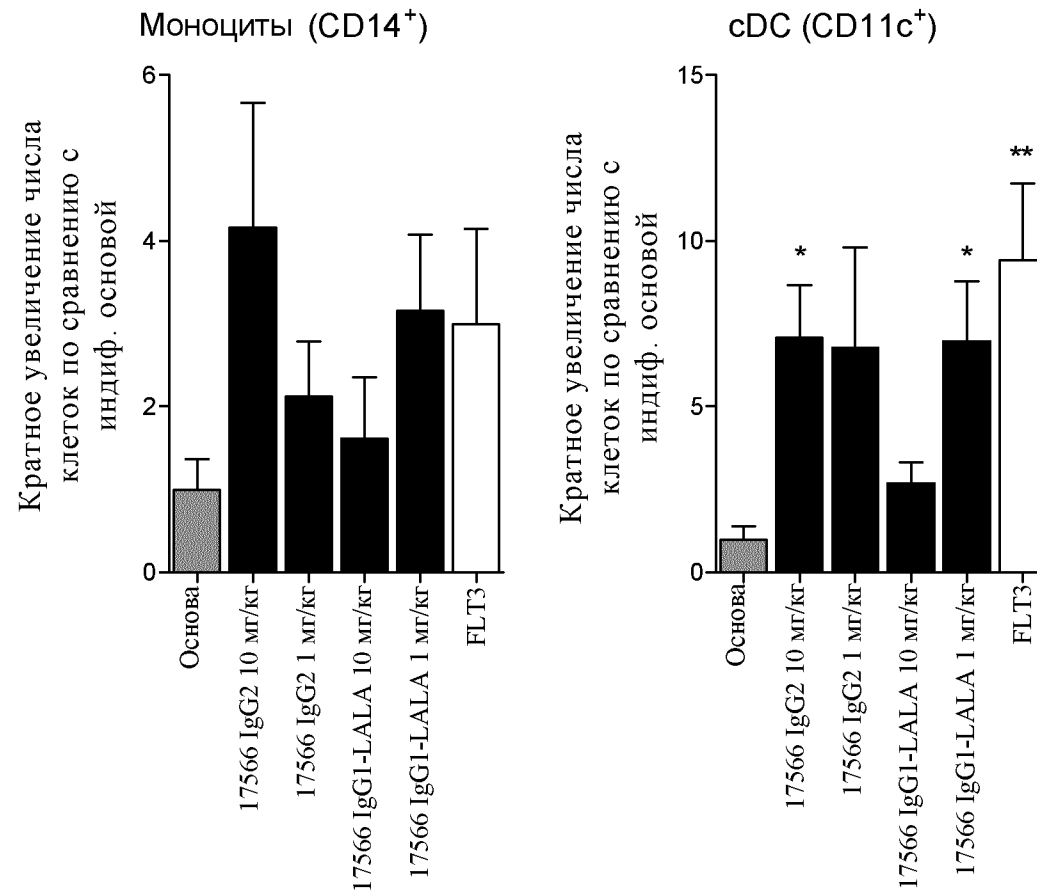
ФИГ. 8С



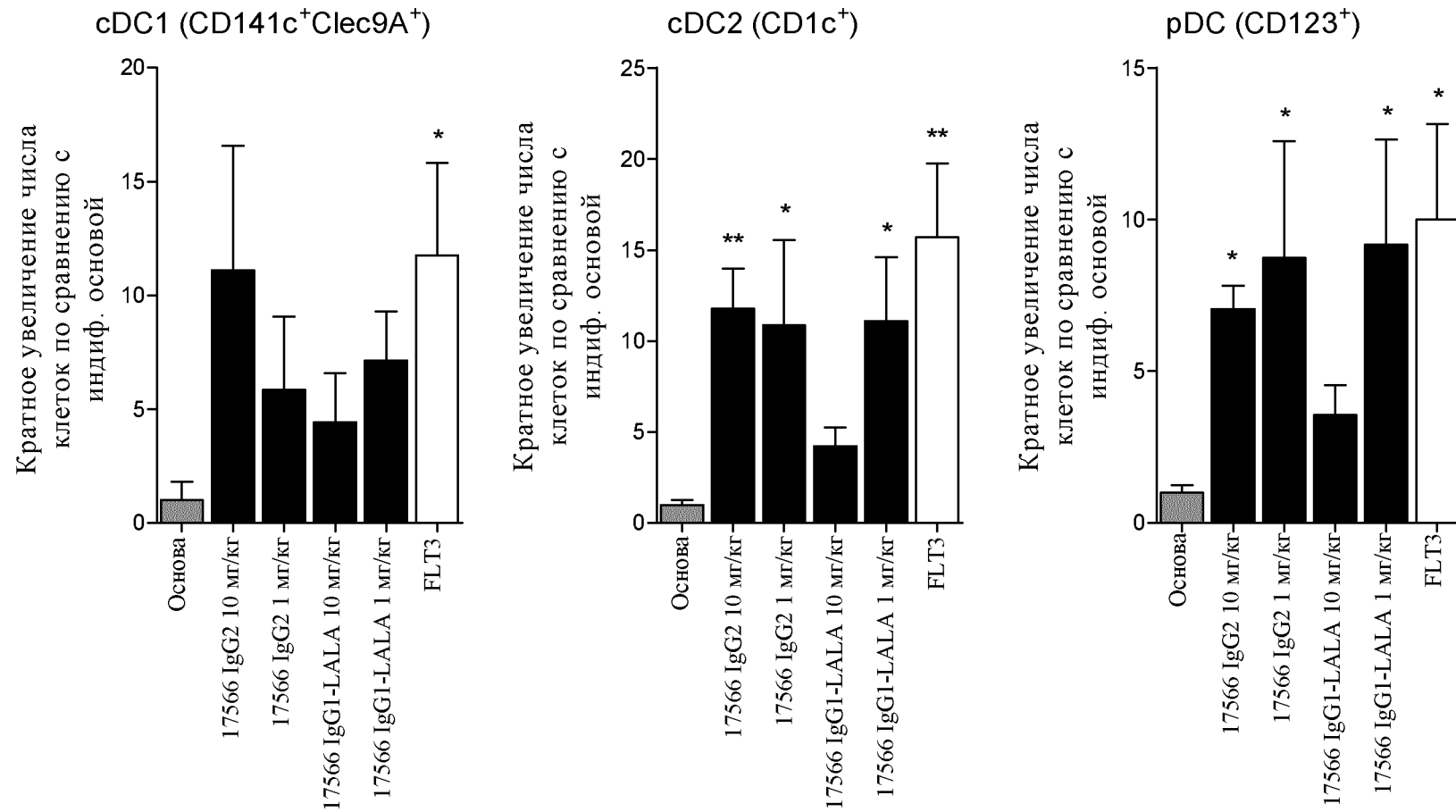
ФИГ. 9А



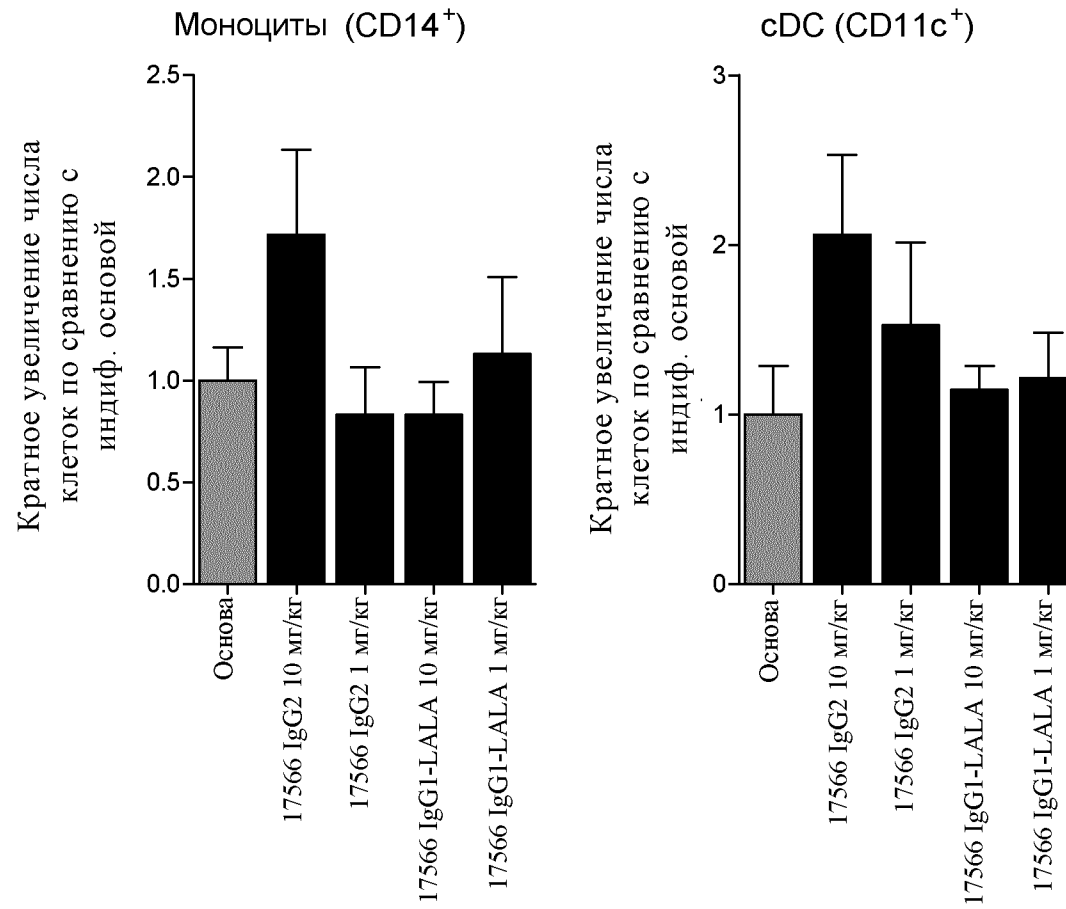
ФИГ. 9В



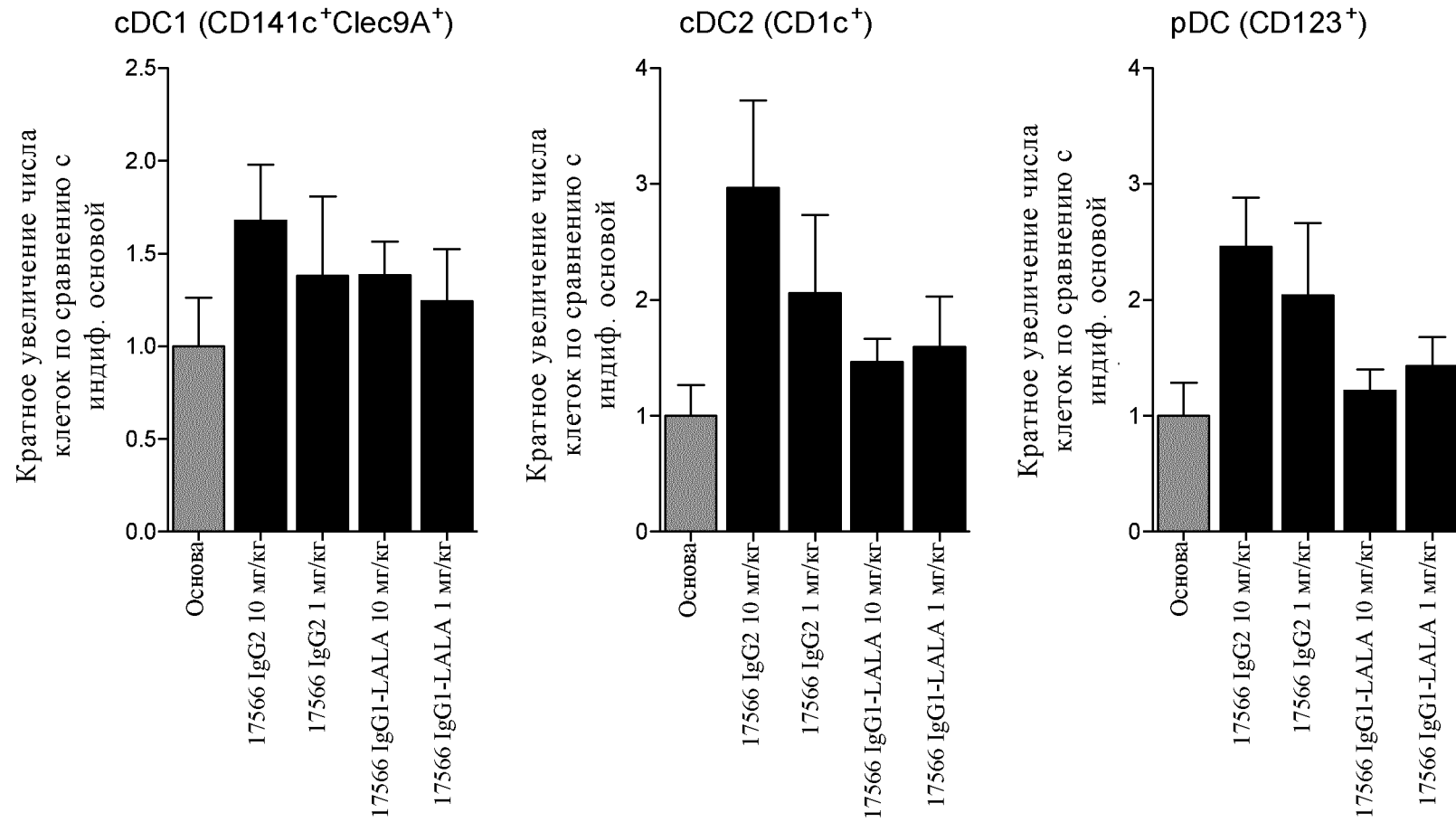
ФИГ. 10А



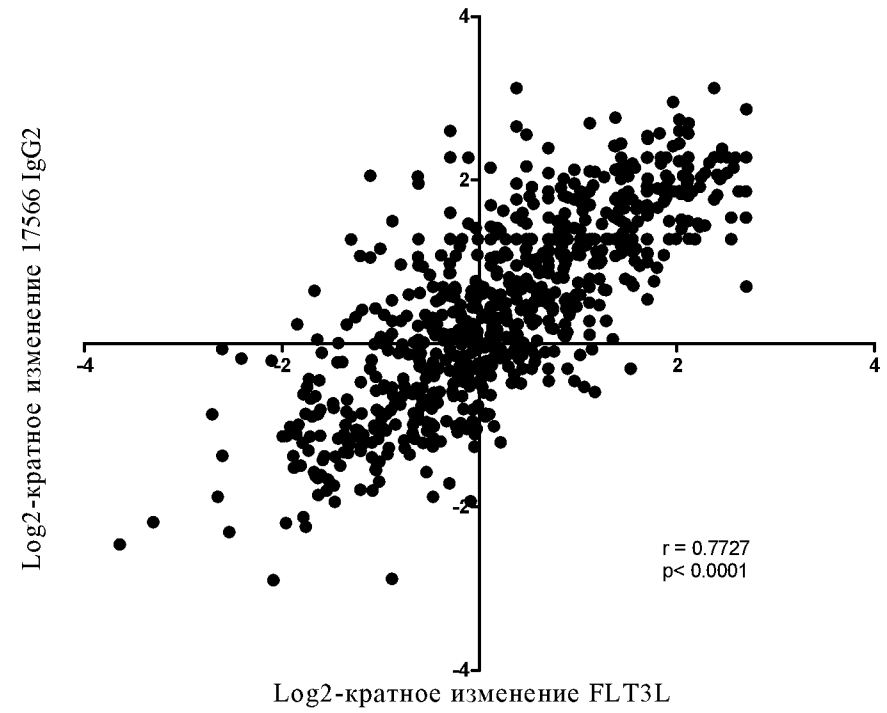
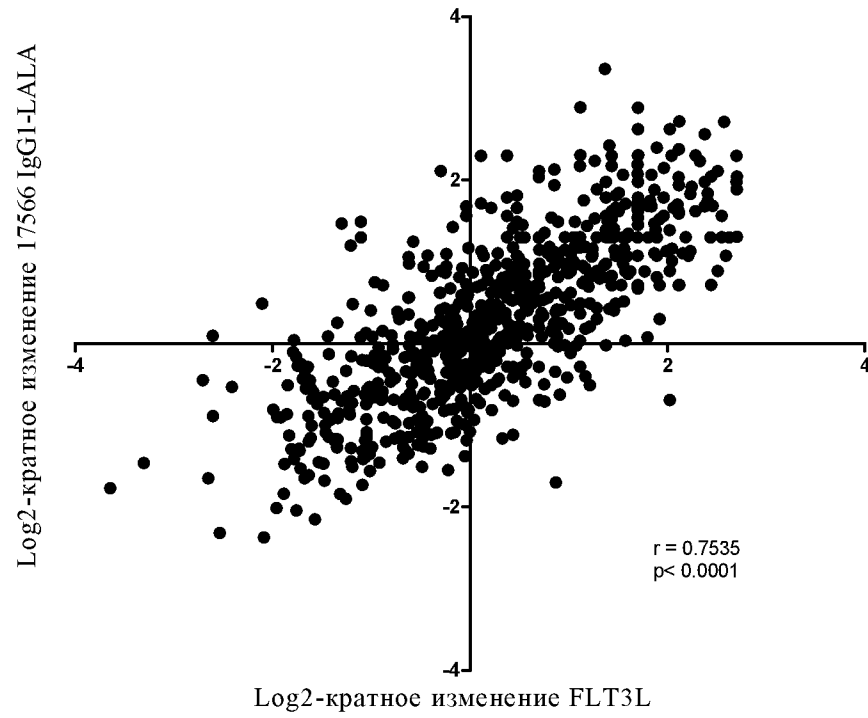
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С

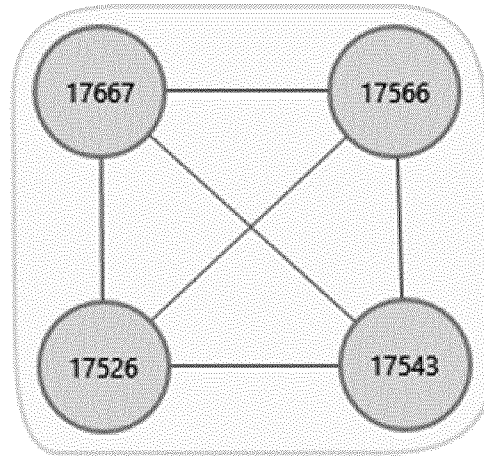


ФИГ. 10D

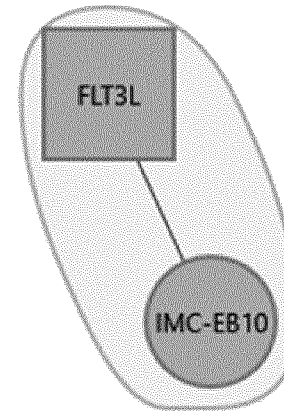


ФИГ. 11

Корзина 1



Корзина 2

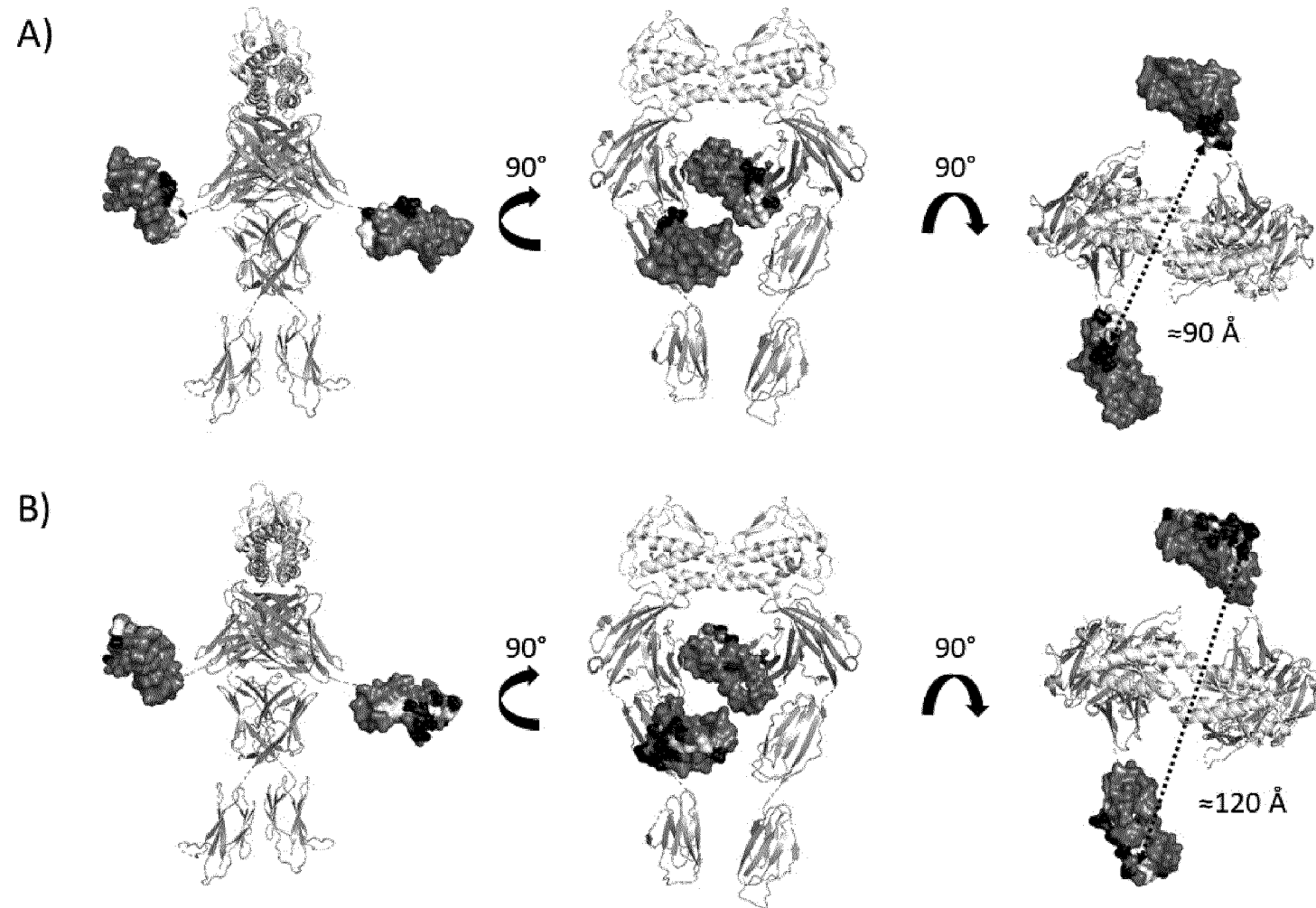


Корзина 3



ФИГ. 12

20/20



ФИГ. 13