



MD/EP 3313884 T2 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3313884 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)

A61K 39/395 (2006.01.01)

A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0449 (22) Data de depozit: 2016.06.28 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16736718.4, 2016.06.28 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3313884, 2018.05.02 (31) Numărul cererii prioritare: 201562186161 P; 201662338203 P; 201662346730 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.29; 2016.05.18; 2016.06.07 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 47/2020, 2020.11.18 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2018, 2018.06.30
(71) Solicitant: IMMUNOGEN, INC., US (72) Inventatori: KOVTUN Yelena, US; TAVARES Daniel, US; RUI Lingyun, US; CHITTENDEN Thomas, US (73) Titular: IMMUNOGEN INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Anticorpi anti-CD123 și conjugați și derivați ai acestora

(57) Rezumat:

1

Prezenta dezvăluire se referă, în general, la anticorpi, fragmente care leagă antigenul acestora, polipeptide și imunoconjugați care se leagă de antigenul CD123 (lanțul α al receptorului interleukinei 3 sau IL-3R α). Prezenta dezvăluire se referă, de asemenea, la metode de utilizare a unor astfel

2

de molecule care leagă CD123 pentru diagnosticarea și tratarea bolilor, cum ar fi tumorile maligne ale celulelor B.

Secvențe: 97

Revendicări: 25

Figuri: 33

MD/EP 3313884 T2 2021.04.30

(54) Anti-cd123 antibodies and conjugates and derivatives thereof**(57) Abstract:**

1
The present disclosure generally relates to antibodies, antigen-binding fragments thereof, polypeptides, and immunoconjugates that bind to CD 123 antigen (the α chain of the interleukine 3 receptor, or IL-3Ra). The present disclosure also relates to methods of

2
using such CD123-binding molecules for diagnosing and treating diseases, such as B-cell malignancies.

Sequences: 97

Claims: 25

Fig.: 33

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

- 5 Prezenta invenție se referă în general la anticorpi, fragmente de legare la anticorpi ale acestora, polipeptide și imunoconjugate care se leagă la antigenul de CD123 (lanțul α al receptorului de interleukină 3, sau IL-3R α). Prezenta invenție se referă, de asemenea, la astfel de molecule de legare a CD123 pentru utilizare în metode de diagnostic și tratare a unor boli, cum ar fi tumorile maligne cu celule B.

10

BAZELE INVENȚIEI

- CD123 (receptor alfa al interleukinei 3, IL-3R α) este o moleculă de 40 kDa care face parte din complexul receptorului interleukinei 3 (IL-3R). Citokina interleukina 3 (IL-3) determină diferențierea timpurie a celulelor stem multipotente în celule ale progenitorilor eritroizi, mieloizi și limfoizi. CD123 este exprimat pe progenitori angajați ai CD34⁺, dar nu pe celule stem hematopoietice normale CD34⁺/CD38⁻ (HSC-uri). CD123 este exprimat de bazofile, mastocite, celule dendritice plasmacitoide, o anumită exprimare de către monocite, macrofage și eozinofile și o exprimare redusă sau deloc de neutrofile și megakariocite. Unele țesuturi non-hematopoietice, cum ar fi placenta, celulele Leydig ale testiculului, anumite elemente ale celulelor creierului și unele celule endoteliale, exprimă, de asemenea, CD123. Cu toate acestea, exprimarea în acestea este în mare parte citoplasmatică.

- S-a raportat faptul că CD123 este exprimat de celulele blastice leucemice ("blaști de leucemie") și de celulele stem de leucemie (LSC) (Jordan și colab., Leukemia 14:1777-1784, 2000; Jin și colab., Blood 113:6603-6610, 2009). La populațiile precursore umane normale, CD123 este exprimat de un subset de celule progenitoare hematopoietice (HPC), dar nu de HSC-uri normale. CD123 este, de asemenea, exprimat de celule dendritice plasmacitoide (pDC) și bazofile și, într-o măsură mai mică, monocite și eozinofile.

- S-a raportat faptul că CD123 este supraexprimat pe celulele maligne într-o gamă largă de tumori maligne hematologice, incluzând leucemia mieloidă acută (AML) și sindromul mielodisplazic (MDS) (Munoz și colab., Haematologica 86(12): 1261-1269, 2001). Supraexprimarea CD123 este asociată cu prognostic mai slab în AML (Tettamanti și colab., Br. J. Haematol. 161:389-401, 2013). Se crede că AML și MDS apar și sunt perpetuate de o populație mică de celule stem leucemice (LSC-uri), care sunt în general latente (*adică*, celule care nu se divid rapid) și, prin urmare, rezistă morții celulare (apoptoză) și agenților chimioterapici convenționali. LSC-urile sunt caracterizate prin supraexprimarea CD123, în timp ce CD123 nu este prezent în populația corespunzătoare de celule stem hematopoietice normale din măduva osoasă umană normală (Jin și colab., Blood 113:6603-6610, 2009; Jordan și colab., Leukemia 14:1777-1784, 2000). Exprimarea CD123 este, de asemenea, asociată cu alte multiple tumori maligne / pre-malignități: celule progenitoare ale leucemiei mieloide cronice (CML) (inclusiv CML de criză blastică); Celulele Reed Sternberg (RS) ale lui Hodgkin; limfom non-Hodgkin transformat (NHL); unele leucemii limfocitare cronice (CLL) (CD11c⁺); un subset de leucemie limfoblastică acută T (T-ALL) (16%, cea mai imatură, majoritatea adultă), malignități ale celulelor dendritice plasmacitoide (pDC) (DC2) și sindrom mielodisplazic (MDS) cu malignități ale celulelor măduvei CD34⁺/CD38⁻.

- AML este o boală clonală caracterizată prin proliferarea și acumularea de celule progenitoare mieloide transformate în măduva osoasă, ceea ce conduce în cele din urmă la insuficiență hematopoietică. Incidența AML crește odată cu înaintarea în vârstă, și pacienții mai în vârstă au de obicei rezultate mai slabe de tratament decât pacienții mai tineri (Robak și colab., Clin. Ther. 2:2349-2370, 2009). Din nefericire, în prezent, majoritatea adulților cu AML decedează din cauza bolii lor.

- Tratamentul pentru AML se concentrează inițial pe inducerea remisiunii (terapia de inducție). Odată ce remisiunea este atinsă, tratamentul se schimbă pentru a se concentra asupra asigurării unei astfel de remisiuni (terapie post-remisiune sau de consolidare) și, în unele cazuri, terapie de întreținere. Paradigma inducerii remisiunii standard a AML este chimioterapia cu o combinație de antraciclină / citarabină, urmată fie de chimioterapie de consolidare, uzual cu doze mai mari din aceleași medicamente decât cele utilizate în perioada de inducție, fie de transplant de

celule stem umane, în funcție de capacitatea pacientului de a tolera tratamentul intensiv și probabilitatea vindecării numai prin chimioterapie (a se vedea Roboz, Curr. Opin. Oncol. 24:711-719, 2012).

5 Agenții utilizați frecvent în terapia de inducere includ citarabina și antraciclina.

Citarabina, cunoscută și sub numele de AraC, ucide celulele canceroase și alte celule normale care se divid rapid, interferând cu sinteza ADN-ului. Efectele secundare asociate tratamentului cu AraC includ rezistența scăzută la infecție, rezultatul scăderii producției de celule albe din sânge; sângerări, ca urmare a scăderii producției de trombocite; și anemie, datorită unei potențiale reduceri a globulelor roșii din sânge. Alte reacții adverse includ greață și vărsături. Antraciclina

10 (*de exemplu*, daunorubicina, doxorubicina și idarubicina) au mai multe moduri de acțiune, incluzând inhibarea sintezei ADN și ARN, întreruperea structurilor de ADN de ordin superior și producerea de celule care distrug radicalii liberi de oxigen. Cel mai important efect advers al antraciclinelor este cardiotoxicitatea, care limitează considerabil doza administrată pe tot parcursul vieții și într-o oarecare măsură utilitatea lor.

15 Astfel, din nefericire, în pofida progreselor substanțiale în tratamentul AML nou diagnosticate, 20% la 40% dintre pacienți nu obțin remisiune cu chimioterapia de inducere standard și 50% la 70% dintre pacienții care intră în prima remisiune completă sunt de așteptat să recidiveze în termen de 3 ani. Strategia optimă în momentul recăderii sau pentru pacienții cu boală rezistentă rămâne incertă. Transplantul cu celule stem a fost stabilit ca fiind cea mai eficientă formă de terapie antileucemică la pacienții cu AML în prima sau ulterioara remisiune (Roboz, 2012).

25 Conjugatii anticorp-medicament (ADC) și alți conjugati agent de legare celulară-medicament apar ca o clasă puternică de agenți antitumorali cu eficacitate într-o serie de tipuri de cancere. Conjugatii agent de legare celulară-medicament (cum ar fi ADC-urile) sunt compuși de obicei din trei elemente distincte: un agent de legare a celulelor (*de exemplu*, un anticorp); un linker; și un fragment citotoxic. Convențional, fragmentul de medicament citotoxic este atașat covalent la resturile de lizină de pe anticorp sau la resturile de cisteină, obținute prin reducerea legăturilor disulfurice inter-catenare, rezultând ADC-uri care sunt amestecuri heterogene care poartă un număr diferit de medicamente atașate la diferite poziții pe molecula anticorpului.

In WO 2015/044386 (Ablynx NV), sunt descrise polipeptide bispecifice care cuprind un prim și un al doilea domeniu variabil unic de imunoglobulină (ISV), în care primul ISV se leagă la o prim țintă pe suprafața unei celule canceroase cu o afinitate scăzută și, atunci când este legată inhibă o funcție a primei ținte menționate, și al doilea ISV se leagă de o a doua țintă de pe suprafața celulei menționate cu o afinitate mare și în care prima țintă menționată este diferită de a doua țintă menționată. Sunt de asemenea descrise metode de identificare și obținere a unor astfel de polipeptide bispecifice.

40 In WO 2015/026892 (MacroGenics Inc), sunt descriși diacorpi monovalenți bispecfici CD 123 x CD3 optimizați pentru secvență, care sunt capabili de legarea simultană la CD 123 și CD3. Sunt descrise, de asemenea, utilizările unor astfel de diacorpi în tratamentul malignităților hematologice.

45 X. Du, M. Ho și I. Pastan în J. Immunother. 2007, 30(6), 607-613, raportează sinteza unor imunotoxine dezvoltate pentru a ținti selectiv CD123. ARN-urile totale sunt extrase din hibridomii 26292, 32701 și 32716 anti-CD123 și utilizate pentru a produce fragmente variabile cu un singur lanț care sunt apoi fuzionate cu un fragment de 38 kd de exotoxină *A pseudomonas*.

50 In EP 2426148 (Kyowa Hakko Kirin Co), este descris un anticorp la lanțul IL-3Ra uman, care nu inhibă semnalizarea IL3 și se leagă de domeniul B, dar nu se leagă de domeniul C al lanțului uman IL-3Ra. De asemenea, este descrisă o compoziție pentru prevenirea sau tratarea unei tumori a sângelui în care o celulă care exprimă IL-3Ra se găsește în măduva osoasă sau în sângele periferic al unui subiect, care cuprinde anticorpul la IL-3Ra uman ca ingredient activ, precum și o metodă de tratare a unei tumori a sângelui în care o celulă care exprimă IL-3Ra se găsește în măduva osoasă sau în sângele periferic, metoda cuprinzând administrarea, la un subiect, a unei compoziții cuprinzând ca ingredient activ anticorpul IL-3Ra.

In WO 2012/021934 (CSL Ltd), sunt descriși anticorpi izolați sau recombinanți capabili să se lege specific la lanțul interleukină IL-3R α și utilizări ale acestora. Anticorpul cuprind regiuni variabile specifice lanțului ușor și lanțului greu.

5 In WO 2008/127735 (Stemline Therapeutics Inc), sunt descriși anticorpi care se leagă de lanțul subunității de IL-3 R α (113 R α) și compoziții care cuprind astfel de anticorpi. Sunt de asemenea descrise metode de inhibare sau reducere a unei populații de celule care exprimă IL-3R α și cuprind contactarea unei populații de celule care exprimă IL-3R α cu anticorpii. Sunt de asemenea descriși conjugați care cuprind anticorpi legați la un agent citotoxic sau agent anticelular
10 și compoziții care cuprind astfel de conjugați, precum și metode pentru prevenirea, tratarea și/sau gestionarea unei tulburări asociate cu celule care exprimă IL-3R α , care cuprind administrarea anticorpului.

15 Huang, L. in "Generation and Functional Assays of Acute Myeloid Leukemic Stem Cells Targeted Anti-CD123 Monoclonal Antibody", 2011, o teză de doctorat susținută la Huazhong University of Science and Technology, descrie purificarea și identificarea unui domeniu extracelular IL3-R α /proteină de fuziune Fc ca un imunogen.

20 REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se bazează pe constatările surprinzătoare conform cărora conjugați conform prezentei invenții sunt deosebit de eficienți împotriva diferitelor celule canceroase care exprimă CD123, în special leucemie cu cel puțin un factor de prognostic negativ.

25 Anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia poate (a) lega un epitop in aminoacizii 101 la 346 ai antigenului CD123/IL3-R α uman și (b) inhiba proliferarea dependentă de IL3 in celule TF-1 pozitive la antigen.

30 Anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia poate lega un epitop in aminoacizii 101 la 204 ai antigenului CD123 uman. Anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului a acestuia poate lega un epitop din aminoacizii 205 la 346 ai antigenului CD123 uman.

35 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate (a) lega un epitop in interiorul aminoacizilor 1 la 100 ai antigenului CD123 uman, și (b) inhiba proliferarea dependentă de IL3 in celule TF-1 pozitive la antigen, cu o valoare IC₅₀ de 0,1 nM sau mai mică (*de exemplu*, 0,08 nM, 0,05 nM, 0,03 nM).

Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate inhiba proliferarea celulelor stem leucemice sau a celulelor blaste leucemice dar nu a celulelor stem hematopoietice.

40 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega la celule pozitive la antigenul CD123 umane cu o constantă de disociere (K_d) de 0,3 nM sau mai scăzută, cum ar fi cuprinsă între 0,01 nM și 0,3 nM, între 0,01 nM și 0,2 nM, între 0,01 nM și 0,19 nM, între 0,01 nM și 0,18 nM, între 0,01 nM și 0,15 nM, sau între 0,01 nM și 0,1 nM.

45 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega la CD123 de maimuță cynomolgus. De exemplu, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega la CD123 de maimuță cynomolgus cu o K_d cuprinsă între 0,05 și 0,3 nM, între 0,05 și 0,2 nM, între 0,05 nM și 0,19 nM, între 0,05 nM și 0,18 nM, între 0,05 nM și 0,15 nM, sau între 0,05 și 0,1 nM. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega atât la
50 CD123 uman cât și de maimuță cynomolgus cu o afinitate de legare substanțial similară. De exemplu, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega la CD123 uman și de maimuță cynomolgus cu o K_d cuprinsă între 0,05 și 0,3 nM, între 0,05 și 0,2 nM, sau între 0,05 și 0,1 nM. Valoarea K_d poate fi măsurată prin citometrie de flux, rezonanță plasmonică de suprafață sau radioimunoanaliză.

55 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate inhiba cel puțin 50% din proliferarea dependentă de IL3 în celulele TF-1 pozitive la antigen la o concentrație de 0,5 nM sau mai scăzută.

60 Intr-un prim aspect, este redat un anticorp sau fragment de legare a antigenului acestuia, cuprinzând:

- (i) (a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 1; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 2 sau SECV ID NR: 3; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 4; și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 18;
- (ii) (a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 5; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 6, SECV ID NR: 7, SECV ID NR: 8, SECV ID NR: 9, sau SECV ID NR: 10; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 11; și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 20, sau SECV ID NR: 72; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 21 sau SECV ID NR: 71; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; sau
- (iii) a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13 sau SECV ID NR: 14; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15 sau SECV ID NR: 70; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25.

În anumite modalități de realizare, anticorpul este un anticorp umanizat grefat pe CDR care cuprinde regiuni CDR de șoarece și în care unul sau mai multe (*de exemplu*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, sau 8) resturi ale zonei vernier ale regiunii cadru a lanțului greu și/sau a lanțului ușor ale anticorpului menționat sunt de origine de șoarece.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 sau 40; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34, este Phe. În alte modalități de realizare, Xaa este Val.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 sau 40, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 sau 40; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser, și cu excepția faptului că restul din poziția care corespunde aceleiași poziții Kabat de la al 5^{lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys (*adică*, Cys din poziția numărului EU/OU 442); și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul din poziția care

corespunde aceleiași poziții Kabat de la cel de-al 5^{lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser.

5 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 38; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35.

10 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37.

15 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 56; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35.

20 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 54; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37.

25 În anumite modalități de realizare, Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 38, 34, 56, și 54, este Phe. În alte modalități de realizare, Xaa este Val.

30 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul din poziția corespunzătoare aceleiași poziții Kabat de la cel de-al 5^{lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 41.

35 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 54; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35.

40 În anumite modalități de realizare, Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54 sau 56, este Phe. În alte modalități de realizare, Xaa este Val.

45 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 1, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2 sau 3, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 4; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 16, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 17, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 18.

50 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 5, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 6, 7, 8, 9, sau 10, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 11; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 19 sau 20, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 21, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 22.

60 În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 12, o CDR2 având o secvență

de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 13 sau 14, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 15; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 23, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 24, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 25.

În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o secvență V_H cel puțin 95% identică cu o secvență V_H de referință selectată din grupul care constă din: SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (preferabil 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau, b) o secvență V_L cel puțin 95% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul care constă din: SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (preferabil 27, 29, 31, 35, și 37). În anumite modalități de realizare, secvența V_H este cel puțin 99% identică cu una dintre SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (preferabil 26, 28, 30, 32, 34, și 38), și/sau în care secvența V_L este cel puțin 99% identică cu una dintre SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (preferabil 27, 29, 31, 35, și 37). În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde: a) o secvență V_H selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (preferabil 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau, b) o secvență V_L selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (preferabil 27, 29, 31, 35, și 37). În anumite modalități de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde o secvență V_H a SECV ID NR: 26 și o secvență V_L a SECV ID NR: 27, sau o secvență V_H a SECV ID NR: 28 și o secvență V_L a SECV ID NR: 29, sau o secvență V_H a SECV ID NR: 30 și o secvență V_L a SECV ID NR: 31, sau o secvență V_H a SECV ID NR: 34 și o secvență V_L a SECV ID NR: 35.

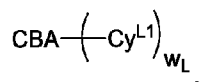
În anumite modalități de realizare, anticorpul este de la o murină, mamifer non-uman, himeric, umanizat, sau anticorp uman. De exemplu, anticorpul umanizat poate fi un anticorp grefat pe CDR sau anticorp refăcut la suprafață. În anumite modalități de realizare, anticorpul este un anticorp cu lungime completă. În anumite modalități de realizare, fragmentul de legare la antigen al acestuia este un Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, Fv cu un singur lanț sau scFv, Fv legat prin disulfură, domeniu V-NAR, IgNar, intracopr, IgGACH₂, minicorp, F(ab')₃, tetracorp, triacorp, diacorp, anticorp cu un singur domeniu, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, sau scFv-Fc.

Un al doilea aspect al invenției redă o polipeptidă care cuprinde secvențele V_H și V_L ale oricărui anticorp în cauză sau fragment de legare la antigen al acestuia. Polipeptida poate fi o fuziune cu o proteină care nu este o toxină pseudomonas.

Un al treilea aspect al invenției redă o celulă care produce anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau polipeptida conform invenției.

Un al patrulea aspect al invenției redă o metodă de producere a anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau a polipeptidei conform invenției, care cuprinde: (a) cultivarea celulei conform invenției; și, (b) izolarea anticorpului, a fragmentului de legare la antigenului al acestuia sau a polipeptidei din celula cultivată. În anumite modalități de realizare, celula este o celulă eukariotă.

În al cincilea aspect al invenției, este redat un imunoconjugat având următoarea formulă:



în care:

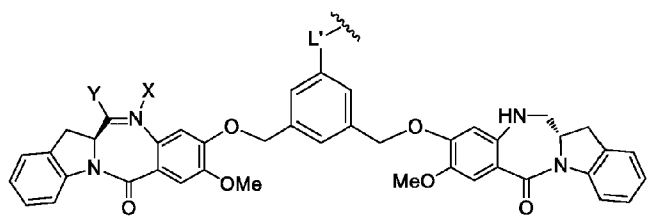
CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

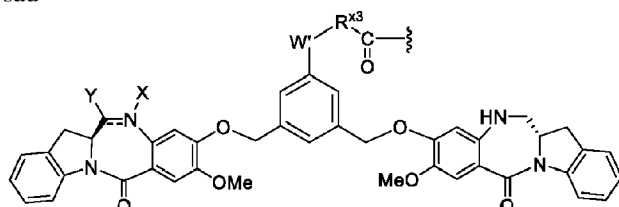
sau polipeptida acestora conform invenției, care este legată covalent printr-un rest de lizină la Cy^{L1} ;

w_L este un număr întreg de la 1 la 20; și

Cy^{L1} este reprezentat de următoarea formulă:

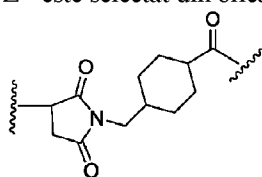


sau

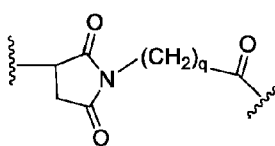


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

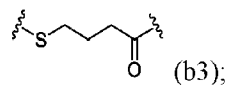
- 5 linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C_1-C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau $-SO_3M$;
- 10 W' este $-NR^{e'}$;
 $R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
 n este un număr întreg de la 2 la 6;
 R^k este -H sau -Me;
 R^{x3} este un alchil(C_1-C_6);
 L' este reprezentat de următoarea formulă:
- 15 $-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');
sau
 $-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-$ (B3');
- 20 R_5 este -H sau un alchil(C_1-C_3);
 P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține de la 2 la 20 resturi de aminoacid;
 R_a și R_b , la fiecare apariție, sunt fiecare independent -H, alchil(C_1-C_3), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;
 m este un număr întreg de la 1 la 6; și
- 25 Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



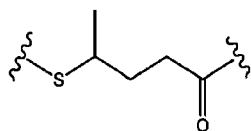
(b1);



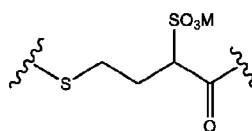
(b2);



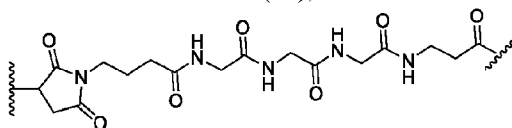
(b3);



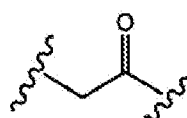
(b4);



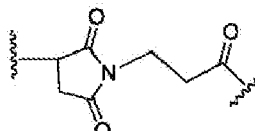
(b5),



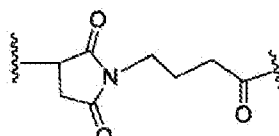
(b6),



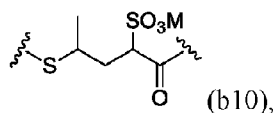
(b7);



(b8);



(b9); și



in care:

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

M este H^+ sau un cation.

5

În anumite modalități de realizare, R_a și R_b sunt ambii H; și R_5 este H sau Me.

În anumite modalități de realizare, P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P poate fi selectat din Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe- N^9 -tosil-Arg, Phe- N^9 -nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. În anumite modalități de realizare, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

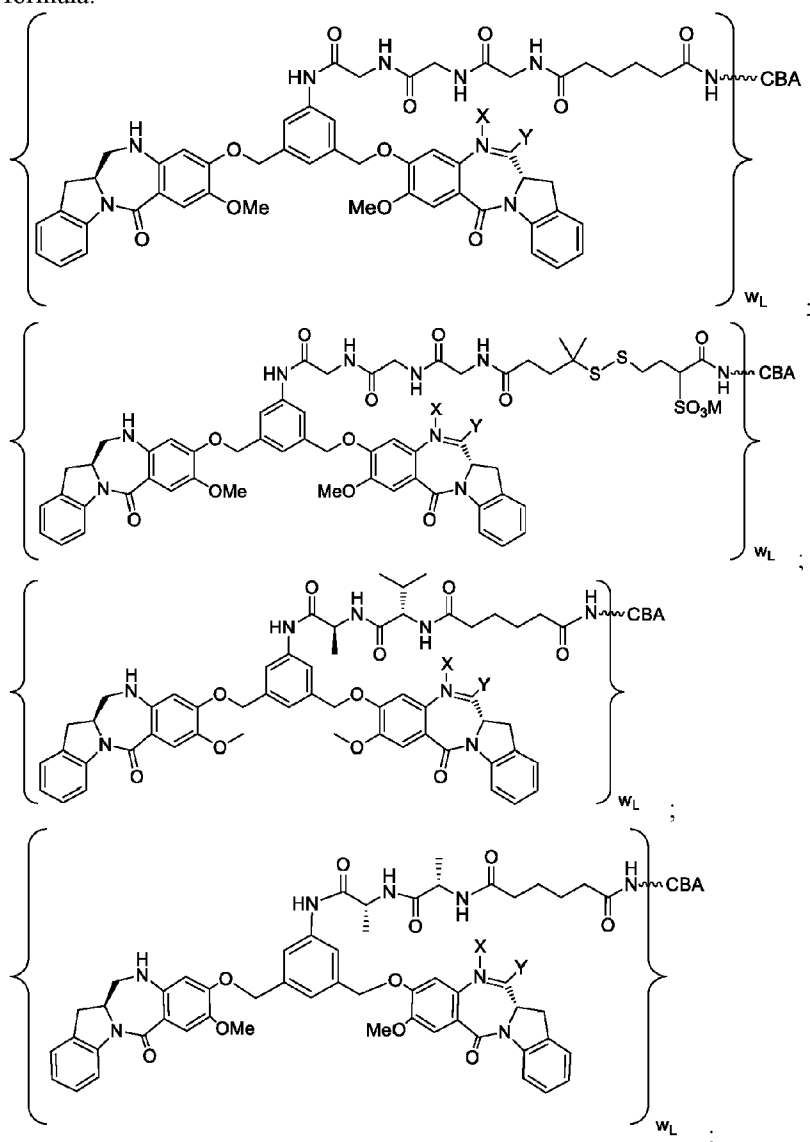
10

15

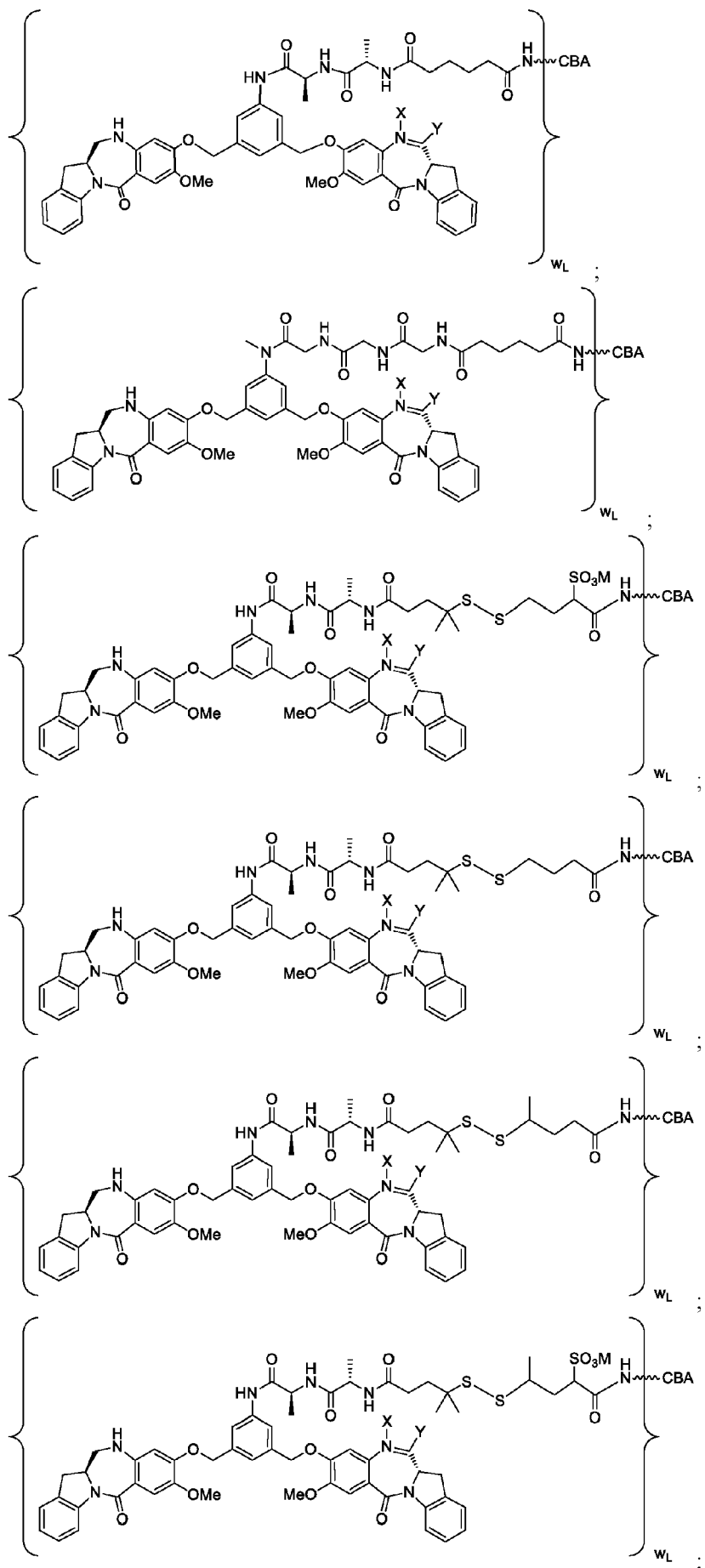
În anumite modalități de realizare, Q este $-SO_3M$.

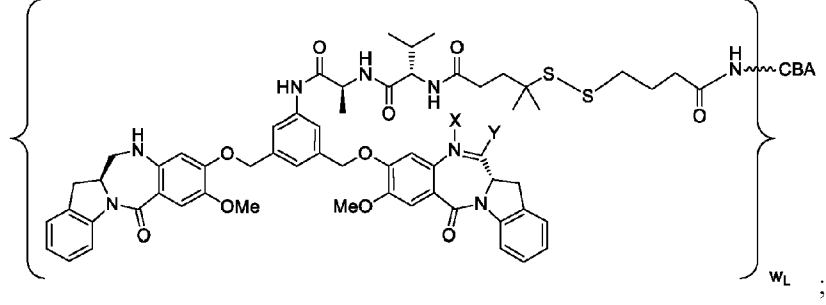
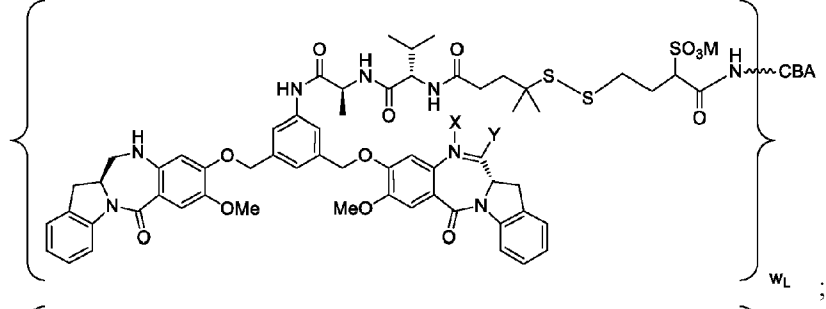
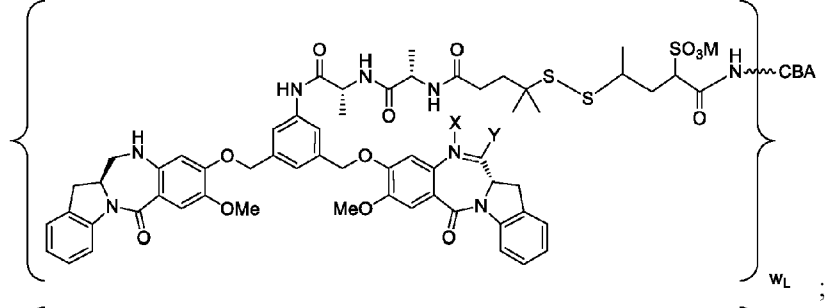
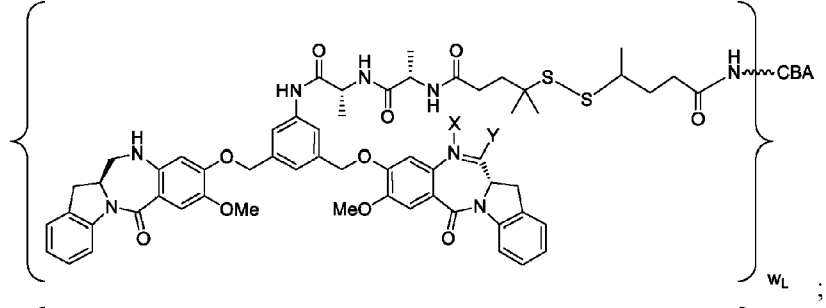
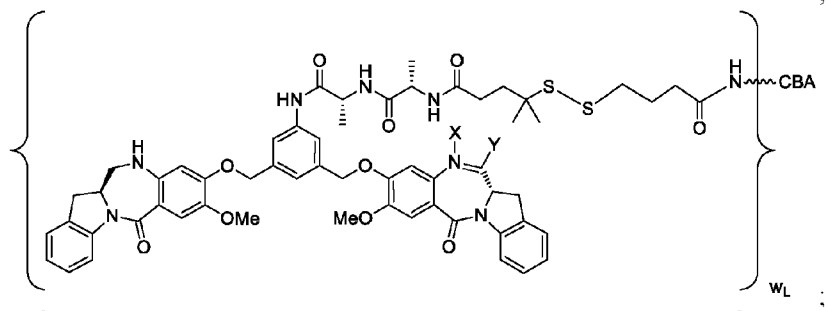
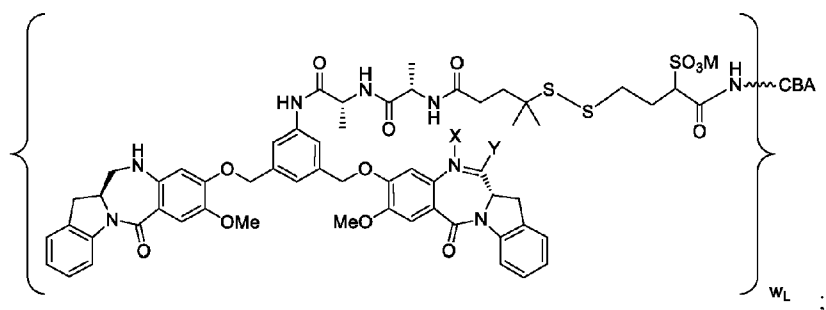
În anumite modalități de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:

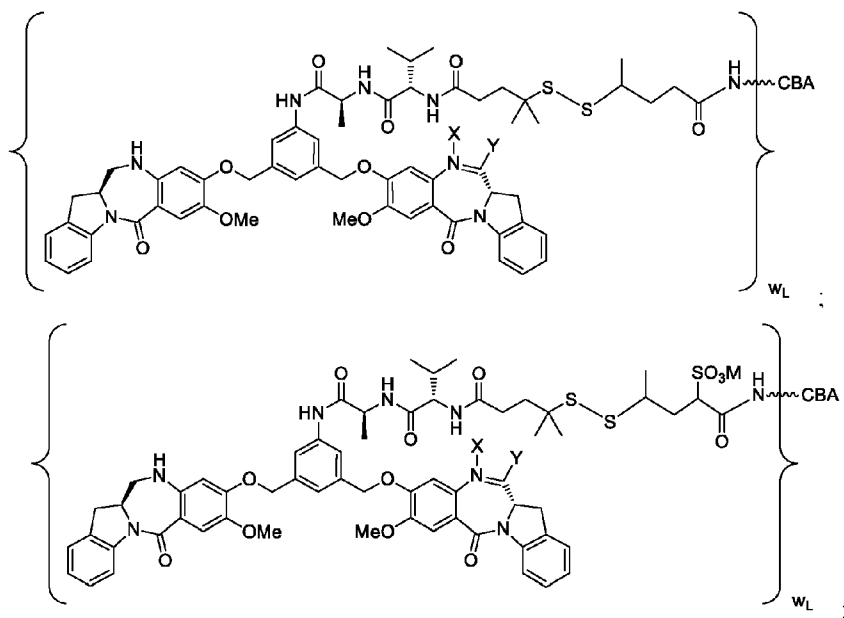
20



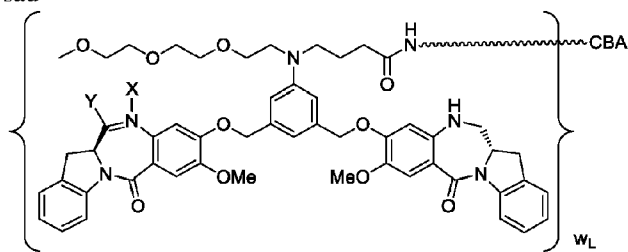
25





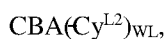


sau



- 5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 la 10; linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau $-SO_3M$.

- 10 Al cincilea aspect redă, de asemenea, un imunoconjugat având formula:

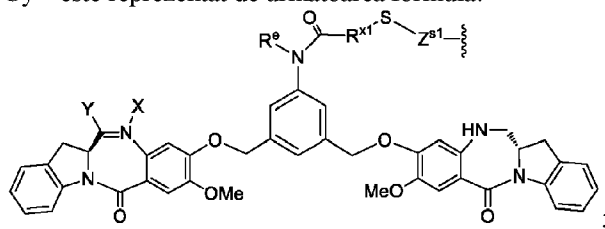


in care:

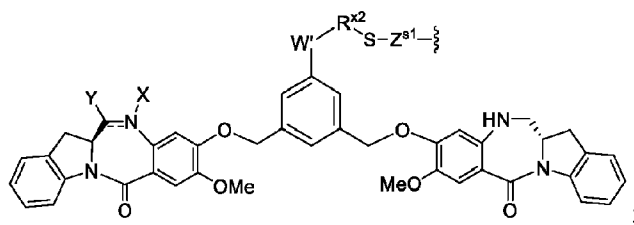
- 15 CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care cuprinde:

- a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

- 20 sau o polipeptida a acestora conform invenției, care este legată covalent la Cy^{L2} printr-un rest de lizină;

 W_L este un număr întreg de la 1 la 20; și Cy^{L2} este reprezentat de următoarea formulă:

- 25 sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau -SO₃M;

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

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

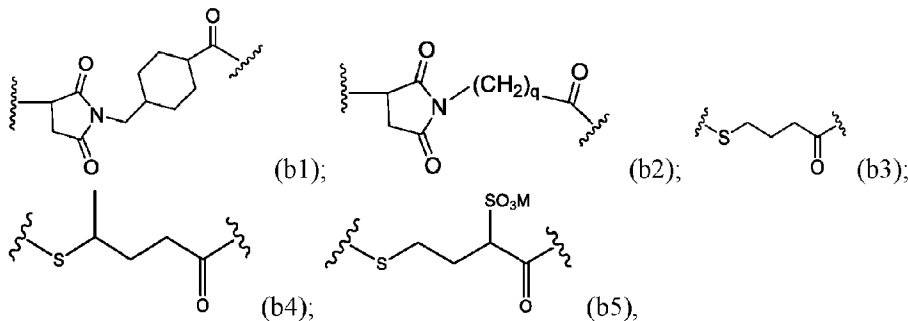
W' este -NR^{e'};

10 R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

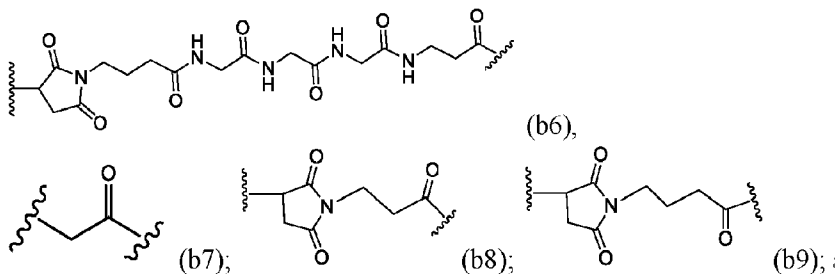
n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

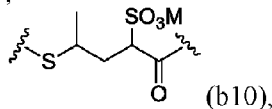
Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



15



și



20

in care:

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

M este -H⁺ sau un cation.

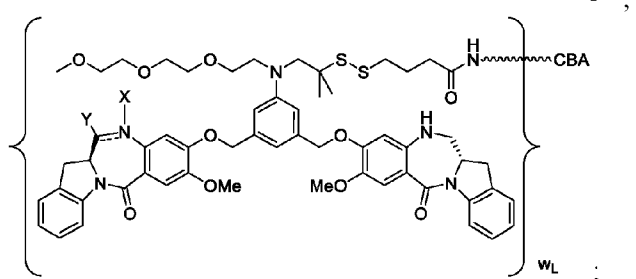
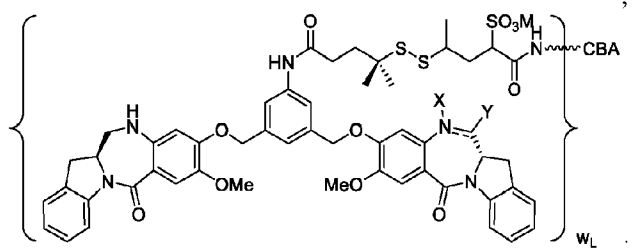
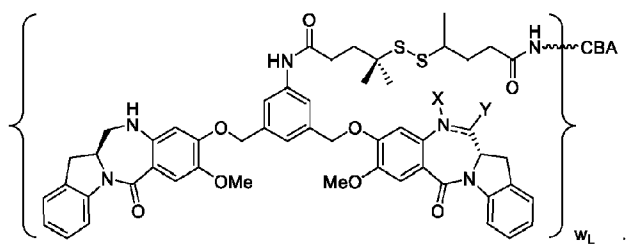
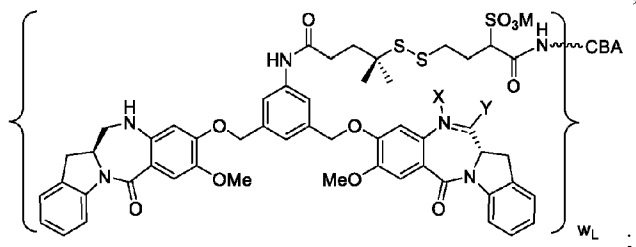
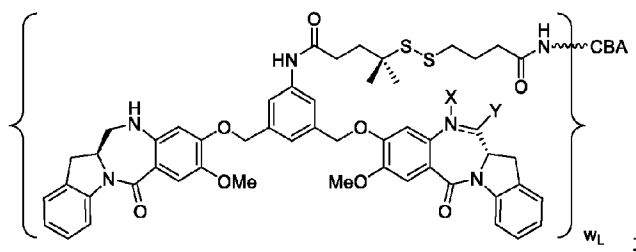
25

În anumite modalități de realizare, R^e este H sau Me; R^{x1} și R^{x2} sunt independent -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, în care R^f și R^g sunt fiecare independent -H sau un alchil(C₁-C₄); și p este 0, 1, 2 sau 3.

În anumite modalități de realizare, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selectați dintre -H și -Me.

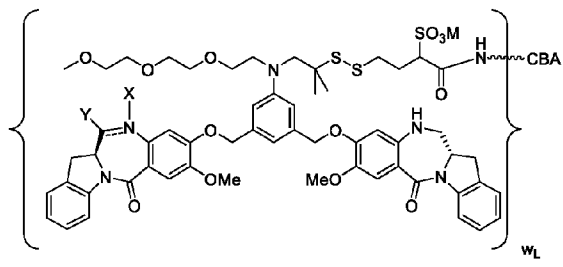
30

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



5

sau



10

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care w_L este un număr întreg de la 1 la 10;

linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H și Y este -OH sau -SO₃M.

În anumite modalități de realizare, linia dublă $\equiv$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. În anumite modalități de realizare, linia dublă $\equiv$ dintre N și C

reprezintă o legătură simplă, X este -H, și Y este -SO₃M. În anumite modalități de realizare, M este H⁺, Na⁺ sau K⁺.

5 În al cincilea aspect al invenției, este redat, de asemenea, un imunoconjugat având formula:

CBA(Cy^{L3})_{WL},

în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care

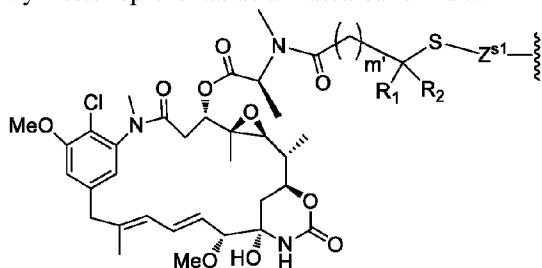
10 a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

sau polipeptida conform invenției, care este legată covalent la Cy^{L3} printr-un rest Lys;

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

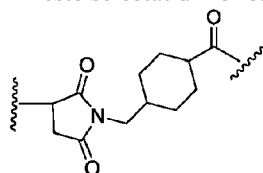
Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:



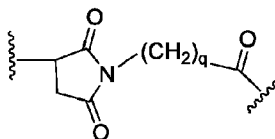
m' este 1 sau 2;

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

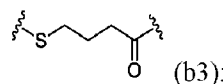
20 Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



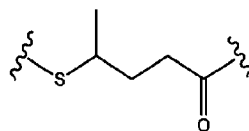
(b1);



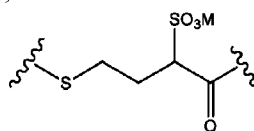
(b2);



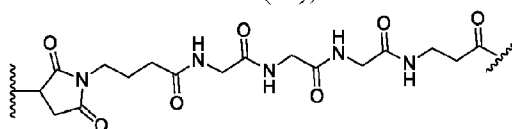
(b3);



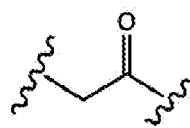
(b4);



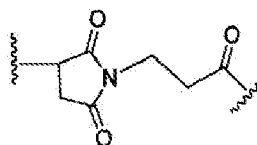
(b5);



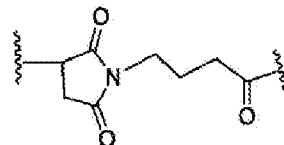
(b6);



(b7);



(b8); și



(b9);

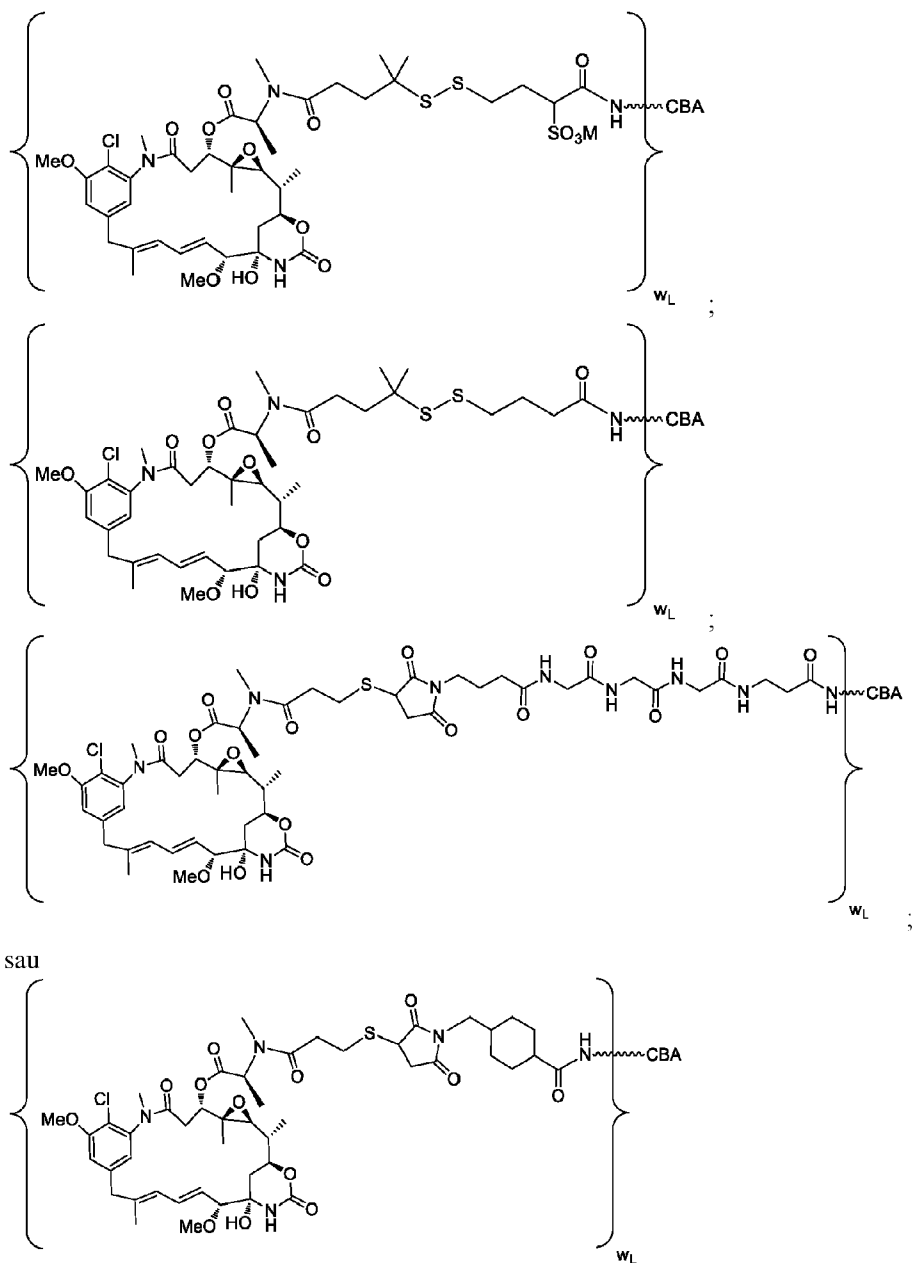
25 în care:

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

M este H⁺ sau un cation.

30 În anumite modalități de realizare, m' este 1, și R₁ și R₂ sunt ambii H. În anumite alte modalități de realizare, m' este 2, și R₁ și R₂ sunt ambii Me.

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



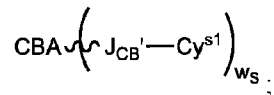
5

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

În anumite modalități de realizare, M este H^+ , Na^+ sau K^+ .

10

Într-un al șaselea aspect al invenției, este redat un imunoconjugat având următoarea formulă:



în care:

15

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care cuprinde:

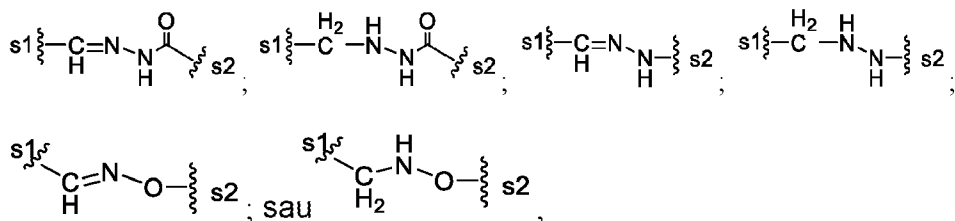
- a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și
- b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37,

20

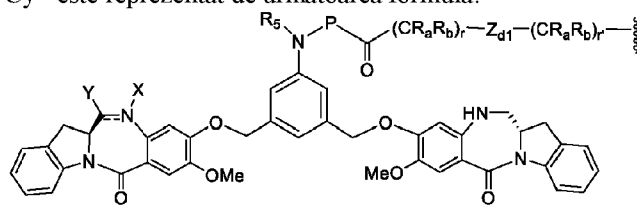
sau polipeptida acestuia conform invenției, legată covalent la gruparea $J_{CB'}$;

W_S este 1, 2, 3, sau 4;

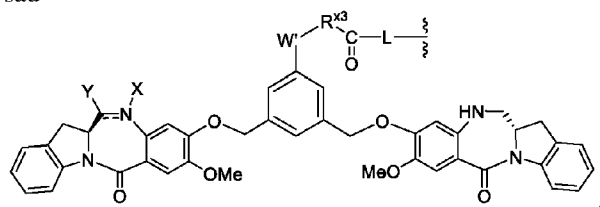
J_{CB}' este un fragment format prin reacția unei grupări de aldehydă derivată din oxidarea unui fragment de 2-hidroxietylamină (în care fragmentul de 2-hidroxietylamină poate face parte dintr-un rest de serină, treonină, hidroxilizină, 4-hidroxiornitină sau acid 2,4-diamino-5-hidroxi valeric) pe N-terminalul respectivului anticorp sau fragment de legare a antigenului acestuia sau a polipeptidei acestuia menționate și a unei grupări reactive aldehydice pe Cy^{s1}, și este reprezentat de următoarea formulă:



în care s1 este partea legată covalent la CBA; și s2 este partea legată covalent la Cy^{s1}; Cy^{s1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă = - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R₅ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;

Z_{d1} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

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

r și r' sunt independent un întreg de la 1 la 6;

W' este -NR^e;

R^e este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un alchil(C₁-C₆);

L este -NR₉-(CR_aR_b)_r sau absent; și

r'' este un număr întreg de la 0 la 6.

Pentru simplitate, în fiecare caz de mai jos, în care se menționează Ser ca rest N-terminal, ar trebui să se înțeleagă că, este luat în considerare, acolo unde este cazul, un alt fragment 2-hidroxietylamină, ca parte a unei serine, treonine, hidroxilizine, 4-hidroxiornitine sau rest de acid 2,4-diamino-5-hidroxi valeric, în special în ceea ce privește Thr.

În anumite modalități de realizare, R_a și R_b sunt ambii H, și R₅ și R₉ sunt ambii H sau Me.

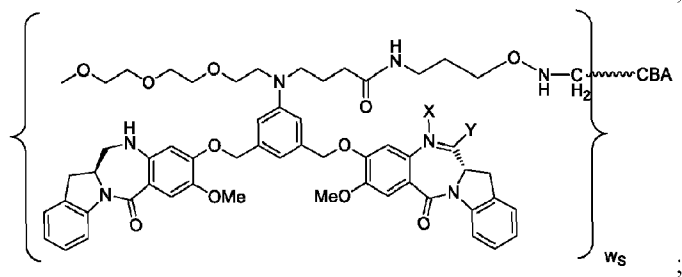
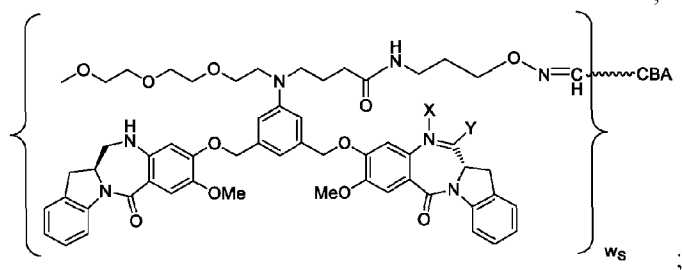
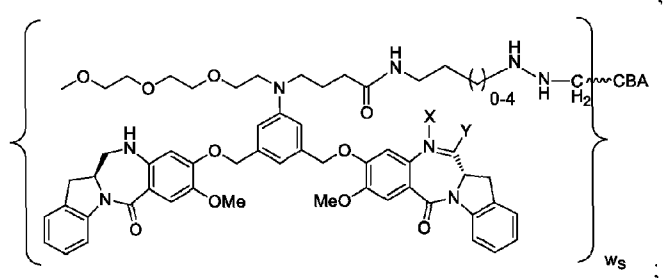
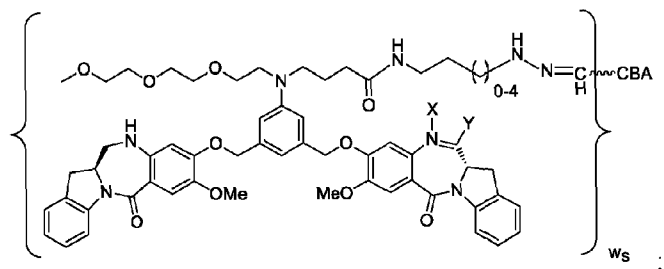
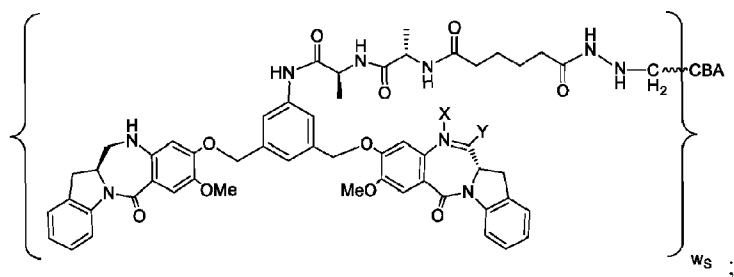
În anumite modalități de realizare, P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P poate fi selectat din grupul care constă din: Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-

5

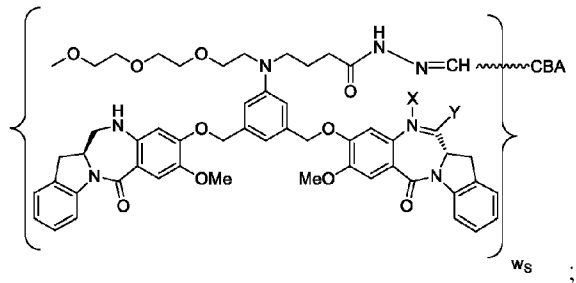
10



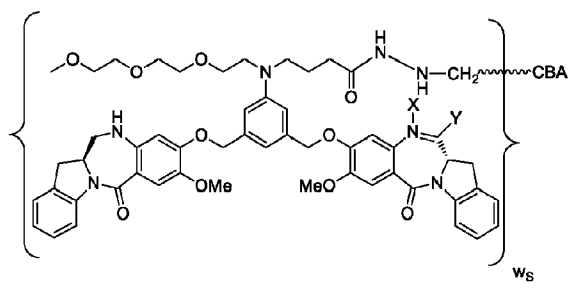
15



5



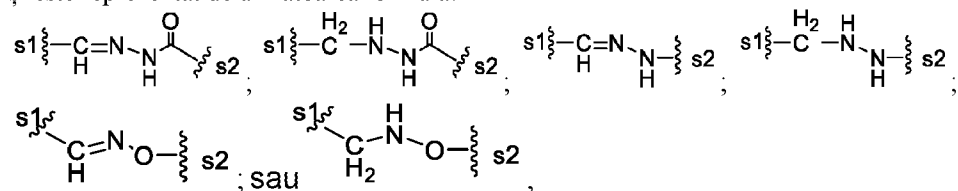
sau



5

$$CBA \sim \left(J_{CB'} - Cy^{s_2} \right)_{WS}.$$

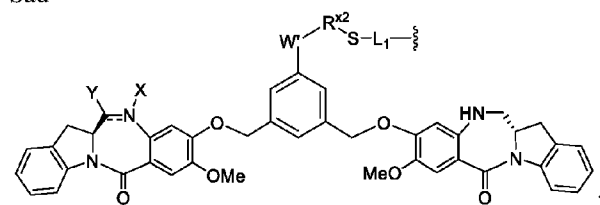
20 și este reprezentat de următoarea formulă:



The chemical structure shows a central benzene ring substituted at the 1 and 3 positions with two identical groups. Each group consists of a methylene group (-CH₂-) connected to the 3-position of an indole ring. The indole ring has a carboxamide group (-CONH-) at the 2-position, with a wavy line indicating a bond to a substituent. The indole ring also has a methoxy group (-OMe) at the 4-position. The central benzene ring has a substituent at the 4-position, which is a group -N(R^a)-C(=O)-R^x-S-L₁, where L₁ is a wavy line representing a linker.

25

Sau



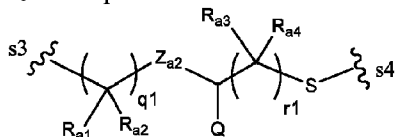
M este H^+ sau un cation:

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

$$R^{e'} \text{ este } -(CH_2-CH_2-O)_n-R^k;$$

R^k este -H sau -Me;

L_1 este reprezentat de următoarea formulă:



s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB'};

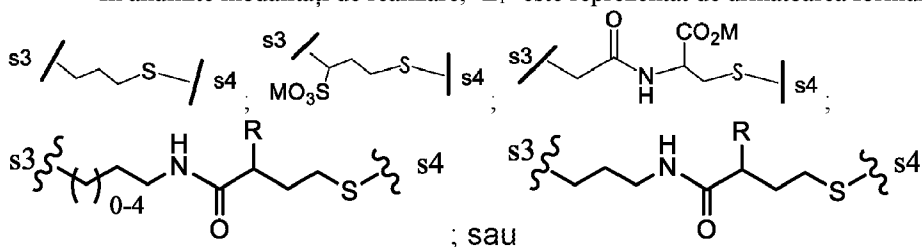
Z_{a2} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} , la fiecare apariție, sunt independent H sau alchil(C_1 - C_3); și

q1 și r1 sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 10, cu condiția ca, q1 și r1 să nu fie ambii 0.

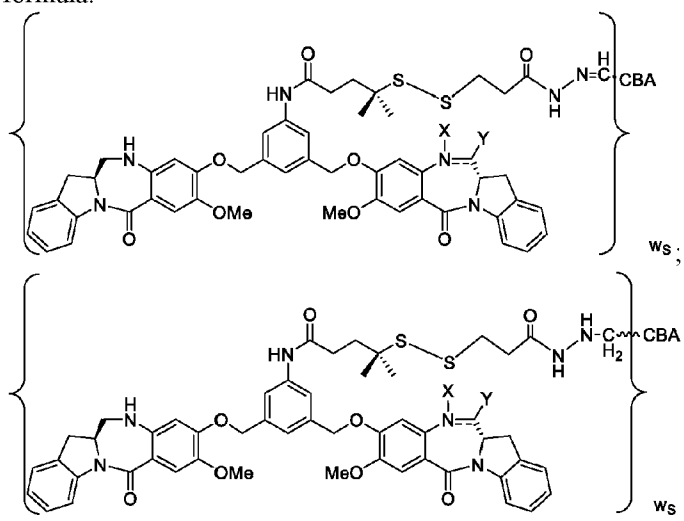
20

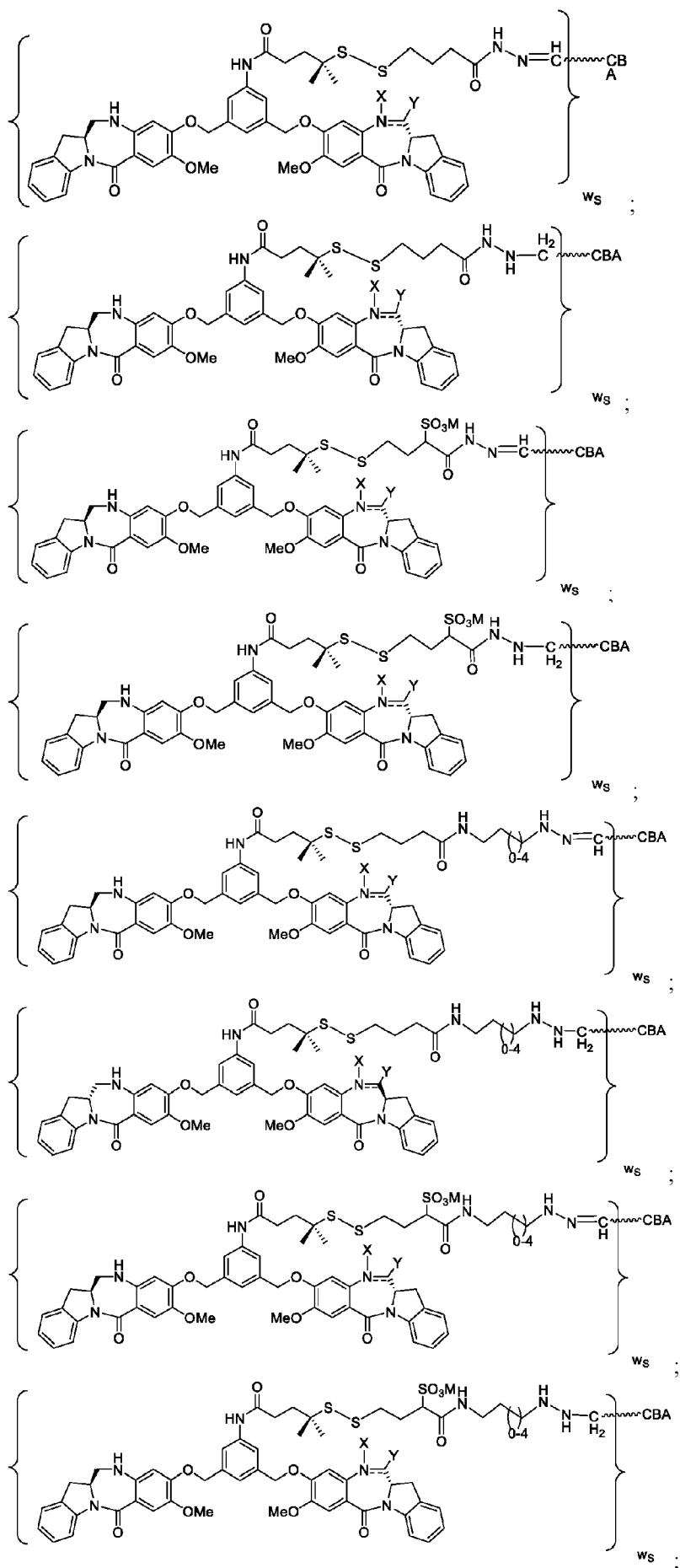


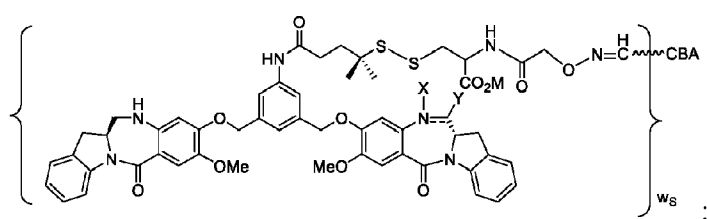
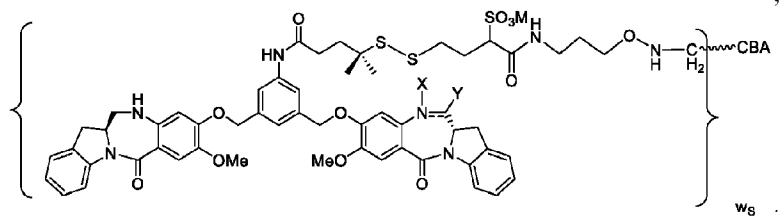
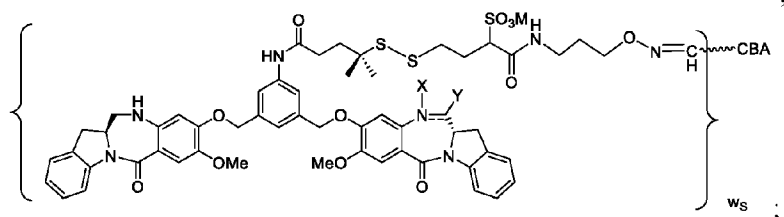
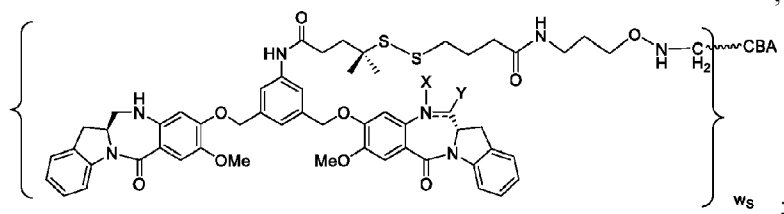
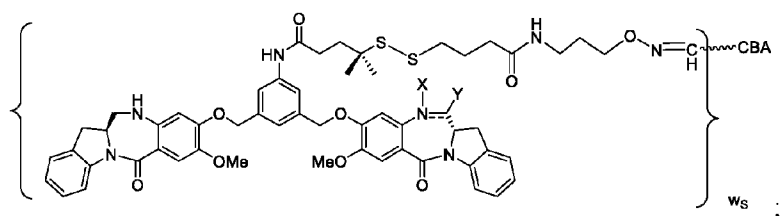
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R este H sau -SO₃M.

În anumite modalități de realizare, R^e este H sau Me; și R^{x1} este $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, și R^{x2} este $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, în care R^f și R^g sunt fiecare independent -H sau un alchil (C_1-C_4); și p este 0, 1, 2 sau 3. În anumite modalități de realizare, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selecționați dintre -H și -Me.

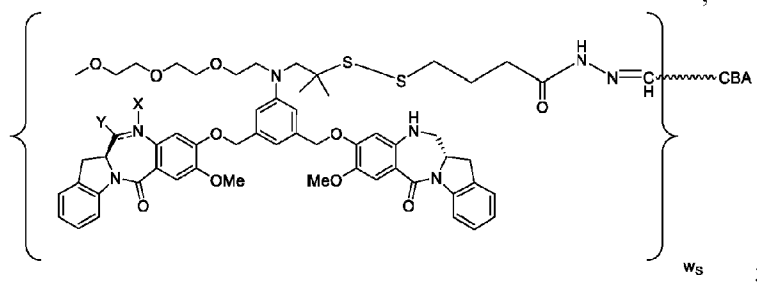
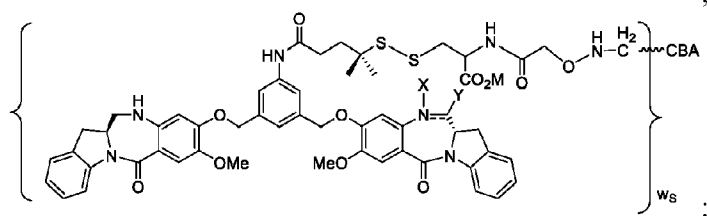
În anumite modalități de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:



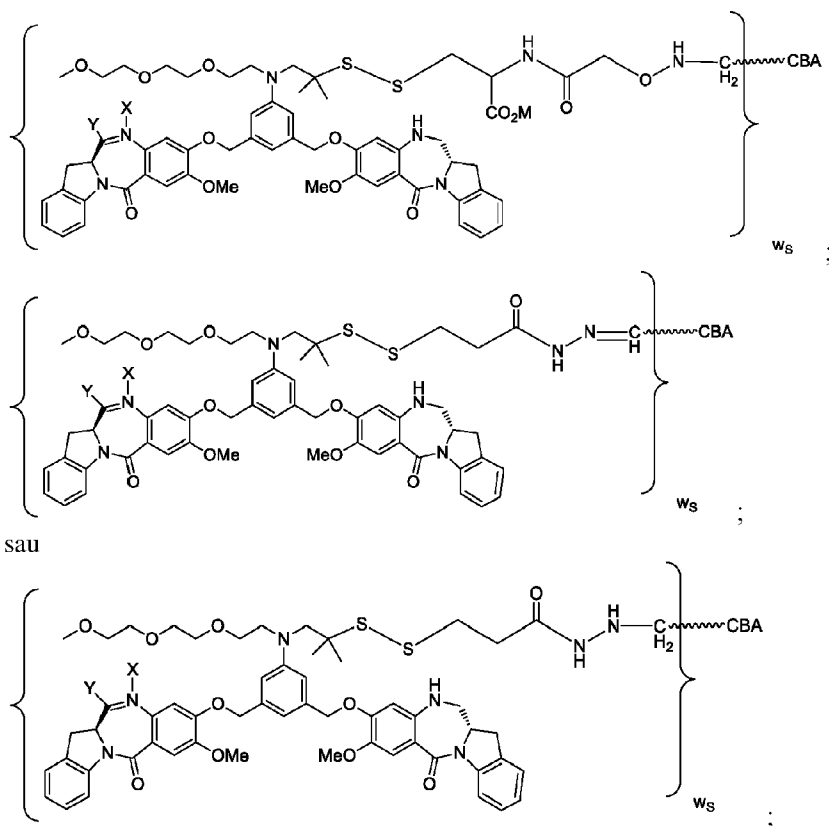




5







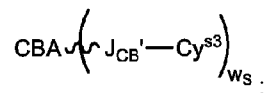
sau

- 5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H; și Y este -OH sau -SO₃M.

- 10 În anumite modalități de realizare, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H.

În anumite modalități de realizare, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃M. În anumite modalități de realizare, M este H⁺, Na⁺ sau K⁺.

- 15 În al șaselea aspect al invenției, este redat de asemenea un imunconjugat având următoarea formulă:



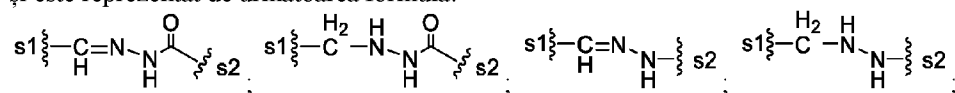
în care:

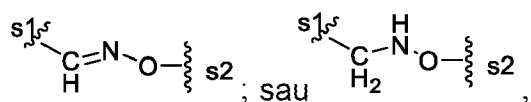
- 20 CBA este anticorpusul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care cuprinde:

- a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37,

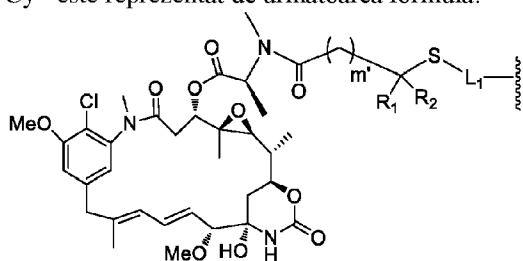
- 25 sau polipeptida acestuia conform invenției, legată covalent la gruparea J_{CB'};

J_{CB'} este un fragment format prin reacția unei grupări aldehidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxitilamină de pe un N-terminal a anticorpusului menționat sau fragment de legare la antigen al acestuia, sau polipeptida acestuia, și o grupare reactivă cu aldehida de pe Cy^{s3}, și este reprezentat de următoarea formulă:

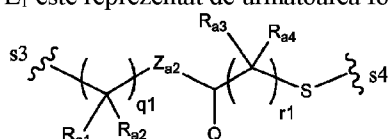




in care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s3}; Cy^{s3} este reprezentat de următoarea formulă:



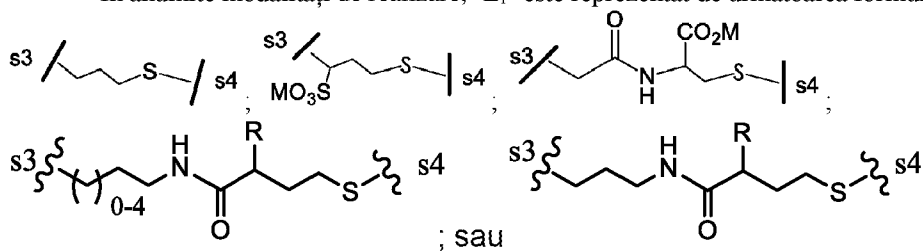
- 5 in care:
m' este 1 sau 2;
R₁ și R₂, sunt fiecare independent H sau un alchil(C₁-C₃);
L₁ este reprezentat de următoarea formulă:



- 10 in care:
s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB}';
s4 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{s3};
Z_{a2} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;
R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);
15 Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;
R_{a1}, R_{a2}, R_{a3}, R_{a4}, la fiecare apariție, sunt independent H sau un alchil(C₁-C₃); și
q1 și r1 sunt fiecare independent un intreg de la 0 la 10, cu condiția ca, q1 și r1 să nu fie ambii 0.

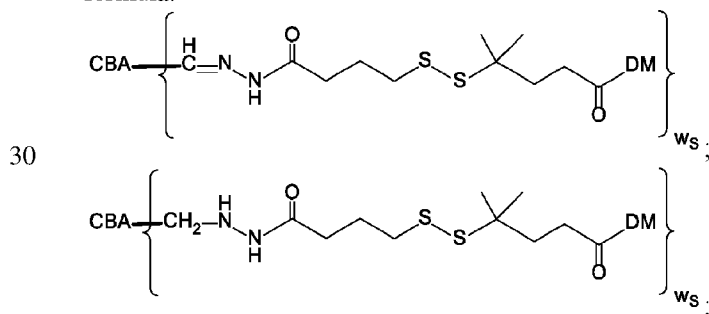
- 20 În anumite modalități de realizare, m' este 1 și R₁ și R₂ sunt ambii H. In anumite modalități de realizare, m' este 2 și R₁ și R₂ sunt ambii Me.

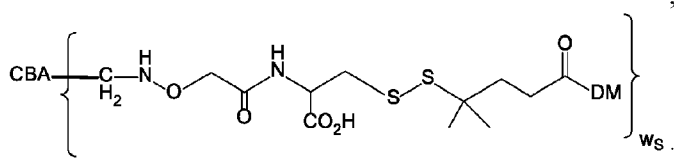
În anumite modalități de realizare, -L₁- este reprezentat de următoarea formulă:



- 25 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R este H sau -SO₃M și M este H⁺ sau un cation.

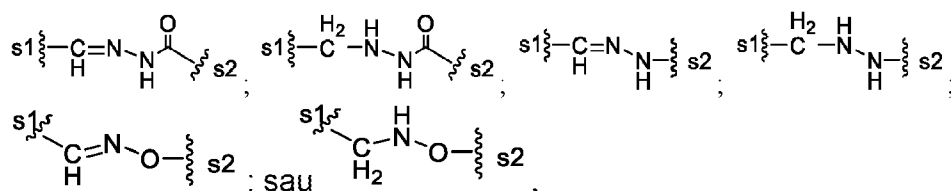
În anumite modalități de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:



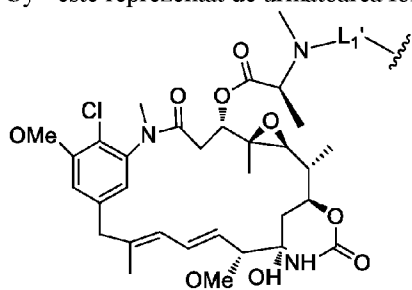


The chemical structure of compound 1 is a large macrocyclic lactone. It features a 4-chloro-3-methoxyphenyl group attached to the macrocycle via an amide linkage. The macrocycle contains a methylamino group (Me-N) and a methyl group (Me). The lactone ring is part of a larger cyclic structure that includes a double bond and a hydroxyl group (HO).

JCB' este un fragment format prin reacția unei grupări aldehidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxiethylamină de pe un N-terminal a anticorpului menționat sau fragment de legare la antigen al acestuia, sau polipeptidă a acestuia, și o grupare reactivă cu aldehida de pe Cy^{s4} și este reprezentat de următoarea formulă:

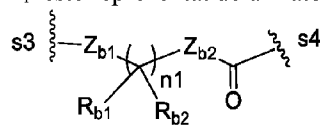


in care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s4};
Cy^{s4} este reprezentat de următoarea formulă:

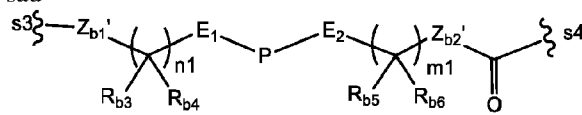


5

L1' este reprezentat de următoarea formulă:



sau



10

in care:

s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB}';

s4 este locul legat covalent la gruparea -NMe- de pe Cy^{s4};

Z_{b1} și Z_{b2} sunt ambii absenți, sau unul dintre Z_{b1} și Z_{b2} este absent și celălalt este -CH₂-O- sau -O-CH₂-;

15

Z_{b1'} și Z_{b2'} sunt fiecare independent absenți, -CH₂-O-, -O-CH₂-, -NR₉-C(=O)-CH₂-, sau -CH₂-C(=O)-NR₉-;

R₉ este H sau alchil(C₁-C₃);

n1 și m1 sunt fiecare independent un întreg de la 1 la 6;

20

unul dintre E₁ și E₂ este -C(=O)-, și celălalt este -NR₉-; sau unul dintre E₁ și E₂ este -C(=O)- sau -NR₉-, și celălalt este absent;

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

R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}, R_{b4}, R_{b5} și R_{b6}, la fiecare apariție, sunt fiecare independent H sau un alchil(C₁-C₃).

25

În anumite modalități de realizare, R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}, R_{b4}, R_{b5}, și R_{b6} sunt toți H. În anumite modalități de realizare, R₉ este H.

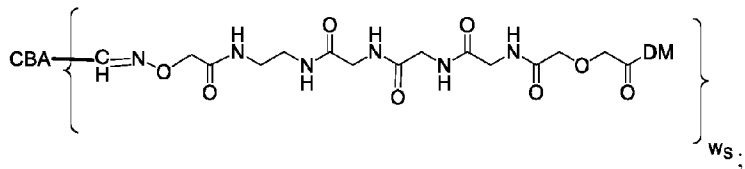
În anumite modalități de realizare, Z_{b1'} și Z_{b2'} sunt ambii absenți; sau Z_{b1'} este -CH₂-O-; și Z_{b2'} este absent; sau Z_{b1'} este -CH₂-C(=O)-NR₉-; și Z_{b2'} este -O-CH₂- sau absent.

30

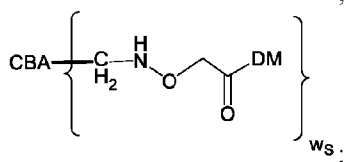
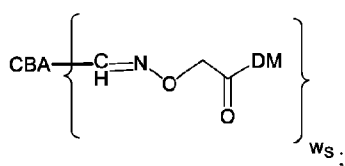
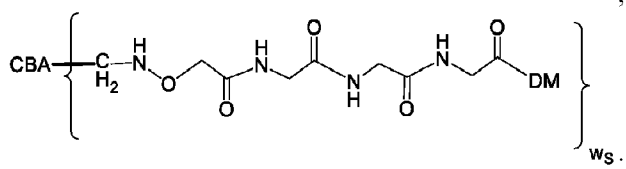
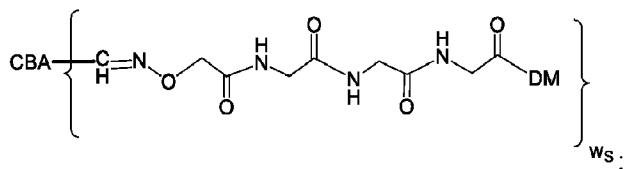
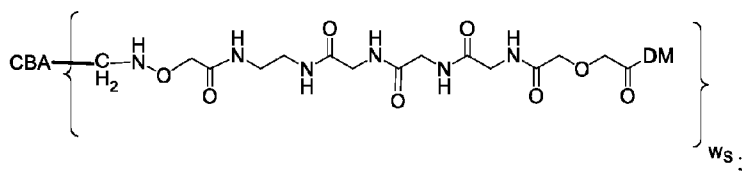
În anumite modalități de realizare, P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P poate fi selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. În anumite modalități de realizare, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, și D-Ala-D-Ala.

40

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

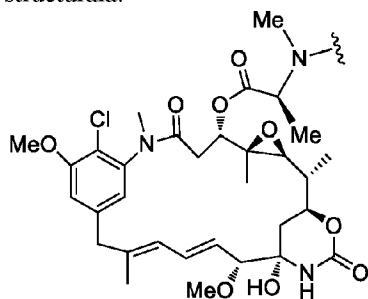


10



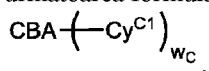
5

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care DM este reprezentat de următoarea formulă structurală:



10

Intr-un al șaptelea aspect al invenției, este redat un imunoconjugat reprezentat de următoarea formulă:



în care:

15

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care cuprinde:

a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 54; și

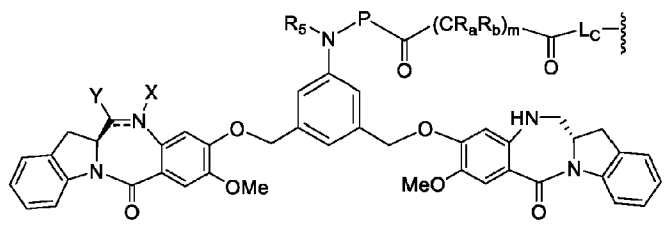
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

20

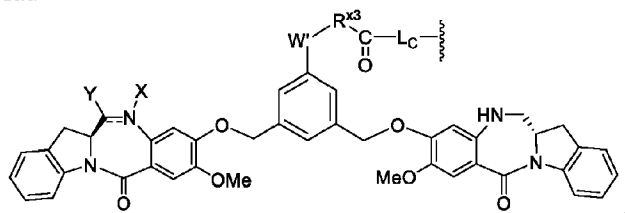
sau polipeptida acestuia conform invenției, legată covalent la Cy^{C1} printr-un rest de cisteină;

w_c este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:

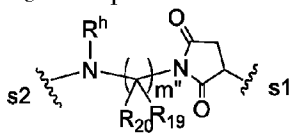


sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

- 5 linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;
R₅ este -H sau un alchil(C₁-C₃);
- 10 P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;
R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt independent -H, alchil(C₁-C₃), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;
W' este -NR^{e'},
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,
15 n este un număr întreg de la 2 la 6;
R^k este -H sau -Me;
R^{x3} este un alchil(C₁-C₆); și,
L_C este reprezentat de



- 20 s1 este locul legat covalent la CBA, și s2 este locul legat covalent la gruparea -C(=O)- de pe Cy^{C1}; în care:
R₁₉ și R₂₀, la fiecare apariție, sunt independent -H sau un alchil(C₁-C₃);
m'' este un număr întreg între 1 și 10; și
R^h este -H sau un alchil(C₁-C₃).

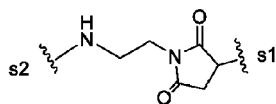
25

În anumite modalități de realizare, R_a și R_b sunt ambii H; și R₅ este H sau Me.

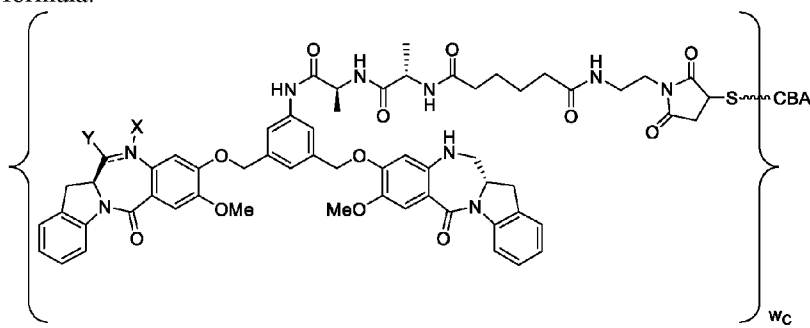
- 30 În anumite modalități de realizare, P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P poate fi selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. În anumite modalități de realizare, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala. În anumite modalități de realizare, Q este -SO₃M.

- 40 În anumite modalități de realizare, R₁₉ și R₂₀ sunt ambii H; și m'' este un număr întreg de la 1 la 6.

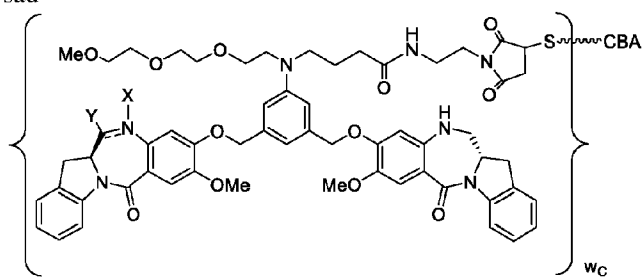
În anumite modalități de realizare, -L_C- este reprezentat de următoarea formulă:



5



10



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă --- dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau -SO₃M.

15

in care:

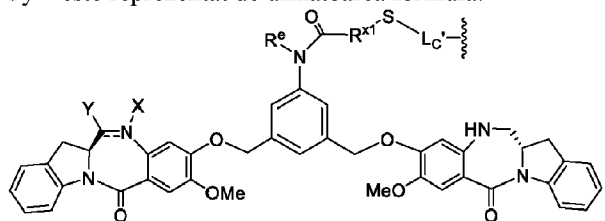
20

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

W_C este 1 sau 2;

25

Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

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

5 SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R^{x1} este un alchil(C₁-C₆);

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

W' este -NR^{e'};

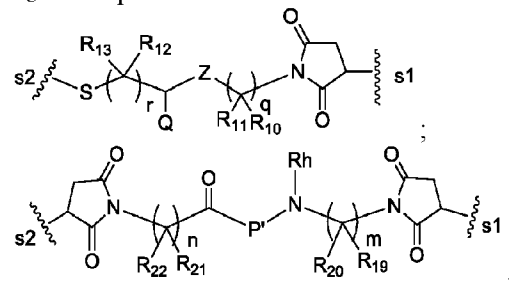
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

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

R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un alchil(C₁-C₆);

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



15

în care:

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

Z este -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

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

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

q și r, la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

R^h este -H sau un alchil(C₁-C₃); și

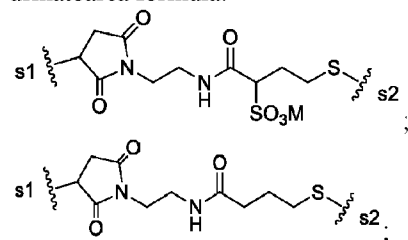
25 P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid.

În anumite modalități de realizare, P' este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P' poate fi selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. În anumite modalități de realizare, P' este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

30

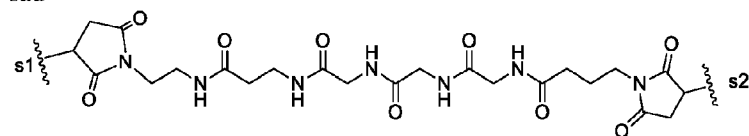
35

În anumite modalități de realizare, în imunoconjugatul -Lc'- este reprezentat de următoarea formulă:



40

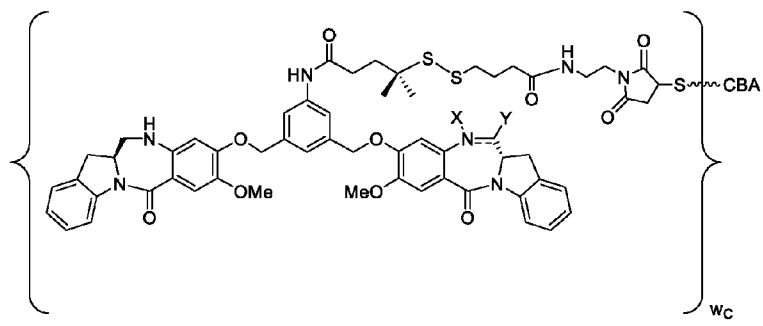
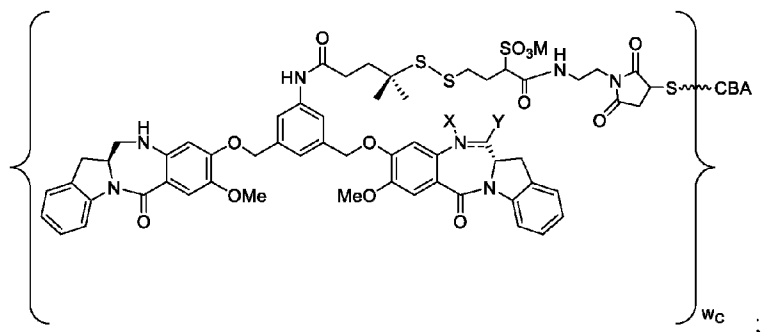
sau



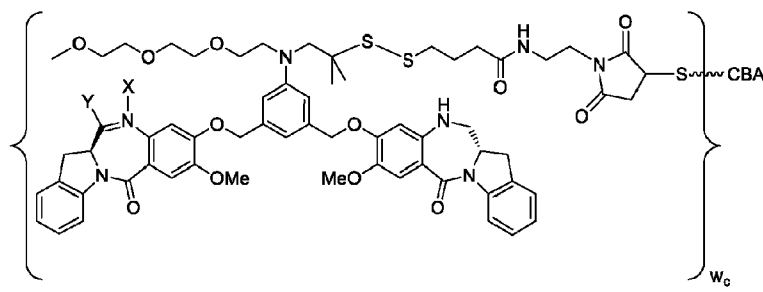
În anumite modalități de realizare, R^e este H sau Me; R^{x1} este $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, și R^{x2} este $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, în care R^f și R^g sunt fiecare independent -H sau un alchil(C_1-C_4); și p este 0, 1, 2 sau 3. În anumite modalități de realizare, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selectați dintre -H și -Me.

5

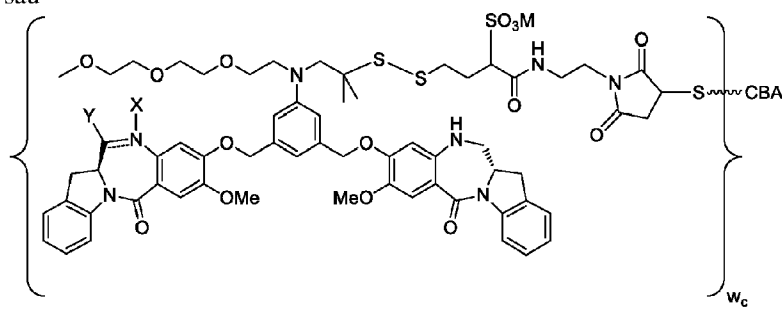
În anumite modalități de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:



10



sau



15

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau $-SO_3M$.

20

În anumite modalități de realizare, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H.

În anumite modalități de realizare, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este $-SO_3M$. În anumite modalități de realizare, M este H^+ , Na^+ sau K^+ .

În al șaptelea aspect al invenției, este redat de asemenea un imunoconjugat având următoarea formulă:

$CBA(Cy^{C3})_{WC}$,

5 in care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, care cuprinde:

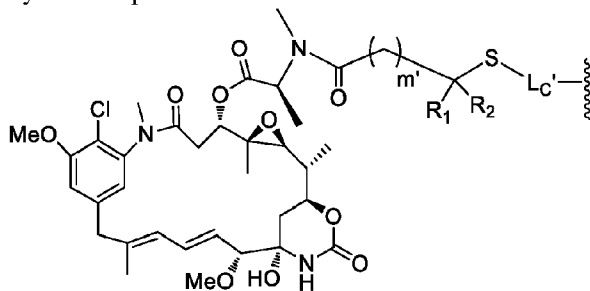
a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 54; și

10 b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35,

sau polipeptida acestuia conform invenției, legată covalent la Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:

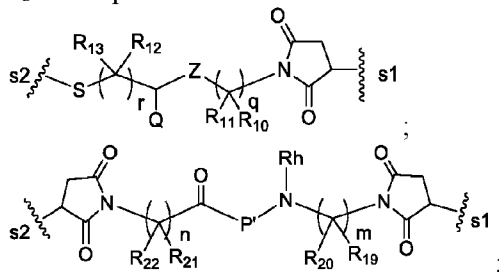


15 in care:

m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare independent -H sau un alchil(C_1-C_3);

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



20

in care:

s_1 este locul legat covalent la CBA și s_2 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{C3} ;

Z este $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;

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

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

q și r , la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

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

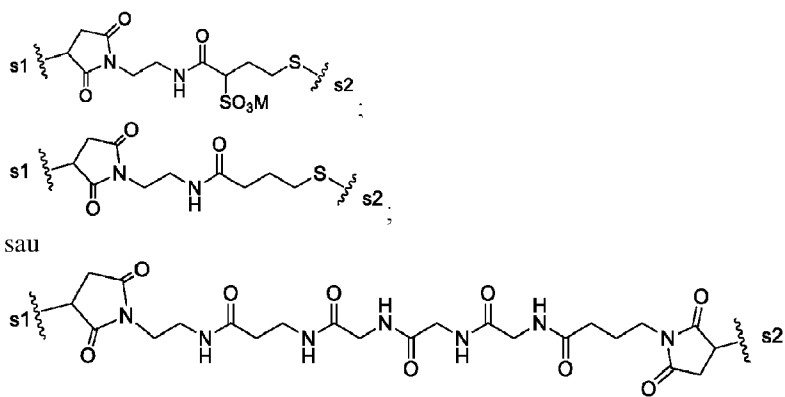
P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid.

În anumite modalități de realizare, P' este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid. De exemplu, P' este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe- N^9 -tosyl-Arg, Phe- N^9 -nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. În anumite modalități de realizare, P' este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

35

40

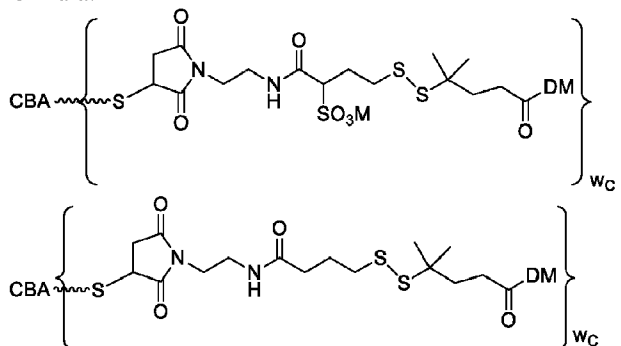
În anumite modalități de realizare, $-Lc'$ este reprezentat de următoarea formulă:



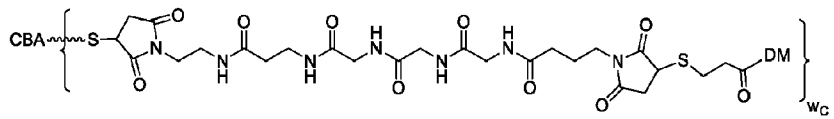
5 in care M este H⁺ sau un cation.

În anumite modalități de realizare, m' este 1 și R₁ și R₂ sunt ambii H. În anumite modalități de realizare, m' este 2 și R₁ și R₂ sunt ambii Me.

10 În anumite modalități de realizare, imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:

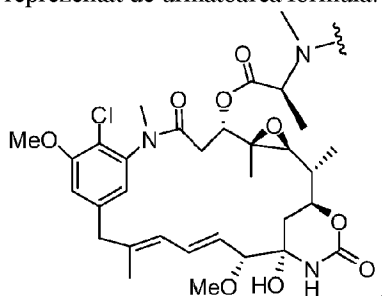


sau



15

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care DM este un fragment de medicament reprezentat de următoarea formulă:



20

Un al optulea aspect al invenției redă o compoziție farmaceutică care cuprinde anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau polipeptida conform invenției, sau imunoconjugatul conform invenției, și un purtător acceptabil farmaceutic.

25

Un al nouălea aspect al invenției redă o metodă *in vitro* sau *ex vivo* pentru inhibarea creșterii unei celule care exprimă CD123, care cuprinde contactarea celulei, cu anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau polipeptida conform invenției, sau imunoconjugatul conform invenției, sau compoziția farmaceutică conform invenției.

30

În anumite modalități de realizare, celula este o celulă tumorală. În anumite modalități de realizare, celula este o celulă de leucemie sau o celulă de limfom.

Intr-un al zecelea aspect al invenției, este redat un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau o polipeptidă conform invenției, sau un imunoconjugat conform invenției, sau o compoziție farmaceutică conform invenției pentru utilizarea într-o metodă de tratare a unui subiect care are cancer, în care celulele de cancer exprimă CD123. Metoda poate cuprinde administrarea la acest subiectul menționat a unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau polipeptida conform invenției, sau imunoconjugatul conform invenției, sau compoziția farmaceutică conform invenției.

În anumite modalități de realizare, cancerul sau tulburarea proliferativă a celulelor este leucemia sau limfomul. În anumite modalități de realizare, cancerul sau tulburarea proliferativă celulară este selectată din grupul care constă din: leucemia mieloidă acută (AML); leucemia mieloidă cronică (CML); leucemia limfoblastică acută (ALL), incluzând leucemia limfoblastică acută a liniei de celule B (B-ALL); leucemia limfocitară cronică (CLL); leucemia cu celule păroase (HCL); sindromul mielodisplazic; leucemie de neoplasm DC bazic plasmacitoid (BPDCN); limfoame non-Hodgkin (NHL), incluzând limfom cu celule manta; și leucemia Hodgkin (HL). În anumite modalități de realizare, cancerul este leucemia mieloidă acută (AML). În anumite modalități de realizare, cancerul este leucemia limfoblastică acută a celulei B (B-ALL).

În al zecelea aspect al invenției, este redat de asemenea un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau o polipeptidă conform invenției, sau un imunoconjugat conform invenției, sau o compoziție farmaceutică a invenției pentru utilizarea într-o metodă pentru tratarea unei tulburări proliferative celulare la un subiect, la care celulele tulburării proliferative celulare exprimă CD123. Metoda poate cuprinde administrarea la subiectul menționat a unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției, sau a polipeptidei conform invenției, sau a imunoconjugatului conform invenției, sau a compoziției farmaceutice conform invenției, într-o cantitate suficientă pentru a trata tulburarea proliferativă celulară menționată.

Se are în vedere că orice modalitate de realizare descrisă aici, inclusiv cele descrise numai într-un aspect al invenției (dar nu în altele sau care nu sunt repetate în altele), și cele descrise numai în Exemple, să poată să fie combinate cu oricare sau mai multe alte modalități de realizare ale invenției, cu excepția cazului în care sunt în mod explicit exceptate sau inaplicabile.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

FIG. 1 prezintă inhibarea proliferării dependente de IL-3 a celulelor TF-1 de către anticorpul himeric CD123-6 (chCD123-6) și anticorpul huCD123-6 săi grefați la CDR (huCD123-6Gv4.6 și huCD123-6Gv4.7).

FIG. 2A și 2B arată că trei anticorpi anti-CD123 murini (muCD123-3, -6 și -14) inhibă proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 cel puțin la fel ca 7G3. FIG. 2A prezintă inhibarea celulelor TF-1 cultivate în prezența IL-3 (1 ng/mL) de către diferiții anticorpi anti-CD123, inclusiv anticorpul martor 7G3, 6H6 și 9F5 care se leagă la CD123. FIG. 2B prezintă inhibarea celulelor TF-1 cultivate în prezența de GM-CSF (2 ng/mL) de către aceiași anticorpi anti-CD123.

FIG. 3 arată că anticorpul murin muCD123-3, -6 și -14 anti-CD123 inhibă proliferarea dependentă de IL-3 (1 ng/mL) a celulelor TF-1 într-o manieră dependentă de doză și într-un grad mai mare decât anticorpul 7G3. muCD123-16 este un anticorp anti-CD123 martor negativ care leagă CD123, dar nu inhibă proliferarea celulelor TF-1 dependente de IL-3.

FIG. 4A și 4B arată că anticorpul murin muCD123-3, -6 și -14 au afinitate de legare mai mare la celulele AML pozitive la CD123 decât cea a anticorpului 7G3 din celule TF-1 care exprimă CD123 (FIG. 4A) și HNT-34 (FIG. 4B).

FIG. 5A și 5B arată că anticorpul himeric anti-CD-123 chCD123-3, -6 și -14 păstrează o afinitate ridicată de legare a omologilor lor murini, folosind fie celule HNT-34 (FIG. 5A), fie linia celulară MOLM-13 de leucemia mieloidă acută (AML) pozitivă la CD123 (FIG. 5B). Anticorpul himeric chKTI, care nu leagă CD123, a fost inclus ca martor negativ.

FIG. 6 arată că anticorpul himeric chCD123-3, -6 și -14 anti-CD-123 păstrează activitatea funcțională a omologilor lor murini, dovadă fiind capacitatea lor de a inhiba proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1. Un anticorp himeric anti-CD123 nefuncțional (chCD123-18) care leagă CD123, dar nu inhibă proliferarea celulelor TF-1 dependente de IL-3 a fost inclus ca martor negativ.

FIG. 7A arată că anticorpul murini (muCD123-6), himerici (chCD123-6) și huCD123-6 grefați cu CDR (huCD123-6Gv4.7S2 și huCD123-6Gv4.7S3) au o afinitate mai mare decât 7G3 la celulele HNT-34 care exprimă CD123. Anticorpul himeric chKTI, care nu se leagă la CD123, a fost inclus ca martor negativ. FIG. 7B și 7C arată că, conjugarea anticorpului huCD123-6Gv4.7S3 sau -Gv4.7 la compușii D1 sau D2 prin legătura Lys-, Ser- sau Cys a afectat numai moderat afinitățile de legare ale acestor conjugați de ADC, *adică*, huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-sD1 legat la Ser (a se vedea structura în FIG. 17) și huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8, și huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1, legat la Lys și huCD123-6Gv4.7S3-D2 în FIG. 7B; și huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4 și huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 legați la Cys în FIG. 7C. În FIG. 7C, anticorpul huCD123-6Gv4.7 neconjugat are o secvență de lanț greu cu SECV ID NR: 54, în care Xaa este Val. Conjugații cu "S3-SeriMab" au legătură de citotoxină (în acest caz, compușii de indolinobenzodiazepină sau "IGN" de mai departe) prin Ser N-terminal oxidat de pe lanțul ușor. Conjugații cu "CysMab" au legătură de citotoxină (în acest caz, compușii IGN) prin Cys modificat din lanțul greu (*adică*, Cys-ul corespunzător celui de-al 5^{lea} până la ultimul Cys din SECV ID NR: 54).

FIG. 8A arată că anticorpul himeric (chCD123-6) și (huCD123-6Gv4.7S2 și huCD123-6Gv4.7S3) huCD123-6 grefați pe CDR inhibă proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 mai bine decât anticorpul 7G3. Inhibarea este dependentă de IL-3, deoarece acești anticorpi nu au avut niciun efect inhibitor atunci când celulele au fost crescute în prezența GM-CSF (FIG. 8B).

FIG. 9A prezintă construcții de exprimare ai domeniului IL-3R α extracelular (CD123) și proteinele receptorilor himerici care cuprind domenii IL-3R α (gri) și GMR α (alb). FIG. 9B arată că anticorpul CD123-6 se leagă în primul rând de domeniul CRM al IL-3R α (resturile 101-306). FIG. 9C arată că anticorpul CD123-3 se leagă în primul rând de domeniul CRM al IL-3R α (resturile 101-306). FIG. 9D arată că anticorpul CD123-14 se leagă exclusiv de domeniul N-terminal al IL-3R α (resturile 1-100). FIG. 9E arată că anticorpul 7G3 se leagă exclusiv de domeniul N-terminal al IL-3R α (resturile 1-100). FIG. 9F arată că anticorpul 6H6 se leagă exclusiv de domeniul N-terminal al IL-3R α (resturile 1-100). FIG. 9G arată că anticorpul 9F5 se leagă exclusiv de domeniul N-terminal al IL-3R α (resturile 1-100).

FIG. 10 demonstrează că, conjugatul maitansinoid DM1 al anticorpului huCD123-6Rv1.1 refăcut la suprafață, huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1, prezintă citotoxicitate dependentă de doză pe linia celulară AML care exprimă CD123 independent de factorul de creștere OCI-AML4. Citotoxicitatea este dependentă de CD123, dovadă fiind capacitatea excesului de anticorp huCD123-6 neconjugat (500 nM) de a bloca citotoxicitatea.

FIG. 11A prezintă citotoxicitatea *in vitro* a diferiților conjugați huCD123-6Rv1.1-IGN legați la lizină, refăcuți la suprafață pe mai multe linii celulare maligne pozitive la CD123 de origine diferită.

FIG. 11B prezintă citotoxicitatea *in vitro* a diferiților conjugați de huCD123-6-IGN legați de lizină sau cisteină pe mai multe linii celulare B-ALL pozitive la CD123. Conjugații pe bază de anticorpi care nu se leagă KTI sunt incluși ca martori negativi.

FIG. 11C arată că diferiții compuși IGN legați la Lys sau Cys sunt foarte activi pe liniile de celule AML pozitive P-gp (P-glicoproteină) Kasumi-3 și MOLM-1. Curbele martor cu puncte de date deschise sunt produse în prezența unui exces de anticorpi huCD123 potriviți neconjugați.

FIG. 11D arată că aproape toți dintre diferiții conjugați de CD123-IGN legați de Lys sau Cys din invenție ucid 90% din celulele progenitoare AML din 9 probe de la pacienți AML la concentrații nM sau sub-nM.

FIG. 11E arată că, conjugatul huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 legat de Cys ucide celulele sanguine normale la concentrații care sunt > de 100 de ori mai ridicate decât cele necesare pentru a ucide progenitorii de AML. În comparație, Mylotarg nu prezintă un astfel de efect de ucidere preferențial.

FIG. 12A și 12B prezintă citotoxicitatea *in vitro* a diferiților conjugați huCD123-6Rv1.1-IGN legați de lizină pe celule primare de la pacienți cu AML. Rezultatul unei analize tipice CFU pentru o probă primară de pacient este prezentat în FIG. 12A. FIG. 12B prezintă valorile IC₉₀ pentru toate probele de pacienți cu AML tratate cu conjugați.

FIG. 13A-13C arată că, conjugatul IGN al CysMab al huCD123-6 (huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5, cerc negru plin) este cel puțin la fel de activ ca și conjugatul legat de lizină (huCD123-6Gv4.6-D2, pătrat negru plin) al aceluiași anticorp față de linia celulară EOL-1 de AML (FIG. 13A), linia celulară B-ALL de KOPN-8 (FIG. 13B) și linia celulară CML de MOLM-1 (FIG. 13C). Curbele punctate care leagă punctele de date deschise din fiecare figură reprezintă activitatea conjugaților respectivi (*adică*, cercul deschis pentru huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5 și pătratul deschis pentru huCD123-6Gv4.6-D2) în prezența concentrației de blocare (500 nM) de anticorp chCD123-6 neconjugat.

FIG. 14A-14C arată că SeriMab din huCD123-6 (huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8, cerc negru plin) este cel puțin la fel de activ ca și conjugatul legat de lizină (huCD123-6Rv1.1-D2, triunghi negru plin în jos) a aceluiași anticorp în liniile celulare AML de SHI-1 (FIG. 14A) și HNT-34 (FIG. 14B), precum și în linia celulară CML de MOLM-1 (FIG. 14C). Curbele punctate care

5 conectează punctele de date deschise din fiecare figură reprezintă activitatea respectivilor conjugați (*adică*, cerc deschis pentru huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 și triunghi deschis în jos pentru huCD123-6Rv1.1-D2) în prezența concentrației de blocare (500 nM) a anticorpului huCD123-6 neconjugat.

10 FIG. 15 prezintă un desen schematic pentru a arăta etapele generale care pot fi utilizate pentru sintetizarea unui conjugat de legare a Ser, conform invenției.

FIG. 16 prezintă un desen schematic pentru a arăta etapele generale care pot fi utilizate pentru sintetizarea unui conjugat de legare a Ser conform invenției.

FIG. 17 prezintă un desen schematic pentru a arăta etapele generale care pot fi utilizate pentru sintetizarea unui conjugat de legare a Ser conform invenției.

15 FIG. 18 arată că, conjugatul huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 legat de Cys are activitate mai mare decât gemtuzumab ozogamicina (GO) (cunoscută și sub denumirea de Mylotarg) în probe de pacienți AML neselectate.

FIG. 19 arată că, conjugatul huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 legat de Cys ucide celulele progenitoare normale la concentrații care sunt > de 100 de ori mai ridicate decât cele necesare pentru a ucide progenitorii de AML. În comparație, Mylotarg și huCD123-6G4.7-CysMab-D5' (ADC de agent de legare încrucișată D5' a ADN) nu prezintă un astfel de efect de ucidere preferențială.

20 FIG. 20 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatilor de CD123-IGN în modelul de șoareci cu AML MV4-11 subcutanat.

25 FIG. 21 arată că, conjugatul huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 legat de Cys este foarte activ pe diverse linii celulare de AML pozitive la CD123 cu factori prognostici slabi.

FIG. 22 prezintă imagini de bioluminescență *in vivo* ale șoarecilor tratați cu conjugat huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 în comparație cu șoarecii tratați cu vehicul și martor, în ziua 26. Tratamentul cu conjugat reduce semnificativ sarcina tumorală la șoareci.

30 FIG. 23 arată că tratamentul cu conjugatul huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 extinde supraviețuire la șoareci 6/6 comparativ cu șoarecii tratați cu vehicul și martor.

FIG. 24 arată că incubarea celulelor MV4-11 cu conjugat huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5 conduce la deteriorarea ADN-ului, stoparea în faza S a ciclului celular și moartea celulară mediată de apoptoză.

35 FIG. 25 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatilor de CD123-IGN în modelul Molm-13 de diseminare a AML.

FIG. 26 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatilor de CD123-IGN în modelul subcutanat EOL-1.

FIG. 27 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatului huCD123-CysMab-D5 la doze diferite în modelul subcutanat EOL-1.

40 FIG. 28 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatului de huCD123-CysMab-D5 în comparație cu forma corespunzătoare liberă de medicament a sarcinii utile (FGN849 sau D5), anticorp gol, martor, citarabină și azacitidină în modelul subcutanat EOL-1.

FIG. 29 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatilor de CD123-IGN în modelul MV4-11 de diseminare a AML.

45 FIG. 30 prezintă eficacitatea *in vivo* a conjugatilor de CD123-IGN în modelul MV4-11 de AML subcutanat.

FIG. 31 arată că tratamentul cu conjugatul huCD123-CysMab-D5 extinde perioada de supraviețuire la șoareci în comparație cu șoarecii tratați cu vehicul și martor.

50 FIG. 32 prezintă tolerabilitatea *in vivo* a conjugatilor de huCD123-CysMab-D5 și huCD123-SeriMab-sD1 la șoareci.

FIG. 33 prezintă tolerabilitatea *in vivo* a conjugatului D2 de huCD123 legat la lizină la șoareci.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

1. DEFINIȚII

55 Pentru a facilita înțelegerea prezentei invenții, mai jos, sunt definite un număr de termeni și fraze.

60 Termenii "IL-3Rα (uman)", "Receptor alfa de Interleukină-3" sau "CD123", astfel cum se utilizează aici în mod interschimbabil, se referă la orice IL-3Rα sau CD123 nativ (uman), dacă nu se indică altfel. Proteina CD123 este o subunitate specifică interleukinei 3 a unui receptor heterodimeric de citokină (receptorul IL-3 sau IL-3R). IL-3R-ul este alcătuit dintr-o subunitate alfa

specifică ligandului și o subunitate beta comună care transduce semnalul (cunoscută și sub numele de CD131) partajată de receptorii pentru interleukina 3 (IL3), factorul de stimulare a coloniei 2 (CSF2 / GM-CSF) și interleukina 5 (IL5). Legarea CD123/IL-3R α la IL3 depinde de subunitatea beta. Subunitatea beta este activată prin legarea ligandului și este necesară pentru activitățile biologice ale IL3.

Prin urmare, toți acești termeni de mai sus pentru CD123 se pot referi fie la o secvență de proteine, fie la o secvență de acid nucleic, astfel cum este indicat aici. Termenul "CD123/IL-3R α " cuprinde CD123/IL-3R α neprelucrat, cu "lungime completă", precum și orice formă de CD123/IL-3R α care rezultă din prelucrarea în cadrul celulei. Termenul cuprinde, de asemenea, variante naturale de proteină CD123/IL-3R α sau acid nucleic, *de exemplu*, variante de imbinare, variante alelice și izoforme. Polipeptidele și polinucleotidele CD123/IL-3R α descrise aici pot fi izolate dintr-o diversitate de surse, cum ar fi din tipuri de țesut uman sau dintr-o altă sursă, sau preparate prin metode recombinante sau sintetice. Exemple de secvențe CD123/IL-3R α includ, dar nu sunt limitate la numerele de referință NCBI NP_002174 & NM_002183 (secvențe proteice și de acid nucleic pentru varianta 1 de CD123 umană), și NP_001254642 & NM_001267713 (secvențe de proteine și acid nucleic pentru varianta 2 de CD123 umană).

Termenul "anticorp" înseamnă o moleculă de imunoglobulină care recunoaște și se leagă în mod specific de o țintă, cum ar fi o proteină, polipeptidă, peptidă, carbohidrat, polinucleotidă, lipidă sau combinații ale celor de mai sus prin cel puțin un loc de recunoaștere a antigenului din regiunea variabilă a moleculei de imunoglobulină. Astfel cum se utilizează aici, termenul "anticorp" cuprinde anticorpi policlonali intacti, anticorpi monoclonali intacti, fragmente de anticorpi (cum ar fi fragmente Fab, Fab', F(ab')₂, și Fv), mutanți de Fv cu un singur lanț (scFv), anticorpi multispecifici cum ar fi anticorpii bispecifici, anticorpii himerici, anticorpii umanizați, anticorpii umani, proteinele de fuziune cuprinzând o porțiune de determinare a antigenului unui anticorp și orice altă moleculă de imunoglobulină modificată care cuprinde un loc de recunoaștere a antigenului atâta timp cât anticorpii prezintă activitatea biologică dorită. Un anticorp poate fi din oricare dintre cele cinci clase majore de imunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG, și IgM, sau subclasele (izotipuri) ale acestora (*de exemplu*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2), pe baza identității domeniilor lor constante ale lanțului greu menționate ca alfa, delta, epsilon, gamma și, respectiv, mu. Diferitele clase de imunoglobuline au structuri ale subunităților diferite și bine cunoscute și configurații tridimensionale. Anticorpii pot fi goi sau conjugați cu alte molecule cum ar fi toxine, radioizotopi etc.

În unele modalități de realizare, un anticorp este un anticorp care nu apare natural. În unele modalități de realizare, un anticorp este purificat din componente naturale. În unele modalități de realizare, un anticorp este produs recombinant. În unele modalități de realizare, un anticorp este produs de un hibridom.

Un anticorp de "blocare" sau un anticorp "antagonist" este unul care inhibă sau reduce activitatea biologică a antigenului pe care îl leagă, cum ar fi CD123/IL-3R α . Într-o anumită modalitate de realizare, anticorpii de blocare sau anticorpii antagoniști inhibă substanțial sau complet activitatea biologică a antigenului. De dorit, activitatea biologică este redusă cu 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, sau chiar 100%.

Termenul "anticorp anti-CD123," "anticorp anti-IL-3R α " sau "un anticorp care se leagă (specific) la CD123/IL-3R α " se referă la un anticorp care este capabil de legarea CD123/IL-3R α cu o afinitate suficientă astfel încât anticorpul să fie util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea CD123/IL-3R α . Cu excepția cazului în care se specifică altfel, gradul de legare a unui anticorp anti-CD123/IL-3R α la o proteină care nu are legătură cu CD123/IL-3R α este mai mic de aproximativ 10% din gradul de legare a anticorpului la CD123/IL-3R α astfel cum este măsurat, *de exemplu*, printr-o analiză radioimunologică (RIA). În anumite modalități de realizare, un anticorp care se leagă la CD123/IL-3R α are o constantă de disociere (K_d) de <0,5 nM, $\leq$ 0,3 nM, $\leq$ 0, 1 nM, $\leq$ 0,05 nM, sau $\leq$ 0,01 nM. Într-o modalitate de realizare, anti-CD123/IL-3R α nu se leagă la lanțul beta de CD131 comun. Într-o modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α nu se leagă la același epitop al CD123 care este legat de anticorpii CD123 cunoscuți și disponibili comercial, cum ar fi 7G3 (IgG_{2a}) de șoarece, 6H6 (IgG₁ de șoarece), și 9F5 (IgG₁ de șoarece) (Sun și colab., Blood 87(1): 83-92, 1996).

Secvențele de anticorpi anti-CD123/IL-3R α și fragmente ale acestora care leagă antigenul, conform invenției, sunt redată în tabelele 1-6 de mai jos Nomenclatura pentru diferiții anticorpi și imuno-conjugați ai invenției sunt redată separat mai jos.

5 Termenul "fragment de anticorp" se referă la o porțiune a unui anticorp intact și se referă la regiunile variabile determinante antigenice ale unui anticorp intact. Exemple de fragmente de anticorpi includ, dar nu sunt limitate la, fragmente, Fab, Fab', F(ab')₂, și F_v anticorpi liniari, anticorpi cu un singur lanț și anticorpi multispecifici formați din fragmente de anticorpi. Termenul "fragment de legare a antigenului" a unui anticorp include unul sau mai multe fragmente de anticorp care păstrează capacitatea de a se lega specific la un antigen. S-a demonstrat faptul că funcția de legare a antigenului a unui anticorp poate fi îndeplinită de anumite fragmente ale unui anticorp cu lungime completă. Exemple de fragmente de legare cuprinse în termenul "fragment de legare a antigenului" a unui anticorp includ (fără limitare): (i) un fragment Fab, un fragment monovalent care constă din domeniile V_L, V_H, C_L, și C_{H1} (*de exemplu*, un anticorp digerat de papaină produce trei fragmente: două fragmente Fab de legare a antigenului și un fragment Fc care nu leagă antigenul); (ii) un fragment F(ab')₂, un fragment bivalent care cuprinde două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea de balama (*de exemplu*, un anticorp digerat de pepsină produce două fragmente: un fragment bivalent de legare a antigenului F(ab')₂, și un fragment pFc' care nu leagă antigenul) și unitatea sa F(ab') monovalent aferentă; (iii) un fragment F_d care constă din domeniile V_H și C_{H1} (*adică*, acea porțiune a lanțului greu care este inclusă în Fab); (iv) un fragment F_v care constă din domeniile V_L și V_H ale unui anticorp cu un singur braț, și F_v legat prin disulfură aferentă; (v) un fragment dAb (domeniu de anticorp) sau sdAb (anticorp cu un singur domeniu) (Ward și colab., Nature 341:544-546, 1989), care constă dintr-un domeniu V_H; și (vi) o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR).

25 Un "anticorp monoclonal" se referă la o populație de anticorpi omogeni implicați în recunoașterea și legarea foarte specifică a unui singur determinant antigenic sau epitop. Aceasta este în contrast cu anticorpii policlonali care includ tipic diferiți anticorpi direcționați împotriva diferiților determinanți antigenici. Termenul "anticorp monoclonal" cuprinde atât anticorpi monoclonali intacti, cât și pe cei cu lungime completă, precum și fragmente de anticorpi (cum ar fi Fab, Fab', F(ab')₂, F_v), mutanți cu lanț unic (scFv), proteine de fuziune care cuprind o porțiune de anticorp și orice altă moleculă de imunoglobulină modificată care cuprinde un situs de recunoaștere a antigenului. Mai mult, "anticorp monoclonal" se referă la astfel de anticorpi produși în orice număr de maniere incluzând, dar fără a se limita la hibridom, selecție a fagilor, exprimare recombinantă și animale transgenice.

40 Termenul "anticorp umanizat" se referă la forme de anticorpi neumani (*de exemplu*, murini) care sunt lanțuri specifice de imunoglobulină, imunoglobuline himerice sau fragmente ale acestora care conțin minimum de secvențe neumane (*de exemplu*, murine). Tipic, anticorpii umanizați sunt imunoglobuline umane în care resturile de la regiunea determinantă complementară (CDR) sunt înlocuite cu resturi de la CDR ale unei specii neumane (*de exemplu*, șoareci, șobolani, iepuri, hamsteri) care au specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite (Jones și colab., Nature 321:522-525, 1986; Riechmann și colab., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen și colab., Science 239:1534-1536, 1988).

45 In unele cazuri, resturile (FR) ale regiunii cadru F_v ale unei imunoglobuline umane sunt înlocuite cu resturile corespunzătoare dintr-un anticorp dintr-o specie neumană care are specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. Anticorpul umanizat poate fi modificat în continuare prin substituirea unor resturi suplimentare, fie în regiunea cadru F_v și/sau în interiorul resturilor neumane înlocuite pentru a rafina și optimiza specificitatea, afinitatea, și/sau capacitatea anticorpului. În general, anticorpul umanizat va cuprinde substanțial toate dintre cel puțin unul, și tipic două sau trei, domenii variabile care conțin toate sau substanțial toate regiunile CDR care corespund imunoglobulinei neumane, în timp ce toate sau substanțial toate regiunile FR sunt cele ale unei secvențe consens a imunoglobulinei umane. Anticorpul umanizat poate cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune sau un domeniu (F_c) constant de imunoglobulină, tipic cea a unei imunoglobuline umane. Exemple de metode utilizate pentru a genera anticorpi umanizați sunt descrise în Brevetele U.S. 5.225.539 și 5.639.641, Roguska și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(3):969-973, 1994; și Roguska și colab., Protein Eng. 9(10):895-904, 1996. În unele modalități de realizare, un "anticorp umanizat" este un anticorp cu suprafața refăcută. În unele modalități de realizare, un "anticorp umanizat" este un anticorp grefat pe CDR.

O "regiune variabilă" a unui anticorp se referă la regiunea variabilă a lanțului ușor a anticorpului sau regiunea variabilă a lanțului greu a anticorpului, fie individual, fie în combinație. Regiunile variabile ale lanțului greu și ușor constau fiecare din patru regiuni cadru (FR) conectate prin trei regiuni determinante complementare (CDR-uri), cunoscute și sub numele de regiuni hipervariabile. CDR-urile din fiecare lanț sunt ținute împreună în strânsă apropiere de către FR-uri și, împreună cu CDR-urile din celălalt lanț, contribuie la formarea locului de legare la antigen al anticorpilor. Există cel puțin două tehnici pentru determinarea CDR-urilor: (1) o abordare bazată pe variabilitatea secvenței între specii (*adică*, Kabat și colab. Sequences of Proteins of Immunological Interest, ed. a 5-a, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); și (2) o abordare bazată pe studii cristalografice ale complexilor antigen-anticorp (Al-lazikani și colab., J. Molec. Biol. 273:927-948, 1997). În plus, pentru a determina CDR-urile sunt uneori folosite în domeniu combinații ale acestor două abordări.

Sistemul de numerotare Kabat se utilizează în general atunci când se face referire la un rest din domeniul variabil (aproximativ resturile 1-107 ale lanțului ușor și resturile 1-113 ale lanțului greu) (*de exemplu*, Kabat și colab., Sequences of Immunological Interest, Ed. a 5-a, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Numerotarea poziției aminoacizilor ca în Kabat, se referă la sistemul de numerotare utilizat pentru domeniile variabile ale lanțului greu sau domeniile variabile ale lanțului ușor ale compilației anticorpilor din Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Ed. a 5-a, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Folosind acest sistem de numerotare, secvența de aminoacizi liniară reală poate conține mai puțini aminoacizi sau unii suplimentari care corespund unei scurtări sau inserții într-un FR sau CDR al domeniului variabil. De exemplu, un domeniu variabil al lanțului greu poate include o singură inserție de aminoacizi (rest 52a conform Kabat) după restul 52 al H2 și resturi inserate (*de exemplu*, resturile 82a, 82b, și 82c etc. conform Kabat) după restul 82 FR al lanțului greu. Numerotarea Kabat a resturilor poate fi determinată pentru un anticorp dat prin alinierea la regiunile de omologie a secvenței anticorpului cu o secvență numerotată Kabat "standard". Chothia se referă în schimb la localizarea buclelor structurale (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Sfarșitul buclei CDR-H1 Chothia atunci când este numerotată folosind convenția de numerotare Kabat variază între H32 și H34 în funcție de lungimea buclei. Aceasta se datorează faptului că schema de numerotare Kabat plasează inserțiile la H35A și H35B - dacă nu sunt prezente nici 35A și 35B, bucla se termină la 32; dacă este prezent doar 35A, bucla se termină la 33; dacă sunt prezente atât 35A cat și 35B, bucla se termină la 34. Regiunile hipervariabile AbM reprezintă un compromis între CDR-urile Kabat și buclele structurale Chothia și sunt utilizate de software-ul de modelare a anticorpilor AbM de la Oxford Molecular.

Buclă	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Numerotare Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Numerotare Kabat)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Termenul "anticorp uman" înseamnă un anticorp produs de un om sau un anticorp având o secvență de aminoacizi corespunzătoare unui anticorp produs de un om obținut prin folosirea oricărei tehnici cunoscute în domeniu. În anumite modalități de realizare, anticorpul uman nu are secvență non-umană. Această definiție a anticorpului uman include anticorpi intacți sau cu lungime completă sau fragmente ale acestora care leagă antigenul.

Termenul "anticorpi himerici" se referă la anticorpi în care secvența de aminoacizi a moleculei de imunoglobulină este derivată de la două sau mai multe specii. Tipic, regiunea variabilă atât a lanțurilor ușoare cât și a celor grele corespunde regiunii variabile a anticorpilor derivați de la o specie de mamifere (*de exemplu*, șoarece, șobolan, iepure etc.) cu specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite în timp ce regiunile constante sunt omoloage cu secvențele din

anticorpi derivate de la o alta (tipic umană) pentru a evita sau reduce șansa de a provoca un răspuns imun la acea specie (*de exemplu*, umană). În anumite modalități de realizare, un anticorp himeric poate include un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde cel puțin o polipeptidă de lanț greu și/sau ușor uman, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care cuprinde polipeptide de lanț ușor murin și de lanț greu uman.

Termenii "epitop" sau "determinant antigenic" sunt utilizați aici în mod interschimbabil și se referă la acea porțiune de antigen capabilă să fie recunoscută și legată specific de un anticorp particular. Atunci când antigenul este o polipeptidă, epitopii pot fi formați atât din aminoacizi contigui, cât și din aminoacizi necontigui juxtapuși prin plierea terțiară a unei proteine. Epitopii formați din aminoacizi contigui sunt reținuți tipic la denaturarea proteinelor, în timp ce epitopii formați prin pliere terțiară se pierd tipic la denaturarea proteinelor. Un epitop include, tipic, cel puțin 3 și, mai uzual, cel puțin 5 sau 8-10 aminoacizi într-o conformație spațială unică.

"Afinitate de legare" se referă, în general, la puterea sumei totale a interacțiunilor necovalente între un singur situs de legare al unei molecule (*de exemplu*, un anticorp) și partenerul său de legare (*de exemplu*, un antigen). Cu excepția cazului în care se indică altfel, astfel cum se utilizează aici, "afinitate de legare" se referă la afinitate de legare intrinsecă care reflectă o interacțiune 1:1 între membrii unei perechi de legare (*de exemplu*, anticorp și antigen). Afinitatea unei molecule X pentru partenerul său Y poate fi, în general, reprezentată prin constanta sa de disociere (K_d) sau concentrația eficientă demi-maximă (EC_{50}). Afinitatea poate fi măsurată prin metode comune cunoscute în domeniu, inclusiv cele descrise aici. Anticorpii cu afinitate scăzută se leagă în general lent de antigen și au tendința de a se disocia cu ușurință, în timp ce anticorpii cu afinitate mare se leagă în general mai repede de antigen și tind să rămână legați mai mult timp. Sunt cunoscute în domeniu o diversitate de metode de măsurare a afinității de legare, oricare dintre acestea putând fi utilizată în scopul prezentei invenții. Exemplele de realizare ilustrative specifice sunt descrise aici.

"Sau mai bine" atunci când se utilizează aici pentru a se referi la afinitatea de legare se referă la o legare mai puternică între o moleculă și partenerul său de legare. "Sau mai bine" atunci când se utilizează aici se referă la o legare mai puternică, reprezentată de o valoare numerică K_d mai mică. De exemplu, un anticorp care are o afinitate pentru un antigen de "0,3 nM sau mai bună," afinitatea anticorpului pentru antigen este $\leq 0,3$ nM, *de exemplu*, 0,29 nM, 0,28 nM, 0,27 nM *etc.*, sau orice valoare egală cu sau mai mică decât 0,3 nM. Într-o modalitate de realizare, afinitatea anticorpului astfel cum este determinată printr-un K_d va fi între aproximativ 10^{-3} și aproximativ 10^{-12} M, între aproximativ 10^{-6} și aproximativ 10^{-11} M, între aproximativ 10^{-6} și aproximativ 10^{-10} M, între aproximativ 10^{-6} și aproximativ 10^{-9} M, între aproximativ 10^{-6} și aproximativ 10^{-8} M, sau între aproximativ 10^{-6} și aproximativ 10^{-7} M.

Prin "se leagă specific", se înțelege în general că un anticorp se leagă de un epitop prin domeniul său de legare la antigen și că legarea implică o oarecare complementaritate între domeniul de legare al antigenului și epitop. Conform acestei definiții, se spune că un anticorp "se leagă specific" de un epitop atunci când se leagă de acel epitop, prin domeniul său de legare la antigen mai ușor decât s-ar lega de un epitop aleatoriu, necorelat. Termenul "specificitatea" se utilizează aici pentru a califica afinitatea relativă prin care un anumit anticorp se leagă de un anumit epitop. De exemplu, anticorpul "A" poate fi considerat a avea o specificitate mai mare pentru un epitop dat decât anticorpul "B" sau se poate spune că anticorpul "A" se leagă de epitopul "C" cu o specificitate mai mare decât pentru epitopul corelat "D."

În anumite modalități de realizare, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului conform invenției "se leagă specific" la un antigen CD123, în sensul că are o specificitate de legare mai mare la antigenul CD 123 (de la orice specie) decât cea pentru un antigen non-CD 123. În anumite modalități de realizare, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului conform invenției "se leagă specific" la un antigen CD123 uman, în sensul că acesta are o specificitate de legare mai mare la antigenul de CD123 uman decât cel la un antigen CD123 non-uman (*de exemplu*, un șoarece sau un șobolan CD123).

Prin "se leagă preferențial", se înțelege că anticorpul se leagă specific de un epitop mai ușor decât s-ar lega de un epitop înrudit, similar, omolog sau analog. Astfel, un anticorp care "se leagă preferențial" de un epitop dat s-ar lega mai probabil de acel epitop decât de un epitop înrudit, chiar dacă un astfel de anticorp poate reacționa încrucișat cu epitopul înrudit. De exemplu, în

anumite modalități de realizare, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului conform invenției "se leagă preferențial" la un antigen CD 123 uman față de un CD123 de șoarece.

Se spune că un anticorp "inhibă competitiv" legarea unui anticorp de referință la un epitop dat dacă se leagă preferențial la acel epitop în măsura în care blochează, într-o oarecare măsură, legarea anticorpului de referință de epitop. Inhibarea competitivă poate fi determinată prin orice metodă cunoscută în domeniu, de exemplu, analizele ELISA de concurență. Se poate spune că un anticorp inhibă competitiv legarea anticorpului de referință la un epitop dat cu cel puțin 90%, cel puțin 80%, cel puțin 70%, cel puțin 60%, sau cel puțin 50%.

Fraza "substanțial similar," sau "substanțial același," astfel cum se utilizează aici, denotă un grad suficient de mare de similitudine între două valori numerice (în general una asociată cu un anticorp conform invenției și cealaltă asociată cu un anticorp de referință/comparator) astfel încât un specialist în domeniu ar considera că diferența dintre cele două valori este mică sau nesemnificativă biologic și/sau statistic în contextul caracteristicilor biologice măsurate prin valorile menționate (*de exemplu*, valori K_d). Diferența dintre aceste două valori menționate este mai mică de aproximativ 50%, mai mică de aproximativ 40%, mai mică de aproximativ 30%, mai mică de aproximativ 20%, sau mai mică de aproximativ 10% în funcție de valoarea corespunzătoare anticorpului de referință/comparator.

O polipeptidă, anticorp, polinucleotidă, vector, celulă sau compoziție care este "izolată" este o polipeptidă, anticorp, polinucleotidă, vector, celulă sau compoziție care se află în o formă care nu se găsește în natură. Polipeptidele, anticorpii, polinucleotidele, vectorii, celulele sau compozițiile izolate le includ pe acelea care au fost purificate într-o măsură în care nu mai sunt într-o formă în care se găsesc în natură. Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă sau compoziție care este izolat poate fi substanțial pură.

Astfel cum se utilizează aici, "substanțial pur" se referă la materialul care este cel puțin 50% pur (*adică*, liber de contaminanți), cel puțin 90% pur, cel puțin 95% pur, cel puțin 98% pur, sau cel puțin 99% pur.

Termenul "imunoconjugat," "conjugat," sau "ADC" astfel cum se utilizează aici se referă la un compus sau un derivat al acestuia care este legat de un agent de legare a celulelor (*adică*, un anticorp anti-CD123/IL-3R α sau fragment al acestuia) și este definit printr-o formulă generică: A-L-C, în care C = citotoxină, L = linker, și A = agent de legare la celulă (CBA), cum ar fi un anticorp anti-CD123/IL-3R α sau fragment de anticorp. Imunoconjugati pot fi definiți și prin formula generică în ordine inversă: C-L-A.

Un "linker" este orice fragment chimic care este capabil să lege un compus, tipic un medicament, cum ar fi un agent citotoxic descris aici (*de exemplu*, compuși maitansinoizi sau IGN (indolinobenzodiazepină)), la un agent de legare a celulelor, cum ar fi un anticorp anti-CD123/IL-3R α sau un fragment al acestuia într-un mod covalent stabil. Linkerii pot fi susceptibili la sau pot fi substanțial rezistenți la clivarea indusă de acid, clivarea indusă de lumină, clivarea indusă de peptidază, clivarea indusă de esterază și clivarea legăturii de disulfură, în condițiile în care compusul sau anticorpul rămân activi. Linkeri adecvați sunt bine cunoscuți în domeniu și includ, de exemplu, grupări de disulfură, grupări de tioeter, grupări labile acide, grupări fotolabile, grupări labile de peptidază și grupări labile de esterază. Linkerii includ, de asemenea, linkeri cu sarcină și forme hidrofiele ale acestora, astfel cum este descris aici și cunoscut în domeniu.

Termenii CD123/IL-3R α "ridicat", "exprimare crescută" a CD123/IL-3R α și "supraexprimare" a CD123/IL-3R α se referă la o probă care conține niveluri ridicate de exprimare a CD123. CD123 poate fi ridicat, crescut sau supraexprimat în comparație cu o valoare martor (*de exemplu*, nivelul de exprimare într-o probă biologică, țesut sau celulă de la un subiect fără cancer, o probă sau un cancer cunoscut că nu exprimă sau exprimă la un nivel scăzut CD123/IL-3R α , o probă normală, sau un cancer care nu are valori ridicate de CD123/IL-3R α). De exemplu, o probă (*de exemplu*, una de la un cancer hematologic, cum ar fi leucemia și limfomul) cu exprimare crescută poate conține o creștere de cel puțin 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, sau cel puțin 50-ori în raport cu valorile martor/normale.

O "probă de referință" poate fi utilizată pentru a corela și compara rezultatele obținute în metodele conform invenției de la o probă de testare. Probele de referință pot fi celule (*de*

- exemplu*, linii celulare, pelete de celule) sau țesuturi. Nivelurile de CD123/IL-3R α din "proba de referință" pot fi o cantitate absolută sau relativă, un interval de cantitate, o cantitate minimă și/sau maximă, o cantitate medie și/sau o cantitate mediană de CD123/IL-3R α . O "probă de referință" poate servi, de asemenea, ca linie de bază de referință a exprimării CD123/IL-3R α cu care este comparată proba de testare. "Proba de referință" poate include o probă anterioară sau o probă de la linia de bază de la același pacient, o referință normală cu un nivel cunoscut de exprimare a CD123/IL-3R α sau o referință de la o populație relevantă de pacienți cu un nivel cunoscut de exprimare a CD123/IL-3R α . Nivelurile de CD123/IL-3R α pot fi de asemenea exprimate ca valori într-o curbă standard. O curbă standard este o metodă cantitativă de reprezentare grafică a datelor de analiză pentru a se determina concentrația de CD123/IL-3R α dintr-o probă. O probă de referință poate fi un antigen standard care cuprinde CD123/IL-3R α purificat. Metodele de diagnostic conform invenției pot implica o comparație între nivelurile de exprimare ale CD123/IL-3R α într-o probă de testare și o "valoare de referință". O valoare de referință poate fi nivelul de exprimare a CD123/IL-3R α într-o probă de referință. O valoare de referință poate fi o valoare predeterminată și poate fi determinată și din probe de referință (*de exemplu*, probe biologice martor sau probe de referință) testate în paralel cu probele de testare. O valoare de referință poate fi o singură valoare limită, cum ar fi o valoare mediană sau o medie sau o gamă de valori, cum ar fi un interval de încredere. Valorile de referință pot fi stabilite pentru diferite subgrupuri de indivizi.
- Termenul "anticorp primar" se referă aici la un anticorp care se leagă specific la antigenul proteic țintă dintr-o probă. Un anticorp primar este, în general, primul anticorp utilizat într-o analiză ELISA sau o procedură IHC. Un anticorp primar poate fi singurul anticorp utilizat într-o procedură IHC.
- Termenul "anticorp secundar" se referă aici la un anticorp care se leagă specific la un anticorp primar, formând astfel o punte sau o legătură printr-un linker între anticorpul primar și un reactiv ulterior, după caz. Anticorpul secundar este în general al doilea anticorp utilizat într-o procedură imunohistochimică.
- O "probă" sau "probă biologică" conform prezentei invenții este de origine biologică, cum ar fi de la organisme eucariote. Proba poate fi o probă umană, dar pot fi utilizate și probe de la animale. Sursele nelimitative ale unei probe pentru utilizarea în prezenta invenție includ, de exemplu, țesut solid, aspirate de biopsie, ascită, extracte fluidice, sânge, plasmă, ser, fluid spinal, fluid limfatic, secțiunile externe ale pielii, respiratorii, intestinale și tractele genito-urinare, lacrimile, saliva, laptele, tumorile, organele, culturile celulare și/sau constituenții culturii celulare. O "probă canceroasă" este o probă care conține o celulă canceroasă. Metoda poate fi utilizată pentru a examina un aspect al exprimării CD123/IL-3R α sau a unei stări a unei probe, incluzând, dar fără a se limita la, compararea diferitelor tipuri de celule sau țesuturi, compararea diferitelor etape de dezvoltare și detectarea sau determinarea prezenței și/sau tipul de boală sau anomalie.
- Astfel cum se utilizează aici, termenul "reactiv de capturare" se referă la un reactiv capabil să lege și să captează o moleculă țintă într-o probă, astfel încât, în condiții adecvate, complexul reactiv de capturare - moleculă țintă poate fi separat de restul probei. Reactivul de capturare poate fi imobilizat. Reactivul de capturare într-o analiză imunologică tip sandwich poate fi un anticorp sau un amestec de anticorpi diferiți împotriva unui antigen țintă.
- Astfel cum se utilizează aici, termenul "anticorp detectabil" se referă la un anticorp care poate fi detectat fie direct printr-o etichetă amplificată printr-un mijloc de detectare, fie indirect prin, *de exemplu*, un alt anticorp care este etichetat. Pentru etichetarea directă, anticorpul este conjugat, tipic, cu o porțiune care este detectabilă prin unele mijloace. Într-o modalitate de realizare, anticorpul detectabil este un anticorp biotinitat.
- Astfel cum se utilizează aici, termenul "mijloace de detectare" se referă la un fragment sau tehnică utilizată pentru a detecta prezența anticorpului detectabil și include agenți de detecție care amplifică eticheta imobilizată cum ar fi o etichetă captată pe o placă de microtitrare. Într-o modalitate de realizare, mijloacele de detectare sunt un agent de detectare fluorimetric cum ar fi avidina sau streptavidina.
- Uzual, un "sandviș ELISA" utilizează următoarele etape: (1) placa de microtitrare este acoperită cu un anticorp de capturare; (2) se adaugă proba și orice antigen prezent se leagă pentru a capta anticorpul; (3) se adaugă anticorpul de detectare și se leagă la antigen; (4) se adaugă

anticorpu secundar legat printr-un linker de enzimă și se leagă de anticorpu de detectare; și (5) se adaugă substrat și este transformat de enzimă în forma detectabilă.

5 Cuvântul "etichetă" atunci când se utilizează aici se referă la un compus sau compoziție detectabilă care este conjugat direct sau indirect cu anticorpu astfel încât să genereze un anticorpu "etichetat". Eticheta poate fi detectabilă în sine (*de exemplu* etichete radioizotopice sau etichete fluorescente) sau, în cazul unei etichete enzimatice, poate cataliza modificarea chimică a unui compus sau a unei compoziții de substrat care este detectabilă.

10 Prin "corelare" sau "care corelează" se înțelege compararea, în orice mod, a performanței și/sau a rezultatelor unei prime analize cu performanța și/sau rezultatele unei a doua analize. De exemplu, se pot folosi rezultatele unei prime analize în efectuarea celei de-a doua analize și/sau se pot folosi rezultatele unei prime analize pentru a se determina dacă ar trebui efectuată o a doua analiză și/sau se pot compara rezultatele unei prime analize cu rezultatele unei a doua analize.

15 Exprimarea crescută a CD123/IL-3Rα se poate corela cu probabilitatea crescută a eficacității unei terapii de țintire a CD123/IL-3Rα.

Termenii "cancer" și "canceros" se referă la sau descriu starea fiziologică la mamifere în care o populație de celule este caracterizată printr-o creșterea celulară nereglată. "Tumoare" și

20 "neoplasm" se referă la a una sau mai multe celule care rezultă din creșterea sau proliferarea excesivă a celulelor, fie benigne (necanceroase), fie maligne (canceroase), inclusiv leziuni precanceroase.

Exemple de cancer includ limfom și leucemie. Exemple de boli canceroase sau

25 tumorigene care pot fi tratate și/sau prevenite prin metodele și reactivii (*de exemplu*, anticorpu anti-CD123, fragment de legare la antigen al acestuia, sau imuno-conjugat al acestora) conform invenției includ AML, CML, ALL (*de exemplu*, B-ALL), CLL, sindromul mielodisplazic, leucemie de neoplasm DC bazic plasmacitoid (BPDCN), limfoame a celulei B incluzând limfoame non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică cu celulei B precursore / limfom și neoplasm a celulei B mature, cum ar fi leucemia limfocitară cronică a celulei B (B-CLL) / limfomul limfocitar mic (SLL), leucemia prolimfocitară a celulei B, limfomul limfoplasmatic, limfomul cu celule de manta (MCL), limfomul folicular (FL), inclusiv FL de grad inferior, grad intermediar și grad superior, limfom central al foliculului cutanat, limfomul celulei B din zona marginală (tip MALT, tip nodal și splenic), leucemie cu celule păroase (HCL), limfom difuz a celulei B mari, limfom

30 Burkitt, plasmacitom, mielom cu celule plasmatic, tulburare limfoproliferativă post-transplant, macroglobulinemie Waldenstrom, limfomul anaplastic cu celule mari (ALCL) și leucemia Hodgkin (HL).

Cancerele cuprind de asemenea și cancerele care conțin celule cu niveluri crescute de

40 exprimare a CD123/IL-3Rα. Astfel de cancere cu CD123/IL-3Rα crescute includ, dar nu se limitează la acestea, AML, CML, ALL (*de exemplu*, B-ALL) și CLL.

Termenii "celulă canceroasă", "celulă tumorală" și echivalentele gramaticale se referă la populația totală de celule derivate dintr-o tumoră sau o leziune precanceroasă, inclusiv ambele

45 celulele non-tumorigene, care cuprind cea mai mare parte a populației de celule tumorale, și celulele stem tumorigenice (celule stem canceroase). Astfel cum se utilizează aici, termenul "celulă tumorală" va fi modificat de termenul "non-tumorigen" atunci când se referă exclusiv la acele celule tumorale care nu au capacitatea de a se reinnoi și de a diferenția pentru a le distinge de acele celule tumorale de la celulele stem canceroase.

50 Termenul "subiect" se referă la orice animal (*de exemplu*, un mamifer), inclusiv, dar fără a se limita la oameni, primate neumane, rozătoare și altele asemenea, care urmează să fie destinatarul unui anumit tratament. Tipic, termenii "subiect" și "pacient" se utilizează interschimbabil aici cu referire la un subiect uman.

55 Administrarea "în combinație cu" unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari include administrarea simultană (concurrentă) și consecutivă în orice ordine.

Termenul "formulare farmaceutică" se referă la un preparat care are o astfel de formă

60 încât să permită ca activitatea biologică a ingredientului activ să fie eficientă și care nu conține

componente suplimentare care sunt inacceptabil de toxice pentru un subiectul cărui i s-ar putea administra formularea. O astfel de formulare poate fi sterilă.

- 5 O "cantitate eficientă" dintr-un anticorp sau imunoconjugat astfel cum este dezvăluit aici este o cantitate suficientă pentru a îndeplini un scop declarat specificat. O "cantitate eficientă" poate fi determinată empiric și într-o manieră de rutină, în raport cu scopul declarat.

10 Termenul "cantitate eficientă terapeutic" se referă la o cantitate de anticorp sau alt medicament eficient pentru "tratarea" unei boli sau tulburări la un subiect sau mamifer. În cazul cancerului, cantitatea eficientă terapeutic de medicament poate reduce numărul de celule canceroase; reduce dimensiunea tumorii; inhiba (*adică*, încetini într-o anumită măsură și într-o anumită modalitate de realizare, stopa) infiltrarea celulelor canceroase în organele periferice; inhiba (*adică*, încetini într-o anumită măsură și într-o anumită modalitate de realizare, opri) metastaza tumorii; inhiba, într-o oarecare măsură, creșterea tumorii; ameliora într-o oarecare măsură unul sau mai multe dintre simptomele asociate cu cancerul; și/sau rezulta într-un răspuns favorabil, cum ar fi creșterea supraviețuirii fără progresie (PFS), supraviețuirii fără boală (DFS) sau supraviețuirii globale (OS), răspuns complet (CR), răspuns parțial (PR) sau, în unele cazuri, boală stabilă (SD), o scădere a bolii progresive (PD), un timp redus de progresie (TTP) sau orice combinație a acestora. A se vedea definiția de aici a "tratării". În funcție de măsura în care medicamentul poate preveni creșterea și/sau ucide celulele canceroase existente, poate fi citostatic și/sau citotoxic.

25 O "cantitate eficientă profilactic" se referă la o cantitate eficientă, la doze și pentru perioade de timp necesare, pentru a realiza rezultatul profilactic dorit. Tipic, dar nu necesar, deoarece o doză profilactică este utilizată la subiecții anterior sau într-o etapă timpurie a bolii, cantitatea eficientă profilactic va fi mai mică decât cantitatea eficientă terapeutic.

30 Termenul "răspunde favorabil" se referă în general la provocarea unei stări benefice la un subiect. În ceea ce privește tratamentul cancerului, termenul se referă la furnizarea unui efect terapeutic asupra subiectului. Efectele terapeutice pozitive în cancer pot fi măsurate în mai multe moduri (a se vedea, W.A. Weber, J. Nucl. Med. 50: 1S-10S (2009)). De exemplu, inhibarea creșterii tumorale, exprimarea markerului molecular, exprimarea markerului seric și tehnicile de imagistică moleculară pot fi utilizate toate pentru a evalua eficacitatea terapeutică a unui tratament anti-canceros. În ceea ce privește inhibarea creșterii tumorii, conform standardelor NCI, un T/C < 42% este nivelul minim al activității anti-tumorale. Un T/C <10% este considerat un nivel ridicat de activitate anti-tumorală, cu $T/C (\%) = \frac{\text{Volumul median al tumorii tratate}}{\text{Volumul median al tumorii martor}} \times 100$. Un răspuns favorabil poate fi evaluat, de exemplu, prin supraviețuire crescută fără progresie (PFS), supraviețuire fără boală (DFS) sau supraviețuire globală (OS), răspuns complet (CR), răspuns parțial (PR) sau, în unele cazuri, boală stabilă (SD), o scădere a bolii progresive (PD), un timp redus de progresie (TTP) sau orice combinație a acestora.

45 PFS, DFS, și OS pot fi măsurate conform standardelor stabilite de National Cancer Institute și U.S. Food and Drug Administration pentru aprobarea unor noi medicamente. Vezi Johnson și colab., (2003) J. Clin. Oncol. 21(7): 1404-1411.

50 "Supraviețuirea fără progresie" (PFS) se referă la timpul de la înscriere până la progresia bolii sau deces. PFS este măsurată în general prin utilizarea metodei Kaplan-Meier și a Criteriilor de evaluare a răspunsului în tumori solide (RECIST) 1.1 standard. În general, supraviețuirea fără progresie se referă la situația în care un pacient rămâne în viață, fără înrăutățirea cancerului.

Un "răspuns complet" sau "remisiune completă" sau "CR" indică dispariția tuturor semnelor de tumoare sau cancer ca răspuns la tratament. Aceasta nu înseamnă întotdeauna că a fost vindecat cancerul.

55 Un "răspuns parțial" sau "PR" se referă la o scădere a dimensiunii sau volumului unei sau mai multor tumori sau leziuni sau a nivelului de cancer din organism, ca răspuns la tratament.

60 "Boala stabilă" se referă la boala fără progresie sau recidivă. În boala stabilă nu există nici o contracție tumorală suficientă pentru a se califica pentru răspuns parțial, nici o creștere tumorală suficientă pentru a se califica ca boală progresivă.

"Boala progresivă" se referă la apariția uneia sau mai multor leziuni sau tumori noi și/sau progresia neechivocă a leziunilor non-țintă existente. Boala progresivă se poate referi, de asemenea, la o creștere a tumorii de peste 20 procente de la începerea tratamentului, fie datorită creșterii masei, fie a răspândirii tumorii.

5

"Supraviețuirea liberă de boală" (DFS) se referă la perioada de timp, în timpul și după tratament, în care pacientul rămâne liber de boală.

10 "Supraviețuirea globală" (OS) se referă la timpul de la înscrierea pacientului până la deces sau cenzurat la ultima dată cunoscută în viață OS include o prelungire a speranței de viață în comparație cu persoanele sau pacienții naivi sau netratați. Supraviețuirea globală se referă la situația în care un pacient rămâne în viață pentru o perioadă de timp definită, cum ar fi un an, cinci ani *etc, de exemplu*, din momentul diagnosticului sau tratamentului.

15 Un "agent chimioterapeutic" este un compus chimic util în tratamentul cancerului, indiferent de mecanismul de acțiune. Termeni ca "tratare" sau "tratament" sau "a trata" sau "atenuare" sau "pentru a atenua" se referă la măsuri terapeutice care vindecă, încetinesc, diminuează simptomele și/sau opresc progresia unei stări sau tulburări patologice diagnosticate. Astfel, cei care au nevoie de tratament îi includ pe cei deja diagnosticați cu tulburarea și îi pot include, de asemenea, pe cei care au o boală reziduală minimă sau o boală rezistentă sau o boală recidivată. În anumite modalități de realizare, un subiect este "tratat" cu succes de cancer conform metodelor prezentei invenții dacă pacientul prezintă una sau mai multe dintre următoarele: o reducere a numărului sau absența completă a celulelor canceroase; o reducere a dimensiunii tumorii; inhibarea sau absența infiltrării celulelor canceroase în organele periferice incluzând, de
20 exemplu, răspândirea cancerului în țesutul moale și în os; inhibarea sau absența metastazei tumorale; inhibarea sau absența creșterii tumorii; atenuarea unuia sau mai multor simptome asociate cu cancerul specific; morbiditate și mortalitate reduse; îmbunătățire a calității vieții; reducere a tumorigenității, frecvenței tumorigenice sau a capacității tumorigenice a unei tumori; reducere a numărului sau frecvenței celulelor stem canceroase într-o tumoră; diferențierea celulelor tumorigene la o stare non-tumorigenă; creșterea supraviețuirii libere de progresie (PFS), supraviețuirii libere de boală (DFS) sau supraviețuirii globale (OS), răspuns complet (CR), răspuns parțial (PR), boală stabilă (SD), o scădere a progresiei bolii (PD), un timp redus de progresie (TTP) sau orice combinație a acestora.

35 Măsurile profilactice sau preventive se referă la măsuri care previn și/sau încetinesc dezvoltarea unei stări sau tulburări patologice țintite. Astfel, cei care au nevoie de măsuri profilactice sau preventive îi includ pe cei care sunt predispuși să aibă tulburarea și cei la care tulburarea trebuie prevenită.

40 Măsurile profilactice sau preventive se referă la măsuri terapeutice care previn și/sau încetinesc dezvoltarea unei stări sau tulburări patologice țintite. Astfel, cei care au nevoie de măsuri profilactice sau preventive îi includ pe cei predispuși la tulburare și pe cei la care trebuie să fie prevenită tulburarea.

45 Astfel cum se utilizează aici, termenul "furnizor de asistență medicală" se referă la persoane sau instituții care interacționează direct cu și administrează subiecții vii, de exemplu, pacienți umani. Exemple nelimitative de furnizori de asistență medicală includ medici, asistenți medicali, tehnicieni, terapeuți, farmaciști, consilieri, practicanți de medicină alternativă, facilități medicale, cabinete medicale, spitale, săli de urgență, clinici, centre de îngrijire de urgență, clinici/facilități de medicină alternativă și orice altă entitate care furnizează tratament general și/sau specializat, evaluare, întreținere, terapie, medicație și/sau sfaturi referitoare la toate sau la orice parte din starea de sănătate a pacientului, inclusiv, dar fără a se limita la medical general, medical de specialitate, chirurgical și/sau orice alt tip de tratament, evaluare, întreținere, terapie, medicație și/sau consiliere.

55

Un furnizor de asistență medicală poate administra sau instrui un alt furnizor de asistență medicală să administreze o terapie pentru tratarea cancerului. "Administrarea" unei terapii, astfel cum se utilizează aici, include prescrierea unei terapii unui subiect, precum și eliberarea, aplicarea sau administrarea terapiei unui subiect. Un furnizor de asistență medicală poate implementa sau
60 instrui un alt furnizor de asistență medicală sau un pacient să efectueze următoarele acțiuni: să obțină o probă, să proceseze o probă, să trimită o probă, să primească o probă, să transfere o probă,

să analizeze sau să măsoare o probă, să cuantifice o probă, să furnizeze rezultatele obținute după analiza/măsurarea/cuantificarea unei probe, să primească rezultatele obținute după analizarea/măsurarea/cuantificarea unei probe, compare/acorde scoruri rezultatelor obținute după analizarea/măsurarea/cuantificarea uneia sau mai multor probe, furnizeze comparația/scorul de la unul sau mai multe probe, să obțină comparația/scorul de la una sau mai multe probe, să administreze o terapie sau agent terapeutic (*de exemplu*, un agent de legare a CD123/IL-3Rα), să înceapă administrarea unei terapii, să înceteze administrarea unei terapii, să continue administrarea unei terapii, să întrerupă temporar administrarea unei terapii, să crească cantitatea de agent terapeutic administrat, să scadă cantitatea de agent terapeutic administrat, să continue administrarea unei cantități de agent terapeutic, să crească frecvența de administrare a unui agent terapeutic, să scadă frecvența de administrare a unui agent terapeutic, să mențină aceleași frecvențe de dozare ale unui agent terapeutic, să înlocuiască o terapie sau un agent terapeutic cu cel puțin o altă terapie sau agent terapeutic, să combine o terapie sau agent terapeutic cu cel puțin o altă terapie sau agent terapeutic suplimentar. Aceste acțiuni pot fi efectuate de un furnizor de asistență medicală automat, utilizând o metodă implementată de computer (*de exemplu*, printr-un serviciu web sau un sistem informatic autonom).

"Polinucleotidă" sau "acid nucleic", astfel cum sunt utilizate interschimbabil aici, se referă la polimeri de nucleotide de orice lungime și includ ADN și ARN. Nucleotidele pot fi deoxiribonucleotide, ribonucleotide, nucleotide sau baze modificate, și/sau analogii lor, sau orice substrat care poate fi incorporat într-un polimer de ADN sau ARN polimeraza. O polinucleotidă poate cuprinde nucleotide modificate, cum ar fi nucleotide metilate și analogii acestora. Dacă este prezentă, modificarea structurii nucleotidice poate fi atribuită înainte sau după asamblarea polimerului. Secvența nucleotidelor poate fi întreruptă de componente non-nucleotidice. O polinucleotidă poate fi modificată ulterior după polimerizare, cum ar fi prin conjugare cu o componentă de etichetare. Alte tipuri de modificări includ, de exemplu, "capace", înlocuirea uneia sau mai multor nucleotide naturale cu modificări analoge, internucleotidice, cum ar fi, de exemplu, cele cu legături prin linker lipsiți de sarcină (*de exemplu*, fosfonați de metil, fosfortriesteri, fosfoamidați, cabamați etc.) și prin legături cu linker cu sarcină (*de exemplu*, fosforotioați, fosforoditioați etc.), cei care conțin fragmente atârinate, cum ar fi, de exemplu, proteine (*de exemplu*, nucleaze, toxine, anticorpi, peptide de semnal, ply-L-lizină etc.), cele cu agenți de intercalare (*de exemplu*, acridină, psoralen etc.), cele care conțin agenți de chelatizare (*de exemplu*, metale, metale radioactive, bor, metale oxidative etc.), cele care conțin agenți alchilanți, cele cu legături cu linker modificați (*de exemplu*, acizi nucleici alfa anomerici etc.), precum și forme nemodificate ale polinucleotidei(lor). Mai mult, oricare dintre grupările hidroxil prezente în mod obișnuit în zaharuri pot fi înlocuite, de exemplu, cu grupări fosfonat, grupări fosfat, protejate prin grupări protectoare standard sau activate pentru a se prepara legături cu linker suplimentare la nucleotide suplimentare sau pot fi conjugate cu suporturi solide. OH-ul 5' și 3' terminal poate fi fosforilat sau substituit cu amine sau fragmente de grupări organice de capșonare cu 1 la 20 de atomi de carbon. Alți hidroxili pot fi, de asemenea, derivați la grupări protectoare standard. Polinucleotidele pot conține, de asemenea, forme analoage de zaharuri de riboză sau dezoxiriboză care sunt în general cunoscute în domeniu, incluzând, de exemplu, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- sau 2'-azido-riboză, analogi de zaharuri carbociclice, zaharuri alfa-anomerice, zaharuri epimerice cum ar fi zaharuri de arabinoză, xiloze sau lixoză, piranoze, furanoze, sedoheptulose, analogi aciclici și analogi de nucleozide abazice cum ar fi metil ribozida. Una sau mai multe legături prin linker de fosfodiester pot fi înlocuite cu grupări linker alternative. Aceste grupări linker alternative includ, dar nu se limitează la, modalități de realizare în care fosfatul este înlocuit de P(O)S ("tioat"), P(S)S ("ditioat"), (O)NR₂ ("amidat"), P(O)R, P(O)OR*, CO sau CH₂ ("formacetal"), în care fiecare R sau R este independent H sau substituit sau nesubstituit alchil(1-20 C) care conține opțional o legătură prin linker de eter (-O-), aril, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil sau araldil. Într-o polinucleotidă nu este necesar ca toate legăturile prin linker să fie identice. Descrierea precedentă se aplică tuturor polinucleotidelor menționate aici, inclusiv ARN și ADN.

Termenul "vector" înseamnă un construct care este capabil să furnizeze și să exprime una sau mai multe gene sau secvențe de interes într-o celulă gazdă. Exemple de vectori includ, dar nu se limitează la, vectori virali, vectori de exprimare ADN sau ARN goi, vectori de plasmidă, cosmidă sau fagi, vectori de exprimare ADN sau ARN asociați cu agenți de condensare cationici, vectori de exprimare ADN sau ARN încapsulați în lipozomi și anumite celule eucariote, cum ar fi celulele producătoare.

Termenii "polipeptidă", "peptidă" și "proteină" se utilizează interschimbabil aici, pentru a se referi la polimeri de aminoacizi de orice lungime. Polimerul poate fi liniar sau ramificat, poate cuprinde aminoacizi modificați și poate fi întrerupt de non-aminoacizi. Termenii cuprind, de asemenea, un polimer de aminoacizi care a fost modificat natural sau prin intervenție; de exemplu, formarea legăturii de disulfură, glicozilarea, lipidarea, acetilarea, fosforilarea sau orice altă manipulare sau modificare, cum ar fi conjugarea cu o componentă de etichetare. De asemenea, sunt incluse în definiție, de exemplu, polipeptide care conțin unul sau mai mulți analogi ai unui aminoacid (incluzând, de exemplu, aminoacizi nenaturali *etc.*), precum și alte modificări cunoscute în domeniu. Se înțelege că, deoarece polipeptidele din această invenție se bazează pe anticorpi, în anumite modalități de realizare, polipeptidele pot apărea ca lanțuri unice sau lanțuri asociate. În unele modalități de realizare, o polipeptidă, peptidă sau proteină este ne-naturală. În unele modalități de realizare, o polipeptidă, o peptidă sau o proteină este purificată din alte componente naturale. În unele modalități de realizare, polipeptida, peptida sau proteina este produsă recombinant.

Termenii "identic" sau "identitate" procentuală, în contextul a doi sau mai mulți acizi nucleici sau polipeptide, se referă la două sau mai multe secvențe sau subsecvențe care sunt aceleași sau au un procent specificat de nucleotide sau resturi de aminoacizi care sunt aceleași, atunci când sunt comparate și aliniate (introducând goluri, dacă este necesar) pentru corespondență maximă, fără a lua în considerare nicio substituție conservatoare de aminoacizi ca parte a identității secvenței. Identitatea procentuală poate fi măsurată utilizând un software sau algoritmi de comparare a secvenței sau prin inspecție vizuală. În domeniu sunt cunoscuți diferiți algoritmi și software care se pot utiliza pentru a se obține alinieri ale secvențelor de aminoacizi sau nucleotide. Un astfel de exemplu nelimitativ de algoritm de aliniere a secvenței este algoritmul descris în Karlin și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2264-2268, 1990, astfel cum este modificat în Karlin și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873-5877, 1993, și încorporat în programele NBLAST și XBLAST (Altschul și colab., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Gapped BLAST poate fi utilizat astfel cum este descris în Altschul și colab., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; BLAST-2, WU- BLAST-2 (Altschul și colab., Methods in Enzymology 266:460-480, 1996), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) sau Megalign (DNASTAR) sunt programe software suplimentare disponibile public care pot fi utilizate pentru alinierea secvențelor. Identitatea procentuală între două secvențe de nucleotide poate fi determinată utilizând programul GAP în software-ul GCG (*de exemplu*, utilizând o matrice NWSgapdna.CMP și o greutate a golului de 40, 50, 60, 70, sau 90 și o greutate de lungime de 1, 2, 3, 4, 5, sau 6). Alternativ, programul GAP din pachetul software GCG, care încorporează algoritmul lui Needleman și Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453, 1970) poate fi utilizat pentru a se determina identitatea procentuală între două secvențe de aminoacizi (de exemplu, folosind fie o matrice Blossum 62, fie o matrice PAM250 și o greutate a golului de 16, 14, 12, 10, 8, 6 sau 4 și o greutate de lungime de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativ, identitatea procentuală între secvențele de nucleotide sau aminoacizi poate fi determinată folosind algoritmul lui Myers și Miller (CABIOS, 4: 11-17, 1989). De exemplu, identitatea procentuală poate fi determinată utilizând programul ALIGN (versiunea 2.0) și utilizând un tabel de resturi PAM120, o penalitate de lungime a golului de 12 și o penalitate a golului de 4. Parametrii adecvați pentru alinierea maximă pentru un software de aliniere particular pot fi determinați de către o persoană de specialitate. Se pot utiliza parametri predefiniți ai software-ului de aliniere. Identitatea procentuală "X" a unei prime secvențe de aminoacizi cu o a doua secvență de aminoacizi poate fi calculată ca $100 \times (Y/Z)$, unde Y este numărul de resturi de aminoacizi marcate ca potriviri identice în alinierea primei și a doua secvențe (aliniate prin inspecție vizuală sau un anumit program de aliniere a secvenței) și Z este numărul total de resturi din a doua secvență. Dacă lungimea unei prime secvențe este mai mare decât a celei de-a doua secvențe, identitatea procentuală a primei secvențe la a doua secvență va fi mai mare decât identitatea procentuală a celei de-a doua secvențe la prima secvență.

Ca un exemplu nelimitativ, dacă o anumită polinucleotidă are o anumită identitate procentuală de secvență (*de exemplu*, este cel puțin 80% identică, cel puțin 85% identică, cel puțin 90% identică, și uneori, cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identică) cu o secvență de referință pot fi determinate folosind programul Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versiunea 8 de la Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utilizează algoritmul local de omologie al lui Smith și Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489, 1981, pentru a găsi cel mai bun segment de omologie între două secvențe. Când se utilizează Bestfit sau orice alt program de aliniere a secvenței pentru a determina dacă o anumită secvență este, de exemplu, 95% identică cu o

secvență de referință conform prezentei invenții, parametrii sunt stabiliți astfel încât procentul de identitate să fie calculat pe toată lungimea secvenței de nucleotide de referință și pentru care sunt permise goluri în omologie de până la 5% din numărul total de nucleotide din secvența de referință.

5

Doi acizi nucleici sau polipeptide pot fi substanțial identice, ceea ce înseamnă că au cel puțin cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, și în unele modalități de realizare cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99% identitate de nucleotide sau de resturi de aminoacizi, atunci când sunt comparate și aliniate pentru o corespondență maximă, măsurată utilizând un algoritm de comparare a secvenței sau prin inspecție vizuală. Identitatea poate exista pe o regiune de secvențe care are cel puțin aproximativ 10, aproximativ 20, aproximativ 40-60 resturi în lungime sau orice valoare integrală între acestea, sau pe o regiune mai lungă de 60-80 resturi, cel puțin aproximativ 90-100 resturi, sau secvențele sunt substanțial identice pe toată lungimea secvențelor care sunt comparate, cum ar fi, de exemplu, regiunea de codificare a unei secvențe de nucleotide.

15

O "substituție conservativă a aminoacizilor" este una în care un rest de aminoacid este înlocuit cu un alt rest de aminoacid având un lanț lateral similar. Au fost definite în domeniu familii de resturi de aminoacizi având lanțuri laterale similare, incluzând lanțuri laterale bazice (*de exemplu*, lizină, arginină, histidină), lanțuri laterale acide (*de exemplu*, acid aspartic, acid glutamic), lanțuri laterale polare fără sarcină (*de exemplu*, asparagină, glutamină, serină, treonină, tirozină, cisteină), lanțuri laterale nonpolare (*de exemplu*, glicină, alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină, triptofan), lanțuri laterale beta-ramificate (*de exemplu*, treonină, valină, izoleucină) și lanțuri laterale aromatice (*de exemplu*, tirozină, fenilalanină, triptofan, histidină). De exemplu, substituția unei fenilalanină cu o tirozină este o substituție conservativă. Substituțiile conservative din secvențele polipeptidelor și anticorpilor conform invenției nu pot abroga legarea polipeptidei sau a anticorpului care conține secvența de aminoacizi la antigen(i), *adică*, CD123/IL-3R α la care se leagă polipeptida sau anticorpul. Metodele de identificare ale substituțiilor conservative de nucleotide și aminoacizi care nu elimină legarea antigenului sunt bine cunoscute în domeniu (a se vedea, *de exemplu*, Brummell și colab., *Biochem.* 32:1180-1187, 1993; Kobayashi și colab., *Protein Eng.* 12(10):879-884, 1999; și Burks și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417, 1997).

20

25

30

Astfel cum se utilizează aici, "P-glicoproteina 1", cunoscută și sub denumirea de "glicoproteină de permeabilitate", "P-gp sau Pgp", "proteina 1 cu rezistență la multiple medicamente (MDR1)", "membrul 1 al sub-familie B al casetei de legare a ATP (ABCB1)", sau "cluster de diferențiere 243 (CD243)", este un transportor ABC al subfamiliei MDR/TAP care transportă o mare varietate de substraturi prin membranele extra- și intracelulare. Este o pompă de efflux dependentă de ATP cu specificitate largă a substratului. P-gp este distribuit extensiv și exprimat în epiteliul intestinal unde pompează xenobiotice (cum ar fi toxine sau medicamente) înapoi în lumenul intestinal, în celulele hepatice unde le pompează în căile biliare, în celulele de tubule proximale al rinichiului unde le pompează în ductele conductoare de urină și în celulele endoteliale capilare care compun bariera hematoencefalică și bariera hematotesticulară, unde le pompează înapoi în capilare. Unele celule canceroase exprimă, de asemenea, cantități mari de P-gp, ceea ce face ca aceste tipuri de cancer să fie rezistente la multiple medicamente.

35

40

45

"Alchil" astfel cum se utilizează aici se referă la un radical de hidrocarbură monovalent saturată cu lanț liniar sau ramificat cu unul până la douăzeci de atomi de carbon. Exemple de alchil includ, dar nu se limitează la, metil, etil, 1-propil, 2-propil, 1-butil, 2-metil-1-propil, -CH₂CH(CH₃)₂, 2-butil, 2-metil-2-propil, 1-pentil, 2-pentil 3-pentil, 2-metil-2-butil, 3-metil-2-butil, 3-metil-1-butil, 2-metil-1-butil, 1-hexil, 2-hexil, 3-hexil, 2-metil-2-pentil, 3-metil-2-pentil, 4-metil-2-pentil, 3-metil-3-pentil, 2-metil-3-pentil, 2,3-dimetil-2-butil, 3,3-dimetil-2-butil, 1-heptil, 1-octil, și alții asemenea. De preferință, alchilul are unul până la zece atomi de carbon. Mai preferabil, alchilul are unul până la patru atomi de carbon.

55

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

60

Termenul "compus" sau "compus citotoxic", se utilizează interschimbabil. Se intenționează ca aceștia să includă compuși pentru care a fost dezvăluit(ă) în prezenta invenție o

structură sau o formulă sau orice derivat al acestora. Termenul include, de asemenea, stereoizomeri, izomeri geometrici, tautomeri, solvați, metaboliți și săruri (*de exemplu*, săruri acceptabile farmaceutice) ale unui compus cu toate formulele dezvoltate în prezenta invenție. Termenul include, de asemenea, orice solvați, hidrați și polimorfi ai oricăruia dintre cei menționați anterior. Menționarea specifică a "stereoizomerilor," "izomerilor geometrici," "tautomerilor," "solvaților," "metaboliților," "sărurilor," "conjugatilor," "sărurilor conjugatilor," "solvaților," "hidraților," sau "polimorfilor" în anumite aspecte ale invenției descrise în prezenta cerere, nu trebuie interpretată ca o omisiune intenționată a acestor forme în alte aspecte ale invenției, atunci când termenul "compus" se utilizează fără menționarea acestor alte forme.

Termenul "chiral" se referă la molecule care au proprietatea de non-superpozare a imaginii partenerului în oglindă, în timp ce termenul "achiral" se referă la molecule care sunt superpozabile cu imaginea în oglindă a partenerului lor.

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

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

"Enantiomeri" se referă la doi stereoizomeri ai unui compus care sunt imagini în oglindă non-superpozabile unul al celuilalt.

Definițiile și convențiile stereochemice utilizate în acest document urmează, în general S. P. Parker, Ed, McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; și Eliel, E. și Wilen, S, Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1994. Compușii conform invenției pot conține centri asimetrici sau chirali și, prin urmare, există sub diferite forme stereoizomerice. Se intenționează ca toate formele stereoizomerice ale compușilor conform invenției, inclusiv, însă fără să se limiteze la, diastereoisomeri, enantiomeri și atropizomeri, precum și amestecuri ale acestora, cum ar fi amestecurile racemice, să facă parte din prezenta invenție. Mulți compuși organici există în forme active din punct de vedere optic, *adică* aceștia au capacitatea de a roti planul luminii polarizate în plan. În descrierea unui compus activ optic, prefixele D și L sau R și S, sunt utilizate pentru a indica configurația absolută a moleculei în jurul centrului sau centrilor chiral(i) al(ai) acestuia(ora). Prefixele d și l sau (+) și (-) sunt utilizate pentru a desemna semnul de rotație al planului luminii polarizate de către compus, (-) sau l însemnând faptul că respectivul compus este levorotator. Un compus cu prefixul cu (+) sau d este dextrorotator. Pentru o structură chimică dată, acești stereoizomeri sunt identici, cu excepția cazului în care reprezintă imagini în oglindă unul al celuilalt. Un stereoizomer specific poate fi denumit, de asemenea, enantiomer, și un amestec de astfel de izomeri este adesea denumit amestec enantiomeric. Un amestec 50:50 de enantiomeri este denumit un amestec racemic sau un racemat, care poate apărea acolo unde nu a existat o stereoselecție sau stereospecificitate într-o reacție sau procedeu chimic. Termenii "amestec racemic" și "racemat" se referă la un amestec echimolar format din două specii enantiomerice, lipsit de activitate optică.

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

Termenul "reactant reactiv iminic" se referă la un reactant care este capabil să reacționeze cu o grupare de imină. Exemplele de reactanți imino-reactivi includ, dar nu se limitează la, sulfiți (H_2SO_3 , H_2SO_2 sau o sare de HSO_3^- , SO_3^{2-} sau HSO_2^- formată cu un cation), metabisulfit ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ sau o sare de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formată cu un cation), mono, di, tri, și tetra- tiofosfați (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 sau o sare de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} sau PS_4^{3-} formată cu un cation), esteri de tio fosfat ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), diferite amine (hidroxil

amină (*de exemplu*, NH_2OH), hidrazină (*de exemplu*, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O-R}^i$, $\text{R}^i\text{NH-R}^i$, $\text{NH}_2\text{-R}^i$, $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$, $\text{NH}_2\text{-C(=S)-NH}_2$ tiosulfat ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sau o sare de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formată cu un cation), ditionit ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sau o sare de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formată cu un cation), fosforoditioat ($\text{P(=S)(OR}^k\text{)(SH)(OH)}$) sau o sare a acesteia formată cu un cation), acid hidroxamic ($\text{R}^k\text{C(=O)NHOH}$ sau o sare formată cu un cation), hidrazidă ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), sulfoxilat de formaldehidă ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ sau o sare de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formată cu un cation, cum ar fi $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$), nucleotidă glicată (cum ar fi GDP-manoză), fludarabină sau un amestec al acestora, în care R^1 și R^i sunt fiecare independent un alchil liniar sau ramificat având 1 la 10 atomi de carbon și sunt substituite cu cel puțin un substituent selectat dintre $-\text{N(R}^i\text{)}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, și $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i și R^j poate fi în plus opțional substituit cu un substituent pentru un alchil descris aici; R^j este un alchil liniar sau ramificat având 1 la 6 atomi de carbon; și R^k este un alchil, alchenil sau alchinil liniar, ramificat sau ciclic având 1 la 10 atomi de carbon, aril, heterociclic sau heteroaril (preferabil, R^k este un alchil liniar sau ramificat având 1 la 4 atomi de carbon; mai preferabil, R^k este metil, etil sau propil). Preferabil, cationul este un cation monovalent, cum ar fi Na^+ sau K^+ . De preferință, reactantul imino-reactiv este selectat dintre sulfiți, hidroxilamină, uree și hidrazină. Mai preferabil, reactantul reactiv iminic este NaHSO_3 sau KHSO_3 .

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

Dacă, compusul conform invenției este o bază, sarea acceptabilă farmaceutic dorită poate fi preparată prin orice metodă adecvată disponibilă în domeniu, de exemplu, tratarea bazei libere cu un acid anorganic, cum ar fi acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid azotic, acid metansulfonic și acid fosforic și alții asemenea, sau cu un acid organic, cum ar fi acid acetic, acid maleic, acid succinic, acid mandelic, acid fumaric, acid malonic, acid piruvic, acid oxalic, acid glicolic, acid salicilic, un acid piranozidilic, cum ar fi acidul glucuronic sau acidul galacturonic, un alfa-hidroxi-acid, cum ar fi acidul citric sau acidul tartric, un aminoacid, cum ar fi acidul aspartic sau acidul glutamic, un acid aromatic, cum ar fi acidul benzoic sau acidul cinamic, un acid sulfonic, cum ar fi acidul p-toluensulfonic sau acidul etansulfonic, sau alții asemenea.

Dacă, compusul conform invenției este un acid, sarea acceptabilă farmaceutic dorită poate fi preparată prin orice metodă adecvată, de exemplu, tratarea acidului liber cu o bază anorganică sau organică, cum ar fi o amină (primară, secundară sau terțiară), un hidroxid de metal alcalin sau hidroxid de metal alcalino-pământos, sau altele asemenea. Exemplele ilustrative de săruri adecvate includ, dar nu se limitează la, săruri organice derivate de la aminoacizi, cum ar fi glicina și arginina, amoniacul, amine primare, secundare și terțiare și amine ciclice, cum ar fi piperidina, morfolina și piperazina și săruri anorganice derivate de la sodiu, calciu, potasiu, magneziu, mangan, fier, cupru, zinc, aluminiu și litiu.

Astfel cum se utilizează aici, termenul "solvat" înseamnă un compus care include suplimentar o cantitate stoichiometrică sau non-stoichiometrică de solvent cum ar fi apă, izopropanol, acetonă, etanol, metanol, DMSO, acetat de etil, acid acetic și etanolamină diclorometan 2-propanol sau altele asemenea, legate prin forțe intermoleculare necovalente. Solvații sau hidrații compușilor sunt preparați cu ușurință prin adăugarea a cel puțin unui echivalent molar a unui solvent hidroxilic cum ar fi metanolul, etanolul, 1-propanolul, 2-propanolul sau apa la compus pentru a rezulta solvatarea sau hidratarea fragmentului de imină.

Un "metabolit" sau "catabolit" este un produs, produs prin metabolizarea sau catabolizarea în corp a unui compus specificat, a unui derivat al acestuia, sau un conjugat al acestuia, sau a sării acestuia. Metaboliții unui compus, unui derivat al acestora sau unui conjugat al acestora, pot fi identificați utilizând tehnici de rutină cunoscute în domeniu, și activitățile lor pot fi determinate utilizând teste cum ar fi cele descrise aici. Astfel de produse pot rezulta, de exemplu, din oxidarea, hidroxilarea, reducerea, hidroliza, amidarea, deamidarea, esterificarea, deesterificarea, clivajul enzimatic și altele asemenea ale compusului administrat. În consecință, invenția include metaboliți ai compușilor, un derivat al acestora sau un conjugat al acestora, conform invenției, inclusiv compuși, un derivat al acestora sau un conjugat al acestora, produși printr-un procedeu care cuprinde contactarea unui compus, un derivat al acestuia sau un conjugat al acestuia, conform prezentei invenții, cu un mamifer pentru o perioadă de timp suficientă pentru a se obține un produs metabolic al acestuia.

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

Termenul "grupare protectoare" sau "fragment protector" se referă la un substituent care se utilizează în mod obișnuit pentru a bloca sau proteja o funcțiune particulară în timpul reacției altor grupări funcționale de pe compus, un derivat al acestuia sau un conjugat al acestuia. De exemplu, o "grupare amino-protectoare" sau un "fragment amino-protector" este un substituent atașat la o grupare amino care blochează sau protejează funcționalitatea amino din compus. Astfel de grupări sunt bine-cunoscute în domeniu (a se vedea de exemplu P. Wuts și T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Cap. 7, J. Wiley & Sons, NJ) și exemplificate prin carbamați cum ar fi metil și etil carbamat, Fmoc, etil carbamați substituiți carbamați clivați de 1,6- β -eliminare (de asemenea denumiți "auto-imolativi"), uree, amide, peptide, derivați de alchil și aril. Grupări amino-protectoare adecvate includ acetil, trifluoroacetil, t-butoxicarbonil (BOC), benziloxycarbonil (CBZ) și 9-fluorenilmetilenoxycarbonil (Fmoc). Pentru o descriere generală a grupărilor protectoare și utilizarea acestora, *vezi* P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007.

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

Termenul "cation" se referă la un ion cu sarcină pozitivă. Cationul poate fi monovalent (*de exemplu*, Na^+ , K^+ , NH_4^+ etc.), bi-valent (*de exemplu*, Ca^{2+} , Mg^{2+} etc.) sau multi-valent (*de exemplu*, Al^{3+} etc.). Preferabil, cationul este monovalent.

Termenul "grupare esterică reactivă" se referă la o grupare esterică care poate reacționa cu ușurință cu o grupare amino pentru a forma o legătură amidică. Grupări esterice reactive exemplare includ, dar nu se limitează la, esteri de N-hidroxisuccinimidă, esteri de N-hidroxifalimidă, esteri de N-hidroxi sulfo-succinimidă, esteri de para-nitrofenil, esteri de dinitrofenil, esteri de pentafluorofenil și derivații lor, în care derivații menționați facilitează formarea legăturii amidice. Grupările esterice reactive pot fi esteri de N-hidroxisuccinimidă sau esteri de N-hidroxi sulfo-succinimidă.

Termenul "grupare reactivă la amino" se referă la o grupare care poate reacționa cu o grupare amino pentru a forma o legătură covalentă. Grupări reactive față de amino exemplificative includ, dar nu se limitează la, grupări reactive ester, halogenuri de acil, halogenură de sulfonil, imidoester sau o grupare reactivă de tioester. O grupare reactivă cu amino poate fi o grupare reactivă esterică. O grupare reactivă cu amino poate fi un ester de N-hidroxisuccinimidă sau un ester de N-hidroxi sulfo-succinimidă.

Termenul "grupare reactivă cu tiol" se referă la o grupare care poate reacționa cu un tiol (-SH) pentru a forma o legătură covalentă. Grupări reactive cu tiol exemplare includ, dar nu se

limitează la, maleimidă, haloacetil, aloacetamidă, vinil sulfonă, vinil sulfonamidă sau vinil piridină. O grupare reactivă cu tiol poate fi maleimida.

5 Astfel cum se utilizează în prezenta dezvăluire și revendicări, formele de singular "o," "un," și "-ul" includ formele de plural, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar altfel.

10 Se înțelege că ori de câte ori sunt descrise aici modalități de realizare cu limbajul "care cuprinde," sunt redată de asemenea modalități de realizare analoage descrise în termeni de "constând din" și/sau "constând în esență din".

15 Termenul "și/sau" astfel cum este folosit aici într-o frază precum "A și/sau B" se intenționează să includă ambele "A și B", "A sau B," "A" și "B." Similar, termenul "și/sau" astfel cum se utilizează într-o frază precum "A, B și/sau C" se intenționează să cuprindă fiecare dintre următoarele modalități de realizare: A, B, și C; A, B, sau C; A sau C; A sau B; B sau C; A și C; A și B; B și C; A (individual); B (individual); și C (individual).

Nomenclatura anticorpilor, compușilor și imunoconjugatelor

20 Astfel cum se utilizează aici, nomenclatura utilizată pentru anticorpii anti-CD123, compuși citotoxici și imunoconjugății acestora adoptă în general următoarele semnificații.

25 CD123-3, -6, și -14 (sau CD123 Mu-3, -6, și -14; sau muCD123-3, -6, și 14) sunt trei anticorpi monoclonali anti-CD123 murini. Secvențele de CDR1-3 ale lanțurilor grele și ușoare (VH-CDR1-3 și VL-CDR1-3) sunt redată în Tabelele 1 și 2, asociate cu SECV ID NR: 1-25. Secvențele regiunii variabile a lanțului greu (HCVR) sunt redată în Tabelul 3A asociate cu SECV ID NR: 26, 28, și 30. Secvențele regiunii variabile a lanțului ușor (LCVR) sunt redată în Tabelul 4A asociate cu SECV ID NR: 27, 29, și 31. Secvențele lanțului greu (HC) cu lungime completă ale anticorpilor murini sunt redată în Tabelul 5 (SECV ID NR: 42, 44, și 46), și secvențele lanțului ușor cu lungime completă (LC) ale anticorpilor murini sunt redată în Tabelul 6 (SECV ID NR: 43, 30 45, și 47).

35 chCD123-3, -6 și -14 sunt anticorpii himerici murino-umani corespunzători având regiunile variabile ale lanțului greu și ușor murin și secvențele regiunii constante umane. De exemplu, anticorpus himeric chCD123-6 este alcătuit HCVR și LCVR de șoarece cu SECV ID NR: 28 și respectiv 29, împreună cu secvențele constante umane de IgG1 și Kappa pentru lanțurile grele și respectiv ușoare. Vezi Exemplul 3.

40 huCD123-3, -6, și -14 sunt anticorpii umanizați corespunzători. Când umanizarea se efectuează prin grefarea CDR a celor 6 regiuni de CDR murine corespunzătoare (HC și LC CDR1-3), litera "G" urmează imediat denumirea clonei, care este la rândul său urmată de un număr de versiune care desemnează originea secvențelor regiunii variabile a lanțului ușor și lanțului greu uman. Astfel huCD123-6Gv4.6 se referă la anticorpus CD123 umanizat bazat pe grefarea ("G") a celor 6 regiuni CDR din anticorpus muCDR123-6 corespunzător, pe regiunea variabilă a lanțului ușor uman Gv4 și regiunea variabilă a lanțului greu Gv6. Similar, -Gv4.7 cuprinde regiunea variabilă a lanțului ușor Gv4 și regiunea variabilă a lanțului greu Gv7 uman; și -Gv1.1 cuprinde regiunea variabilă a lanțului ușor Gv1 și regiunea variabilă a lanțului greu Gv1 uman.

50 Cele trei secvențe HCVR, huCD123-6Gv1, -Gv6 și -Gv7 sunt redată în Tabelul 3A (SECV ID NR: 32 și 34, cu SECV ID NR: 34 reprezentând atât -Gv6, cat și - Gv7 deoarece diferă numai la al 2^{-lea} rest Xaa), și secvențele de codificare ale AND-ului acestora în Tabelul 3B (SECV ID NR: 62, 64, și 66). Cele trei secvențe HC cu lungime completă, huCD123-6Gv1, -Gv6 și - Gv7 sunt redată în Tabelul 5 (SECV ID NR: 48 și 50, cu SECV ID NR: 50 reprezentand atat -Gv6, cat și -Gv7 cu lungime completă deoarece diferă doar la al 2^{-lea} rest Xaa).

55 Cele două secvențe LCVR, huCD123-6Gv1 și -Gv4, sunt redată în Tabelul 4A (SECV ID NR: 33 și 35 și secvențele de codificare ale ADN-ului acestora în Tabelul 4B (SECV ID NR: 63 și 65). Cele două secvențe LC cu lungime completă, huCD123-6Gv1 și -Gv4, sunt redată în Tabelul 6 (SECV ID NR: 49 și 51).

60 Când umanizarea este efectuată prin refacerea suprafeței, secvențele lanțului greu refăcute la suprafață sunt desemnate prin, "rh" urmând imediat după numărul clonei anticorpusului CD123

murin, și sunt desemnate în plus prin una dintre două versiuni ale secvențelor refăcute la suprafață, v1.0 sau v1.1. Astfel huCD123-6rhv1.0 și -rhv1.1 sunt secvențe refăcute la suprafață ale lanțului greu cu regiuni de CDR care corespund anticorpului muCD123-6, cu versiunea desemnată ca 1.0 și respectiv 1.1. Vezi HCVR SECV ID NR: 39 și 40 în Tabelul 3A, și SECV ID NR: 68 și 69 în Tabelul 3B. Vezi de asemenea HC cu lungime completă SECV ID NR: 59 și 60 în Tabelul 5.

Similar, singura versiune a secvenței lanțului ușor refăcut la suprafață, huCD123-6r1v1.0, are LCVR SECV ID NR: 41 din Tabelul 4A și LC cu lungime completă SECV ID NR: 61 din Tabelul 6.

Un anticorp refăcut la suprafață huCD123-6rhv1.0 și huCD123-6rlv1.0 este huCD123-6Rv1.0; și un anticorp refăcut la suprafață având huCD123-6rhv1.1 și huCD123-6rlv1.0 este huCD123-6Rv1.1.

NTS2 sau "S2" pe scurt se referă la un anticorp care are un Ser proiectat la capătul N-terminal al lanțului greu. Varianta S2 a huCD123-6Gv6/7 are secvența HCVR SECV ID NR: 38 din Tabelul 3A și secvența proteinei HC de lungime completă SECV ID NR: 53 din Tabelul 5.

Similar, NTS3 sau "S3" pe scurt se referă la un anticorp care are un Ser modificat la capătul N-terminal al lanțului ușor. Varianta S3 a huCD123-6Gv4 are secvența LCVR SECV ID NR: 37 din Tabelul 4A și secvența proteică LC cu lungime completă SECV ID NR: 58 din Tabelul 6.

Un anticorp care cuprinde un Ser N-terminal modificat (fie S2 sau S3) poate fi conjugat cu un medicament/agent citotoxic fie prin Ser-ul N-terminal oxidat, fie prin legătura prin linker Lys "convențională". Dacă legătura medicamentului se face prin linker Ser N-terminal oxidat, numele conjugat conține o denumire a "SeriMab". Dacă legătura prin linker a medicamentului este prin Lys, atunci numele conjugatului nu conține SeriMab (în pofida faptului că există o denumire S2 sau S3 pentru a semnaliza prezența Ser modificat la capătul N-terminal). Tipul particular de legătură prin linker va fi, de asemenea, evident pe baza grupării reactive de citotoxină. De exemplu, huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8 se referă la conjugat între D8 și anticorpul CD123 umanizat huCD123-6Gv4.7S3, prin N-terminalul de Ser oxidat de pe lanțul ușor. Anticorpul CD123 umanizat are regiunile CD123-6 CDR murine grefate, LC Gv4 uman și lanțul greu Gv7, și N-terminalul lanțului ușor are un Ser modificat (S3). Prin contrast, huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1 se referă la conjugat între D1 și același anticorp CD123 umanizat huCD123-6Gv4.7S3, prin legătura prin linker a Lys printr-un linker de SPDB sulfonat.

În anumite variante de realizare, dacă atât lanțul ușor cât și lanțul greu N-terminale conțin Ser modificat, în numele anticorpului pot apărea "S2S3" sau "S2S3-SeriMab".

Anumiți anticorpi conform invenției au un Cys modificat în domeniul CH3 al lanțului greu, într-o poziție corespunzătoare aceleiași poziții Kabat de la al 5^{-lea} până la ultimul Cys din SECV ID NR: 54. Astfel de HC-uri sau anticorpi cuprinzând astfel de HC-uri conțin denumirea CysMab. Astfel huCD123-6Gv4.6-CysMab este un anticorp CD123 umanizat care are grefate regiuni muCD123-6 CDR, se bazează pe secvențele Gv4 ale lanțului ușor și Gv6 ale lanțului greu umane, în care un Cys modificat este localizat în regiunea HC CH3 într-o poziție corespunzător celui de-al 5^{-lea} la ultimul Cys din SECV ID NR: 54. Similar, secvența sa de lanț greu este huCD123-6Gv6-CysMab. În plus, huCD123-6Gv4.6S2-CysMab este altfel identic, dar are un Ser modificat la capătul N-terminal al lanțului greu, și secvența sa de lanț greu este huCD123-6Gv6S2-CysMab.

Anticorpul refăcut la suprafață descris mai sus poate fi modificat în continuare pentru a conține Ser N-terminal fie la lanțul ușor (varianta S3 a anticorpului refăcut la suprafață), fie la lanțul greu (varianta S2 a anticorpului refăcut la suprafață), sau ambele (a se vedea mai jos). Alternativ sau în plus, anticorpul refăcut la suprafață poate avea un Cys proiectat în domeniul CH3 al lanțului greu într-o poziție corespunzătoare aceleiași poziții Kabat de la al 5^{-lea} la ultimul Cys din SECV ID NR: 54 (versiunea CysMab a anticorpului refăcut la suprafață). Un anticorp refăcut la suprafață poate avea ambii Cys, și Ser N-terminal modificați.

La conjugării formați între astfel de CysMab și citotoxină, totuși, cel puțin teoretic, citotoxina poate fi legată cu linker de CysMab fie prin Cys, fie prin Lys convențional. Astfel cum

5

10

15

Compus Nr.	Structură
D1	
D2	
DGN462	
D3	

Compus Nr.	Structură
D4	
D5	
D5'	
D6	
D7	
D8	
D9	

Este de notat că unii agenți diferă ușor numai din cauza chimiei diferite a legăturii prin linker, necesare pentru legarea citotoxinei la diferite lanțuri laterale ale anticorpilor (*adică*, legătură prin linker Lys, legătură prin linker Cys, legătură prin linker Ser N-terminală oxidată). Cu toate acestea, aceste citotoxine inrudite li se atribuie denumiri "D" diferite. Vezi D1 și D4, precum și D2, D5, și D8.

Conjugați anticorpilor în cauză și ale agenților citotoxici urmează în general nomenclatura anticorpilor și a agenților citotoxici astfel cum este descris mai sus.

De exemplu, huCD123-6Gv4.6-sulfo-SPDB-D1 este un conjugat al anticorpului huCD123-6Gv4.6 la compusul D1 printr-un linker SPDB sulfonat, la unul sau mai multe resturi Lys ale anticorpului. huCD123-6-CX1-1-DM1 este un conjugat al anticorpului huCD123-6 conjugat cu agentul citotoxic DM1 printr-un linker triglicilic denumit "linker CX1-1", la unul sau mai multe dintre resturile Lys ale anticorpului. Vezi Exemplul 9e.

O excepție notabilă este conjugatul huCD123-6-SeriMab-sD1 prezentat în FIG. 7B și 17, în care secvența linker scurtă dintre huCD123-6-SeriMab și citotoxina sD1 nu este menționată explicit în denumirea conjugatului. Similar, conjugatul huCD123-6-SeriMab-sDGN462 din FIG. 15 este, de asemenea, o excepție de la regulile generale de mai sus.

2. Agenți de legare la CD123

Prezenta invenție redă agenți care leagă specific CD123/IL-3R α , cum ar fi CD123/IL-3R α uman. Acești agenți sunt denumiți în general aici ca "agenți de legare la CD123/IL-3R α ". Agenții de legare la CD123/IL-3R α sunt anticorpi sau fragmente de legare la antigen a acestora (sau "anticorpi" pentru simplitate), imunoconjugați ai acestora sau polipeptide ale acestora.

Secvențele de aminoacizi și nucleotide pentru speciile umane și alte specii de CD123/IL-3R α sunt cunoscute în domeniu. De exemplu, secvența de proteină variantă 1 de îmbinare a CD123/IL-3R α umană descrisă în NCBI RefSeq NP_002174 este reprodusă mai jos:

```

1  MVLWLITLLL IALPCLLQTK EDPNPPITNL RMKAKAQQLT WDLNRNVTDI ECVKDADYSM
61  PAVNNSYCQF GAISLCEVTN YTVRVANPPF STWILFPENS GKPWAGAENL TCWIHDVDFL
121 SCSWAVGPGA PADVQYDLYL NVANRRQQYE CLHYKTDAQG TRIGCRFDDI SRLSSGSQSS
181 HILVRGRSAA FGIPCTDKFV VFSQIEILTP PNMTAKCNKT HSFMHWKMRS HFNRKFRYEL
241 QIQKRMQPMI TEQVRDRTSF QLLNPGTYTV QIRARERVYE FLSAWSTPQR FECQEEGAN
301 TRAWRTSLLI ALGTLLALVC VFVICRRYLW MQRLEFPRIPH MKDPIGDSFQ NDKLVVWEAG
361 KAGLEECLVT EVQVVQKT (SECV ID NR: 36)

```

Secvența de mai sus prezintă proteina lanțului precursor alfa de CD123/IL-3R, care este compusă din 378 aminoacizi, conținând domeniul extracelular (resturile 1-306, incluzând o peptidă semnal N-terminală cu 18 resturi), un domeniu transmembranar de 20 de aminoacizi și o coadă citoplasmatică scurtă de 52 de aminoacizi.

Secvența de acid nucleic varianta 1 de îmbinare a CD123/IL-3R α uman descrisă în NCBI RefSeq NM_002183 este reprodusă mai jos:

```

1  GTCAGGTTCA TGGTTACGAA GCTGCTGACC CCAGGATCCC AGCCCGTGGG AGAGAAGGGG
61 GTCTCTGACA GCGCCACACC CTCCCCTG CCAGATCCTT ATTGGGTCTG AGTTTCAGGG
121 GTGGGGCCCC AGCTGGAGGT TATAAACAG CTCAATCGGG GAGTACAACC TTCGGTTTCT
181 CTTGCGGGAA AGCTGCTTTC AGCGCACACG GGAAGATATC AGAAACATCC TAGGATCAGG
241 ACACCCACAGA TCTTCTCAAC TGAACACAG AAGGCTGTTT CTTCCACACA GTACTTTGAT
301 CTCCATTTAA GCAGGCACCT CTGTCTGCG TCCCGGAGCT GCGTTCCCGA TGGTCTCCT
361 TTGGCTCAGC CTGCTCCTGA TCGCCCTGCC CTGTCTCCTG CAAACGAAGG AAGATCCAAA
421 CCCACCAATC ACGAACCTAA GGATGAAAGC AAAGGCTCAG CAGTTGACCT GGGACCTTAA
481 CAGAAATGTG ACCGATATCG AGTGTGTTAA AGACGCCGAC TATTCTATGC CGGCAGTGAA
541 CAATAGCTAT TGCCAGTTTG GAGCAATTTT CTTATGTGAA GTGACCAACT ACACCGTCCG
601 AGTGGCCAAC CCACCATCTT CCACGTGGAT CCTCTTCCCT GAGAACAGTG GGAAGCCTTG
661 GGCAGGTGCG GAGAATCTGA CCTGCTGGAT TCATGACGTG GATTTCTTGA GCTGCAGCTG
721 GCGCGTAGGC CCGGGGGGCC CCGCGGACGT CCAGTACGAC CTGTACTTGA ACGTTGCCAA
781 CAGGCGTCAA CAGTACGAGT GTCTTCACTA CAAAACGGAT GCTCAGGGAA CACGTATCGG
841 GTGTCGTTTC GATGACATCT CTCGACTCTC CAGCGGTTCT CAAAGTTCCC ACATCCTGGT
901 GCGGGGACAG AGCGCAGCCT TCGGTATCCC CTGCACAGAT AAGTTTGTG TCTTTTCACA
961 GATTGAGATA TTAACCTCC CCAACATGAC TGCAAAGTGT AATAAGACAC ATTCCTTTAT
1021 GCACTGGAAA ATGAGAAGTC ATTTCAATCG CAAATTTGCG TATGAGCTTC AGATACAAAA
1081 GAGAATGCAG CCTGTAATCA CAGAACAGGT CAGAGACAGA ACCTCCTTCC AGCTACTCAA
1141 TCCTGGAACG TACACAGTAC AAATAAGAGC CCGGGAAAGA GTGTATGAAT TCTTGAGCGC
1201 CTGGAGCACC CCCAGCGCCT TCGAGTGCAG CCAGGAGGAG GGCGCAAACA CACGTGCCTG
1261 GCGGACGTCG CTGCTGATCG CGCTGGGGAC GCTGCTGGCC CTGGTCTGTG TCTTCGTGAT
1321 CTGCGAAGG TATCTGGTGA TGCAGAGAT CTTTCCCGC ATCCCTCACA TGAAAGACCC
1381 CATCGGTGAC AGCTTCCAAA ACACAGAGCT GGTGGTCTGG GAGGCGGGCA AAGCCGGCCT
1441 GGAGGAGTGT CTGGTGACTG AAGTACAGGT CGTGACAGAA ACTTGAGACT GGGTTTCAGG
1501 GCTTGTGGGG GTCTGCCTCA ATCTCCCTGG CCGGGCCAGG CGCCTGCACA GACTGGCTGC
1561 TGGACCTGCG CACGCAGCCC AGGAATGGAC ATTCCTAACG GGTGGTGGGC ATGGGAGATG
1621 CCTGTGTAAT TTGCTCCGAA GCTGCCAGGA AGAAGAACAG AACTTTGTGT GTTTATTICA
1681 TGATAAAGTG ATTTTTTTTT TTTTAACCCA AAA (SECV ID NR: 52)

```

5 Proteinele și secvențele de acid nucleic ale CD123/IL-3R α din alte specii neumane pot fi regăsite cu ușurință în baza de date publică, cum ar fi GenBank, folosind instrumente de căutare a secvențelor cunoscute în domeniu (cum ar fi NCBI BLASTp sau BLASTn) și respectiv secvențele de proteine și acid nucleic de mai sus ca secvențe de interogare.

10 Astfel de secvențe din speciile neumane pot fi aliniate cu secvențele umane utilizând oricare dintre multele instrumente de aliniere a secvențelor recunoscute în domeniu, cum ar fi cele descrise aici și mai sus, astfel încât orice resturi de aminoacizi sau nucleotidele "corespunzătoare" oricărei secvențe sau regiuni de secvențe umane date pot fi obținute cu ușurință.

15 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia: (a) leagă un epitop între aminoacizii 101 la 346 ai antigenului CD123 uman și (b) inhibă proliferarea dependentă de IL3 în celule TF-1 pozitive la antigen.

20 În unele modalități de realizare, un anticorp anti-CD123/IL-3R α sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se poate lega specific la un epitop cu SECV ID NR: 36. În anumite modalități de realizare, epitopul este într-o regiune corespunzătoare resturilor 101-346 de CD123/IL-3R α uman. În anumite modalități de realizare, epitopul este într-o regiune corespunzătoare resturilor 101-204 ale SECV ID NR: 36. În anumite alte modalități de realizare, epitopul este într-o regiune corespunzătoare resturilor 205-346 ale SECV ID NR: 36. În anumite modalități de realizare, epitopul nu este într-o regiune corespunzătoare resturilor 1-100 ale CD123/IL-3R α uman.

25 În anumite modalități de realizare, agenții de legare ai CD123/IL-3R α - (*de exemplu*, anticorpi) inhibă semnalizarea dependentă de IL3, cum ar fi proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 pozitive la CD123. Deși nu doresc să fie legați de nicio teorie anume, agenții de legare CD123/IL-3R α (*de exemplu*, anticorpi) din invenție se leagă de CD123, cum ar fi într-o regiune CD123 corespunzătoare resturilor 101-346 (*de exemplu*, resturi 101-204, sau 205-346) ale CD123/IL-3R α umane și previn, reduc, diminuează sau inhibă într-un alt mod legarea productivă între CD123 și ligandul IL-3 și/sau legarea productivă între CD123 și lanțul beta comun CD131, conducând la reducerea sau abolirea semnalizării dependente de IL-3.

35 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate: (a) lega un epitop în interiorul aminoacizilor 1 la 100 ai antigenului CD123 uman, și (b) inhiba proliferarea dependentă

de IL3 în celule TF-1 pozitive la antigen, cu o valoare IC_{50} de 0,1 nM sau mai mică (*de exemplu*, 0,08 nM, 0,05 nM, 0,03 nM).

5 În anumite modalități de realizare, legarea de către agenții de legare CD123/IL-3R α (*de exemplu*, anticorpi) conform invenției inhibă (*de exemplu*, inhibă preferențial) proliferarea celulelor stem leucemice (LSC-uri), progenitorilor leucemici (LP-uri), sau blastelor leucemice, dar nu inhibă substanțial proliferarea celulelor stem hematopoietice normale (HSC-uri).

10 Inhibarea proliferării celulare poate fi condusă utilizând orice analize standard cunoscute în domeniu, incluzând dar fără a se limita la citometrie în flux. De exemplu, HSC-urile normale, LSC-urile, LP-urile și blastele de leucemie pot fi separate folosind citometrie de flux pe baza diferenței de exprimare a markerilor de suprafață celulară, și numărul relativ al celulelor supraviețuitoare sau rămase, după incubarea cu agenții de testare, poate fi măsurat cantitativ și comparată.

15 Inhibarea proliferării celulare a LSC-urilor, LP-urilor sau blastele de leucemie în comparație cu HSC-urile normale poate fi, de asemenea, analizată utilizând analiza de eficacitate in vitro pe celulele canceroase primare, cum ar fi celulele AML primare. De exemplu, celulele AML (sau probe normale de măduvă osoasă umană care conțin HSC-uri normale) pot fi expuse timp de 24 de ore la diferite concentrații ale anticorpilor anti-CD123 în cauză, fragmente ale acestora care leagă antigenul, imuno-conjugați ai acestora sau polipeptidă care cuprinde anticorpi sau fragmente care leagă antigenul. Anticorpii care nu țintesc (potrivii cu izotipul) sau controlul imuno-conjugaților (ADC) pot fi, de asemenea, utilizați în analiză. Probele pot fi împărțite într-o analiză de cultură lichidă (STLC) pe termen scurt pentru a măsura citotoxicitatea față de LSC-uri, 20 LP-uri sau blaste de leucemie; și o analiză de cultură lichidă pe termen lung (LTLC) pentru a măsura efectul asupra LSC-urilor și HSC-urilor normale. STLC poate fi utilizat pentru măsurarea unităților care formează colonii 10-14 zile în celule, *de exemplu*, după depunerea pe placă în mediu semi-solid MethoCult H4230 (tehnologii Stemcell). Analizele LTLC pot fi efectuate similar cu adăugarea factorilor de creștere pentru cultura pe termen lung de 5-7 săptămâni. În ambele analize, 25 coloniile pot fi numărate pentru a se determina unitățile care formează colonii pe numărul de celule depuse inițial pe placă. Coloniile LTLC pot fi analizate în continuare în ceea ce privește prezența markerilor moleculari de cancer (*de exemplu*, AML) utilizând PCR sau FISH sau ambele.

35 În anumite modalități de realizare, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă la celule umane pozitive la antigenul CD123 cu o constantă de disociere (K_d) de 0,3 nM sau mai scăzută. În anumite modalități de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă la CD123 uman cu o K_d cuprinsă între 0,05 și 0,3 nM, sau între 0,05 și 0,2 nM, sau între 0,05 și 0,1 nM, sau între 0,01 nM și 0,3 nM, sau între 0,01 nM și 0,2 nM, sau 40 între 0,01 nM și 0,1 nM.

45 În anumite modalități de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă la CD123 de maimuță cynomolgus. În anumite modalități de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă la CD123 de maimuță cynomolgus cu o K_d cuprinsă între 0,05 și 0,3 nM, sau între 0,05 și 0,2 nM, sau între 0,05 și 0,1 nM.

50 În anumite modalități de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă la ambele CD123 uman și de maimuță cynomolgus cu o afinitatea de legare substanțial similară. În anumite modalități de realizare, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă la ambele CD123 uman și de maimuță cynomolgus cu o K_d cuprinsă între 0,05 și 0,3 nM, sau între 0,05 și 0,2 nM, sau între 0,05 și 0,1 nM.

55 În anumite modalități de realizare, valoarea K_d se bazează pe analiza de legare pe bază de celule. În anumite modalități de realizare, valoarea K_d este măsurată prin citometrie de flux. În anumite modalități de realizare, valoarea K_d este măsurată prin rezonanță plasmonică de suprafață (cum ar fi prin utilizarea sistemului de rezonanță plasmonică de suprafață BIOCORE™). În anumite modalități de realizare, valoarea K_d este măsurată prin analiză radioimunologică (RIA). În anumite modalități de realizare, K_d este măsurată prin orice alte metode recunoscute în domeniu.

60 În anumite modalități de realizare, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen al acestuia inhibă cel puțin 50% din proliferarea dependentă de IL3 în celule TF-1 pozitive la antigen la o concentrație de 0,5 nM sau mai scăzută.

- 5 Anticorpul CD123/IL-3R α ca agenți de legare ai CD123/IL-3R α sau fragmentele de legare la antigen ale acestora care cuprind o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR), cuprinzând fiecare trei CDR regiuni (CDR1-CDR3 pentru HCVR, și CDR1-CDR3 pentru LCVR), în care CDR-urile compozite pentru HCVR și LCVR sunt astfel cum au fost dezvoltate în primul aspect. Anticorpul CD123/IL-3R α sau fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind secvențele redată în Tabelele 1 și 2 de mai jos.

Tabelul 1 Secvențele de aminoacid ale regiunii variabile CDR a lanțului greu

Anticorp	Denumire Alt	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
CD123-3	CD123Mu-3	SYVMH (SECV ID NR:1)	YIKPYKDGTK (SECV ID NR:2)	EGENGYDAMDY (SECV ID NR:4)
			YIKPYKDGTKYNEKFKG (Kabat) (SECV ID NR:3)	
CD123-6	CD123Mu-6	SSIMH (SECV ID NR:5)	YIKPYNDGDK Murin + Grefat (SECV ID NR:6)	EGGNDYYDTMDY (SECV ID NR:11)
			YIRPYNDGTR (refăcut la suprafață versiune 1.0) (SECV ID NR:7)	
			YIKPYNDGDKYNEKFKG (Kabat Murin + Grefat) (SECV ID NR:8)	
			YIRPYNDGTRYNQKFQG (Kabat - refăcut la suprafață v1.0) (SECV ID NR:9)	
			YIKPYNDGDKYNQKFQ G (Kabat - refăcut la suprafață v1.1) (SECV ID NR:10)	
CD123-14	CD123Mu-14	NYAMS (SECV ID NR: 12)	TINSGGSFTY (SECV ID NR:13)	QSEAYYGDKRT (SECV ID NR:15) QSEAYYGDKRTW FAY (SECV ID NR:70)
			TINSGGSFTYYPDSVKG (Kabat) (SECV ID NR:14)	

10

Tabelul 2 Secvențele de aminoacid ale regiunii variabile CDR a lanțului ușor

Anticorp	Denumire Alt	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
CD123-3	CD123Mu-3	KASQDINKYIA (SECV ID NR:16)	YTSTLQP (SECV ID NR:17)	LQYDNLLYT (SECV ID NR:18)
CD123-6	CD123Mu-6	KASQDINSYLS (SECV ID NR:19)	RVNRLVD (SECV ID NR:21)	LQYDAFPYT (SECV ID NR:22)
		RASQDINSYLS Umanizat (SECV ID NR:20) RASQDINSYLA (SECV ID NR:72)	RVNRLVS (SECV ID NR:71)	
CD123-14	CD123Mu-14	RASQSVGTSIH (SECV ID NR:23)	YASESIS (SECV ID NR:24)	QQSKSWPLT (SECV ID NR:25)

Anticorp	Denumire Alt	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
			NR:24)	

În anumite modalități de realizare, anticorpul este un anticorp umanizat grefat la CDR care cuprinde regiuni CDR de șoarece, și în care una sau mai multe (*de exemplu*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, sau 8) resturi ale zonei vernier a regiunii cadru a lanțului greu și/sau a lanțului ușor a anticorpul este de origine de șoarece.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 1, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2 sau 3, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 4; și 2) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 16, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 17, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 18. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 2. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 3.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 5, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 6, 7, 8, 9, sau 10, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 11; și 2) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 19 sau 20, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 21, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 22. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 6, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 19. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 7, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 19. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 8, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 19. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 9, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 19. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 10, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 19. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 6, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 20. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 7, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 20. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 8, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 20. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 9, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 20. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 10, și CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor este SECV ID NR: 20. Pentru fiecare combinație de perechi dintr-o regiune variabilă a lanțului greu CDR2 cu o regiune variabilă a lanțului ușor CDR1 de mai sus, regiunea variabilă a lanțului greu CDR1 și 3 sunt SECV ID NR: 5 și respectiv 11, și regiunea variabilă a lanțului ușor CDR2 și 3 sunt SECV ID NR: 21 și respectiv 22.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 12, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 13 sau 14, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 15; și 2) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 23, o CDR2 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 24, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 25. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 13. În anumite modalități de realizare, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu este SECV ID NR: 14.

- 5 Toate combinațiile posibile pe baza SECV ID NR: 1-25 din Tabelul 1 corespunzătoare aceluiași număr de anticorpi (*de exemplu*, toate cele șase CDR-uri ale lanțului ușor și ale lanțului greu care provin de la CD123-3, sau de la CD123-6, sau de la CD123-14) sunt avute în vedere aici fără a enumera exhaustiv toate combinațiile specifice.

- 10 În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora au substituții de aminoacizi conservate peste 1, 2, sau 3 resturi consecutive în oricare una sau mai multe dintre secvențele de CDR de mai sus. Astfel, în unele modalități de realizare, anticorpii în cauză și fragmentele de legare la antigen ale acestora pot avea substituții de aminoacizi conservate peste 1, 2, sau 3 resturi consecutive, în oricare una sau mai multe dintre SECV ID NR: 1-25.

- 15 În anumite modalități de realizare, HCVR și LCVR fac parte din secvențele redată în Tabelele 3A și 4A de mai jos. Secvențele de acid nucleic corespunzătoare selectate care codifică HCVR și LCVR sunt redată în Tabelele 3B și 4B.

Tabelul 3A Secvențe de aminoacizi ale unei regiuni variabile a lanțului greu

Anticorp	Denumire Alt	Secvență de aminoacizi a VH (SECV ID NR)
CD123-3	CD123Mu-3	EFQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWMKQ KPGQGLEWIGYIKPYKDGTKYNEKFKGKATLISDKPSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCAREGENGYDAMDYWGQGTSTVTVSS (SECV ID NR: 26)
CD123-6	CD123Mu-6	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTSSIMHWMKQK PGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAN MELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SECV ID NR: 28)
CD123-14	CD123Mu-14	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQ NSEKRLEWVATINSGGSTFTYYPDSVKGRFTISRDNKDSLY LQMSSLNSEDAMYYCARQSEAYYGYDKRTWFAYWGQG TLVTVSS (SECV ID NR: 30)
huCD123-6Gv1		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYGFTSSIMHWVRQ APGQGLEWMGYIKPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTLVTVSS (SECV ID NR: 32)
huCD123-6Gv6/7		QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQA PGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAY MELSSLRSEDAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTLVTVSS (SECV ID NR: 34)
huCD123-6 Gv6/7-NTS2		SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQA PGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAY MELSSLRSEDAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTLVTVSS (SECV ID NR: 38)

Anticorp	Denumire Alt	Secvență de aminoacizi a VH (SECV ID NR)
huCD 123- 6rhv1.0		QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQ KPGQGLEWIGYIRPYNDGTRYNQKFQGKATLTSDRSSSTA NMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTV TVSS (SECV ID NR: 39)
huCD 123- 6rhv1.1		QFQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQ KPGQGLEWIGYIKPYNDGTKYNQKFQGKATLTSDKSSSTA NMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTV TVSS (SECV ID NR: 40)
* În toate secvențele de mai sus în care al 2 ^{-lea} rest de pe N-terminal este X (sau Xaa), <i>de exemplu</i> , SECV ID NR: 34 și 38, X este F pentru secvențele Gv6, în timp ce X este V pentru secvențele Gv7.		

Tabelul 3B Secvențe de acizi nucleici ale regiunii variabile a lanțului greu selectate

Anticorp	Secvență ADN a VH (SECV ID NR)
huCD123-6 V _H Gv1	AAGCTTGCCACCATGGGATGGTCCTGCATTATCCTGTTCTT TGTAGCAACTGCAACAGGAGTCCACAGCCAGGTCCAAGT GTGCAGTCCGGGGCCGAGGTGAAGAAACCAGGCGCATCCG TGAAGGTCAGCTGTAAAGCCAGCGGCTATGGTTTTACCAG CTCAATCATGCACTGGGTCAGGCAAGCCCCAGGACAGGGT CTCGAATGGATGGGATACATTAAGCCTTACAATGATGGTA CAAAATATAATGAAAAATTTAAGGGTCGTGTTACCATGAC AAGGGATACATCAACTAGCACTGTCTATATGGAAGTGAAGC TCTCTCAGGTCCGAGGATACTGCAGTATATTACTGCGCCCG GGAGGGAGGCAACGACTATTACGACACCATGGACTATTGG GGGCAGGGCACACTGGTTACTGTATCCAGCGCCTCTACTA AGGGCCC (SECV ID NR: 62)
huCD123-6 V _H Gv6	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTGTTCTT CGTTGCAACAGCAACTGGCGTGACAGCCAGTTCCAGCTT GTGCAGAGTGGCGCCGAAGTCAAGAAACCAGGCGCTAGTG TCAAGGTGTCCTGTAAAGGCATCAGGCTACATCTTTACCAGC TCCATCATGCATTGGGTCAGACAGGCTCCTGGACAGGGCC TGGAGTGGATTGGGTATATCAAGCCATACAATGATGGGAC AAAATACAATGAAAAGTTTAAAGGGCGAGCCACTCTGACA TCTGATCGGAGTACAAGCACTGCCTACATGGAATTGAGCT CACTGCGGTCCGAAGACACTGCTGTGTATTATTGCGCTCGG GAGGGAGGGAACGACTACTACGATACCATGGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTTACCGTCAGCAGCGCTTCCACTAA GGGCCC (SECV ID NR: 64)

Anticorp	Secvență ADN a VH (SECV ID NR)
huCD123-6 V _H Gv7	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTGTTCTT CGTTGCAACAGCAACTGGCGTGCACAGCCAGGTCCAATT GTGCAGAGTGGCGCCGAAGTCAAGAAACCAGGCGCTAGTG TCAAGGTGTCTGTAAAGGCATCAGGCTACATCTTTACCAGC TCCATCATGCATTGGGTCAGACAGGCTCCTGGACAGGGCC TGGAGTGGATTGGGTATATCAAGCCATACAATGATGGGAC AAAATACAATGAAAAGTTTAAAGGGCGAGCCACTCTGACA TCTGATCGGAGTACAAGCACTGCCTACATGGAATTGAGCT CACTGCGGTCCGAAGACACTGCTGTGTATTATTGCGCTCGG GAGGGAGGGAACGACTACTACGATACCATGGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTTACCGTCAGCAGCGCTTCCACTAA GGGCCC (SECV ID NR: 66)
huCD123-6 V _H rhv1.0	AAGCTTGCCACCATGGGGTGGAGCTGCATTATTCTGTTCTT GGTCGCCACCGCAACTGGCGTCCACTCTCAGGTCCAGCTC GTCCAGTCTGGGGCAGAAGTGGTCAAGCCCGGTGCATCTG TGAAATGTCTTGCAAAGCTAGCGGGTATACATTCACATCT AGTATCATGCATTGGATGAAACAGAAGCCTGGCCAGGGTC TGGAGTGGATAGGATATATCAGGCCTTACAACGATGGCAC TCGATACAACCAAAAGTTCCAGGGTAAAGCTACACTGACC TCAGACCGCTCAAGCAGTACAGCAAACATGGAAGTGAACA GTCTTACCTCTGAGGACAGTGCCGTTTACTATTGCGCCAGG GAGGGTGGCAATGACTACTATGATACTATGGACTACTGGG GACAGGGTACCTCTGTAACAGTTTCAAGCGCCAGCACTAA GGGCCC (SECV ID NR: 68)
huCD123-6 V _H rhv1.1	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCTTGTATTATTCTGTTTCT GGTGGCCACCGCAACAGGCGTTCACAGTCAATTCCAGCTG GTCCAGTCCGGCGCCGAGGTTGTCAAACCTGGTGCCAGCG TAAAGATGTCTTGCAAAGCTAGCGGCTATACTTTCACTTCT TCAATTATGCACTGGATGAAGCAAAAGCCTGGACAGGGCC TGGAATGGATCGGCTACATTAAACCTTATAACGACGGCAC AAAGTACAATCAGAAGTTCCAAGGAAAGGCAACCCTGACC TCAGACAAGTCTTCATCCACTGCCAACATGGAAGTTAATAG TCTTACCTCTGAGGATTCCGCTGTCTATTATTGCGCTCGGG AGGGGGGGAACGACTATTACGACACCATGGACTACTGGGG ACAGGGCACCAAGTGTACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAG GGCCC (SECV ID NR: 69)
* Bazele cu caractere aldine marchează primul codon al secvenței de aminoacizi a regiunii variabile mature	

Tabelul 4A Secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului ușor

Anticorp	Denumire Alt	Secvență de aminoacizi a VL (SECV ID NR)
CD123-3		DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPG KGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIAT YYCLQYDNLLYTFGGGTKLELKR (SECV ID NR: 27)

Anticorp	Denumire e Alt	Secvență de aminoacizi a VL (SECV ID NR)
CD123-6		DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYED MGIYYCLQYDAFPYTFGGGKLEIKR (SECV ID NR: 29)
CD123-14		DILLTQSPAILSVSPGTRVSFSCRASQSVGTSIHWHYQQRPNP FPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLNINSVESEDIADY YCQQSKSWPLTFGAGTKLELKR (SECV ID NR: 31)
huCD123-6Gv1		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLAWFQQKPG KAPKSLIYRVNRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQYDAFPYTFGQGKVEIKR (SECV ID NR: 33)
huCD123-6Gv4		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPG KAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISLQPEDF ATYYCLQYDAFPYTFGQGKVEIKR (SECV ID NR: 35)
huCD123-6Gv4-NTS3		SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPG KAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISLQPEDF ATYYCLQYDAFPYTFGQGKVEIKR (SECV ID NR: 37)
huCD123-6rlv1.0		DIQMTQSPSSMSASVGERVTITCRASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEPEDM GIYYCLQYDAFPYTFGQGKLEIKR (SECV ID NR: 41)

Tabelul 4B Secvențe de acizi nucleici ale regiunii variabile a lanțului ușor selectate

Anticorp	Denumire e Alt	Secvență de ADN a VL (SECV ID NR)
huCD123-6V ₁ Gv1		GAATTCGCCACCATGGGTGTTGTATAATCCTGTTCC TGGTCGCTACCGCAACAGGGGTTCACTCAGACATCCAGA TGACCCAGAGTCCCTCTTCTCTGAGCGCTTCTGTTGGGG ACCGGGTGACCATCACCTGTCGGGCATCCAGGACATCA ATTCTTACCTGGCTTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGAAAAG CCCCTAAATCTCTCATTTACCGGGTAAACCGTTTGGTCTC CGGAGTGCCTTCAAGGTTTAGTGGATCTGGATCAGGTAC AGACTTCACTCTCACCATAAGCAGCCTGCAACCAGAGGA TTTCGCAACTTACTACTGCTTGCAGTATGACGCCTTCCCT TACACTTTCGGGCAGGGGACCAAAGTGGAATAAAGCG TACG (SECV ID NR: 63)

Anticorp	Denumire e Alt	Secvență de ADN a VL (SECV ID NR)
huCD123-6 V _L Gv4		GAATTCGCCACCATGGGTGGTCTGTATCATCTCTTTCT TGGTGGCAACTGCAACCGGCGTCCATAGCGACATTCAG ATGACACAGTCTCCTTCTTCCCTGAGCGCCAGCGTCGGG GACCGCGTGACTATCACATGTCGGGCCTCCCAGGACATT AACTCTTACCTCTCCTGGTTCAGCAGAAGCCTGGGAAA GCCCCAAAGACACTGATATACAGGGTAAATCGTTTGGTT GACGGTGTACCATCACGATTTTCCGGTAGTGGGTCTGGA AACGATTACACTCTCACAATTAGCAGCCTGCAACCAGAG GACTTTGCAACATACTATTGCCTGCAGTACGATGCTTTTC CTTATACCTTCGGTCAGGGTACCAAGGTGGAAATTAAAC GTACG (SECV ID NR: 65)
huCD123-6V _L (refăcut la suprafață)		GAATTCGCCACCATGGGTGGTCTGTATTATCCTGTTTC TGGTTGCAACCGCAACAGGAGTACACTCTGATATCCAGA TGACTCAGTCTCCCTCTTCTATGTCTGCTTCTGTGGGAGA GAGAGTCACCATCACCTGTCGCGCTTCCCAAGATATTAA TAGCTATCTGTCTTGGTTCCAACAGAAACCTGGCAAATC ACCCAAGACTCTGATTTATCGGGTTAACCGCCTGGTGGGA CGGTGTGCCTTCACGCTTCTCCGGCAGCGGTAGTGGACA AGACTATAGCCTGACAATTTCTTCTCTTGAACCCGAGGA CATGGGAATCTACTATTGCTTGCAGTATGACGCTTTTCCT TATACATTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAACG TACG (SECV ID NR: 67)
* Bazele cu caractere aldine marchează primul codon al secvenței de aminoacizi a regiunii variabile mature.		

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H cel puțin 95% identică cu o secvență V_H de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L cel puțin 95% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H cel puțin 96% identică cu o secvență V_H de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L cel puțin 96% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H cel puțin 97% identică cu o secvență V_H de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L cel puțin 97% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H cel puțin 98% identică cu o secvență V_H de

referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L cel puțin 98% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123 și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H cel puțin 99% identică cu o secvență V_H de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L cel puțin 99% identică cu o secvență V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii CD123/IL-3R α / fragmentul de legare la antigen al acestuia având un anumit procentaj de identitate cu SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (preferabil SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38) și/sau 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37) diferă de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38) și/sau 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37) numai prin substituții conservative ale aminoacizilor, cum ar fi 1, 2, sau 3 substituții conservative de aminoacizi. În anumite modalități de realizare, substituțiile conservative de aminoacizi sunt substituții de 1, 2 sau 3 aminoacizi consecutivi într-una sau mai multe regiuni CDR ale lanțurilor grele și/sau ușoare.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: (a) o secvență de V_H identică cu o secvență de V_H de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, 38, 39, și 40 (sau SECV ID NR: 26, 28, 30, 32, 34, și 38); și/sau (b) o secvență de V_L identică cu o secvență de V_L de referință selectată din grupul având secvențele de aminoacizi reprezentate de SECV ID NR: 27, 29, 31, 33, 35, 37, și 41 (sau SECV ID NR: 27, 29, 31, 35, și 37).

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: o secvență de V_H astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 26, și/sau o secvență de V_L astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 27.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: o secvență de V_H astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 28, și/sau o secvență de V_L astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 29.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: o secvență de V_H astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 30, și/sau o secvență de V_L astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 31.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: o secvență de V_H astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 34, și/sau o secvență de V_L astfel cum este stabilită în SECV ID NR: 35.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind o secvență de V_H și o secvență de V_L cu o combinație de SECV ID NR. selectate din grupul care constă din: 32/33, 34/33, 38/33, 39/33, 40/33, 32/35, 34/35, 38/35, 39/35, 40/35, 32/37, 34/37, 38/37, 39/37, 40/37, 39/33, 39/35, 39/37, 39/41, 40/33, 40/35, 40/37, și 40/41.

De exemplu, într-o modalitate de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 39 sau 40; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41. În anumite modalități de realizare, secvența de V_H este stabilită în SECV ID NR: 39, și secvența de V_L este stabilită în SECV ID NR: 41. În anumite modalități de realizare, secvența de V_H este stabilită în SECV ID NR: 40, și secvența de V_L este stabilită în SECV ID NR: 41.

Intr-o modalitate de realizare înrudită, anticorpii anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină

având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 34 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 34 este Val (V).

5

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 39 sau 40, cu excepția faptului că primul rest este înlocuit de Ser (S); și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41.

10

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 39 sau 40; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41, cu excepția faptului că primul rest este înlocuit de Ser (S).

15

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser, și cu excepția faptului că restul corespunzător celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41.

20

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul corespunzător celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41, cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser.

25

30

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 38; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 38 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 38 este Val (V).

35

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 34 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 34 este Val (V).

40

45

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 56; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 56 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 56 este Val (V).

50

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Val (V).

55

Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3R α și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 59 sau 60, cu excepția faptului că restul corespunzător celui

60

de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 este Cys; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41.

5 Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3Rα și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Val (V).

10

15 Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3Rα și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 56; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 56 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 56 este Val (V).

20 Intr-o altă modalitate de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3Rα și fragmentele de legare la antigen ale acestora cuprind: a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și, b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37. În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Phe (F). În anumite modalități de realizare, Xaa din SECV ID NR: 54 este Val (V).

25 În anumite modalități de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3Rα și fragmentele de legare la antigen ale acestora se leagă specific la CD123/IL-3Rα. În anumite modalități de realizare, anticorpul CD123/IL-3Rα sau fragmentul de legare la antigen al acestuia este un anticorp murin, himeric, umanizat, sau uman sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care se leagă specific la CD123/IL-3Rα. În anumite modalități de realizare, anticorpul umanizat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia este un anticorp grefat la CDR sau refăcut la suprafață sau fragment de legare la antigen al acestuia.

30 În anumite modalități de realizare, anticorpul anti-CD123/IL-3Rα sunt anticorpi cu lungime completă. Anticorpul cu lungime completă pot cuprinde oricare dintre anticorpii definiți mai sus de secvențele 1-6 ale CDR (CDR1-CDR3 ale lanțurilor greu sau ușor), sau oricare dintre anticorpii definiți mai sus de LCVR și/sau HCVR, sau oricare dintre anticorpii cu lungime completă având o secvență a lanțului greu din Tabelul 5, sau oricare dintre anticorpii cu lungime completă având o secvență a lanțului ușor din Tabelul 6, sau oricare dintre anticorpii cu lungime completă având o secvență a lanțului greu din Tabelul 5 și o secvență a lanțului ușor din Tabelul 6.

40

Tabelul 5 Secvențele de aminoacizi ale lanțului greu cu lungime completă

Anticorp	Secvența de aminoacizi a lanțului greu cu lungime completă (SECV ID NR)
CD123-3	EFQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWMKQKPGQGLEWIGY IKPYKDGTKYNEKFKGKATLISDKPSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREGEN GYYDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTPSSPRPSETVTCNVA HPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCV VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SECV ID NR: 42)
CD123-6	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYIK PYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGND YYDTMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYF PEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTPSSMRPSETVTCNVAH PASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCV VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN
	GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCM ITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SECV ID NR: 44)
CD123-14	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQNSEKRLEWVATI NSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNADSLYLQMSSLNSEDAMYYCARQSEAY YGYDKRTWFAYWGQGT LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV KGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTPSSPRPSETVTCN VAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SECV ID NR: 46)
huCD123-6Gv1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYGFTSSIMHWVRQAPGQGLEWMGY IKPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGG NDYYDTMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 48)
huCD123-6Gv6/7	QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIK PYNDGTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGND YYDTMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 50)

huCD123-6 Gv6/7- NTS2 (sau "S2")	SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIK PYNDGTKYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGND YYDTMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 53)
huCD123-6 Gv6/7- CysMab	QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIK PYNDGTKYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGND YYDTMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 54)
huCD123-6 Gv6/7S2- CysMab	SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIK PYNDGTKYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGND YYDTMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 56)
huCD123- 6rhv1.0	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYI RPNYNDGTRYNQKFQGKATLTSDRSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGN DYDDTMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 59)
huCD123- 6rhv1.1	QFQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYI KPYNDGTKYNQKFQGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGN DYDDTMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SECV ID NR: 60)
* In toate secvențele de mai sus în care al 2 ^{-lea} rest de pe N-terminal este X (sau Xaa), de exemplu, SECV ID NR: 50, 53, 54, și 56, X este F pentru secvențele Gv6, în timp ce X este V pentru secvențele Gv7. În unele modalități de realizare, Met (aldin) în SECV ID NR:44 este Pro.	

Tabelul 6 Secvențele de aminoacizi ale lanțului ușor cu lungime completă

	Secvența de aminoacizi a lanțului ușor cu lungime completă (SECV ID N
	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTS TLQPGIPSRFSGSGSGRDYDFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGKLE LKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC (SECV ID NR: 43)
	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRVN RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDAFPYTFGGGK LEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNEC (SECV ID NR: 45)
	DILLTQSPAILSVSPGTRVSFSCRASQSVGTSIHWYQQRPNFGPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGDFTLNINSVESEDIADYYCQQSKSWPLTFGAGTKLEL KRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC (SECV ID NR: 47)
√1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINSYLAWFQKPGKAPKSLIYRVN RLVSGVPSRFSGSGSGDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGKTV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SECV ID NR: 49)
√4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRVN RLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SECV ID NR: 51)
(sau "S3")	SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRVN RLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SECV ID NR: 58)
1.0	DIQMTQSPSSMSASVGERVTITCRASQDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRVN RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEPEDMGIYYCLQYDAFPYTFGQGK EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SECV ID NR: 61)

In anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α sunt anticorpi cu lungime completă care cuprinde: (a) un lanț greu având cel puțin aproximativ 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identitate a secvenței cu oricare dintre secvențele lanțului greu cu lungime completă de mai sus, cum ar fi oricare dintre secvențele lanțului greu cu lungime completă din Tabelul 5; și/sau (b) un lanț ușor având cel puțin aproximativ 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identitate a secvenței cu oricare dintre secvențele lanțului ușor cu lungime completă de mai sus, cum ar fi oricare dintre secvențele lanțului ușor cu lungime completă din Tabelul 6. În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α sunt anticorpi cu lungime completă care cuprind o combinație între o secvență a lanțului greu cu lungime completă și o secvență a lanțului ușor cu lungime completă selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 42/43, 44/45, 46/47, 48/49, 50/49, 53/49, 54/49, 56/49, 59/49, 60/49, 48/51, 50/51, 53/51, 54/51, 56/51, 59/51, 60/51, 48/58, 50/58, 53/58, 54/58, 56/58, 59/58, 60/58, 59/49, 59/51, 59/58, 59/61, 60/49, 60/51, 60/58, și 60/61, sau anticorpi cu cel puțin aproximativ 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identitate a secvenței cu oricare dintre secvențele lanțului greu cu lungime completă și/sau secvențele lanțului ușor ale acestora.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α sunt anticorpi cu lungime completă care cuprind o combinație între o secvență a lanțului greu cu lungime completă și o secvență a lanțului ușor cu lungime completă selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 59/61, și 60/61, sau anticorpi cu cel puțin aproximativ 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identitate a secvenței cu oricare dintre secvențele lanțului greu cu lungime completă și/sau secvențele lanțului ușor ale acestora. Astfel de anticorpi pot cuprinde suplimentar Ser/Thr cu N-terminal modificat în lanțul ușor, lanțul greu sau ambele. Astfel de anticorpi pot cuprinde în plus Cys modificat în domeniul de CH3 al lanțului greu într-o poziție corespunzătoare de la cel de-al 5^{lea} până la ultimul Cys al SECV ID NR: 54.

În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α este un anticorp murin, himeric, umanizat, sau uman care se leagă specific la CD123/IL-3R α . În anumite modalități de realizare, anticorpii anti-CD123/IL-3R α având un anumit procentaj de identitate cu oricare dintre SECV ID NR cu lungime completă diferă de astfel de SECV ID NR numai prin substituții conservative ale aminoacizilor, *de exemplu*, prin 1, 2, 3, 4, sau 5 substituții conservative consecutive numai ale aminoacizilor. În anumite modalități de realizare, substituțiile conservative de aminoacizi sunt în afara CDR-urilor.

În anumite modalități de realizare, fragmentul de legare la antigen al acestuia este sau cuprinde un Fab, Fd, Fab', F(ab')₂, Fv sau scFv cu un singur lanț, Fv legat printr-un linker de disulfură, domeniu V-NAR, IgNar, intracorp, IgG Δ CH2, minicorp, F(ab')₃, tetracorp, triacorp, diacorp, anticorp cu un singur domeniu, DVD-Ig, Fcab, mAb2, (scFv)₂, sau scFv-Fc, al oricăruia dintre anticorpii de mai sus.

Intr-un al doilea aspect, invenția redă de asemenea o polipeptidă care cuprinde oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora, oricare dintre secvențele de V_H și/sau V_L de mai sus, oricare dintre HCVR și/sau LCVR de mai sus sau oricare dintre secvențele de CDR ale HCVR și/sau LCVR de mai sus. Polipeptida poate fi, de exemplu, o fuziune cu o proteină sau un domeniu non-anticorp. În anumite modalități de realizare, proteina de fuziune nu este o fuziune cu o toxină pseudomonas.

Afinitatea sau aviditatea unui anticorp pentru un antigen pot fi determinate experimental folosind orice metodă adecvată bine cunoscută în domeniu, *de exemplu*, citometrie de flux, analiză de imunoabsorbent legat de enzime (ELISA) sau analiză radioimunologică (RIA), sau cinetice (*de exemplu*, analiza BIACORE™). Pot fi utilizate cu ușurință analize de legare directă, precum și formate de analize de legare competitivă. Vezi, de exemplu, Berzofsky și colab., "Anticorp-Antigen Interactions," in Fundamental Immunology, Paul, W. E, Ed, Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman și Company: New York, N.Y. (1992); și metodele descrise aici.

Afinitatea măsurată a unei interacțiuni anticorp-antigen particulare poate varia dacă este măsurată în condiții diferite (*de exemplu*, concentrație de sare, pH, temperatură). Astfel, măsurătorile de afinitate și alți parametri de legare a antigenului (*de exemplu*, K_d sau K_a, k_{on}, k_{off}) se efectuează cu soluții standardizate de anticorp și antigen și un tampon standardizat, astfel cum este cunoscut în domeniu și, cum ar fi un tampon descris aici.

Analizele de legare pot fi efectuate folosind citometrie de flux pe celule care exprimă la suprafață antigenul CD123/IL-3R α . De exemplu, Celulele pozitive la CD123/IL-3R α pot fi incubate cu diferite concentrații de anticorpi anti-CD123/IL-3R α folosind 1×10^5 celule pe probă în 100 μ L tampon FACS (*de exemplu*, mediu RPMI-1640 suplimentat cu 2% ser normal de capră). Apoi, celulele pot fi peletizate, spălate și incubate timp de 1 oră cu 100 μ L de anticorp IgG capră anti-șoarece sau capră anti uman conjugat FITC (cum ar fi cel care poate fi obținut, de exemplu, de la Jackson Laboratory, 6 μ g/mL în tampon FACS). Celulele pot fi apoi peletizate din nou, spălate cu tampon FACS și resuspendate în 200 μ L de PBS conținând 1% formaldehidă. Probele au fost obținute, de exemplu, utilizând un citometru de flux FACSCalibur cu ajutorul dispozitivului de prelevare a probelor HTS cu multiple godeuri și analizate utilizând CellQuest Pro (toate de la BD Biosciences, San Diego, US). Pentru fiecare probă, intensitatea medie a fluorescenței pentru FL1 (MFI) poate fi exportată și reprezentată grafic în raport cu concentrația de anticorp printr-o reprezentare grafică semi-log pentru a genera o curbă de legare. O curbă sigmoidală doză-răspuns este potrivită pentru curbele de legare, și valorile EC₅₀ sunt calculate utilizând programe cum ar fi GraphPad Prism v4 cu parametri implicați (GraphPad software, San Diego, CA). Valorile EC₅₀ pot fi utilizate ca măsură pentru constanta de disociere aparentă "K_d" sau "K_D" pentru fiecare anticorp.

Anticorpii monoclonali pot fi preparați folosind metode de hibridom, precum cele descrise de Kohler și Milstein (1975) Nature 256:495. Folosind metoda hibridomului, un șoarece, hamster sau alt animal gazdă adecvat este imunizat pentru a determina producerea de către limfocite a anticorpilor care se vor lega specific de un antigen imunizant. Limfocitele pot fi, de asemenea, imunizate *in vitro*. După imunizare, limfocitele sunt izolate și fuzionate cu o linie celulară de mielom adecvată folosind, de exemplu, polietilenglicol, pentru a forma celule hibridom care pot fi apoi selectate departe de limfocite și celule de mielom nefuzionate. Hibridomii care produc anticorpi monoclonali direcționați specific împotriva unui antigen ales astfel cum este determinat prin imunoprecipitare, imunobloting, sau printr-o analiză de legare *in vitro* (*de exemplu*, analiză radioimunologică (RIA); analiza de imunosorbent legat de enzimă (ELISA)) pot fi apoi propagate fie prin cultură *in vitro* utilizând metode standard (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) fie *in vivo* ca tumori de ascită la un animal. Anticorpii monoclonali pot fi apoi purificați din mediul de cultură sau fluidul de ascită astfel cum este descris pentru anticorpii policlonali.

Alternativ anticorpii monoclonali pot fi de asemenea obținuți utilizând metode de ADN recombinant astfel cum este descris în Brevetul U.S. 4.816.567. Polinucleotidele care codifică un anticorp monoclonal sunt izolate din celule B mature sau celule hibridom, cum ar fi prin RT-PCR folosind primeri oligonucleotidici care amplifică specific genele care codifică lanțurile grele și ușoare ale anticorpului, și secvența lor este determinată prin utilizarea unor proceduri convenționale. Polinucleotidele izolate care codifică lanțurile grele și ușoare sunt apoi clonate în vectori de exprimare adecvați, care atunci când sunt transfectați în celule gazdă, cum ar fi celulele de *E. coli*, celulele COS simian, celulele de ovar de hamster chinezesc (CHO) sau celulele de mielom care altfel nu produc proteina imunoglobulină, sunt generați de celulele gazdă anticorpi monoclonali. De asemenea, anticorpii monoclonali recombinanți sau fragmente ale acestora din speciile dorite pot fi izolați din bibliotecile de afișare a fagilor care exprimă CDR-urile speciei dorite astfel cum este descris de (McCafferty și colab., Nature 348:552-554, 1990; Clackson și colab., Nature, 352:624-628, 1991; și Marks și colab., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

Polinucleotida(ele) care codifică un anticorp monoclonal pot fi modificate în mai multe moduri diferite folosind tehnologia de ADN recombinant pentru a genera anticorpi alternativi. În unele modalități de realizare, domeniile constante ale lanțurilor ușoare și grele ale, de exemplu, un anticorp monoclonal de șoarece pot fi substituite 1) de exemplu, cu acele regiuni ale, unui anticorp uman pentru a genera un anticorp himeric sau, 2) cu o polipeptidă neimunoglobulină pentru a genera un anticorp de fuziune. În unele modalități de realizare, regiunile constante sunt trunchiate sau îndepărtate pentru a genera fragmentul de anticorp dorit al unui anticorp monoclonal. Mutageneza direcționată la situs sau cu densitate ridicată a regiunii variabile poate fi utilizată pentru a optimiza specificitatea, afinitatea *etc.* a unui anticorp monoclonal

În unele modalități de realizare, anticorpii monoclonali împotriva CD123/IL-3R α uman este un anticorp umanizat. Astfel de anticorpi pot fi utilizați terapeutic pentru a reduce răspunsurile de antigenicitate și HAMA (anticorp uman anti-șoarece) atunci când sunt administrați unui subiect uman.

Metode de modificare, umanizare sau refacere la suprafață a anticorpilor neumani sau umani pot fi de asemenea utilizate și sunt bine cunoscute în domeniu. Un anticorp umanizat, refăcut la suprafață sau modificat similar poate avea unul sau mai multe resturi de aminoacizi dintr-o sursă care nu este umană, de exemplu, dar fără a se limita la, șoarece, șobolan, iepure, primată neumană sau alt mamifer. Aceste resturi de aminoacizi neumane sunt înlocuite cu resturi care sunt adesea denumite resturi de "import", care sunt luate tipic dintr-o variabilă, constantă sau alt domeniu de "import" al unei secvențe umane cunoscute.

Astfel de secvențe importate pot fi utilizate pentru a reduce imunogenitatea sau a reduce, îmbunătăți sau modifica legarea, afinitatea, on-rate, off-rate, aviditatea, specificitatea, timpul de înjumătățire, sau orice altă caracteristică adecvată, astfel cum este cunoscut în domeniu. În general, resturile CDR sunt direct și cel mai substanțial implicate în influențarea legării CD123/IL-3R α . În consecință, o parte sau toate secvențele de CDR neumane sau umane sunt menținute în timp ce secvențele neumane ale regiunilor variabile și constante pot fi înlocuite cu aminoacizi umani sau de alt fel.

Anticorpii pot fi, de asemenea, opțional umanizați, refăcuți la suprafață, modificați sau anticorpi umani modificați cu reținerea unei afinități ridicate pentru antigenul de CD123/IL-3R α și a altor proprietăți biologice favorabile. Pentru a atinge acest obiectiv, anticorpii anti-CD123/IL-3R α umanizați (sau umani) sau modificați și cei refăcuți la suprafață pot fi preparați opțional printr-un procedeu de analiză a secvențelor parentale și a diverselor produse conceptuale umanizate și modificate utilizând modele tridimensionale ale secvențelor parentale, modificate și umanizate. Modelele tridimensionale de imunoglobulină sunt disponibile în mod obișnuit și sunt familiare celor calificați în domeniu. Sunt disponibile programe pentru computer care ilustrează și afișează structuri conformaționale tridimensionale probabile ale secvențelor candidate selectate de imunoglobulină. Inspectia acestor afișaje permite analiza rolului probabil al resturilor în funcționarea secvenței de imunoglobulină candidată, *adică* analiza resturilor care influențează capacitatea imunoglobulinei candidate de a-și lega antigenul, cum ar fi CD123/IL-3R α . În acest fel, resturile cadru (FR) pot fi selectate și combinate din secvențele consens și import, astfel încât să se realizeze caracteristica dorită a anticorpului, cum ar fi afinitatea crescută pentru antigenul(ii) țintă.

Umanizarea, refacerea la suprafață sau modificarea anticorpilor din prezenta invenție se poate efectua utilizând orice metodă cunoscută, cum ar fi dar fără a se limita la cele descrise în, Winter (Jones și colab., Nature 321:522, 1986; Riechmann și colab., Nature 332:323, 1988; Verhoeyen și colab., Science 239:1534, 1988, Sims și colab., J. Immunol. 151:2296, 1993; Chothia și Lesk, J. Mol. Biol. 196:901, 1987, Carter și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285, 1992; Presta și colab., J. Immunol. 151:2623, 1993; Raguska și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(3):969-973, 1994; Brev. U.S. nr. 5.639.641, 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567; PCT/: US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP229246; 7.557.189; 7.538.195; și 7.342.110.

in anumite modalități de realizare alternative, anticorpul împotriva CD123/IL-3R α este un anticorp uman. Anticorpi umani pot fi preparați direct utilizând diferite tehnici cunoscute în domeniu. Pot fi generați de limfocite B umane imortalizate imunizate *in vitro* sau izolați de la un individ imunizat care produce un anticorp direcționat împotriva unui antigen țintă (a se vedea, *de exemplu*, Cole și colab., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer și colab., 1991, J. Immunol, 147(1):86-95; și Brevetul U.S. 5.750.373). De asemenea, anticorpul uman poate fi selectat dintr-o bibliotecă de fagi, unde acea bibliotecă de fagi exprimă anticorpi umani, astfel cum este descris, de exemplu, în Vaughan și colab., Nat. Biotech. 14:309-314, 1996, Sheets și colab., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 95:6157-6162, 1998, Hoogenboom și Winter, J. Mol. Biol. 227:381, 1991, și Marks și colab., J. Mol. Biol. 222:581, 1991). Tehnicile pentru generarea și utilizarea bibliotecilor de fagi pentru anticorpi sunt, de asemenea, descrise în Brevetele U.S. nr. 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; și 7.264.963; și Rothe și colab., J. Mol. Bio. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018, 2007. Strategiile de maturare a afinității și strategiile de amestecare a

lanțului (Marks și colab., Bio/Technology 10:779-783, 1992) sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate pentru a genera anticorpi umani cu afinitate ridicată.

Anticorpul umanizat pot fi de asemenea produși la șoareci transgenici care conțin loci de imunoglobulină umană care sunt capabili la imunizare să producă repertoriul complet de anticorpi umani în absența producției de imunoglobulină endogenă. Această abordare este descrisă în Brevetele U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; și 5.661.016.

În anumite modalități de realizare sunt redată un fragment de anticorp împotriva, de exemplu, creșterii penetrării tumorii. Sunt cunoscute diverse tehnici pentru producerea fragmentelor de anticorpi. Tradițional, aceste fragmente sunt derivate prin digestia proteolitică a anticorpilor intacti (de exemplu Morimoto și colab., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117, 1993; Brennan și colab., Science 229:81, 1985). În anumite modalități de realizare, fragmentele de anticorp sunt produse recombinant. Fragmentele de anticorp Fab, Fv, și scFv pot fi toate exprimate și secretate din *E. coli* sau din alte celule gazdă, permițând astfel producerea unor cantități mari din aceste fragmente. Astfel de fragmente de anticorpi pot fi, de asemenea, izolate din bibliotecile de fagi de anticorpi. Fragmentul de anticorpul poate fi de asemenea din anticorpi liniari astfel cum este descris în Brevetul U.S. 5.641.870, de exemplu, și poate fi monospecific sau bispecific. Alte tehnici pentru producerea fragmentelor de anticorpi vor fi evidente unui specialist calificat.

În scopul prezentei invenții, ar trebui apreciat faptul că anticorpul modificat pot cuprinde orice tip de regiune variabilă care asigură asocierea anticorpului cu polipeptidele unui CD123/IL-3R α uman. În această privință, regiunea variabilă poate cuprinde sau poate fi derivată de la orice tip de mamifer care poate fi indus să monteze un răspuns umoral și să genereze imunoglobuline dorite împotriva antigenului asociat tumorii. Ca atare, regiunea variabilă a anticorpilor modificați poate fi, de exemplu, de origine umană, murină, primată neumană (*de exemplu*, maimuțe cynomolgus, macaci etc.) sau lupină. În unele modalități de realizare atât regiunile variabile, cât și cele constante ale imunoglobulinelor modificate sunt umane. În alte modalități de realizare variabile ale anticorpilor compatibili (uzual derivați dintr-o sursă non-umană) pot fi modificate sau adaptate specific pentru a îmbunătăți proprietățile de legare sau pentru a reduce imunogenicitatea moleculei. În această privință, regiunile variabile utile în prezenta invenție pot fi umanizate sau modificate altfel prin includerea unor secvențe de aminoacizi importate.

Domeniile variabile atât în lanțurile grele, cât și în cele ușoare pot fi modificate prin înlocuirea cel puțin parțială a uneia sau mai multor CDR-uri și, dacă este necesar, prin înlocuirea parțială a regiunii de cadru și schimbarea secvenței. Deși CDR-urile pot fi derivate dintr-un anticorp din aceeași clasă sau chiar subclasă ca anticorpul din care sunt derivate regiunile de cadru, se preconizează că CDR-urile vor fi derivate dintr-un anticorp dintr-o clasă diferită și în anumite modalități de realizare dintr-un anticorp dintr-o specie diferită. Este posibil să nu fie necesar să se înlocuiască toate CDR-urile cu CDR-urile complete de la regiunea variabilă a donorului pentru a transfera capacitatea de legare la antigen a unui domeniu variabil la altul. Mai degrabă, poate fi necesar să fie transferate acele resturi care sunt necesare pentru a menține activitatea situsului de legare a antigenului. Date fiind explicațiile stabilite în Brev. U.S. nr. 5.585.089, 5.693.761 și 5.693.762, va fi de competența celor de specialitate în domeniu, fie să efectueze experimentări de rutină sau studii și testare a erorilor pentru a obține un anticorp funcțional cu imunogenicitate redusă.

Indiferent de modificările aduse regiunii variabile, cei de specialitate în domeniu vor aprecia că anticorpul modificat conform acestei invenții vor cuprinde anticorpi (de exemplu, anticorpi de lungime completă sau fragmente imunoreactive ale acestora) în care cel puțin o fracțiune a unuia sau mai multor domenii ale regiunii constante a fost ștearsă sau modificată în alt fel, astfel încât să se asigure caracteristicile biochimice dorite, cum ar fi localizarea crescută a tumorii sau timpul de înjumătățire serică redus în comparație cu un anticorp cu aproximativ aceeași imunogenitate care cuprinde o regiune constantă nativă sau nemodificată. În unele modalități de realizare, regiunea constantă a anticorpilor modificați va cuprinde o regiune constantă umană. Modificările regiunii constante compatibile cu această invenție cuprind adății, deleții sau substituții ale unuia sau mai multor aminoacizi într-unul sau mai multe domenii. Adică, anticorpul modificat dezvăluit aici pot cuprinde alterări sau modificări la unul sau mai multe dintre cele trei domenii constante ale lanțului greu (CH1, CH2 sau CH3) și/sau la domeniul constant al lanțului ușor (CL). În unele modalități de realizare, sunt avute în vedere regiuni

constante modificate în care unul sau mai multe domenii sunt parțial sau în întregime deletate. În unele modalități de realizare, anticorpii modificați vor cuprinde construcții sau variante deletate de domeniu în care întregul domeniu CH2 a fost înlăturat (construcții ACH2). În unele modalități de realizare, domeniul regiunii constante omise va fi înlocuit cu un distanțier scurt de aminoacizi (*de exemplu*, 10 resturi) care asigură o anumită flexibilitate moleculară conferită tipic de regiunea constantă absentă.

ste de notat, că în anumite modalități de realizare, anticorpii modificați pot fi concepuți pentru a fuziona cu domeniul CH3 direct la regiunea de balama a respectivelor anticorpi modificați. În alți construcții poate fi de dorit să se asigure un distanțier peptidic între regiunea balama și domeniile CH2 și/sau CH3 modificate. De exemplu, ar putea fi exprimați construcții compatibili în care domeniul CH2 a fost deletat, și domeniul CH3 rămas (modificat sau nemodificat) este unit la regiunea de balama cu un distanțier de 5-20 aminoacizi. Un astfel de distanțier poate fi adăugat, de exemplu, pentru a se asigura că elementele de reglare ale domeniului constant rămân libere și accesibile sau că regiunea articulației rămâne flexibilă. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că distanțierul de aminoacizi se pot dovedi, în unele cazuri, a fi imunogene și pot provoca un răspuns imun nedorit împotriva constructului. În consecință, în anumite modalități de realizare, orice distanțier adăugat la construct va fi relativ neimunogen sau chiar omis cu totul, astfel încât să se mențină calitățile biochimice dorite ale anticorpilor modificați.

Pe lângă deletarea întregilor domenii ale regiunii constante, se va aprecia că anticorpii conform prezentei invenții pot fi furnizați prin deletarea parțială sau substituirea câtorva sau chiar a unui singur aminoacid. De exemplu, mutația unui singur aminoacid în zone selectate ale domeniului CH2 poate fi suficientă pentru a reduce substanțial legarea Fc și, prin urmare, pentru a crește localizarea tumorii. Similar, poate fi de dorit să se deleteze pur și simplu acea parte a unui sau mai multor domenii ale regiunii constante care controlează funcția efectoare care trebuie să fie modulată (*de exemplu*, legarea complementului C1q). Astfel de deleții parțiale ale regiunii constante pot îmbunătăți caracteristicile selectate ale anticorpului (timpul de înjumătățire a serului) lăsând intacte alte funcții dorite asociate cu domeniul intact al regiunii constante în cauză. Mai mult, după cum sa menționat mai sus, regiunile constante ale anticorpilor dezvoltate pot fi modificate, *de exemplu*, prin mutația sau substituirea unui sau mai multor aminoacizi, care pot îmbunătăți profilul constructului rezultat. În acest sens, poate fi posibil să se întrerupă activitatea furnizată de un situs de legare conservat (*de exemplu*, legarea Fc), menținând în același timp, substanțial, configurația și profilul imunogen al anticorpului modificat. Anumite variante de realizare pot cuprinde adăugarea unui sau mai multor aminoacizi la regiunea constantă pentru a îmbunătăți caracteristicile dorite, cum ar fi scăderea sau creșterea funcției efectoare sau pentru a se asigura legare a mai multă citotoxină sau carbohidrat. În astfel de modalități de realizare poate fi de dorit să fie inserate sau să fie replicate secvențe specifice derivate din domenii ale regiunii constante selectate.

Prezenta invenție cuprinde în plus variante și echivalenți care sunt substanțial omologi cu anticorpii himerici, umanizați și umani, sau fragmentelor de anticorpi ale acestora, stabilite aici. Acestea pot conține, de exemplu, mutații conservative de substituție, *adică*, substituirea unui sau mai multor aminoacizi cu aminoacizi similari. De exemplu, substituția conservativă se referă la substituirea unui aminoacid cu altul din aceeași clasă generală, cum ar fi, de exemplu, un aminoacid acid cu un alt aminoacid acid, un aminoacid bazic cu alt aminoacid bazic sau un aminoacid neutru de un alt aminoacid neutru. Ceea ce se intenționează printr-o substituție conservativă de aminoacizi este bine cunoscut în domeniu, cum ar fi cele definite mai sus.

Poliptidele conform prezentei invenții pot fi polipeptide recombinante, polipeptide naturale sau polipeptide sintetice care cuprind un anticorp sau un fragment al acestora, împotriva unui CD123/IL-3Ra uman. Se va recunoaște în domeniu că unele secvențe de aminoacizi conform invenției pot fi variate fără un efect semnificativ asupra structurii sau funcției proteinei. Astfel, invenția include în plus variații ale polipeptidelor care prezintă activitate substanțială sau care includ regiuni ale unui anticorp sau ale unui fragment al acestuia, împotriva unui antigen CD123, cum ar fi un CD123 uman. Astfel de mutanți includ deleții, inserții, inversiuni, repetări și substituții de tip.

Poliptidele și analogii se pot modifica în continuare pentru a conține fragmente chimice suplimentare care nu fac parte în mod normal din proteină. Aceste fragmente derivatizate pot îmbunătăți solubilitatea, timpul de înjumătățire biologic sau absorbția proteinei. Fragmentele pot

reduce, de asemenea, sau elimina orice efecte secundare dorite ale proteinelor și altele asemenea. O prezentare generală a acestor fragmente poate fi găsită în REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, ediția a 20-a, Mack Publishing Co, Easton, PA (2000).

5 Polipeptidele izolate descrise aici pot fi produse prin orice metodă adecvată cunoscută în domeniu. Astfel de metode variază de la metode directe de sinteză a proteinelor la construirea unei secvențe de ADN care codifică secvențe de polipeptide izolate și exprimă acele secvențe într-o gazdă transformată adecvată. O secvență ADN poate fi construită folosind tehnologia recombinantă prin izolarea sau sintetizarea unei secvențe de ADN care codifică o proteină de tip sălbatic de interes Opțional, secvența poate fi mutagenizată prin mutagenză specifică situsului pentru a furniza analogi funcționali ai acesteia. Vezi, *de exemplu*, Zoeller și colab., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066, 1984, și Brev. U.S. nr. 4.588.585.

15 O secvență de ADN care codifică o polipeptidă de interes (*de exemplu*, anticorp, fragment de legare la antigen sau polipeptidă conform invenției) ar putea fi complet sau parțial construită prin sinteză chimică utilizând un sintetizator oligonucleotidic. Astfel de oligonucleotide pot fi concepute pe baza secvenței de aminoacizi a polipeptidei dorite și selectând acei codoni care sunt favorizați în celula gazdă în care va fi produsă polipeptida recombinantă de interes. Pentru a sintetiza o secvență polinucleotidică izolată care codifică o polipeptidă de interes izolată pot fi aplicate metode standard. De exemplu, o secvență completă de aminoacizi poate fi utilizată pentru a construi o genă translatată înapoi. Mai mult, poate fi sintetizat un oligomer de ADN care conține o secvență de nucleotide care codifică polipeptida particulară izolată. De exemplu, pot fi sintetizate și apoi ligate mai multe oligonucleotide mici care codifică porțiuni din polipeptida dorită. Oligonucleotidele individuale conțin tipic 5' sau 3' console pentru asamblare complementară.

25 Odată asamblate (prin sinteză, mutagenză direcționată la situs sau altă metodă), secvențele de polinucleotidă care codifică o anumită polipeptidă izolată de interes vor fi inserate într-un vector de exprimare și legate operativ prin linker la o secvență de control a exprimării, adecvată pentru exprimarea proteinei într-o gazdă dorită. Asamblarea adecvată poate fi confirmată prin secvențierea nucleotidelor, cartografierea de restricție și exprimarea unei polipeptide biologic active într-o gazdă adecvată. După cum este bine cunoscut în domeniu, pentru a se obține niveluri ridicate de exprimare ale unei gene transfectate la o gazdă, gena trebuie să fie legată operativ de secvențele transcripționale și translaționale de control ale exprimării care sunt funcționale în gazda de exprimare aleasă.

35 Vectorii de exprimare recombinanți pot fi utilizați pentru a amplifica și exprima anticorpii care codifică ADN sau fragmente ale acestuia, împotriva CD123/IL-3R α uman. Vectorii de expresie recombinanți sunt construcții de ADN replicabili care au fragmente de ADN sintetice sau derivate din ADNc care codează un lanț polipeptidic al unui anticorp anti-CD123/IL-3R α , sau fragment al acestuia, legat funcțional la elemente transcripționale adecvate sau regulatoare translaționale derivate din gene de mamifer, microbiene, virale sau de insecte. O unitate transcripțională cuprinde, în general, un ansamblu de (1) un element genetic sau elemente care au un rol de reglare în exprimarea genelor, de exemplu, promotori sau amplificatori transcripționali, (2) o secvență structurală sau codificatoare care este transcrisă în ARNm și translatată în proteină și (3) secvențe de inițiere și terminare a transcrierii și translației corespunzătoare. Astfel de elemente de reglare pot include o secvență operator pentru controlul transcrierii. Capacitatea de a se replica într-o gazdă, conferită uzual de o origine a replicării, și o genă de selecție pentru a facilita recunoașterea transformanților pot fi încorporate în plus. Regiunile de ADN sunt legate operativ atunci când sunt înrudite funcțional una cu cealaltă. De exemplu, ADN-ul pentru o peptidă de semnal (lider secretor) este legat operativ de ADN-ul pentru o polipeptidă dacă este exprimat ca un precursor care participă la secreția polipeptidei; un promotor este legat operativ de o secvență de codificare dacă, controlează transcrierea secvenței; sau un situs de legare a ribozomului este legat operativ de o secvență de codificare dacă este poziționat astfel încât să permită translația. Elementele structurale destinate utilizării în sistemele de exprimare a drojdiei includ o secvență lider care permite secreția extracelulară a proteinelor translate de către o celulă gazdă. Alternativ, în cazul în care proteina recombinantă este exprimată fără un lider sau o secvență de transport, aceasta poate include un rest de metionină N-terminal. Acest rest poate fi opțional clivat ulterior de proteina recombinată exprimată pentru a furniza un produs final.

60 Alegerea secvenței de control a exprimării și a vectorului de exprimare va depinde de alegerea gazdei. Se poate folosi o mare varietate de combinații gazdă/vector de exprimare. Vectorii

de exprimare utili pentru gazdele eucariote, includ, de exemplu, vectori care cuprind secvențe de control a exprimării de la SV40, virusul papilomului bovin, adenovirus și citomegalovirus. Vectori de exprimare utili pentru gazdele bacteriene includ plasmide bacteriene cunoscute, cum ar fi plasmidele de la *Escherichia coli*, incluzând pCR 1, pBR322, pMB9 și derivații acestora, plasmide cu o gamă mai largă de gazde, cum ar fi M13 și fagi ADN monocatenari filamentoși.

Celulele gazdă adecvate pentru exprimarea unei polipeptide sau anticorpi care leagă CD123/IL-3R α (sau a unei proteine CD123/IL-3R α pentru utilizarea ca antigen) includ procariote, drojdie, insecte sau celule eucariote superioare aflate sub controlul promotorilor corespunzători. Procariotele includ organisme gram negative sau gram pozitive, de exemplu *E. coli* sau *bacili*. Celulele eucariote superioare includ linii celulare stabilite de origine mamiferă, cum ar fi celulele CHO. Ar putea fi folosite și sisteme de translație libere de celule. Vectorii de clonare și exprimare corespunzători pentru utilizarea cu gazde celulare bacteriene, fungice, drojdii și de mamifere sunt descriși de Pouwels și colab. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Informații suplimentare referitoare la metodele de producere a proteinelor, inclusiv producția de anticorpi pot fi găsite, *de exemplu*, în Publicația de Brevet U.S. nr. 2008/0187954, Brevetele U.S. nr. 6.413.746 și 6.660.501, și Publicația internațională de brevet nr. WO 04009823.

Diferite sisteme de cultură de celule de mamifere sau insecte sunt de asemenea folosite avantajos pentru a exprima proteina recombinantă. Exprimarea proteinelor recombinante în celulele de mamifere poate fi realizată deoarece aceste proteine sunt în general pliate corect, modificate corespunzător și complet funcționale. Exemple adecvate de linii de celule gazdă de mamifere includ HEK-293 și HEK-293T, liniile COS-7 de celule renale de maimuță, descrise de Gluzman (Cell 23: 175, 1981), și alte linii celulare, inclusiv, de exemplu, celule L, CI 27, 3T3, ovar de hamster chinezesc (CHO), linii de celule HeLa și BHK. Vectorii de exprimare de la mamiferelor pot cuprinde elemente netranscrise, cum ar fi originea replicării, un promotor și amplificator adecvat legat de gena care urmează să fie exprimată și alte secvențe de flancare 5' sau 3' netranscrise și secvențe 5' sau 3' netranslate, cum ar fi situsuri necesare de legare a ribozomilor, un situs de poliadenilare, situsuri donoare și acceptoare de îmbinare și secvențe de terminare transcripțională. Sistemele de baculovirus pentru producerea de proteine heterologe în celulele insectelor sunt trecute în revistă de Luckow și Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Astfel, al treilea aspect al invenției redă, de asemenea, o celulă care produce oricare dintre anticorpii în cauză sau un fragment de legare a antigenului a acestuia sau oricare dintre polipeptidele în cauză. În anumite modalități de realizare, celula este o celulă de mamifer. În anumite modalități de realizare, celula este o celulă HEK-293 sau HEK-293T, o celulă COS-7, o celulă L, o celulă CI 27, o celulă 3T3, o celulă ovariană de hamster chinezesc (CHO), o celulă HeLa sau o celulă BHK. În anumite modalități de realizare, celula este o celulă CHO.

Proteinele produse de o gazdă transformată pot fi purificate conform oricărei metode adecvate. Astfel de metode standard includ cromatografia (*de exemplu*, cu schimb de ioni, afinitate și cromatografia pe coloane de dimensionare), centrifugarea, solubilitatea diferențială sau prin orice altă tehnică standard pentru purificarea proteinelor. La proteină pot fi atașate etichete de afinitate, cum ar fi hexahistidina, domeniul de legare a maltozei, secvența de acoperire a gripei și glutation-S-transferaza pentru a permite purificarea cu ușurință prin trecerea pe o coloană de afinitate adecvată. Proteinele izolate pot fi, de asemenea, caracterizate fizic folosind tehnici cum ar fi proteoliza, rezonanța magnetică nucleară și cristalografia cu raze x.

De exemplu, supernatantele din sistemele care secretă proteine recombinante în mediile de cultură pot fi mai întâi concentrate folosind un filtru de concentrare a proteinelor disponibil comercial, de exemplu, o unitate de ultrafiltrare Amicon sau Millipore Pellicon. După etapa de concentrare, concentratul poate fi aplicat pe o matrice de purificare adecvată. Alternativ, se poate folosi o rășină schimbătoare de anioni, de exemplu, o matrice sau un substrat având grupări dietilaminoetil (DEAE). Matricele pot fi acrilamida, agaroză, dextranul, celuloza sau alte tipuri utilizate în mod obișnuit în purificarea proteinelor. Alternativ, poate fi utilizată o etapă de schimb cationic. Schimbătorii de cationi adecvați includ diverse matrice insolubile care cuprind grupări sulfopropil sau carboximetil. În cele din urmă, una sau mai multe etape de cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversă (RP-HPLC) care utilizează medii hidrofobe RP-HPLC, *de exemplu*, silicagel având grupări suspendate de metil sau alte grupări alifatică, poate fi utilizat pentru a purifica în continuare un agent de legare a CD123/IL-3R α . Unele sau toate etapele de

purificare de mai sus, în diferite combinații, pot fi de asemenea utilizate pentru a furniza o proteină recombinantă omogenă.

Proteina recombinantă produsă în cultură bacteriană poate fi izolată, de exemplu, prin extracția inițială din peletele celulare, urmată de una sau mai multe concentrări, salinizare, schimb ionic apos sau etape de cromatografie de excludere dimensională. Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) poate fi utilizată pentru etapele finale de purificare. Celulele microbiene utilizate în exprimarea unei proteine recombinante pot fi rupte prin orice metodă convenabilă, incluzând un ciclu de îngheț-dezgheț, sonicare, rupere mecanică sau utilizare a unor agenți de lizare a celulelor.

Metodele cunoscute în domeniu pentru purificarea anticorpilor și a altor proteine le includ, de exemplu, pe cele descrise în Publicațiile de Brevet U.S. nr. 2008/0312425, 2008/0177048, și 2009/0187005.

În anumite modalități de realizare, agentul de legare a CD123/IL-3R α din prezenta invenție are o serină N-terminală, care poate fi oxidată cu un agent de oxidare pentru a forma un agent de legare a CD123/IL-3R α oxidat având o grupare de aldehydă N-terminală.

În etapa (a) a metodelor descrise aici poate fi utilizat orice agent de oxidare adecvat. Agentul de oxidare poate fi un periodat. Mai specific, agentul de oxidare poate fi periodatul de sodiu.

Se poate utiliza un exces molar de echivalenți de agent de oxidare în raport cu agentul de legare a CD123/IL-3R α . Se pot utiliza aproximativ 2-100, 5-80, 10-50, 1-10 sau 5-10 echivalenți molari de agent de oxidare. Se pot utiliza aproximativ 10 sau aproximativ 50 de echivalenți de agent de oxidare. Când se utilizează o cantitate mare de agent de oxidare, se utilizează un timp de reacție scurt pentru a evita supra-oxidarea. De exemplu, când se utilizează 50 de echivalenți de agent de oxidare, reacția de oxidare este efectuată timp de aproximativ 5 până la aproximativ 60 de minute. Alternativ, când se utilizează 10 echivalenți de agent de oxidare, reacția se efectuează timp de aproximativ 30 minute până la aproximativ 24 de ore. Se pot utiliza 5-10 echivalenți molari de agent de oxidare și reacția de oxidare poate fi efectuată timp de aproximativ 5 până la aproximativ 60 de minute (*de exemplu*, aproximativ 10 până la aproximativ 30 de minute, aproximativ 20 până la aproximativ 30 de minute).

Este posibil ca reacția de oxidare să nu conducă la o oxidare neîntită semnificativă. De exemplu, nicio măsură semnificativă (*de exemplu*, mai mică de 20%, mai mică de 10%, mai mică de 5%, mai mică de 3%, mai mică de 2% sau mai mică de 1%) de metionină și/sau glicani nu poate fi oxidată în timpul procedurii de oxidare a serinei N-terminale pentru a genera agentul de legare CD123/IL-3R α oxidat având o grupare de aldehydă N-terminală.

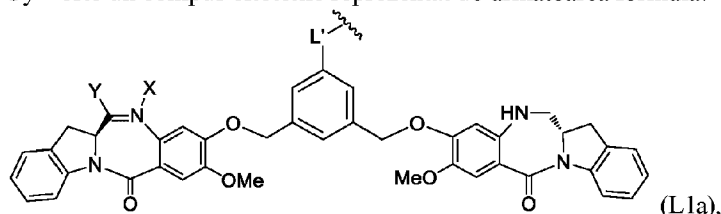
În anumite modalități de realizare, agentul de legare a CD123/IL-3R α conform prezentei invenții are un rest de Cys modificat recombinant, cum ar fi un rest de Cys corespunzător celui de-al 5^{-lea} până la ultimul Cys, de exemplu, în SECV ID NR: 54 sau 56 (*adică*, un rest de Cys din poziția numărul EU/OU 442). Astfel, termenul "anticorp de cisteină modificat" include un anticorp având cel puțin un Cys care nu este prezent în mod normal într-un rest dat al lanțului ușor sau al lanțului greu al anticorpului. Astfel Cys, care poate fi denumit și "Cys modificat", pot fi conceput utilizând orice tehnologie convențională de biologie moleculară sau de ADN recombinant (*de exemplu*, prin înlocuirea secvenței de codificare pentru un rest non-Cys la restul țintă cu o secvență de codificare pentru Cys). De exemplu, dacă restul inițial este Ser cu o secvență de codare de 5'-UCU-3', secvența de codare poate fi mutată (*de exemplu*, prin mutageneză direcționată la situs) la 5'-UGU-3', care codifică Cys. În anumite modalități de realizare, anticorpul cu Cys modificat conform invenției are un Cys modificat în lanțul greu. În anumite modalități de realizare, Cys modificat se află în sau în apropierea domeniului CH3 al lanțului greu. În anumite modalități de realizare, Cys modificat este corespunzător celui de-al 5^{-lea} până la ultimul Cys, de exemplu, din SECV ID NR: 54 sau 56. Secvența de lanț greu (sau ușor) a anticorpului modificat poate fi inserată într-un vector de exprimare recombinant adecvat pentru a produce anticorpul modificat având restul de Cys modificat în locul restului inițial de Ser.

60

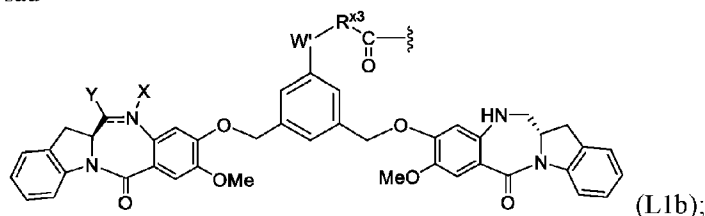
3. Imunoconjugați

Prezenta invenție redă, de asemenea, imunoconjugate care cuprind agenți de legare de CD123/IL-3R α descriși aici legați covalent la una sau mai multe molecule ale agenților citotoxici descriși aici.

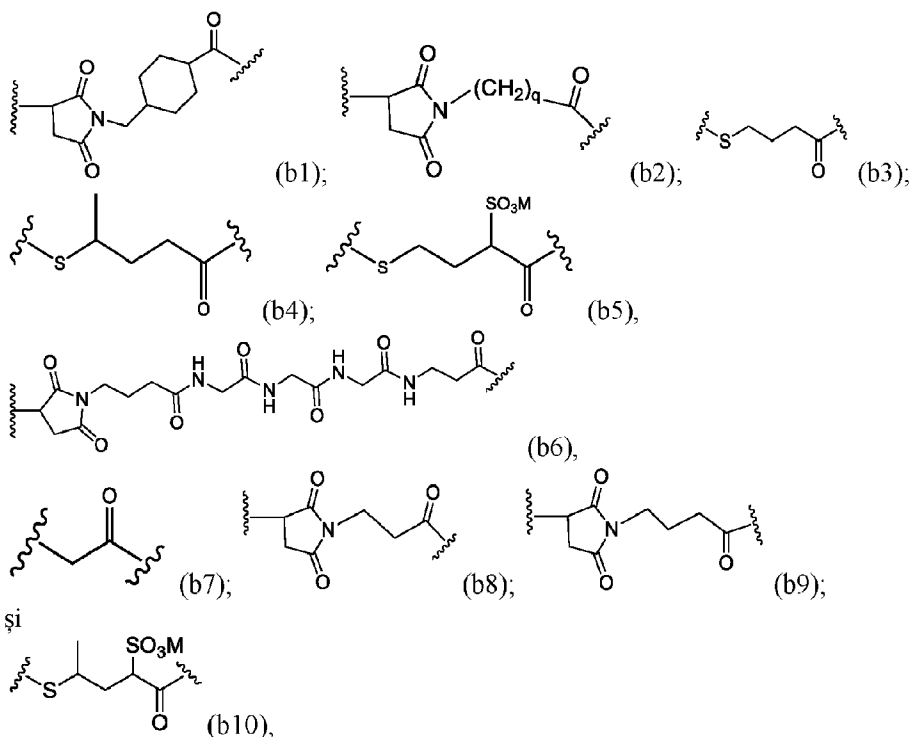
- 5 Imuconjugatul conform prezentei invenții poate cuprinde agenți de legare a CD123/IL-3R α (inclusiv anticorp, fragment de legare a antigenului acestuia sau o polipeptidă care cuprinde anticorpul sau fragmentul de legare la antigen a acestuia) descris aici legat covalent la un agent citotoxic descris aici prin gruparea ϵ -amino a unui sau mai multor resturi de lizină localizate pe agenții de legare a CD123/IL-3R α .
- 10 În 1^a modalitate de realizare specifică a celui de-al cincilea aspect, imunoconjugatul din prezenta invenție este reprezentat de următoarea formulă:
CBA(Cy^{L1})_{WL} (L1),
în care:
CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:
- 15 a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,
sau o polipeptidă descrisă mai sus, care este legată covalent printr-un rest de lizină la Cy^{L1};
- 20 W_L este un număr întreg de la 1 la 20; și
Cy^{L1} este un compus citotoxic reprezentat de următoarea formulă:



sau



- 25 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:
- linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau -SO₃M;
- 30 W' este -NR^{e'},
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,
n este un număr întreg de la 2 la 6;
R^k este -H sau -Me;
R^{x3} este un alchil(C₁-C₆);
- 35 L' este reprezentat de următoarea formulă:
-NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)- (B1');
sau
-NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}- (B3');
R₅ este -H sau un alchil(C₁-C₃);
- 40 P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține între 2 la 20 resturi de aminoacid;
R_a și R_b, la fiecare apariție, sunt fiecare independent -H, alchil(C₁-C₃), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;
m este un număr întreg de la 1 la 6; și
Z^{s1} este selectat din oricare dintre următoarele formule:



5

și

in care:

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

M este H⁺ sau un cation.

10 In a 2^a modalitate de realizare specifică a conjugatilor cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică.

15 In a 3^a modalitate de realizare specifică a conjugatilor cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1b); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică. Mai specific, R^{x3} este un alchil(C₂-C₄).

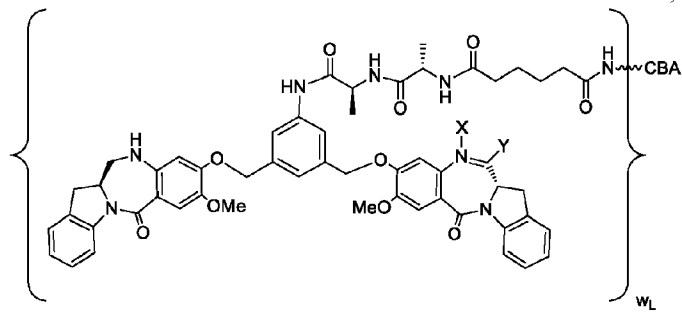
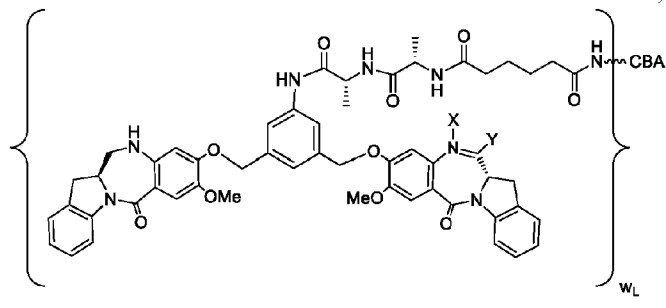
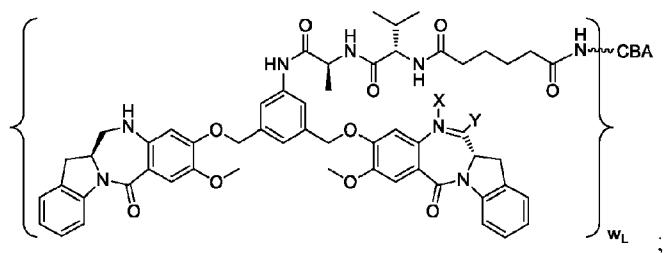
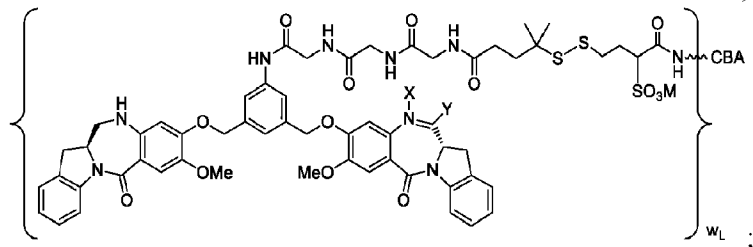
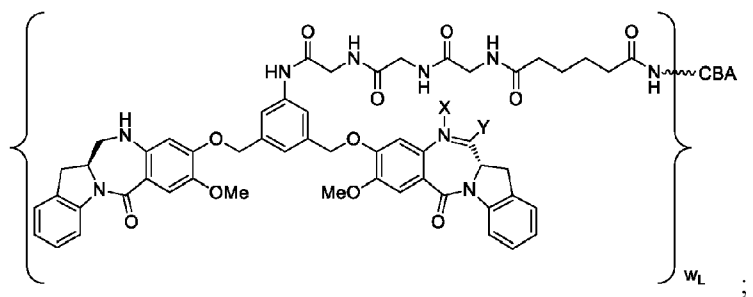
In a 4^a modalitate de realizare specifică a conjugatilor cu formula (L1), Cy^{L1} este reprezentat de formula (L1a); R_a și R_b sunt ambii H; R_s este H sau Me, și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in 1^a modalitate de realizare specifică.

20 In a 5^a modalitate de realizare specifică, P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt descrise mai sus în 1^a, a 2^a sau a 4^a modalitate de realizare specifică.

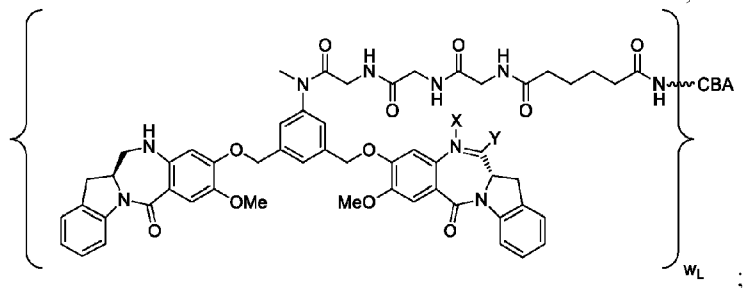
Intr-o modalitate de realizare mai specifică, P este selectată din grupul care constă din Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. Mai specific, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

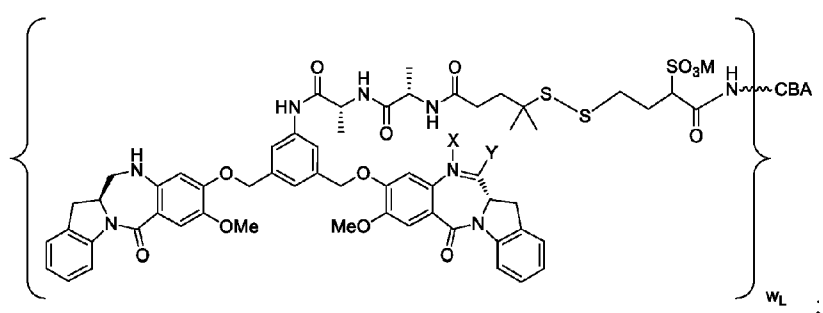
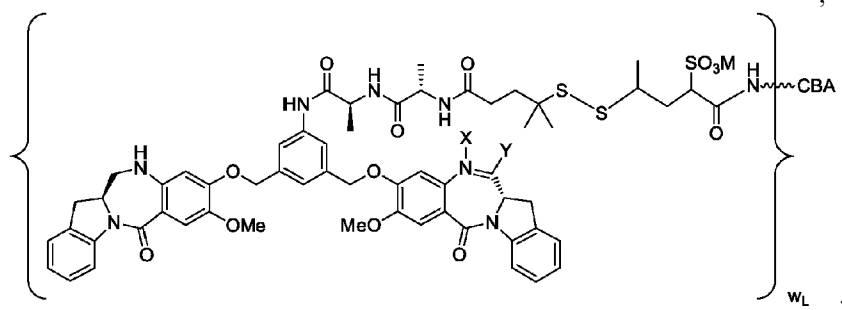
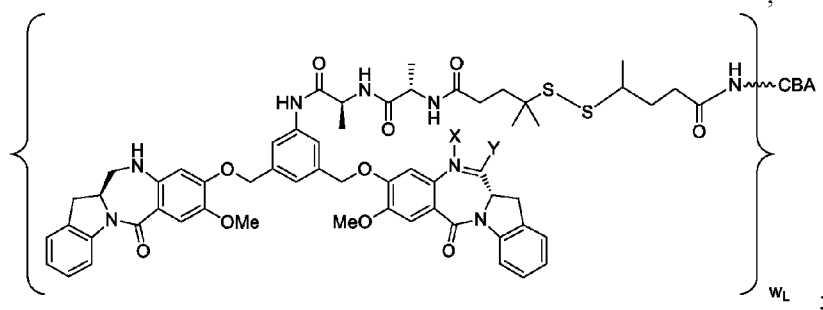
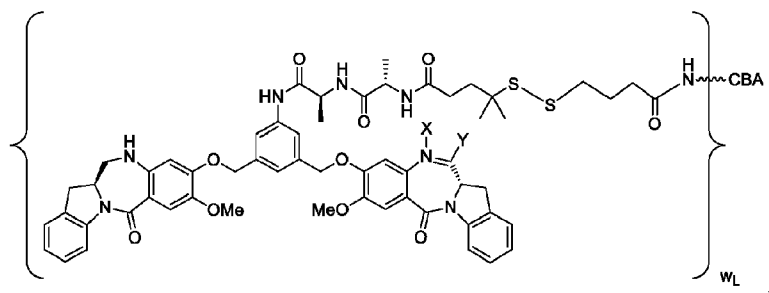
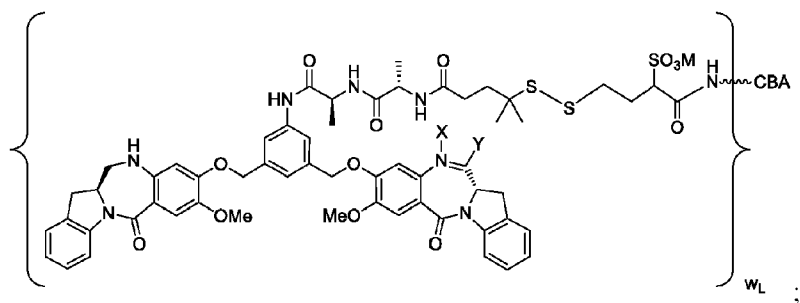
30 In a 6^a modalitate de realizare specifică, Q este -SO₃M; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in 1^a, a 2^a, a 4^a sau a 5^a modalitate de realizare specifică sau oricare alte modalități de realizare specifice descrise aici.

In a 7^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al cincilea aspect este reprezentat de următoarea formulă:

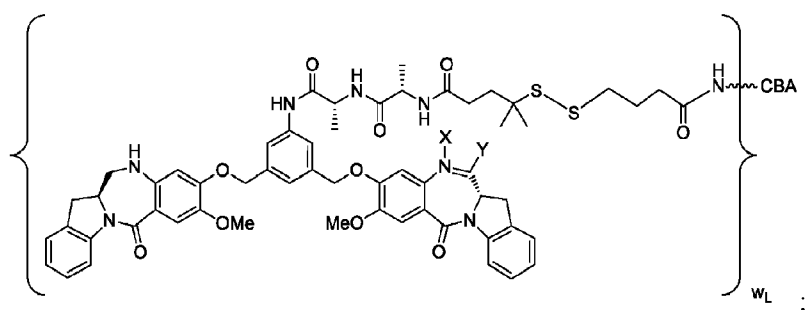


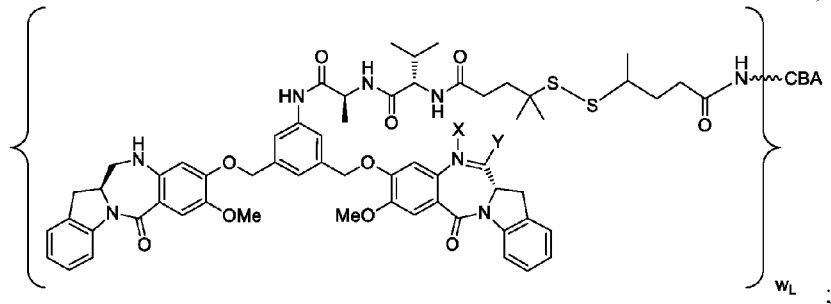
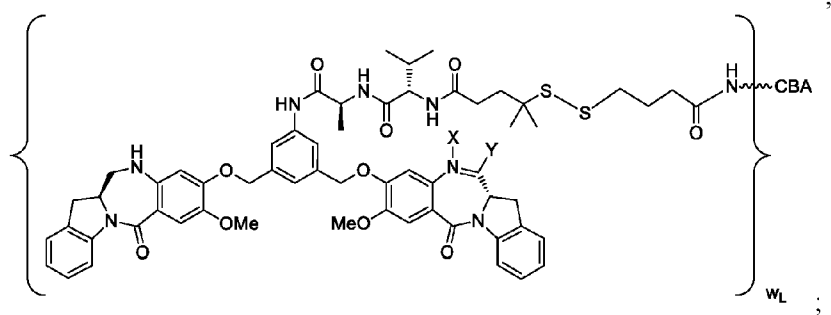
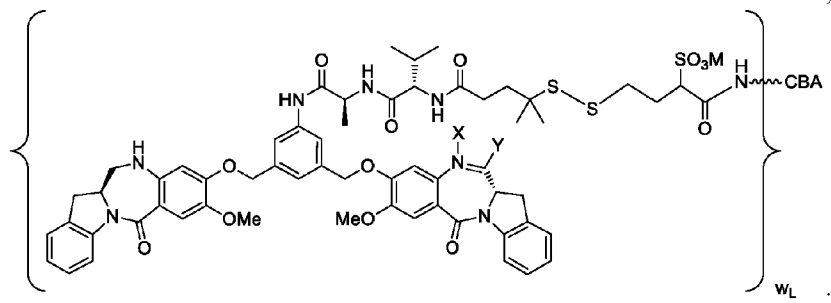
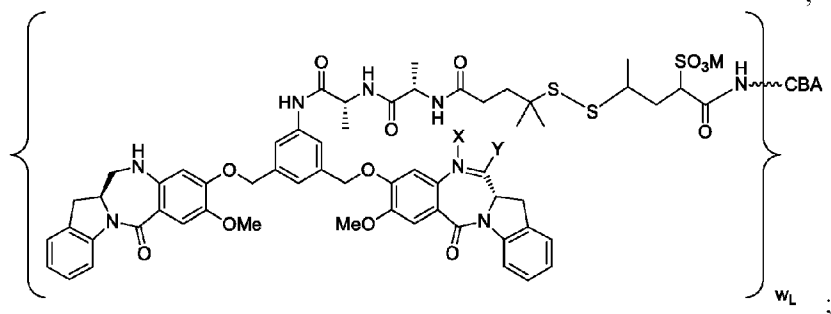
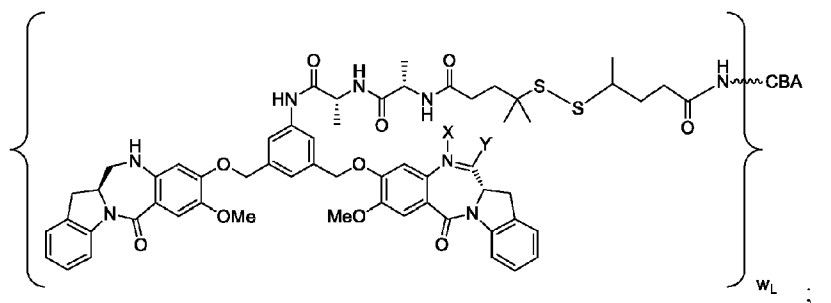
5



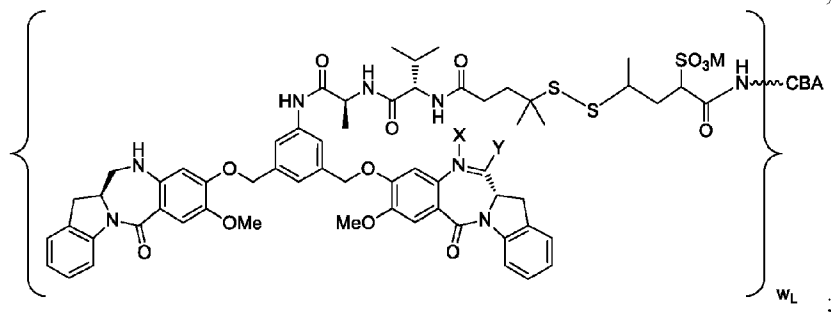


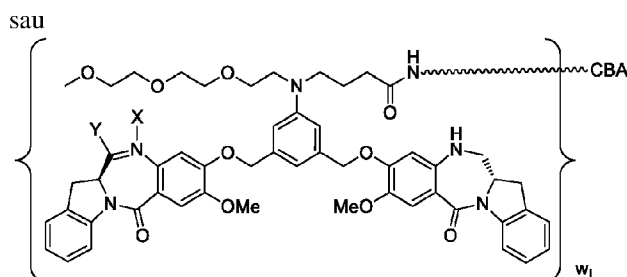
5





5





sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 la 10; linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau $-SO_3M$. Intr-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este $-SO_3M$. În a 8-a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al cincilea aspect este reprezentat de următoarea formulă:

$CBA(Cy^{L2})_{W_L}$ (L2),

în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

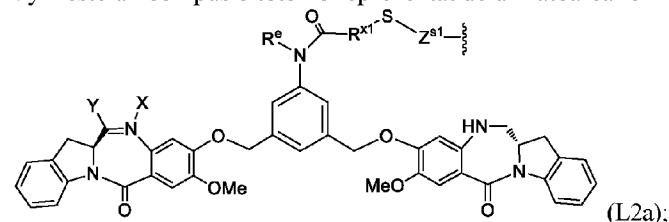
a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

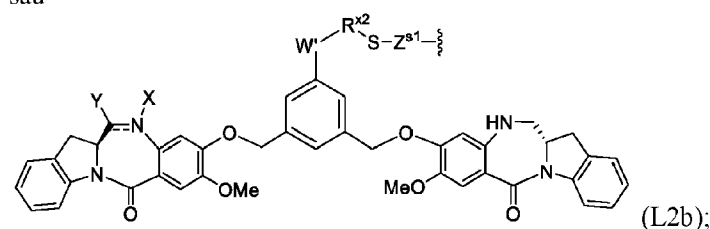
sau o polipeptidă descrisă mai sus, care este legată covalent la Cy^{L2} printr-un rest de lizină;

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

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



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C_1-C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau $-SO_3M$;

R^{x1} și R^{x2} sunt independent alchil(C_1-C_6);

R^e este -H sau un alchil(C_1-C_6);

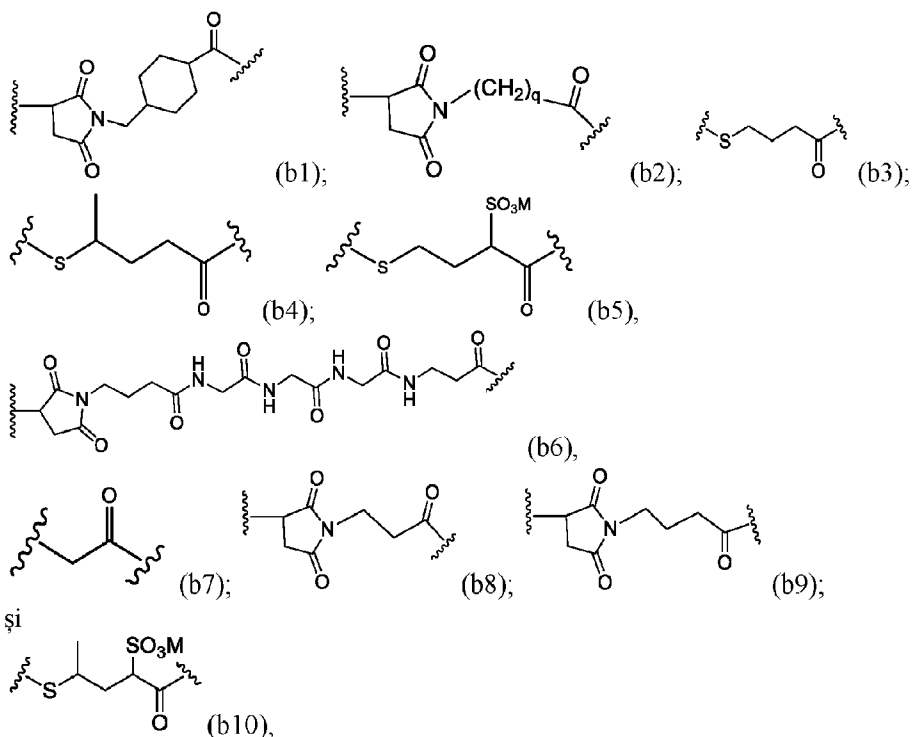
W' este $-NR^e$;

R^e este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

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



5

și

in care:

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

M este H^+ sau un cation.

10

In a 9^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (L2), Cy^{L2} este reprezentat de formula (L2a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 8^a modalitate de realizare specifică.

In a 10^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (L2), Cy^{L2} este reprezentat de formula (L2b); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 8^a

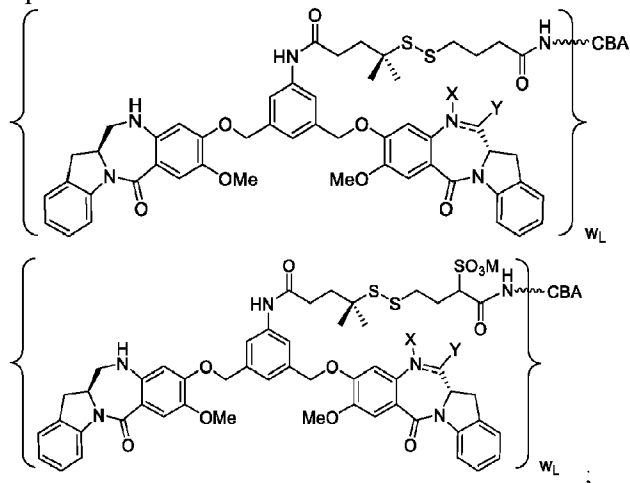
15

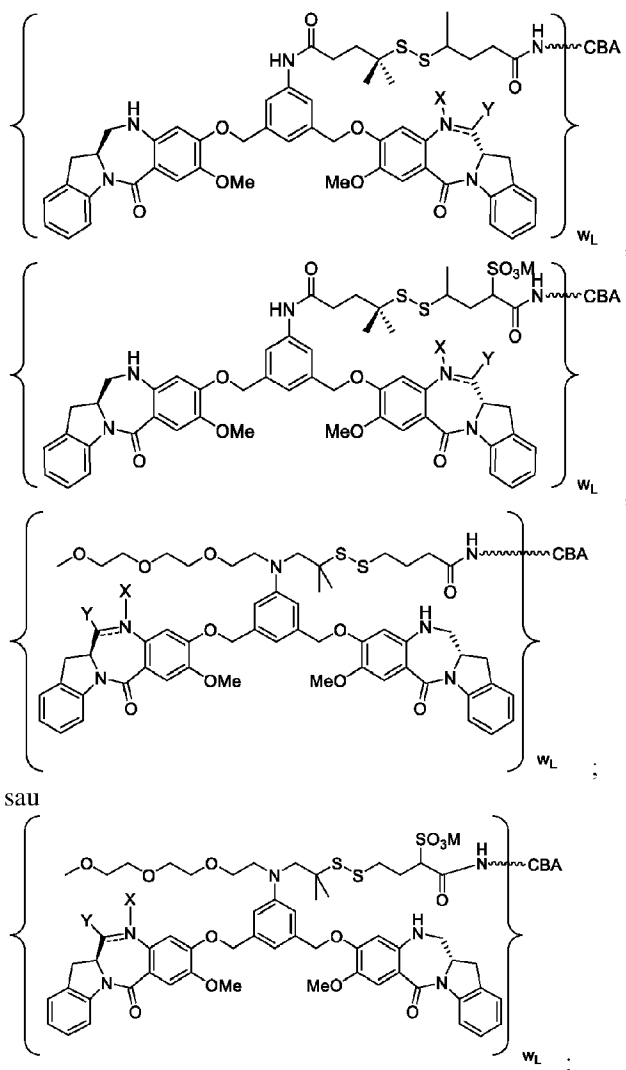
modalitate de realizare specifică.

In a 11^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (L2), R^e este H sau Me; R^{x1} și R^{x2} sunt independent $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CR}^f\text{R}^g)-$, in care R^f și R^g sunt fiecare independent -H sau un alchil($\text{C}_1\text{-C}_4$); și p este 0, 1, 2 sau 3; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in a 8^a, a 9^a sau a 10^a modalitate de realizare specifică. Mai specific, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selectați dintre -H și -Me.

20

In a 12^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al cincilea aspect este reprezentat de următoarea formulă:





sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 la 10; linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H și Y este -OH sau -SO₃M. Într-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură dublă. Într-o altă modalitate de realizare mai specifică, linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃M.

În a 13-a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatului din cel de-al cincilea aspect sunt reprezentați de următoarea formulă:

CBA(Cy^{L3})_{WL} (L3),

în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

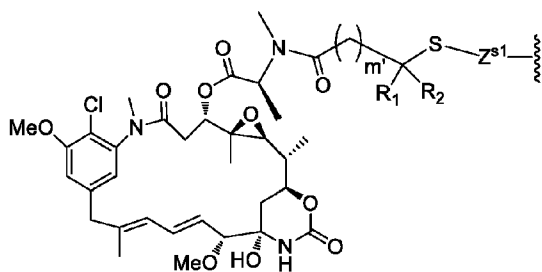
a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

sau o polipeptidă descrisă mai sus, care este legată covalent la Cy^{L3} printr-un rest Lys;

W_L este un număr întreg de la 1 la 20;

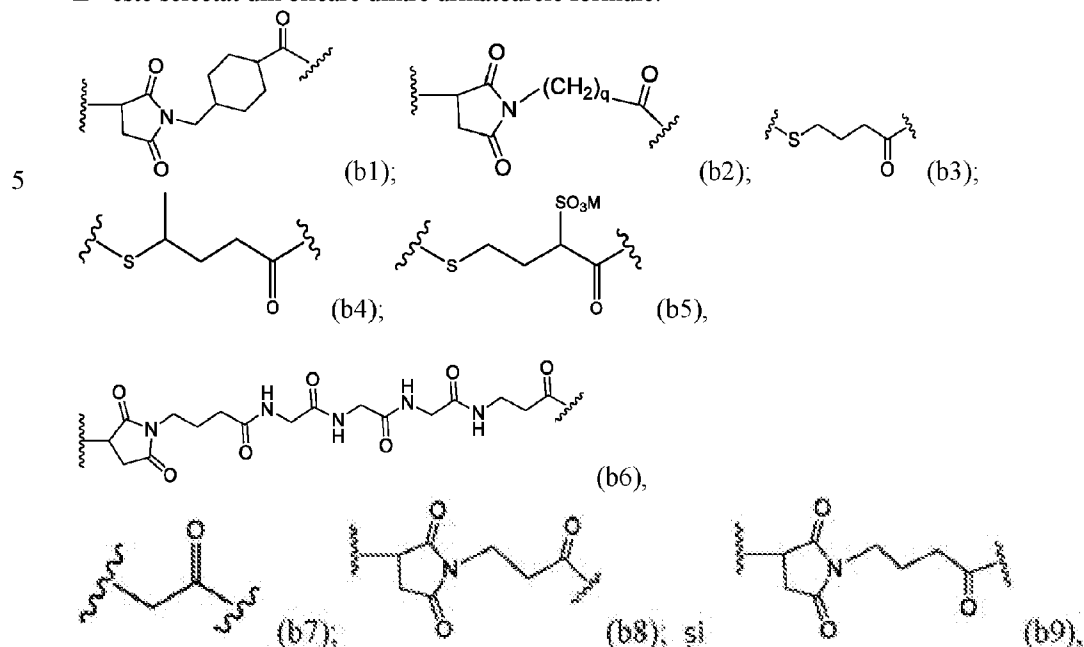
Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:



m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare independent H sau un alchil (C_1 - C_3); și

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



10 în care:

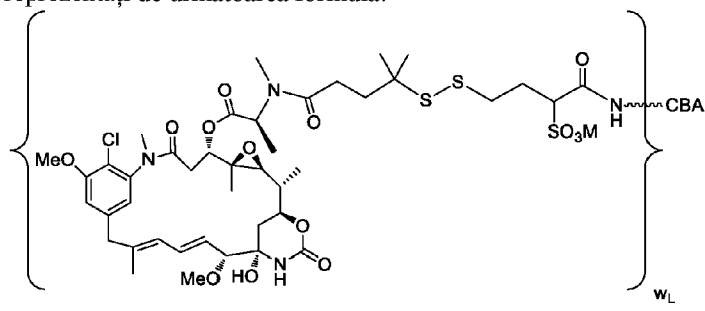
q este un număr întreg de la 1 la 5; și

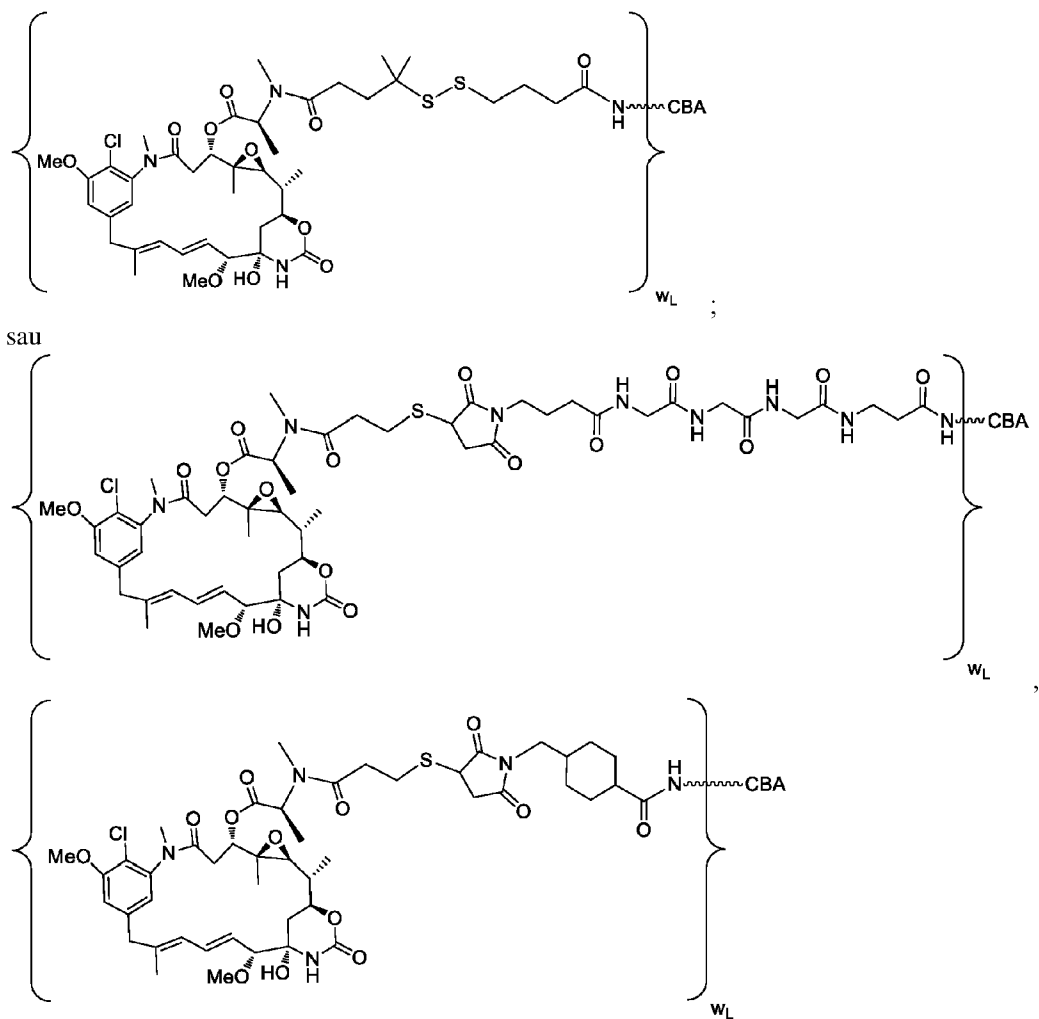
M este H^+ sau un cation.

15 În a 14^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (L3), m' este 1, și R_1 și R_2 sunt ambii H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 13^{-a} modalitate de realizare specifică.

În a 15^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (L3), m' este 2, și R_1 și R_2 sunt ambii Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 13^{-a} modalitate de realizare specifică.

20 În a 16^{-a} modalitate de realizare specifică, imunoconjugatii din cel de-al cincilea aspect sunt reprezentați de următoarea formulă:





5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care W_L este un număr întreg de la 1 la 10.
 În a 17^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor din al cincilea aspect, M este H^+ , Na^+ sau K^+ ; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în oricare dintre 1^{-a} la a 16^{-a} modalitate de realizare specifică sau orice modalitate de realizare mai specifică descrise aici.

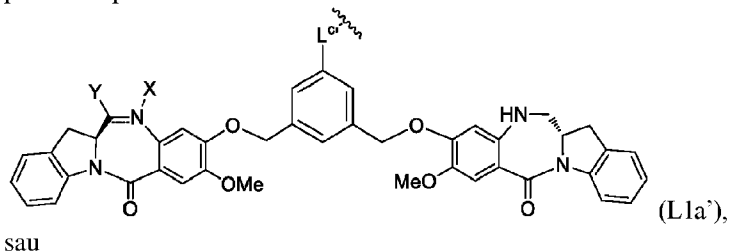
10 În oricare dintre 1^{-a} la a 17^{-a} modalitate de realizare specifică mai sus, anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate avea una sau mai multe dintre (*de exemplu*, substanțial toate dintre, sau 100% dintre) resturile de Lys din oricare dintre al șaselea lanț ușor și lanț greu a regiunilor de CDR (dacă există) substituit cu Arg. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină (HCVR) având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 39 sau 40; și o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină (LCVR) având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 41. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde de asemenea o Ig HCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și o Ig LCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde în plus o Ig HCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 32, 34, 38, 39, sau 40; și o Ig LCVR având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 33, 35, 37, sau 41. În anumite modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34 este Phe, în timp ce în anumite alte modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34 este Val.

25 Imunoconjugatii descriși în al cincilea aspect sau în oricare modalități de realizare specifice descrise aici pot fi preparați conform oricăror metode cunoscute în domeniu, vezi, de exemplu, WO 2012/128868 și WO 2012/112687.

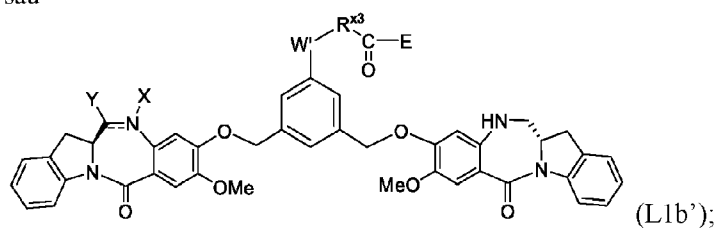
30 Imunoconjugatii din cel de-al cincilea aspect pot fi preparați printr-o primă metodă care cuprinde etapele de reacționare a CBA cu un agent citotoxic având o grupare amino reactivă.

Pentru prima metodă descrisă mai sus, reacția poate fi efectuată în prezența unui reactant reactiv cu imina, cum ar fi NaHSO_3 .

- 5 Pentru prima metodă descrisă mai sus agentul citotoxic având un reactant reactiv aminic poate fi reprezentat de următoarea formulă:

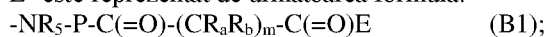


sau

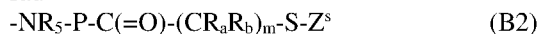


- 10 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

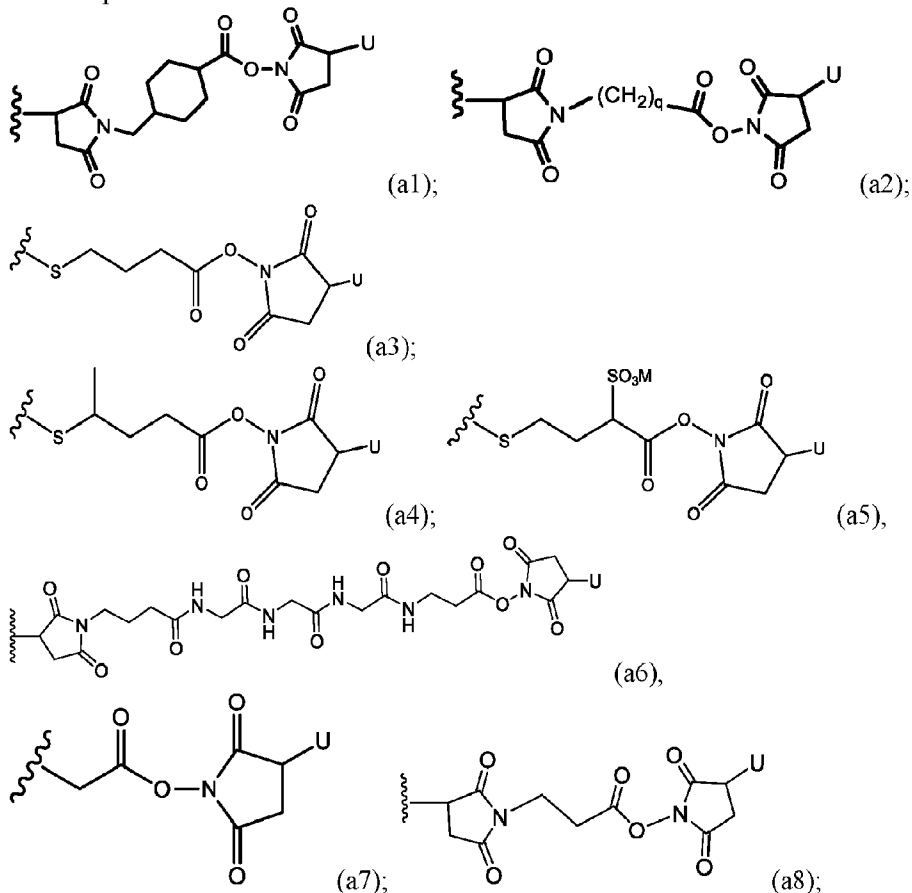
L' este reprezentat de următoarea formulă:

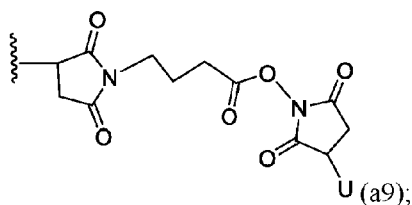


sau

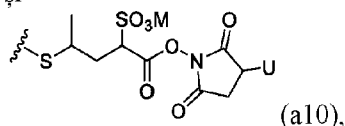


- 15 $\text{C}(=\text{O})\text{E}$ este o grupare de ester reactivă, cum ar fi ester N-hidroxisuccinimdic, ester N-hidroxi sulfosuccinimdic, ester nitrofenil (*de exemplu*, 2 sau 4-nitrofenilic), ester dinitrofenil (*de exemplu*, 2,4-dinitrofenilic), ester sulfo-tetrafluorfenilic (*de exemplu*, 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilic), sau ester pentafluorfenilic, preferabil ester N-hidroxisuccinimdic; Z^s este reprezentat de următoarea formulă:





și



in care:

- 5 q este un număr întreg de la 1 la 5; și
 U este -H sau SO₃M; și
 variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în oricare dintre 1^a la a 7^a și a 17^a modalități de realizare specifice sau oricare modalități de realizare mai specifice descrise aici.

- 10 Imunoconjugatii din cel de-al cincilea aspect pot fi preparați printr-o a doua metodă care cuprinde etapele de:

- (a) reacționare a unui agent citotoxic cu un compus linker având o grupare reactivă amino și o grupare reactivă cu tiol pentru a forma un compus agent citotoxic-linker având gruparea reactivă amino legată la acesta; și
 15 (b) reacționare CBA-ului cu compusul agent citotoxic-linker.

- 20 Pentru a doua metodă descrisă mai sus, reacția din etapa (a) poate fi efectuată în prezența unui reactant reactiv cu imina.

- Pentru a doua metodă descrisă mai sus, compusul agent citotoxic-linker poate fi reacționat cu CBA-ul fără purificare. Alternativ, compusul agent citotoxic-linker poate fi purificat înainte de reacționarea cu CBA-ul.

- 25 Imunoconjugatii din cel de-al cincilea aspect pot fi preparați printr-o a treia metodă care cuprinde etapele de:

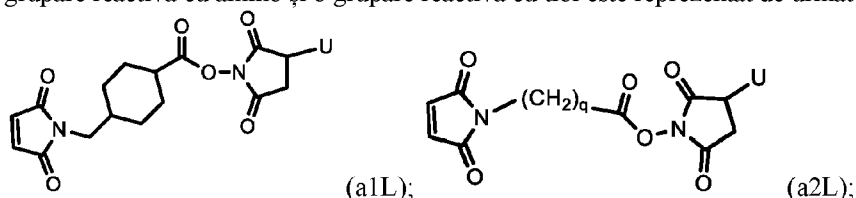
- (a) reacționare a CBA-ului cu un compus linker având o grupare reactivă amino și o grupare reactivă cu tiol pentru a forma un CBA modificat având o grupare reactivă cu tiol legată la acesta; și
 30 (b) reacționare CBA-ului modificat cu agentul citotoxic.

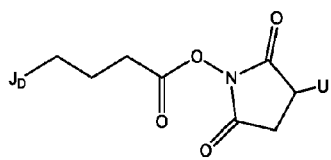
Pentru a treia metodă descrisă mai sus, reacția din etapa (b) poate fi efectuată în prezența unui reactant reactiv cu imina.

- 35 Imunoconjugatii din cel de-al cincilea aspect pot fi preparați printr-o a patra metodă care cuprinde etapele de reacționare a CBA-ului, un compus citotoxic și un compus linker având o grupare reactivă cu amino și grupare reactivă cu tiol.

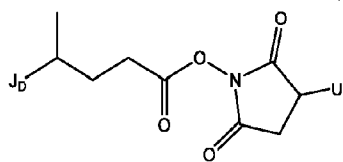
- 40 Pentru a patra metodă, reacția poate fi efectuată în prezența unui agent reactiv iminic.

Pentru a doua, a treia sau a patra metodă descrisă mai sus, compusul linker având o grupare reactivă cu amino și o grupare reactivă cu tiol este reprezentat de următoarea formulă:

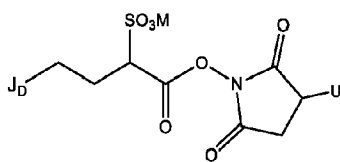




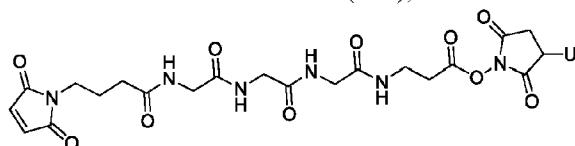
(a3L);



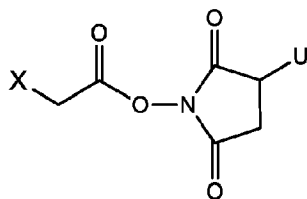
(a4L);



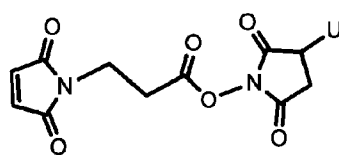
(a5L),



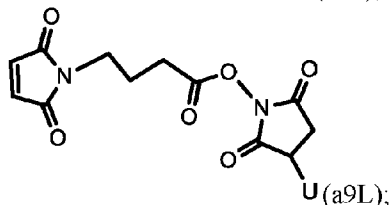
(a6L),



(a7L);



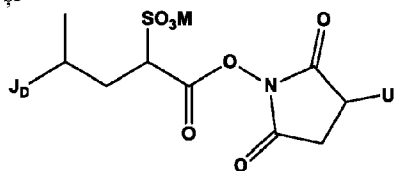
(a8L);



(a9L);

5

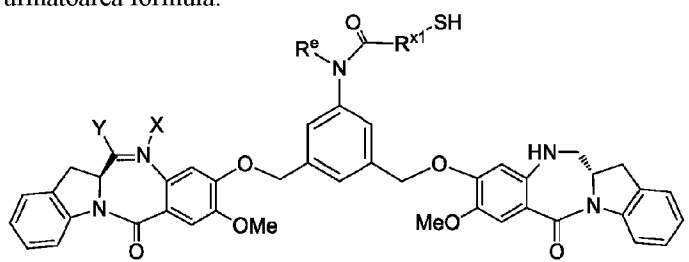
și



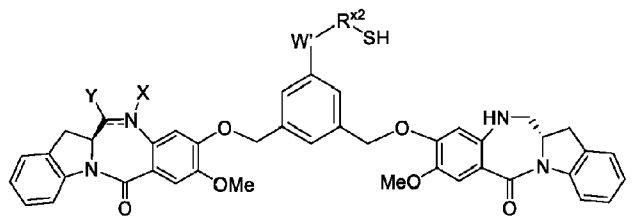
(a10L),

10

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



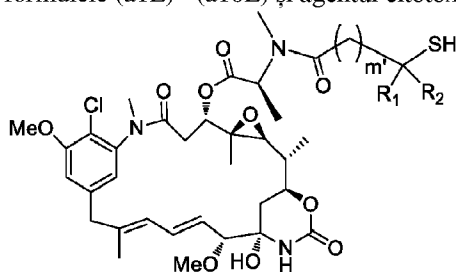
sau



15

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care variabilele sunt astfel cum sunt descrise în oricare dintre a 8^{-a} la a 12^{-a} și a 17^{-a} dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

Pentru a doua, a treia sau a patra dintre metodele descrise mai sus, compusul linker având o grupare reactivă cu amino și o grupare reactivă cu tiol poate fi reprezentat de oricare dintre formulele (a1L) - (a10L) și agentul citotoxic poate fi reprezentat de următoarea formulă:

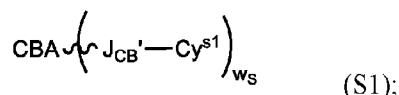


- 5 in care variabilele sunt astfel cum sunt descrise mai sus în oricare a 13^a la a 17^a dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalități de realizare mai specifice descrise aici.

Într-un al șaselea aspect, imunoconjugatul din prezenta invenție cuprinde un anticorp oxidat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

- 10 a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37,
- 15 sau polipeptidă care cuprinde un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia legată covalent la un agent citotoxic descris aici prin una sau mai multe grupări de aldehydă localizate pe anticorpul oxidat, un fragment de legare la antigenului sau o polipeptidă. Grupările de aldehydă sunt generate prin oxidarea unuia sau mai multor fragmente de 2-hidroxi-etilamină de pe N-terminalul anticorpului, fragmentului de legare la antigen sau polipeptidei. Fragmentul de 2-hidroxi-etilamină
- 20 poate face parte dintr-un rest de serină, treonină, hidroxilizină, 4-hidroxornitină sau acid 2,4-diamino-5-hidroxi valeric. Grupările de aldehydă pot fi generate prin oxidarea fragmentului de 2-hidroxi-etilamină a unuia sau mai multor resturi de serină N-terminale localizate pe anticorp, pe un fragment de legare la antigen sau o polipeptidă (*de exemplu*, 1, 2, 3, sau până la 4 resturi de Ser la N-terminalul lanțurilor ușoare și/sau lanțurilor grele).

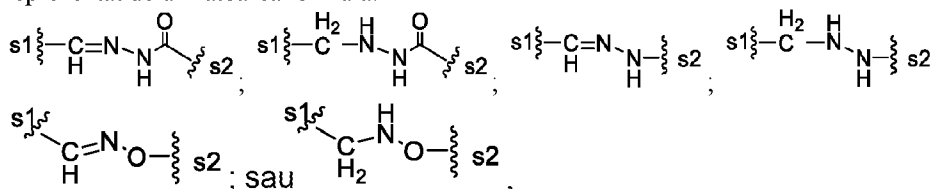
- 25 În 1^a modalitate de realizare specifică a celui de-al șaselea aspect, imunoconjugatul din prezenta invenție este reprezentat de următoarea formulă:



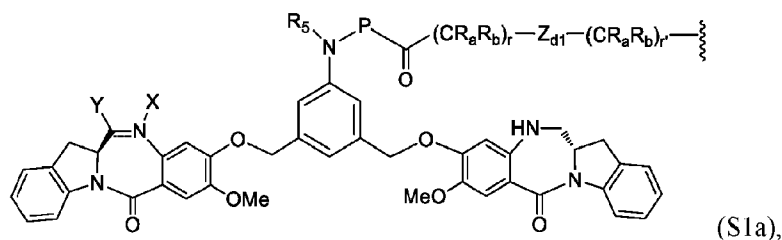
în care:

- 30 CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:
a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37,
- 35 sau o polipeptidă descrisă mai sus;
W_s este 1, 2, 3, sau 4;

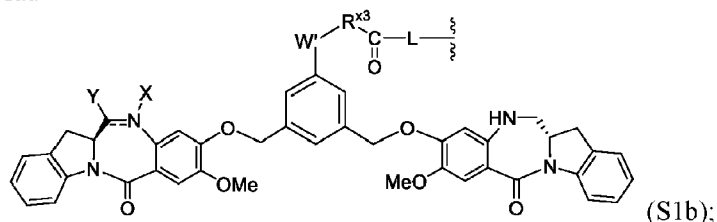
- J_{CB'} este un fragment format prin reacția unei grupări aldehydice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxi-etilamină de pe un N-terminal al anticorpului menționat, fragmentului de legare la antigen al acestuia sau polipeptidei cu o grupare reactivă aldehydică de pe Cy^{s1}, și este
- 40 reprezentat de următoarea formulă:



în care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s1};
Cy^{s1} este reprezentat de următoarea formulă:

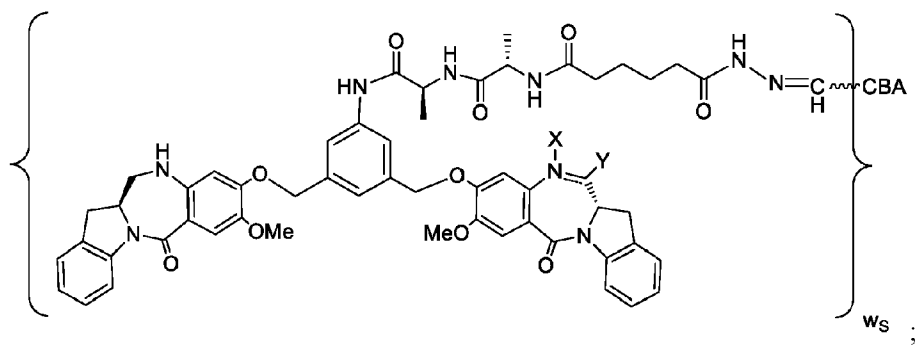
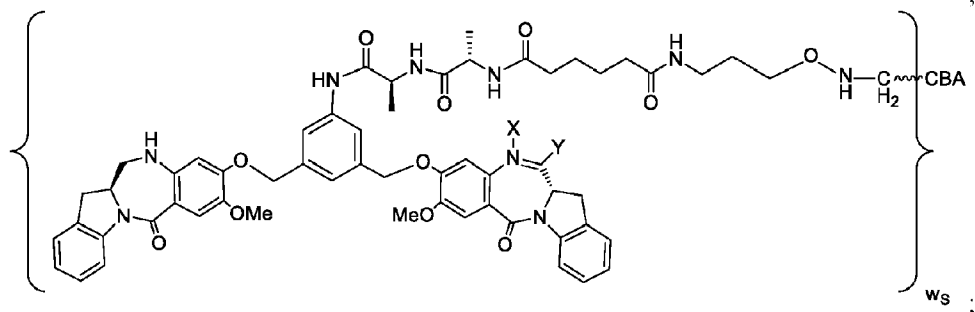
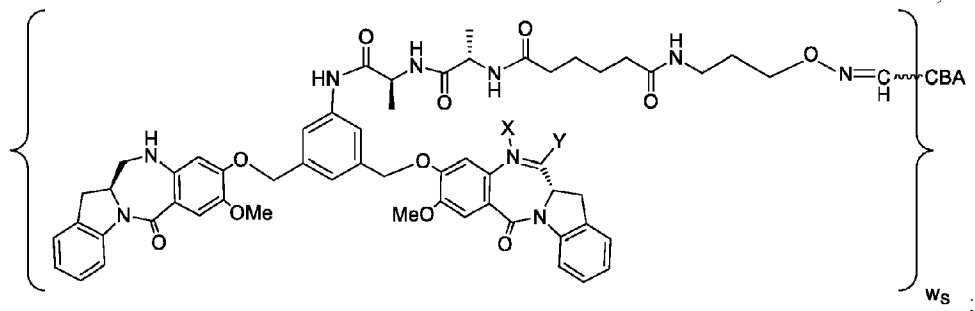
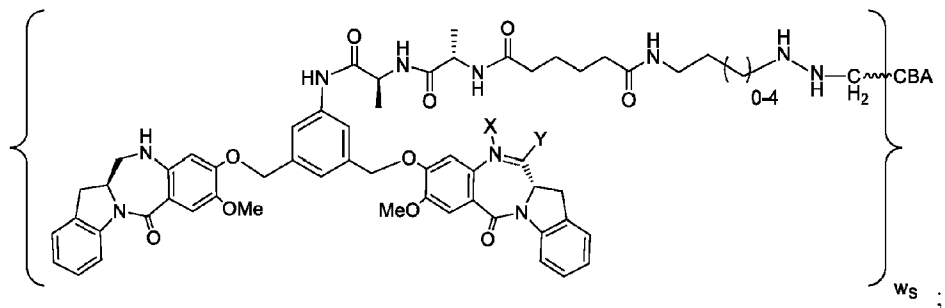
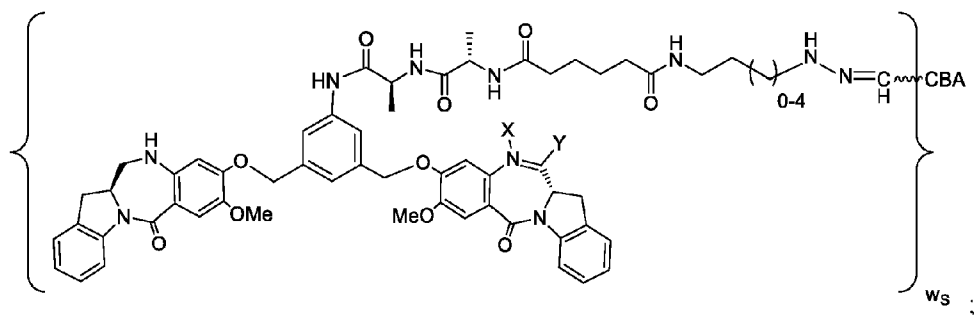


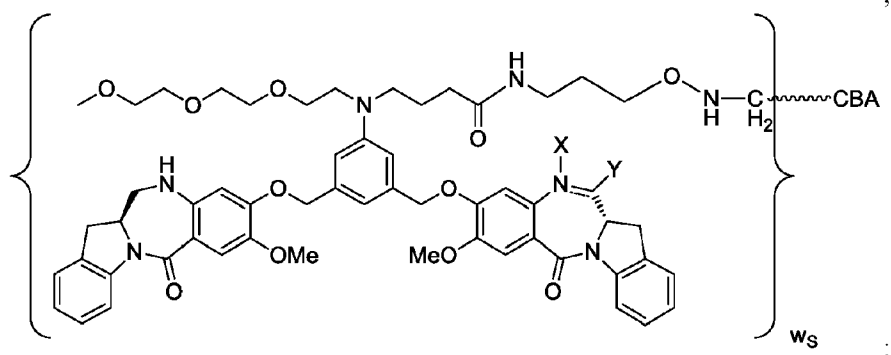
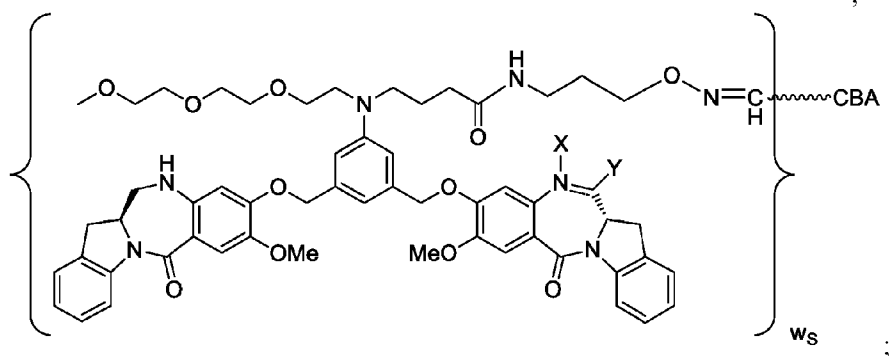
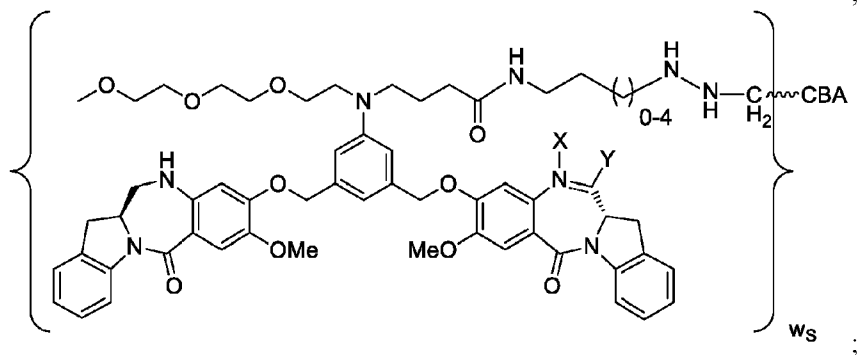
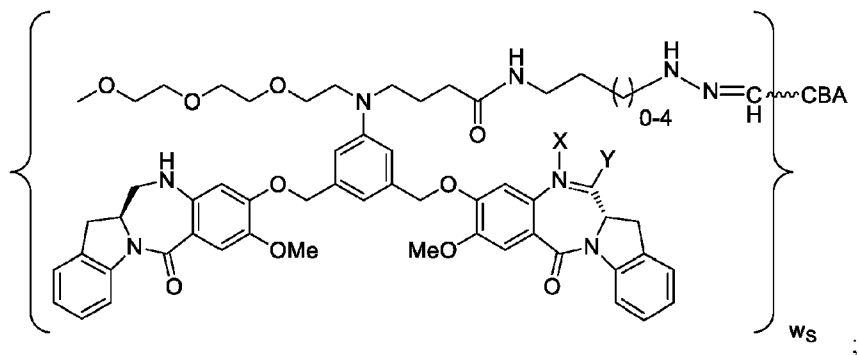
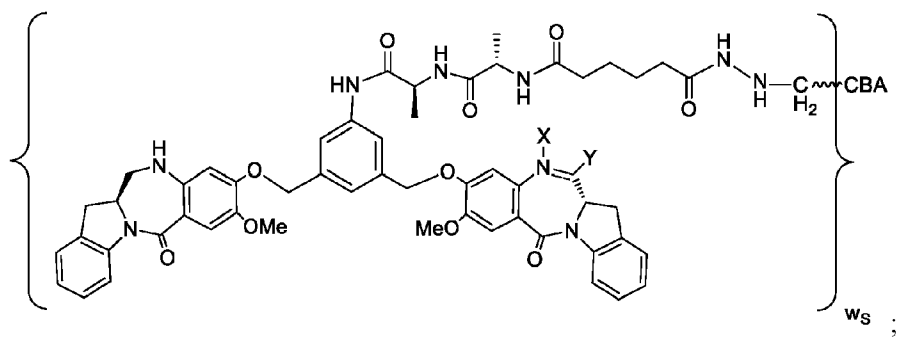
sau

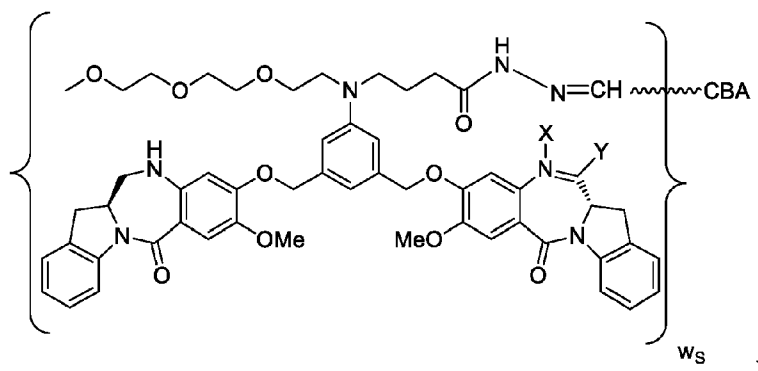


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

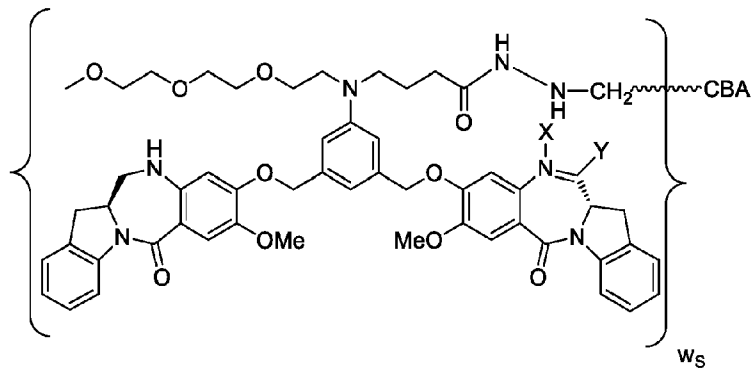
- 5 linia dublă -- dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C_1 - C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau - SO_3M , și M este H^+ sau un cation;
 R_5 este -H sau un alchil(C_1 - C_3);
- 10 P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;
 Z_{d1} este absent, - $C(=O)-NR_9$ -, sau - $NR_9-C(=O)$ -;
 R_9 este -H sau un alchil(C_1 - C_3);
 R_a și R_b , la fiecare apariție, sunt independent -H, alchil(C_1 - C_3), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;
- 15 r și r' sunt independent un întreg de la 1 la 6;
 W' este - $NR^{e'}$;
 $R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
n este un număr întreg de la 2 la 6;
 R^k este -H sau -Me;
- 20 R^{X3} este un alchil(C_1 - C_6);
L este - $NR_9-(CR_aR_b)_r$ sau absent; și
r'' este un număr întreg de la 0 la 6.
- 25 În a 2^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S1), Cy^{s1} este reprezentat de formula (S1a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică.
- 30 În a 3^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S1), Cy^{s1} este reprezentat de formula (S1b); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică. Mai specific, R^{X3} este un alchil(C_2 - C_4).
- 35 În a 4^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S1), R_a și R_b sunt ambii H, și R_5 și R_9 sunt ambii H sau Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a sau a 2^a modalitate de realizare specifică.
- 40 În a 5^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S1), P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a, a 2^a sau a 4^a modalitate de realizare specifică. Într-o modalitate de realizare mai specifică, P este selectată din grupul care constă din Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. Chiar mai specific, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.
- 45 În a 6^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S1), Q este - SO_3M ; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a, a 2^a, a 4^a sau a 5^a modalitate de realizare specifică.
- În a 7^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cea de-a doua modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



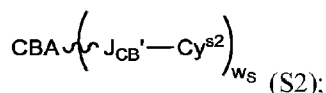




sau

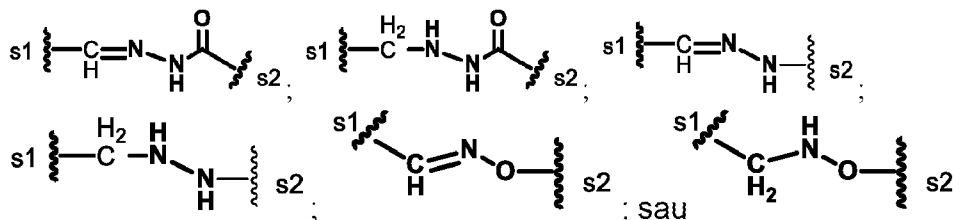


- 5 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau -SO₃M.
- Intr-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃M.
- 10 In a 8^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din prezenta invenție sunt reprezentați de următoarea formulă:



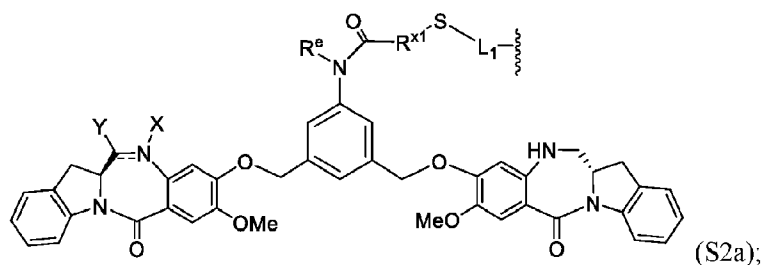
in care:

- CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:
- 15 a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și
- b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37,
- sau o polipeptidă descrisă mai sus;
- 20 $J_{CB'}$ este un fragment format prin reacția unei grupări alchidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxi-etilamină de pe un N-terminal al respectivului anticorp menționat, fragment de legare la antigen al acestuia sau polipeptidă și o grupare reactivă cu alchida de pe Cy^{s2} , și este reprezentat de următoarea formulă:

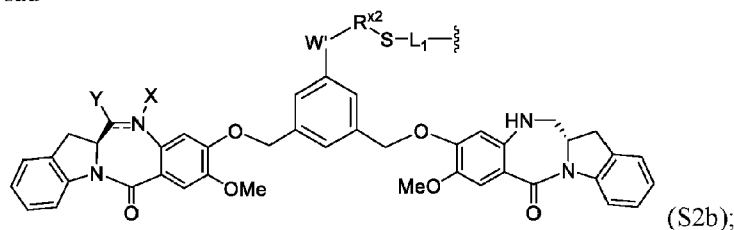


25

in care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s2} ;
 Cy^{s2} este reprezentat de următoarea formulă:

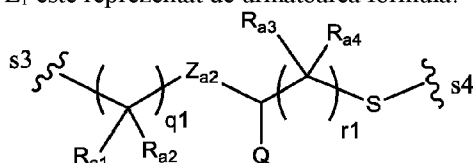


sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

- 5 linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau a alchil(C_1-C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau $-SO_3M$;
M este H^+ sau un cation;
10 R^{x1} este un alchil(C_1-C_6);
 R^e este -H sau alchil(C_1-C_6);
 W' este $-NR^{e'}$;
 $R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
n este un număr întreg de la 2 la 6;
15 R^k este -H sau -Me;
 R^{x2} este un alchil(C_1-C_6);
 L_1 este reprezentat de următoarea formulă:



în care:

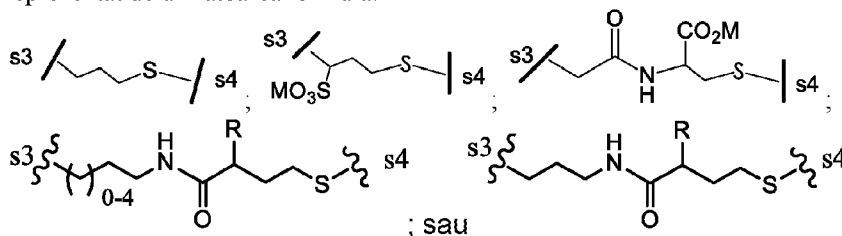
- 20 $s3$ este locul legat covalent la gruparea J_{CB} ;
 $s4$ este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{s2} ;
 Z_{a2} este absent, $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;
 R_9 este -H sau un alchil(C_1-C_3);
Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;
25 R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} , la fiecare apariție, sunt independent H sau alchil(C_1-C_3); și
 $q1$ și $r1$ sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 10, cu condiția ca $q1$ și $r1$ să nu fie ambii 0.

- 30 Într-o modalitate de realizare mai specifică, Z_{a2} este absent; $q1$ și $r1$ sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 3, cu condiția ca $q1$ și $r1$ să nu fie ambii 0; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 8-a dintre modalitățile de realizare specifice. Chiar mai specific, R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} sunt toți -H.

- 35 Într-o altă modalitate de realizare mai specifică, Z_{a2} este $-C(=O)-NH-$, sau $-NH-C(=O)-$; $q1$ și $r1$ sunt fiecare independent un întreg de la 1 la 6; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 8-a dintre modalitățile de realizare specifice. Chiar mai specific, R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} sunt toți -H.

- 40 În a 9-a modalitate de realizare specifică, pentru imunoconjugatul cu formula (S2), Cy^{s2} este reprezentat de formula (S2a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 8-a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

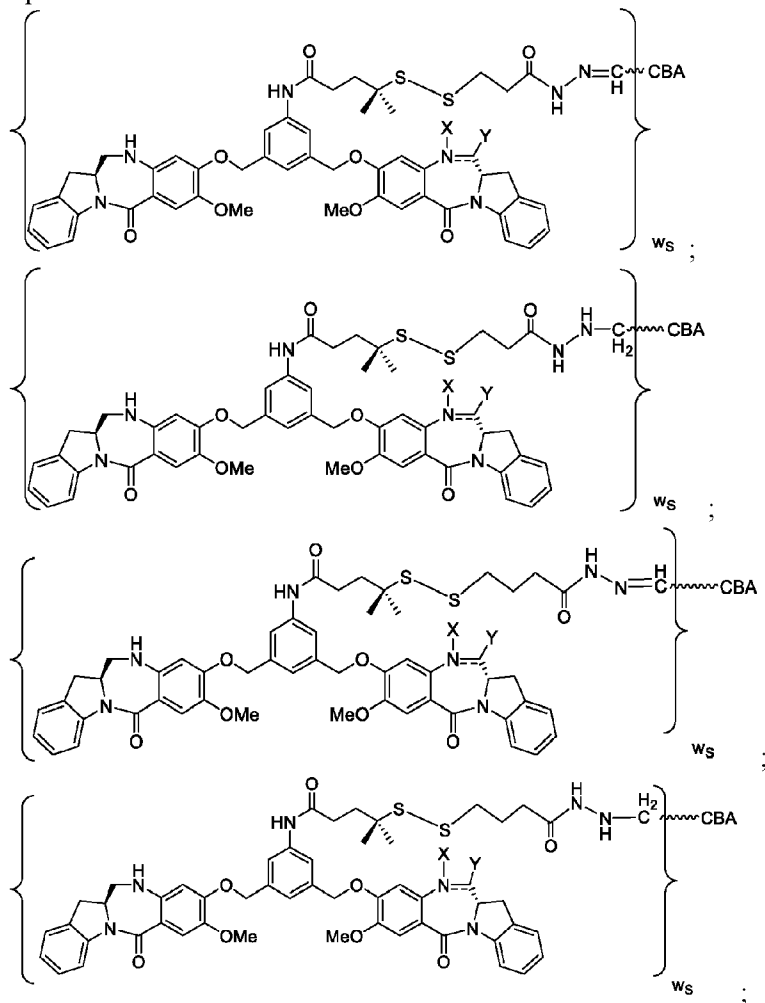
5 In a 11-a modalitate de realizare specifică, pentru imunoconjugatul cu formula (S2), -L₁- este reprezentat de următoarea formulă:

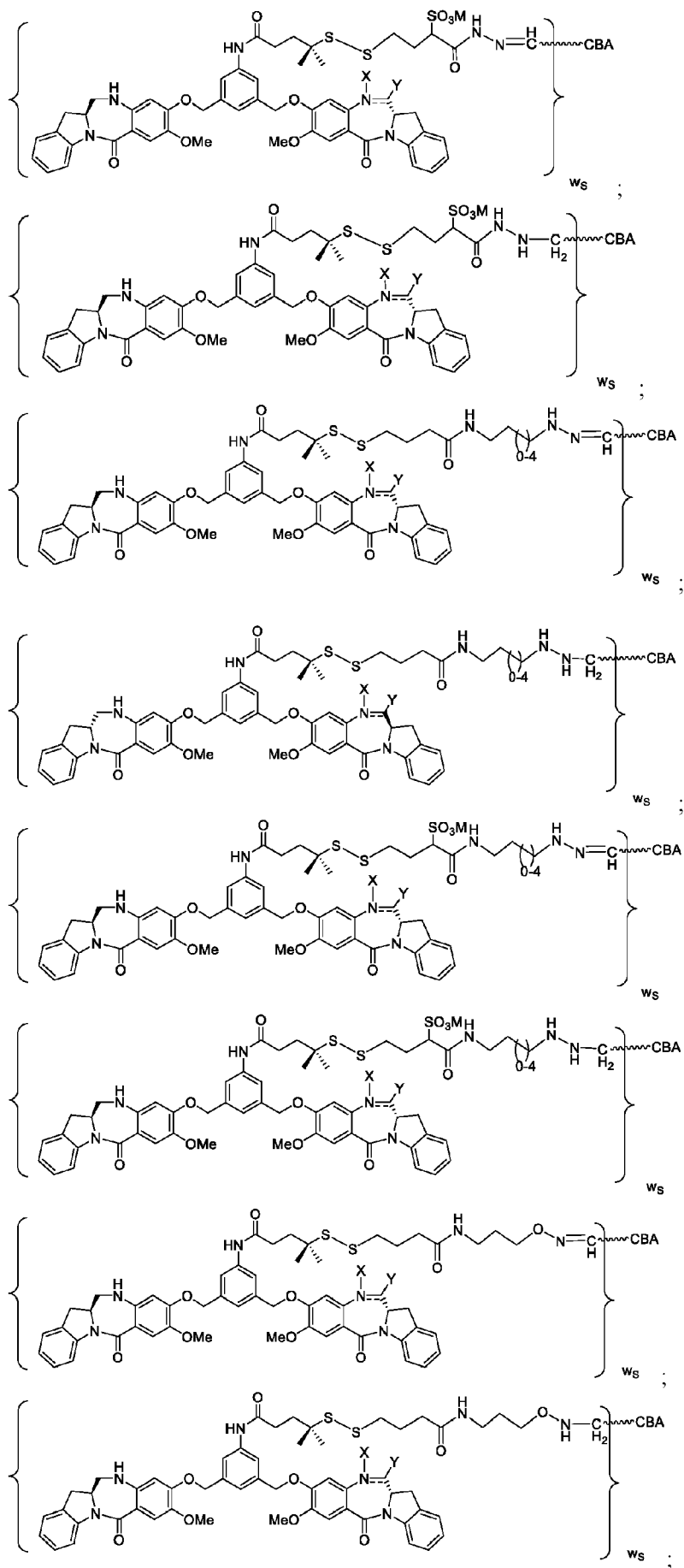


10

15

20



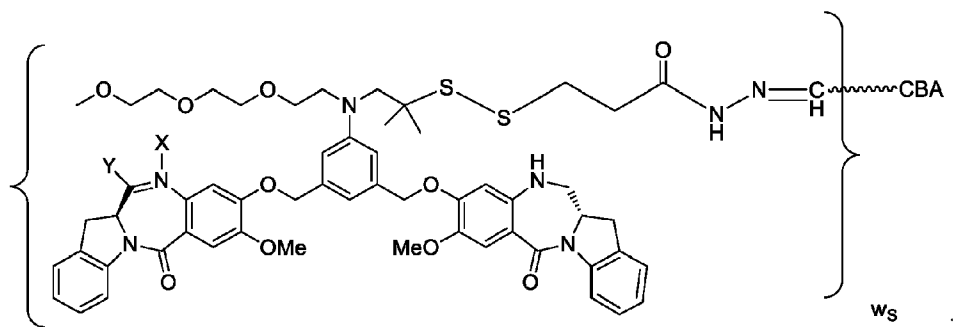
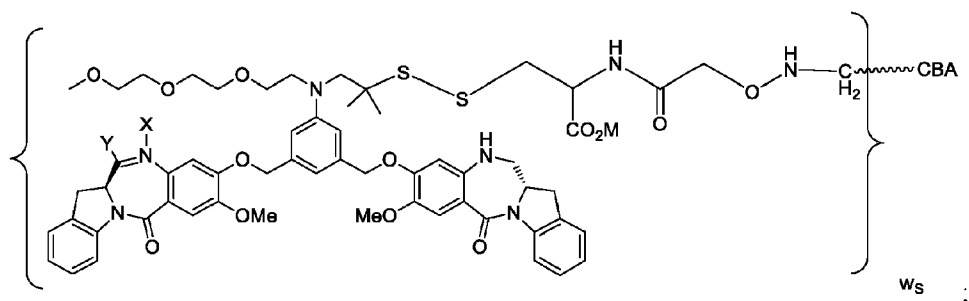




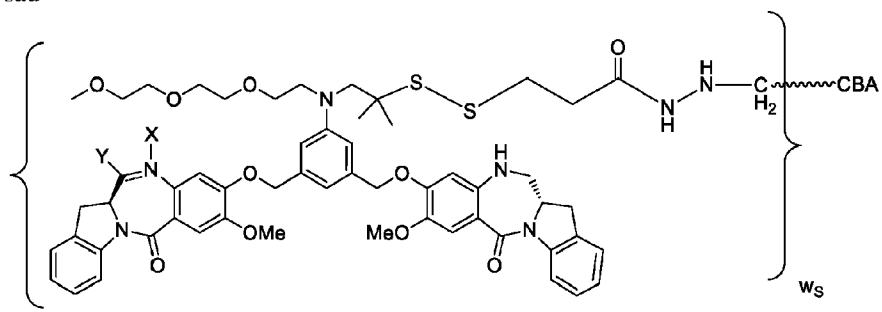
5







sau

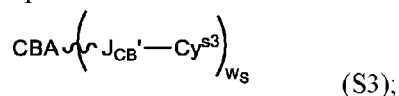


- 5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă -- dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H; și atunci când este o legătură simplă, X este -H; și Y este -OH sau - SO_3M .

Intr-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă -- dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, linia dublă

- 10 -- dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este - SO_3M .

In a 14^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din a doua modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

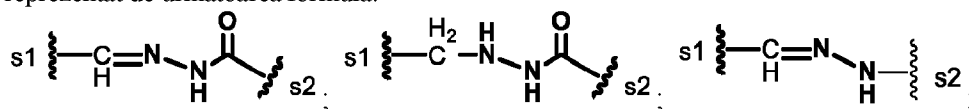


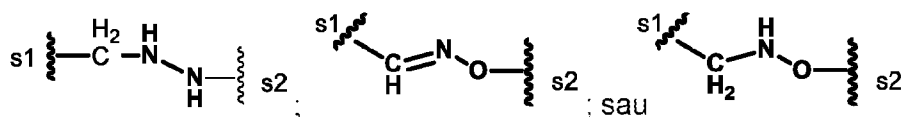
in care:

- 15 CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:
a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și
b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37,

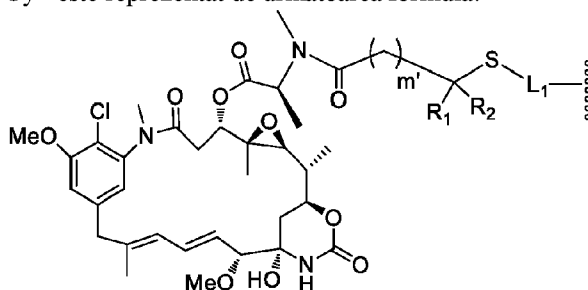
- 20 sau o polipeptidă descrisă mai sus;

$\text{J}_{\text{CB}'}$ este un fragment format prin reacția unei grupări aldehidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxiethylamină de pe un N-terminal a respectivului anticorp menționat, fragment de legare la antigen al acestuia sau polipeptidă și o grupare reactivă cu aldehida de pe Cy^{s3} , și este reprezentat de următoarea formulă:

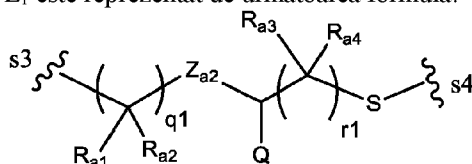




in care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s3}; Cy^{s3} este reprezentat de următoarea formulă:



- 5 in care:
m' este 1 sau 2;
R₁ și R₂, sunt fiecare independent H sau un alchil(C₁-C₃);
L₁ este reprezentat de următoarea formulă:



- 10 in care:
s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB}';
s4 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{s3};
Z_{a2} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;
R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);
15 Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;
R_{a1}, R_{a2}, R_{a3}, R_{a4}, la fiecare apariție, sunt independent H sau un alchil(C₁-C₃); și
q1 și r1 sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 10, cu condiția ca, q1 și r1 să nu fie ambii 0.

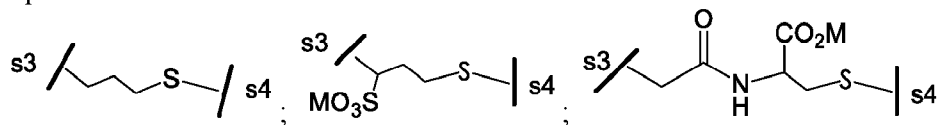
- 20 Intr-o modalitate de realizare mai specifică, Z_{a2} este absent; q1 și r1 sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 3, cu condiția ca q1 și r1 să nu fie ambii 0; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 14^{-a} dintre modalitățile de realizare specifice. Chiar mai specific, R_{a1}, R_{a2}, R_{a3}, R_{a4} sunt toți -H.

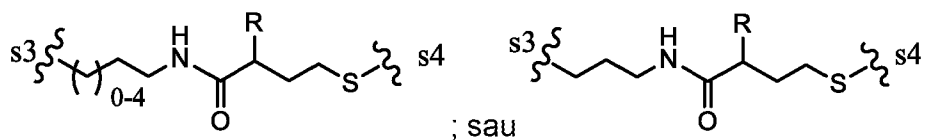
- 25 Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, Z_{a2} este -C(=O)-NH-, sau -NH-C(=O)-;
q1 și r1 sunt fiecare independent un întreg de la 1 la 6; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 14^{-a} dintre modalitățile de realizare specifice. Chiar mai specific, R_{a1}, R_{a2}, R_{a3}, R_{a4} sunt toți -H.

- 30 In a 15^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S3), m' este 1; R₁ și R₂ sunt ambii H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 14^{-a} modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

- 35 In a 16^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S3), m' este 2; R₁ și R₂ sunt ambii Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 14^{-a} modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

In a 17^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S3), -L₁- este reprezentat de următoarea formulă:

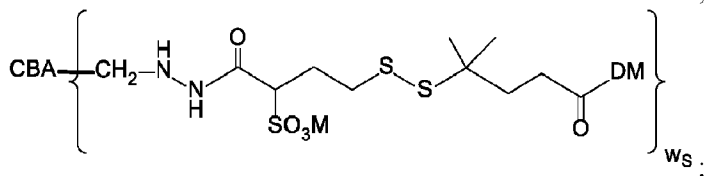
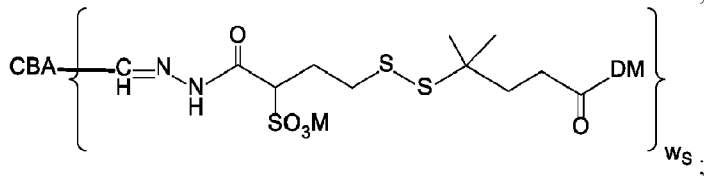
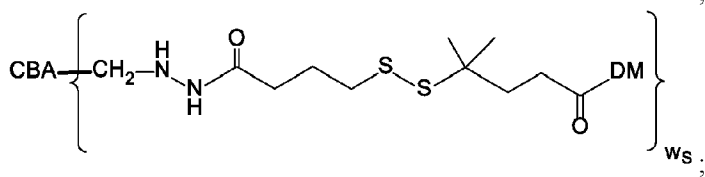
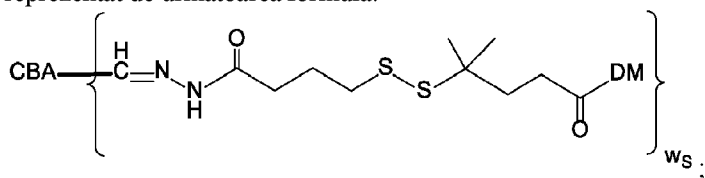




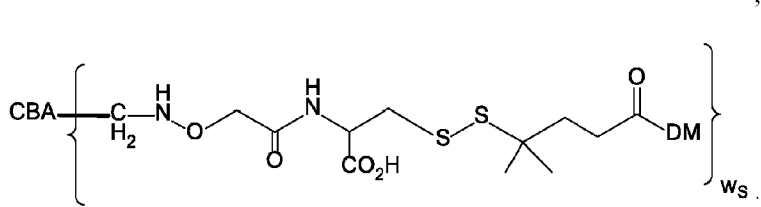
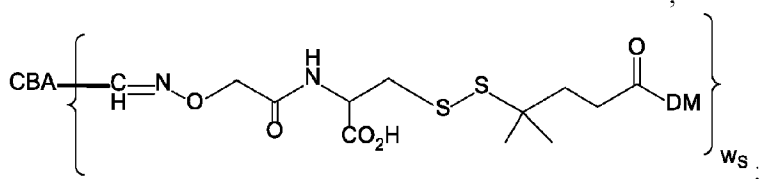
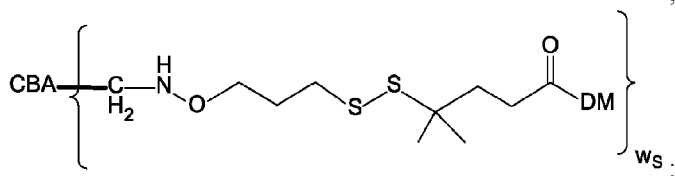
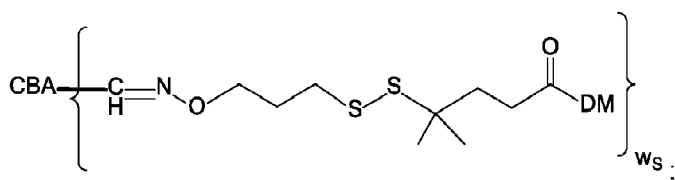
sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care R este H sau $-\text{SO}_3\text{M}$ și M este H^+ sau un cation.

În a 18-a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din a doua modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

5

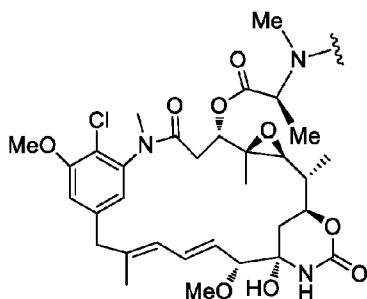


10

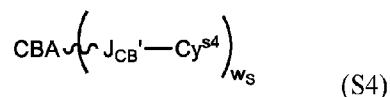


15

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia; în care DM este reprezentat de următoarea formulă:



În a 19-a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din a doua modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



5 în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

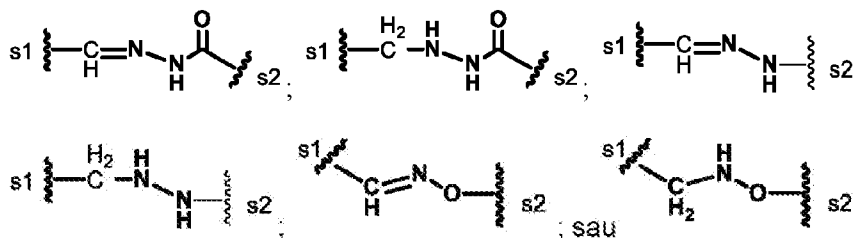
a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

10 b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37,

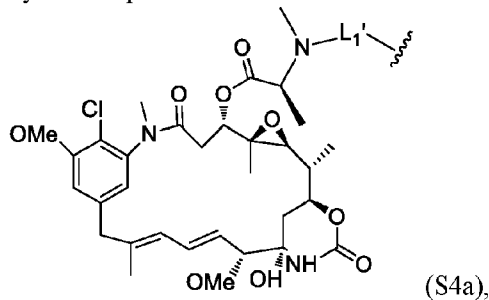
sau o polipeptidă descrisă mai sus;

J_{CB'} este un fragment format prin reacția unei grupări aldehidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxiethylamină de pe un N-terminal al respectivului anticorp menționat, fragment de legare la antigen al acestuia sau polipeptidă și o grupare reactivă cu aldehida de pe Cy^{s4} și este

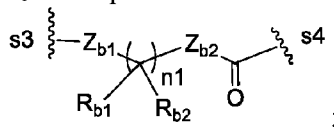
15 reprezentat de următoarea formulă:



20 în care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s4}; Cy^{s4} este reprezentat de următoarea formulă:

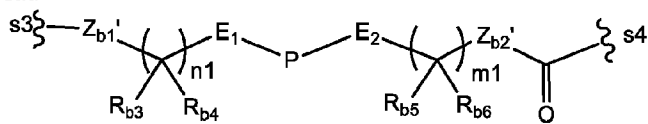


L_{1'} este reprezentat de următoarea formulă:



25

sau



în care:

s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB'};

s4 este locul legat covalent la gruparea -NMe- de pe Cy^{s4};

Z_{b1} și Z_{b2} sunt ambii absenți, sau unul dintre Z_{b1} și Z_{b2} este absent și celălalt este $-\text{CH}_2\text{-O-}$ sau $-\text{O-CH}_2\text{-}$;

Z_{b1}' și Z_{b2}' sunt fiecare independent absent, $-\text{CH}_2\text{-O-}$, $-\text{O-CH}_2\text{-}$, $-\text{NR}_9\text{-C(=O)-CH}_2\text{-}$, sau $-\text{CH}_2\text{-C(=O)-NR}_9\text{-}$;

5 R_9 este H sau alchil($\text{C}_1\text{-C}_3$);

$n1$ și $m1$ sunt fiecare independent un întreg de la 1 la 6;

unul dintre E_1 și E_2 este $-\text{C(=O)-}$, și celălalt este $-\text{NR}_9\text{-}$; sau unul dintre E_1 și E_2 este $-\text{C(=O)-}$ sau $-\text{NR}_9\text{-}$, și celălalt este absent;

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

10 R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} și R_{b6} , la fiecare apariție, sunt fiecare independent H sau un alchil($\text{C}_1\text{-C}_3$).

În a 20^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S4), R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} , și R_{b6} sunt toți H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 19^{-a} modalitate de realizare specifică.

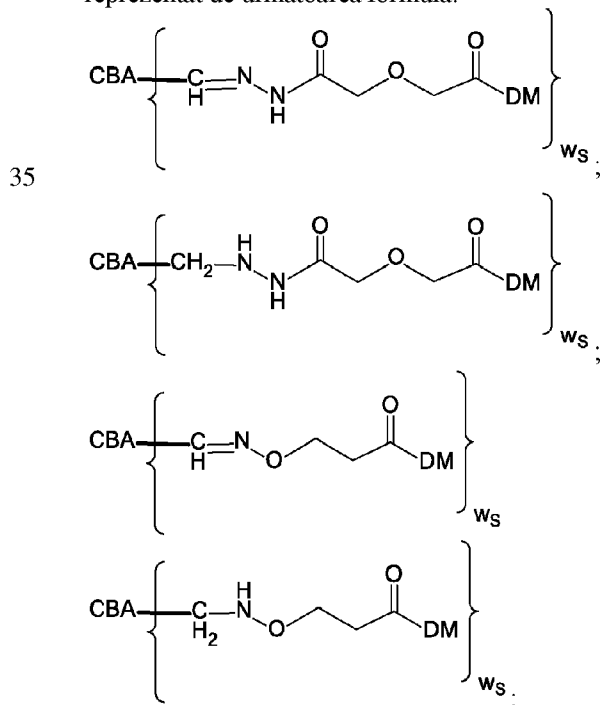
15 În a 21^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S4), R_9 este H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 19^{-a} sau 20^{-a} modalitate de realizare specifică.

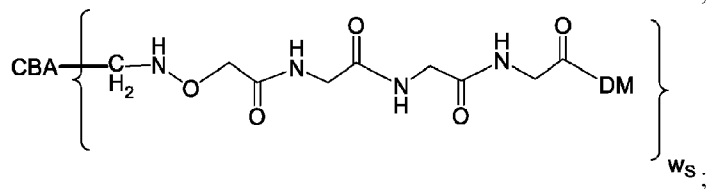
În a 22^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S4), Z_{b1}' și Z_{b2}' sunt ambii absenți; sau Z_{b1}' este $-\text{CH}_2\text{-O-}$ și Z_{b2}' este absent; sau Z_{b1}' este $-\text{CH}_2\text{-C(=O)-NR}_9\text{-}$; și Z_{b2}' este $-\text{O-CH}_2\text{-}$ sau absent; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 19^{-a}, a 20^{-a}

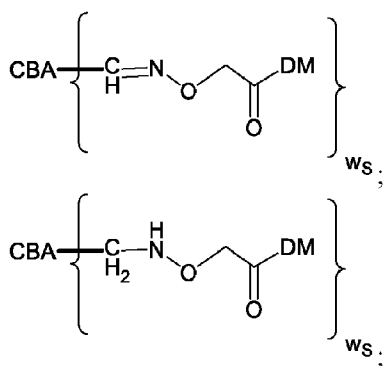
20 sau a 21^{-a} modalitate de realizare specifică.

În a 23^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (S4), P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 19^{-a}, a 20^{-a}, a 21^{-a} sau a 22^{-a} modalitate de realizare specifică. Într-o modalitate de realizare mai specifică, P este selectată din grupul care constă din Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 23^{-a} modalitate de realizare specifică. Chiar mai specific, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

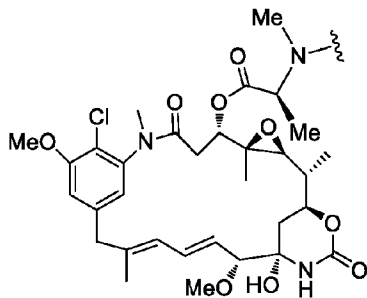
În a 24^{-a} modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din a doua modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:







sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care DM este reprezentat de următoarea formulă structurală:



În a 25^{-a} modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor din al șaselea aspect, M este H⁺, Na⁺ sau K⁺; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în oricare dintre a 1^{-a} la a 24^{-a} modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

În oricare de la 1^{-a} al a 25^{-a} dintre modalitățile de realizare specifice mai sus, anticorpul oxidat în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate avea 1, 2, 3, sau până la 4 fragmente de 2-hidroxietylamină N-terminale oxidate la o grupare(grupări) de aldehydă, pentru legarea covalentă. Fragmentul de 2-hidroxietylamină N-terminal poate fi o parte dintr-o serină, treonină, hidroxilisină, 4-hidroxiornitină sau rest de acid 2,4-diamino-5-hidroxi valeric, preferabil Ser sau Thr. Pentru simplitate, descrierea de mai jos, incluzand reacția de oxidare și orice conjugare ulterioară cu linkeri sau agenți citotoxici, poate face referire la Ser ca un exemplu specific de astfel de resturi de 2-hidroxietylamină N-terminale, dar ar trebui în general interpretate ca referindu-se la toate fragmentele de 2-hidroxietylamină N-terminale. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprind o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină (HCVR) având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină (LCVR) avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde o Ig HCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 38; și o Ig LCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 33, 35, sau 41 (preferabil SECV ID NR: 35). Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde de asemenea o Ig HCVR avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 32, 38, 39, sau 40. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde de asemenea o region a lanțului greu (HC) a Ig având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 53 sau 56; și o Ig LCVR având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 33, 35, sau 41 (preferabil SECV ID NR: 35). Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde de asemenea o region HC a Ig avand secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 48, 50, 53, 54, 56, 59, sau 60 (preferabil SECV ID NR: 53). În anumite modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul din SECV ID NR: 34, 38, 50, 53, 54, sau 56 este Phe, în timp ce în anumite alte modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul din SECV ID NR: 34, 38, 50, 53, 54, sau 56 este Val.

Imunoconjugatii din cel de-al șaselea aspect pot fi preparați printr-o primă metodă care cuprinde reacționare CBA-ul având o aldehydă cu N-terminal descrisă în al șaselea aspect al invenției cu un agent citotoxic având o grupare reactivă cu aldehyda.

Imunoconjugatii din cel de-al șaselea pot fi preparați printr-o a doua metodă care cuprinde reacționare CBA-ul având o aldehydă cu N-terminal din cel de-al șaselea aspect al invenției cu un compus linker având o grupare reactivă cu aldehyda pentru a forma un CBA modificat având un linker legat la acesta, urmată de reacționare CBA-ului modificat cu un agent citotoxic.

Imunoconjugatii din cel de-al șaselea aspect pot fi preparați printr-o a treia metodă care cuprinde contactarea CBA-ul având o aldehydă cu N-terminal din cel de-al șaselea aspect al invenției cu un agent citotoxic urmată de adiația unui compus linker având o grupare reactivă cu aldehyda.

Imunoconjugatii din cel de-al șaselea aspect pot fi preparați printr-o a patra metodă care cuprinde etapele de:

- (a) oxidare a CBA-ul avand un fragment de 2-hidroxietylamină cu N-terminal (*de exemplu*, Ser/Thr) cu un agent de oxidare pentru a forma un CBA oxidat având o grupare aldehydică cu N-terminal; și
- (b) reacționare CBA-ului oxidat avand gruparea aldehydică cu N-terminal cu un agent citotoxic având o grupare reactivă cu aldehyda.

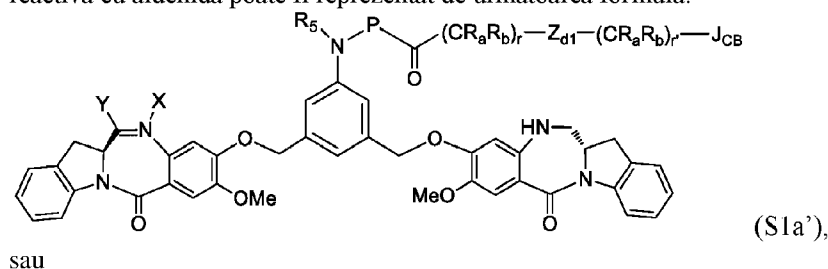
Imunoconjugatii din cel de-al șaselea aspect pot fi preparați printr-o a cincea metodă care cuprinde etapele de:

- (a) oxidare a CBA-ul avand un fragment de 2-hidroxietylamină cu N-terminal (*de exemplu*, Ser/Thr) cu un agent de oxidare pentru a forma un CBA oxidat având o grupare aldehydică cu N-terminal;
- (b) reacționare CBA-ului oxidat având gruparea aldehydică cu N-terminal cu un compus linker avand o grupare reactivă cu aldehyda pentru a forma un CBA modificat având un linker legat la acesta, urmată de reacționare CBA-ului modificat cu un agent citotoxic.

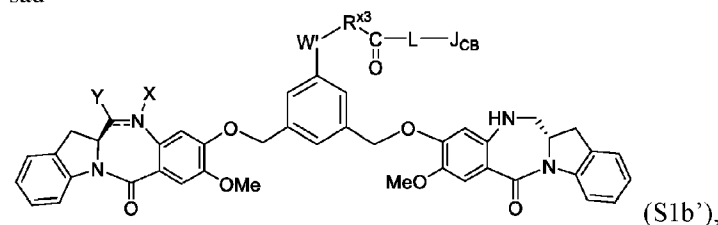
Imunoconjugatii din cel de-al șaselea aspect pot fi preparați printr-o a șasea metodă care cuprinde etapele de:

- (a) oxidare a CBA-ul avand un fragment de 2-hidroxietylamină cu N-terminal (*de exemplu*, Ser/Thr) cu un agent de oxidare pentru a forma un CBA oxidat având o grupare aldehydică cu N-terminal;
- (b) contactarea CBA-ului oxidat având gruparea aldehydică cu N-terminal cu un agent citotoxic urmată de adiația unui compus linker având o grupare reactivă cu aldehyda.

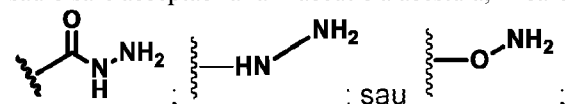
Pentru prima sau a patra metodă descrisă mai sus, agentul citotoxic având o grupare reactivă cu aldehyda poate fi reprezentat de următoarea formulă:



sau

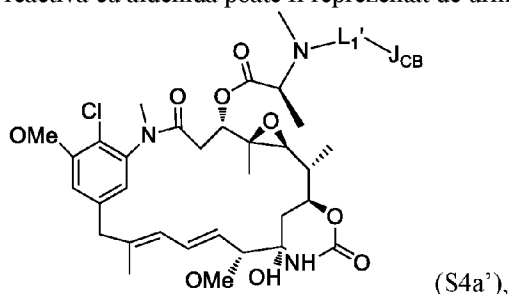


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care J_{CB} este reprezentat de următoarea formulă:



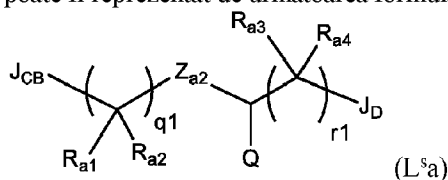
și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în oricare dintre 1^a la a 7^a și a 25^a dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

- 5 Pentru prima sau a patra metodă descrisă mai sus, agentul citotoxic având o grupare reactivă cu aldehida poate fi reprezentat de următoarea formulă:

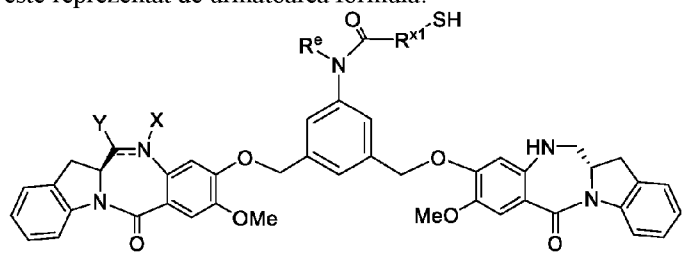


- 10 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care J_{CB} este astfel cum este descris mai sus și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în oricare dintre a 19^a la a 25^a dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

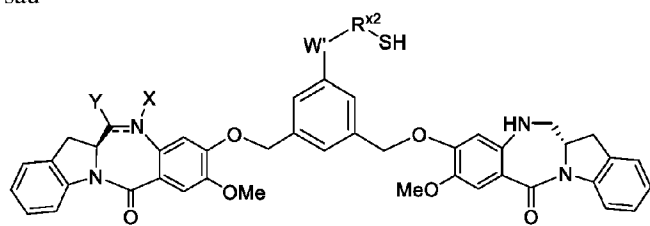
Pentru a doua, a treia, a cincea sau a șasea metodă descrisă mai sus, compusul linker poate fi reprezentat de următoarea formulă:



- 15 în care J_D-SH, -SSR^d, sau -SC(=O)R^g; R^d este fenil, nitrofenil, dinitrofenil, carboxinitrofenil, piridil sau nitropiridil; R^g este un alchil; J_{CB} este astfel cum este descris mai sus; agentul citotoxic este reprezentat de următoarea formulă:

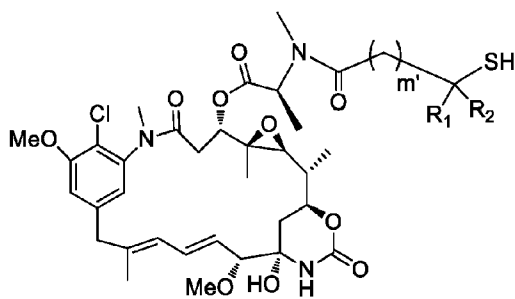


- 20 sau



- 25 și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în oricare dintre a 8^a la a 13^a și a 25^a dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

Pentru a doua, a treia, a cincea sau a șasea metodă descrisă mai sus, compusul linker poate fi reprezentat de formula (L^{5a}) mai sus; compusul citotoxic poate fi reprezentat de următoarea formulă:



și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în oricare dintre a 14^{-a} la a 18^{-a} și a 25^{-a} dintre modalitățile de realizare specifice și oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

5

Pentru prima sau a patra dintre metodele descrise mai sus, agentul citotoxic poate fi reacționat cu un reactant reactiv cu imina, cum ar fi NaHSO₃, pentru a forma un agent citotoxic modificat înainte de reacționarea cu CBA-ului oxidat având aldehida cu N-terminal. Agentul citotoxic modificat nu necesită să fie purificat înainte de reacționarea cu CBA-ul oxidat având aldehida cu N-terminal. Alternativ, agentul citotoxic modificat poate fi purificat înainte de reacționarea cu CBA-ul oxidat având aldehida cu N-terminal.

10

Pentru a doua sau a cincea metodă descrisă mai sus, agentul citotoxic poate fi reacționat cu un reactant reactiv cu imina, cum ar fi NaHSO₃, pentru a forma un agent citotoxic modificat înainte de reacționarea cu CBA-ul modificat având un linker legat la acesta. Agentul citotoxic modificat poate fi purificat înainte de reacționarea cu CBA-ul modificat având un linker legat la acesta. Alternativ, agentul citotoxic modificat se poate să nu fie purificat înainte de reacționarea cu CBA-ul oxidat având aldehida cu N-terminal.

15

Pentru a treia sau a șasea dintre metodele descrise mai sus, reacția de oxidare a CBA-ului, cu agentul citotoxic și compusul linker poate fi efectuată în prezența unui reactant reactiv cu imina, cum ar fi NaHSO₃.

20

Orice agent de oxidare adecvat poate fi utilizat în etapa (a) a celei de-a patra, a cincea sau a șasea metodă descrisă mai sus. Agentul de oxidare poate fi un periodat. Mai specific, agentul de oxidare poate fi periodat de sodiu.

25

Se poate utiliza un exces molar de echivalenți de agent de oxidare în raport cu CBA-ul. Se pot utiliza aproximativ 2-100, 5-80, 10-50, 1-10 sau 5-10 echivalenți molari de agent de oxidare. Se pot utiliza aproximativ 10 sau aproximativ 50 echivalenți de agent de oxidare. Atunci când se utilizează o cantitate mare de agent de oxidare, se utilizează un timp de reacție scurt pentru a se evita supraoxidarea. De exemplu, atunci când se utilizează 50 echivalenți de agent de oxidare, reacția de oxidare se efectuează timp de aproximativ 5 la aproximativ 60 minute. Alternativ, atunci când se utilizează 10 echivalenți de agent de oxidare, reacția se efectuează timp de aproximativ 30 minute la aproximativ 24 de ore. Se pot utiliza 5-10 echivalenți molari de agent de oxidare și reacția de oxidare poate fi efectuată timp de aproximativ 5 la aproximativ 60 minute (*de exemplu*, aproximativ 10 la aproximativ 30 minute, aproximativ 20 la aproximativ 30 minute).

30

35

În reacție poate fi prezent un catalizator în prima, a doua sau a treia metodă descrise mai sus sau în reacția etapei (b) în a patra, a cincea sau a șasea metodă descrise mai sus. Poate fi utilizat orice catalizator adecvat în domeniu. Catalizatorul poate fi o anilină sau o anilină substituită. Un catalizator de anilină exemplar include, dar nu se limitează la, anilină, o-fenilendiamină, m-fenilendiamină, acid 3,5-diaminobenzoic, p-fenilendiamină, 2-metil-p-fenilendiamină, N-metil-p-fenilendiamină, o-aminofenol, m-aminofenol, p-aminofenol, p-metoxianilină, acid 5-metoxi-antranilic, acid o-aminobenzoid, și 4-aminofenetilalcool. Catalizatorul poate fi 4-aminofenetilalcool. Reacția din etapa (b) poate fi efectuată la un pH de aproximativ 5,0 la aproximativ 6,5. Reacția din etapa (b) poate fi efectuată la un pH de aproximativ 5,0.

40

45

Pentru reacția din prima, a doua sau a treia metodă descrise mai sus sau din reacția din etapa (b) din a patra, a cincea sau a șasea metodă descrise mai sus, compusul având o grupare reactivă cu aldehida (*de exemplu*, agentul citotoxic, sau compusul linker descris aici) poate fi

50

utilizat în exces molar în raport cu agentul de legare la celulă oxidat (*de exemplu*, anticorp oxidat sau porțiune de legare a antigenului oxidată). Raportul dintre compusul având o grupare reactivă cu aldehida și agentul de legare la celulă oxidat poate fi între aproximativ 10:1 și aproximativ 1,1:1, între aproximativ 5:1 și aproximativ 2:1. Raportul poate fi de aproximativ 4:1.

5

Intr-un al șaptelea aspect, imunoconjugatăii din prezenta invenție cuprind un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

10 a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

15 sau o polipeptidă descrisă mai sus, legată covalent la un agent citotoxic descris aici prin gruparea tiol (-SH) a unui sau mai multor resturi de cisteină localizate pe anticorp, fragment de legare la antigen, sau polipeptidă.

În 1^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al șaptelea aspect este reprezentat de următoarea formulă:

CBA(Cy^{C1})_{WC} (C1),

în care:

20 CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

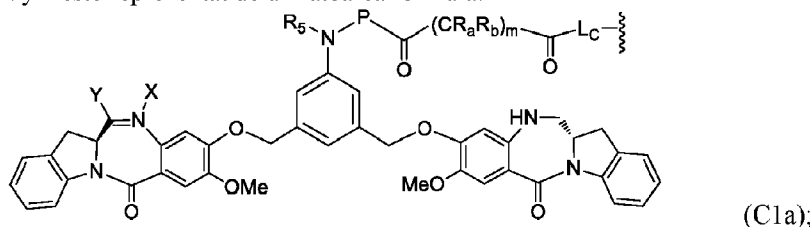
a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

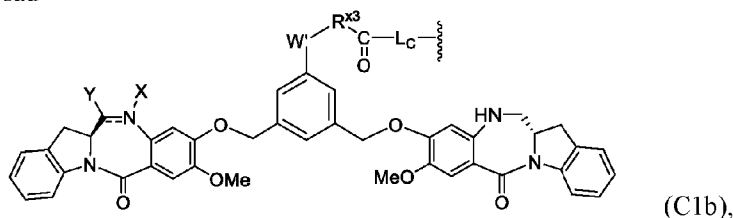
25 sau o polipeptidă descrisă mai sus, legată covalent la Cy^{C1} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



30

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă = - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -

35 SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R₅ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;

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

40 W' este -NR^{e'},

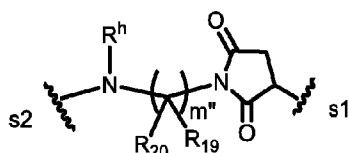
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un alchil(C₁-C₆); și,

45 L_C este reprezentat de:



în care s1 este locul legat covalent la CBA, și s2 este locul legat covalent la gruparea -C(=O)- pe Cy^{C1}; în care:

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

5 m" este un număr întreg între 1 și 10; și

R^h este -H sau un alchil(C₁-C₃).

În a 2^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică.

10 În a 3^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1b); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a modalitate de realizare specifică.

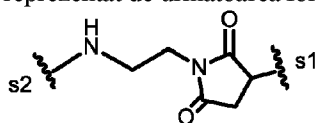
În a 4^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatului cu formula (C1), Cy^{C1} este reprezentat de formula (C1a); R_a și R_b sunt ambii H; și R₅ este H sau Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a sau a 2^a modalitate de realizare specifică.

15 În a 5^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatului cu formula (C1), P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a, a 2^a sau a 4^a modalitate de realizare specifică. Într-o modalitate de realizare mai specifică, P este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. Într-o altă modalitate de realizare mai specifică, P este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

În a 6^a modalitate de realizare specifică a imunoconjugatelor cu formula (C1), Q este -SO₃M; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 1^a, a 2^a, a 4^a sau a 5^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

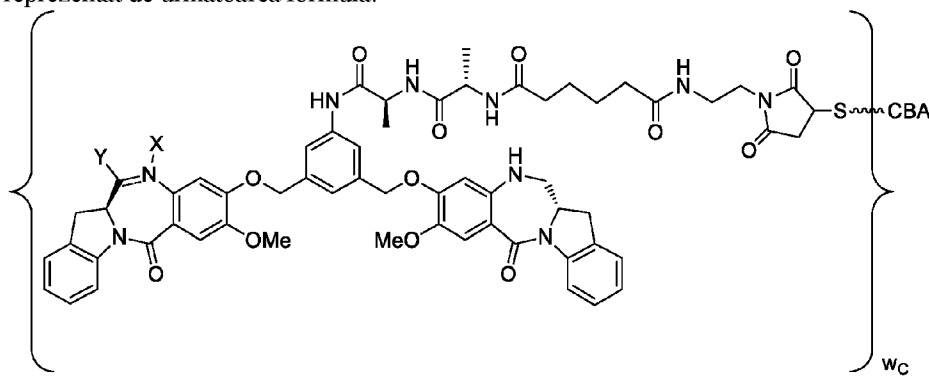
30 În a 7^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C1), R₁₉ și R₂₀ sunt ambii H; și m" este un număr întreg de la 1 la 6; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a, 2nd, 3^a, 4^a, 5^a sau 6^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

În a 8^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C1), -L-Lc- este reprezentat de următoarea formulă:

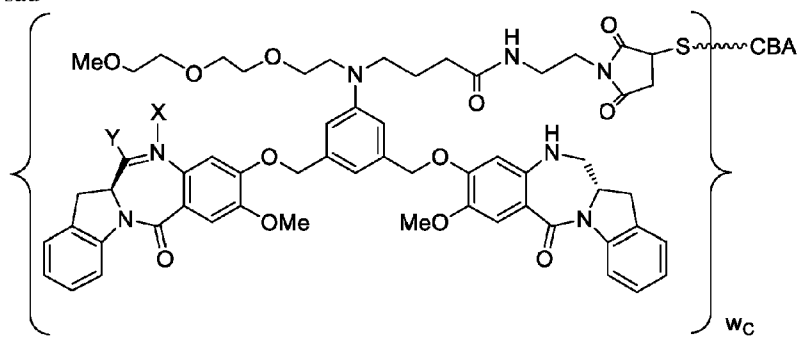


și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în 1^a, a 2^a, a 3^a, a 4^a, a 5^a, a 6^a sau a 7^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

40 În a 9^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al șaptelea aspect este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau -SO₃M.

Intr-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃M.

In a 10⁻⁸ modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cea de-a treia modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

CBA(Cy^{C2})_{wC} (C2),

în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

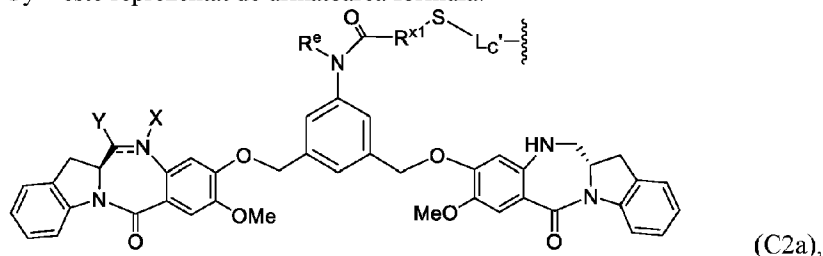
a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

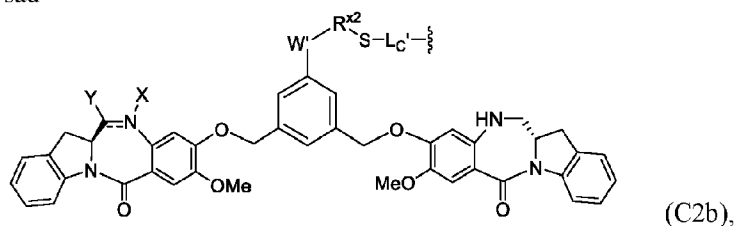
sau o polipeptidă descrisă mai sus, legată covalent la Cy^{C2} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă $--$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R^{x1} este un alchil(C₁-C₆);

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

W' este -NR^{e'};

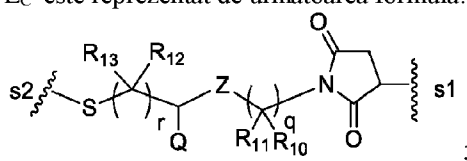
R^{e'} este -(CH₂-CH₂)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

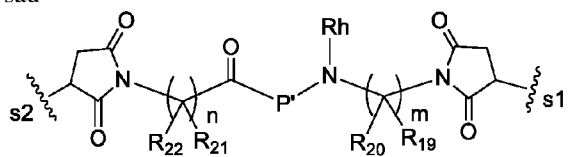
R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un alchil(C_1-C_6);

L_c' este reprezentat de următoarea formulă:



sau



in care:

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

Z este $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;

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

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

q și r, la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

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

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

Intr-o modalitate de realizare mai specifică, q și r sunt fiecare independent un întreg între 1 și 6, mai specific, un întreg între 1 și 3. Chiar mai specific, R_{10} , R_{11} , R_{12} și R_{13} sunt toți H.

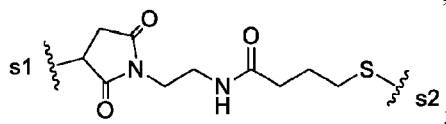
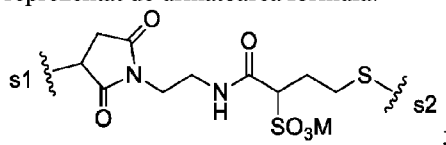
Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, m și n sunt fiecare independent un întreg între 1 și 6, mai specific, un întreg între 1 și 3. Chiar mai specific, R_{19} , R_{20} , R_{21} și R_{22} sunt toți H.

In a 11^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (C2), Cy^{C2} este reprezentat de formula (C2a); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 10^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

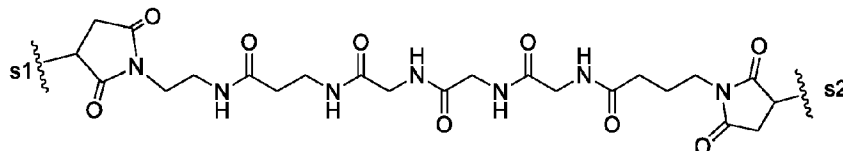
In a 12^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (C2), Cy^{C2} este reprezentat de formula (C2b); și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 10^a modalitate de realizare specifică.

In a 13^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (C2), P' este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în a 10^a, 11^a sau 12^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici. Intr-o modalitate de realizare mai specifică, P' este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, P' este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

In a 14^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu formula (C2), $-Lc'$ este reprezentat de următoarea formulă:

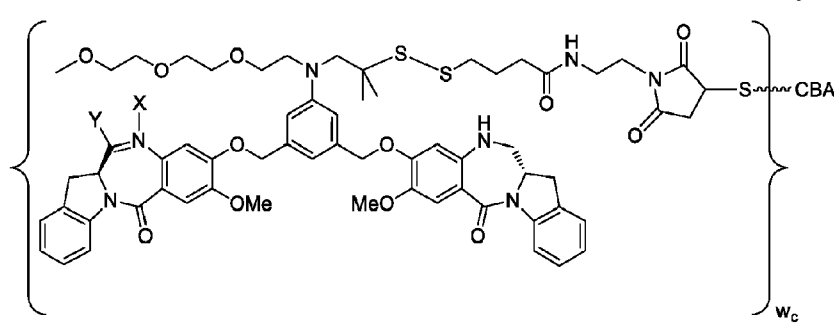
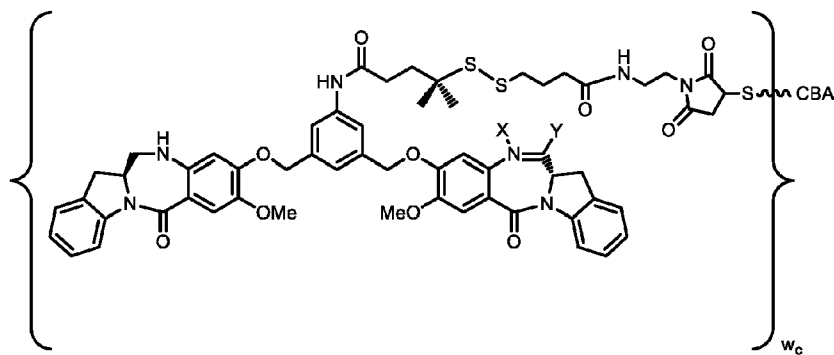
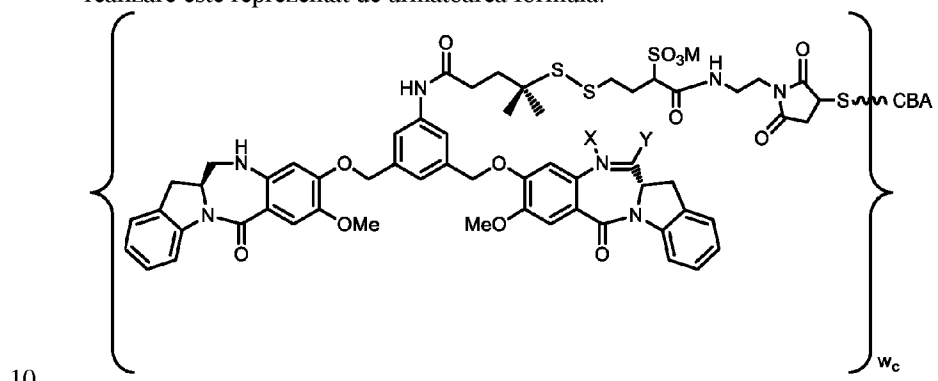


sau

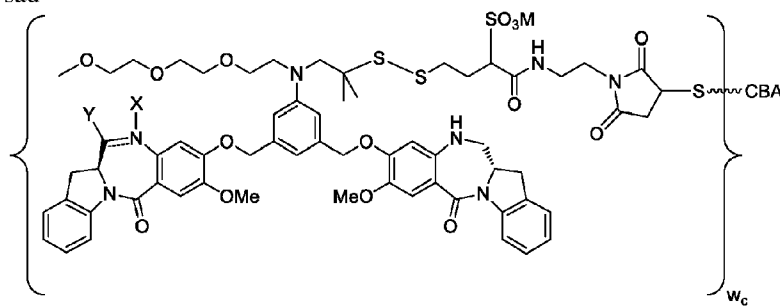


- 5 In a 15^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatilor cu (C2), R^e este H sau Me; R^{x1} este - (CH₂)_p-(CR^fR^g)-, și R^{x2} este -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, in care R^f și R^g sunt fiecare independent -H sau un alchil(C₁-C₄); și p este 0, 1, 2 sau 3; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in cea de-a 10^a, a 11^a, a 12^a, 13^a, sau a 14^a modalitate de realizare specifică. Mai specific, R^f și R^g sunt identici sau diferiți, și sunt selectați dintre -H și -Me.

In a 16^a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cea de-a treia modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă $\overline{\text{--}}$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau -SO₃M.

- Intr-o modalitate de realizare mai specifică, linia dublă $\overline{\text{--}}$ dintre N și C reprezintă o legătură dublă, X este absent și Y este -H. Intr-o altă modalitate de realizare specifică, linia dublă $\overline{\text{--}}$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă, X este -H și Y este -SO₃M.

În a 17-a modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cea de-a treia modalitate de realizare este reprezentat de următoarea formulă:

- 10 CBA(Cy^{C3})_{WC} (C3),
în care:

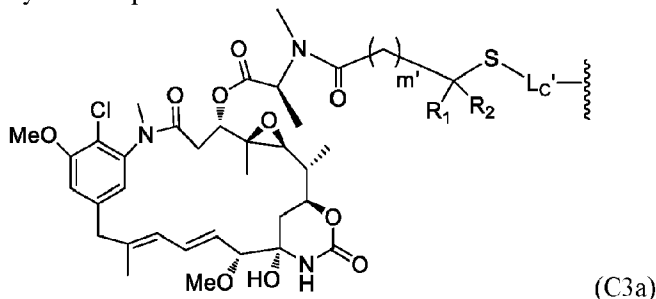
CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

- a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și
15 b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

sau o polipeptidă descrisă mai sus, legată covalent la Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:



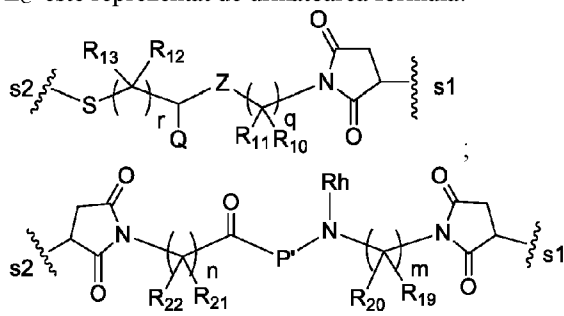
20

în care:

m' este 1 sau 2;

R₁ și R₂, sunt fiecare independent -H sau a (C₁-C₃)alchil;

L_{C'} este reprezentat de următoarea formulă:



25

în care:

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

Z este -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

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

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

q și r, la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

- 35 R^h este -H sau un alchil(C₁-C₃); și

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

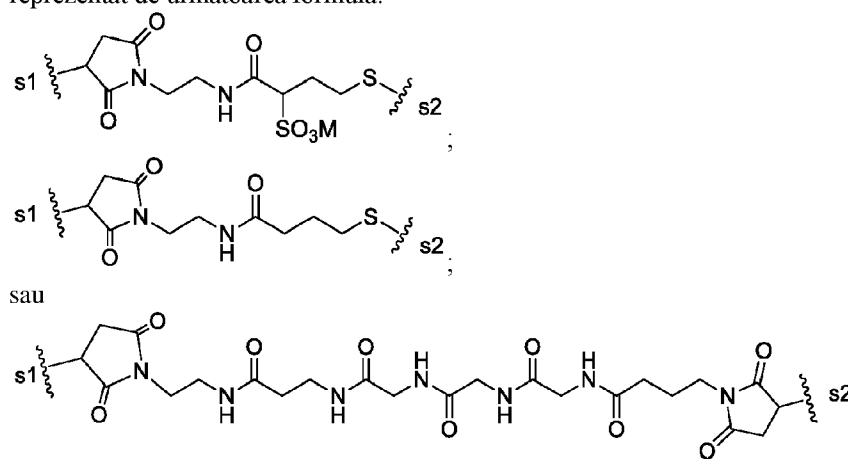
Intr-o modalitate de realizare mai specifică, q și r sunt fiecare independent un întreg între 1 și 6, mai specific, un întreg de la 1 la 3. Chiar mai specific, R₁₀, R₁₁, R₁₂ și R₁₃ sunt toți H.

40

Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, m și n sunt fiecare independent un întreg între 1 și 6, mai specific, un întreg de la 1 la 3. Chiar mai specific, R₁₉, R₂₀, R₂₁ și R₂₂ sunt toți H.

In a 18^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C3), P' este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in a 17^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici. Intr-o modalitate de realizare mai specifică, P' este selectat dintre Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 55), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SECV ID NR: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (SECV ID NR: 73), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, și Met-Ala. Intr-o altă modalitate de realizare mai specifică, P' este Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, sau D-Ala-D-Ala.

In a 19^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C3), -Lc'- este reprezentat de următoarea formulă:

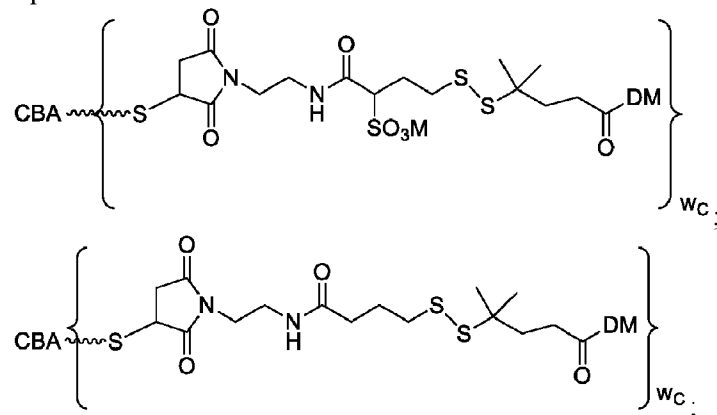


in care M este H⁺ sau un cation; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 17^a sau a 18^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

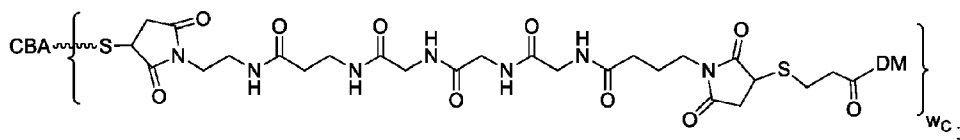
In a 20^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C3), m' este 1 și R₁ și R₂ sunt ambii H; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus in a 17^a, a 18^a sau a 19^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

In a 21^a modalitate de realizare specifică, a imunoconjugatelor cu formula (C3), m' este 2 și R₁ și R₂ sunt ambii Me; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în a 17^a, a 18^a sau a 19^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

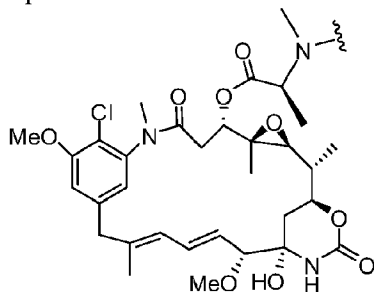
In a 22nd modalitate de realizare specifică, imunoconjugatul din cel de-al șaptelea aspect este reprezentat de următoarea formulă:



sau



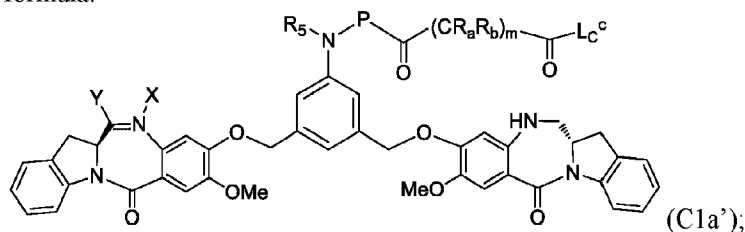
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care DM este un fragment de medicament reprezentat de următoarea formulă:



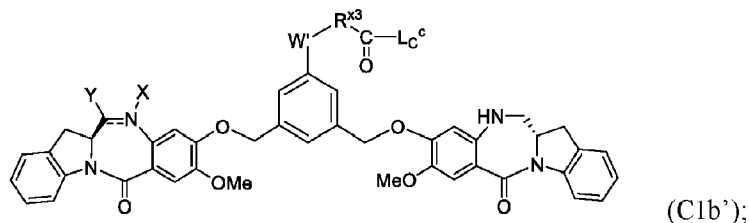
- 5 In a 23^a modalitate de realizare a imunoconjugatilor din cel de-al șaptelea aspect, M este H⁺, Na⁺ sau K⁺; și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise în oricare dintre a 1^a la a 22^a dintre modalitățile de realizare specifice sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.
- 10 In oricare dintre 1^a la a 23^a modalitate de realizare specifică de mai sus dintre, anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprind o regiune a lanțului greu de imunoglobulină (HC) având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină (LCVR) având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia, sau
- 15 polipeptida care cuprinde anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia, are un rest de Cys într-o locație corespunzătoare Cys-ului modificat din domeniul CH3 al lanțului greu (*adică*, de la al 5^a la ultimul rest) din SECV ID NR: 54. Anticorpul în cauză sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate cuprinde o Ig LCVR având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 33, 37, sau 41 (preferabil SECV ID NR: 37). Anticorpul în cauză sau fragmentul de
- 20 legare la antigen al acestuia poate cuprinde de asemenea o regiune a lanțului greu de Ig având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 56; și o Ig LCVR având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 33, 37, sau 41 (preferabil SECV ID NR: 37). În anumite modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54 și 56 este Phe, în timp ce în anumite alte modalități de realizare, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54 și 56 este Val.
- 25 Imunoconjugatii din cel de-al șaptelea aspect descris mai sus (*de exemplu*, imunoconjugatii oricăruia dintre 1^a la a 23^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici) pot fi preparați prin reacționare CBA-ul având una sau mai multe cisteine libere cu un agent citotoxic având o grupare reactivă la tiol descrisă aici.

30

Agentul citotoxic având o grupare reactivă la tiol poate fi reprezentat de următoarea formulă:

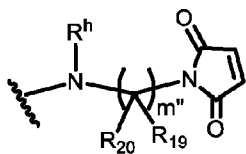


sau



35

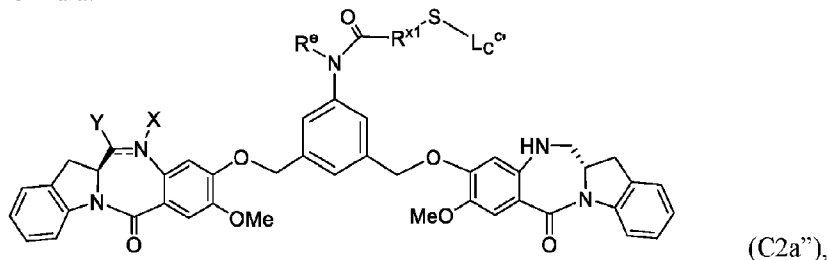
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care -Lc^c este reprezentat de următoarea formulă:



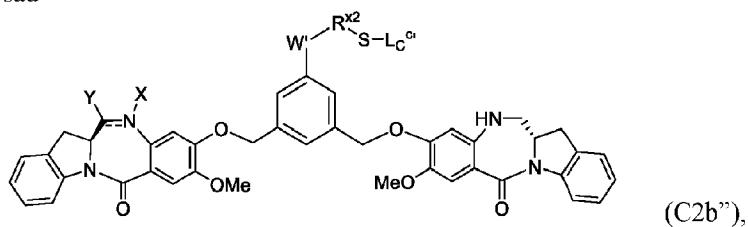
in care variabilele sunt astfel cum sunt descrise mai sus in oricare dintre 1^a la a 9^a și a 23^a dintre modalitățile de realizare specifice sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

5

Agentul citotoxic având o grupare reactivă la tiol poate fi reprezentat de următoarea formulă:

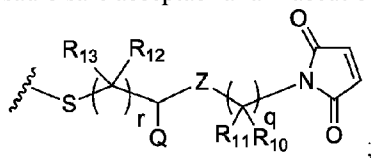


sau

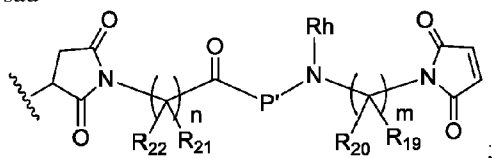


10

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care Lc^c este reprezentat de următoarea formulă:



sau

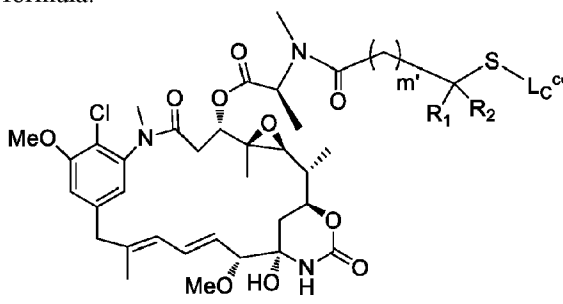


15

in care variabilele sunt astfel cum sunt descrise mai sus in oricare dintre a 10^a la a 16^a și a 23^a modalitate de realizare specifică sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

20

Agentul citotoxic având o grupare reactivă la tiol poate fi reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, in care Lc^c este descrisă mai sus și variabilele rămase sunt astfel cum au fost descrise mai sus în oricare dintre a 17^a la a 23^a dintre modalitățile de realizare specifice sau oricare dintre modalitățile de realizare mai specifice descrise aici.

25

În reacția CBA-ului cu agentul citotoxic se pot utiliza solvenți organici pentru a solubiliza agentul citotoxic. Solvenții organici exemplari includ, dar nu se limitează la, dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol etc. Reacția CBA-ului cu agentul citotoxic poate fi efectuată în prezență de DMA și propilenglicol.

5

4. Compoziții și metode de utilizare

Prezenta invenție include o compoziție farmaceutică care cuprinde anticorp în cauză sau fragmente de legare la antigeni ale acestora, sau imunoconjugată ai acestora (*de exemplu*, conjugată cu formulele (L1), (L2), (L3), (S1), (S2), (S3), (S4), (C1), (C2), și (C3)) descrise aici, și un purtător acceptabil farmaceutic. Prezenta invenție include, de asemenea, o compoziție farmaceutică care cuprinde anticorp în cauză sau fragmente de legare la antigeni ale acestora, sau un conjugat cu formulele (L1), (L2), (L3), (S1), (S2), (S3), (S4), (C1), (C2), și (C3)), și un purtător acceptabil farmaceutic, și care cuprinde în plus un al doilea agent terapeutic. Prezentele compoziții sunt utile pentru inhibarea creșterii celulare anormale sau pentru tratarea unei tulburări proliferative la un mamifer (*de exemplu*, uman), incluzând cancer hematologic, leucemie, sau limfom.

15

În particular, prezenta invenție redă compoziții farmaceutice care cuprind unul sau mai mulți dintre agenții de legare a CD123 sau imunoconjugată ai acestora descriși aici. În anumite modalități de realizare, compozițiile farmaceutice cuprind în plus un vehicul acceptabil farmaceutic. Aceste compoziții farmaceutice își găsesc utilizarea în inhibarea creșterii tumorii și tratarea cancerului la pacienții umani, inclusiv cancer hematologic, leucemie sau limfom.

20

Formulările pot fi preparate pentru depozitare și utilizare prin combinarea unui anticorp purificat sau a unui imunoconjugat conform prezentei invenții cu un vehicul acceptabil farmaceutic (*de exemplu* purtător, excipient) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Vehiculele acceptabile farmaceutice adecvate includ, dar nu se limitează la, tamponi netoxici cum ar fi fosfat, citrat, și alți acizi organici; săruri cum ar fi clorură de sodiu; antioxidanți incluzând acid ascorbic și metionină; conservanți (*de exemplu* clorură de octadecildimetilbenzil amoniu; clorură de hexametoni; clorură de benzalconiu; clorură de benzetoniu; fenol, alcool butilic sau benzilic; alchil paraben, cum ar fi metil sau propil paraben; catechol; rezorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; și m-crezol); polipeptide cu greutate moleculară mică (*de exemplu*, mai mică de aproximativ 10 resturi de aminoacid); proteine cum ar fi albumină serică, gelatină, sau imunoglobuline; polimeri hidrofili cum ar fi polivinilpirolidonă; aminoacizi cum ar fi glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, sau lisina; carbohidrați cum ar fi monozaharide, dizaharide, glucoza, manoza, sau dextrinele; agenți de chelatare cum ar fi EDTA; zaharuri cum ar fi zaharoza, manitolul, trehaloza sau sorbitolul; contraioni care formează săruri cum ar fi sodiu; complecși metalici (*de exemplu*, complecși Zn-proteină); și agenți tensioactivi neionici cum ar fi TWEEN sau polietilenglicol (PEG).

35

Compozițiile farmaceutice descrise aici pot fi administrate prin oricare dintre numeroasele căi, fie pentru tratament local fie sistemic. Administrarea poate fi topică (cum ar fi la membranele mucoase, inclusiv administrarea vaginală și rectală), cum ar fi plasturi transdermici, unguente, loțiuni, creme, geluri, picături, supozitoare, spray-uri, lichide și pulberi; pulmonară (*de exemplu*, prin inhalare sau insuflare de pulberi sau aerosoli, inclusiv prin nebulizare; intratraheală, intranasală, epidermică și transdermică); orală; sau parenterală incluzând injecția sau perfuzia intravenoasă, intraarterială, subcutanată, intraperitoneală sau intramusculară; sau administrarea intracraniană (*de exemplu*, intratecală sau intraventriculară). Administrarea poate fi intravenoasă. Compozițiile farmaceutice descrise aici pot fi de asemenea utilizate *in vitro* sau *ex vivo*.

40

Un anticorp sau imunoconjugat conform invenției poate fi combinat într-o formulare farmaceutică combinată sau regim de dozare ca terapie combinată, cu un al doilea compus, cum ar fi unul care este cunoscut ca fiind eficient în tratarea unei boli sau tulburări de interes. Al doilea compus poate fi un agent anticanceros. Administrarea celui de-al doilea compus și a unui imunoconjugat conform invenției poate avea ca rezultat o eficacitate mai bună în comparație cu administrarea imunoconjugatului individual. Al doilea compus poate fi administrat prin oricare dintre numeroase căi, incluzând, de exemplu, administrare topică, pulmonară, orală, parenterală sau intracraniană. Administrarea poate fi orală. Administrarea poate fi intravenoasă. Administrarea poate fi atât orală, cât și intravenoasă.

50

55

60

Un anticorp sau imunoconjugat poate fi, de asemenea, combinat într-o formulare farmaceutică combinată sau regim de dozare ca terapie combinată, cu un analgezic sau alte medicații.

Un anticorp sau imunoconjugat poate fi combinat într-o formulare farmaceutică combinată sau regim de dozare ca terapie combinată, cu un al doilea compus având proprietăți anticanceroase. Al doilea compus al formulării farmaceutice sau a regimului de dozare combinate poate avea activități complementare la ADC al combinației astfel încât să nu se afecteze advers unul pe celălalt. Sunt redate, de asemenea, compoziții farmaceutice care cuprind agentul de legare la CD123 și un al doilea agent anticanceros.

Prezenta invenție include o metodă *in vitro* sau *ex vivo* de inhibare a creșterii unei celule care exprimă CD123, care cuprinde contactarea celulei cu un anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia; o polipeptidă; un imunoconjugat; sau o compoziție farmaceutică conform invenției. Prezenta invenție include, de asemenea, un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia; o polipeptidă; un imunoconjugat; sau o compoziție farmaceutică dezvăluită aici pentru utilizarea într-o metodă pentru tratarea unui subiect care are cancer sau pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea unei tulburări de proliferare celulară la un subiect, în care celulele cancerului sau tulburarea proliferativă celulară exprimă CD123. Metoda poate fi pentru tratarea unui mamifer (*de exemplu*, uman) care cuprinde administrarea la mamiferul menționat a unei cantități eficiente terapeutic de anticorpi sau fragmente de legare la antigen ale acestora sau imunoconjugați (*de exemplu*, conjugați cu formulele (L1), (L2), (L3), (S1), (S2), (S3), (S4), (C1), (C2), și (C3)) descrise aici, sau o compoziție a acestora, individual sau în combinație cu un al doilea agent terapeutic.

În anumite modalități de realizare, creșterea celulară anormală sau tulburarea proliferativă a celulelor la un mamifer este o boală sau stare asociată sau caracterizată prin exprimarea CD123, cum ar fi cancerul, inclusiv cancer hematologic, leucemie sau limfom. În anumite modalități de realizare, tulburarea proliferativă a celulelor este un cancer al unui organ limfatic sau o malignitate hematologică.

De exemplu, cancerul poate fi selectat din grupul care constă din: leucemia mieloidă acută (AML, incluzând AML cu CD33-scăzut, AML pozitiv la glicoproteină P, AML recidivat, sau refractar AML), leucemie mielogenoasă cronică (CML), incluzând crize blastice de CML și oncogene Abelson asociat cu CML (translocatie Bcr-ABL), sindromul mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută B sau B-cell leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), leucemia limfocitară cronică (CLL), incluzând sindrom Richter sau transformare Richter a CLL, leucemie cu celule păroase (HCL), leucemie promielocitică acută (APL), boală limfoproliferativă cronică cu celule B (B-CLPD), leucemia limfocitară cronică atipică (preferabil cu o exprimare marcată a CD11c), neoplasm cu celule dendritice plasmacitoide blastice (BPDCN), limfoame non-Hodkin (NHL), incluzând leucemie cu celule manta (MCL), și limfom limfocitic mic (SLL), limfom Hodgkin, mastocitoză sistemică, și limfom Burkitt.

În anumite modalități de realizare, B-ALL este o B-ALL pozitivă la CD19. În anumite alte modalități de realizare, B-ALL este o B-ALL negativă la CD19.

În anumite modalități de realizare, cancerul are cel puțin un factor prognostic negativ, *de exemplu*, supraexprimarea glicoproteinei P, supraexprimarea EVI1, alterarea p53, mutația DNMT3A, duplicarea internă în tandem a FLT3.

În anumite modalități de realizare, cantitatea eficientă terapeutic de anticorpi în cauză sau fragmente de legare la antigeni ale acestora, sau imunoconjugați (*de exemplu*, conjugați cu formulele (L1), (L2), (L3), (S1), (S2), (S3), (S4), (C1), (C2), și (C3)) descriși aici, sau o compoziție a acestora, individual sau în combinație cu un al doilea agent terapeutic, preferabil inhibă proliferarea celulelor stem leucemice (LSC-uri), progenitorilor de leucemie (LP-uri), și/sau blastelor leucemice, la celule stem hematopoietice normale (HSC-uri). În anumite modalități de realizare, valoarea IC₅₀ sau concentrația demi-maximă a agenților în cauză de mai sus pentru a inhiba proliferarea celulelor stem leucemice (LSC-uri), progenitorilor de leucemie (LPs), și/sau blastelor leucemice, este de cel puțin 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-, 150-, 300-, 500-ori sau mai mult, mai scăzută decât cea pentru celule stem hematopoietice normale (HSC-uri).

O terapie anti-leucemică conform invenției nu trebuie să țintească și să omoare blastele leucemice, ci, de preferință, să țintească și să omoare progenitorii leucemici (LP) și selulele stem leucemice (LSC-uri). Terapia poate fi mai puțin selectivă împotriva HSC-urilor normale. In anumite modalități de realizare, exprimarea CD123 pe LSC-uri, LP-uri și blaste leucemice sunt mai ridicate (*de exemplu*, de cel puțin 20-25 ori mai ridicate în LSC, progenitori de AML, și blaste de AML) în comparație cu limfocitele normale (care pot fi aproape de negativ). In anumite modalități de realizare, nivelurile de exprimare a CD123 pe LP-uri și LSC-uri sunt cel puțin tot atât de ridicate ca și cele de pe blastele leucemice.

De asemenea, este dezvăluită aici o metodă pentru inducerea morții celulare în populații de celule selectate care cuprinde contactarea celulelor țintă sau a țesutului care conține celule țintă cu o cantitate eficientă de anticorpi în cauză sau de fragmente legare la antigen ale acestora sau imunoconjugată conform prezentei invenții. Celulele țintă sunt celule la care se poate lega agentul de legare celulară a conjugatilor.

Dacă se dorește, împreună cu conjugatul pot fi administrați și alți agenți activi, cum ar fi alți agenți anti-tumorali.

Terapiile cancerului și dozele acestora, căile de administrare și utilizarea recomandată sunt cunoscute în stadiul tehnicii și au fost descrise în literatura de specialitate, cum ar fi Physician's Desk Reference (PDR). PDR dezvăluie dozele de agenți care au fost utilizate în tratamentul diferitelor tipuri de cancere. Regimul de dozare și dozele acestor medicamente chimioterapeutice menționate anterior, care sunt eficiente din punct de vedere terapeutic, vor depinde de tipul specific de cancer tratat, de extinderea bolii și de alți factori cunoscuți de medicul de specialitate în domeniu și pot fi determinate de către medic. Un specialist în domeniu poate trece în revistă PDR, utilizând unul sau mai mulți dintre următorii parametri, pentru a determina regimul de dozare și dozele agenților chimioterapeutici și ale conjugatilor care pot fi utilizate în conformitate cu informațiile din această invenție. Acești parametri includ: Indice cuprinzător; Producător; Produse (după numele medicamentului dat de companie sau marca comercială); Indicele de categorie; Indicele generic/chimic (denumiri comune ale medicamentelor care nu sunt marca comercială); Imagini color ale medicațiilor; Informații despre produs, în conformitate cu etichetarea FDA; Informații chimice; Funcție/acțiune; Indicații și contraindicații; Studii de cercetare, efecte secundare, avertizări.

Exemple de utilizări *in vitro* includ tratamente ale măduvei osoase autologe înainte de transplantul acesteia la același pacient, pentru a ucide celulele bolnave sau maligne; tratamente ale măduvei osoase anterioare transplantului, pentru a ucide celulele T competente și pentru a preveni boala grefă-versus-gazdă (GVHD); tratamente ale culturilor celulare pentru a ucide toate celulele, cu excepția variantelor dorite, care nu exprimă antigenul țintă; sau pentru a ucide acele variante care exprimă un antigen nedorit.

Condițiile de utilizare non-clinică *in vitro* sunt determinate cu ușurință de către un specialist în domeniu.

Exemple de utilizare clinică *ex vivo* sunt îndepărtarea celulelor tumorale sau a celulelor limfoide din măduva osoasă înainte de transplantul autolog în tratamentul cancerului sau în tratamentul bolii autoimune sau îndepărtarea celulelor T și a altor celule limfoide din măduva osoasă sau țesutul autolog sau alogen înainte de transplant pentru a preveni GVHD. Tratamentul poate fi efectuat după cum urmează. Măduva osoasă este recoltată de la pacient sau alt individ și apoi este incubată într-un mediu care conține ser la care se adaugă agentul citotoxic conform invenției, concentrațiile variază de la aproximativ 10 μ M până la 1 pM, timp de aproximativ 30 minute până la aproximativ 48 ore la aproximativ 37°C. Condițiile exacte referitoare la concentrația și timpul de incubare, *adică*, doza, sunt determinate cu ușurință de către un specialist în domeniu. După incubare, celulele măduvei osoase sunt spălate cu un mediu care conține ser și returnate pacientului pe cale intravenoasă conform metodelor cunoscute. În situațiile în care pacientul primește un alt tratament, cum ar fi un curs de chimioterapie ablativă sau iradiere totală a organismului între momentul recoltării măduvei și reperfuzia celulelor tratate, celulele măduvei tratate sunt depozitate congelate în azot lichid utilizând un echipament medical standard.

Pentru utilizarea clinică *in vivo*, agentul citotoxic conform invenției va fi furnizat sub formă de soluție sau pulbere liofilizată care sunt testate în ceea ce privește sterilitatea și nivelurile de endotoxină.

- 5 Purtătorii, diluanții și excipienții acceptabili farmaceutic adecvați sunt bine cunoscuți și pot fi determinați de specialiștii în domeniu, în funcție de situația clinică justificată. Exemple de purtători, diluanți și excipienți adecvați includ: (1) soluție salină Dulbecco tamponată cu fosfat, pH aproximativ 7,4, conținând sau neconținând aproximativ 1 mg/mL la 25 mg/mL albumină serică umană, (2) 0,9% soluție salină (0,9% gr/v NaCl), și (3) 5% (ge/v) de dextroză; și poate conține de asemenea un antioxidant cum ar fi triptamina și un agent de stabilizare cum ar fi Tween 20.

Metoda de inducere a morții celulare în rândul populațiilor de celule selectate poate fi practică *in vitro*, *in vivo*, sau *ex vivo*.

15 **EXEMPLE**

Exemplul 1 Generarea de anticorpi monoclonali de șoarece împotriva antigenului CD123 uman și de Cynomolgus

- Pentru a produce anticorpi anti-CD123 murini, șoareci femele BALB/c de tip sălbatic (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) au fost injectați subcutanat cu CD123 uman care exprimă o linie celulară stabilă de 300-19, care este o BALB/c derivată linia celulară pre-B (M. G. Reth și colab. 1985, *Nature*, 317: 353-355), în PBS la o doză de 5×10^6 celule/șoarece la fiecare 2 săptămâni timp de cinci ori. Cu trei zile înainte de a fi sacrificați pentru generarea hibridomului, șoarecii imunizați au primit o injecție intraperitoneală cu o altă doză de antigen. Splina de la șoarece a fost recoltată conform protocoalelor standard pentru animale și a fost mărunțită între două lamele microscopice sterile înghețate, pentru a se obține o singură suspensie celule în mediu RPMI-1640. După lizarea celulelor roșii din sânge cu tampon de lizare ACK, celulele splenice au fost apoi amestecate cu celule de mielom murin P3X63Ag8.653 (celule P3) (J. F. Kearney și colab, 1979, *J. Immunol*, 123: 1548-1550) la un raport de 1 celule P3: 3 celule splenice. Amestecul de celule splenice și celule P3 s-a spălat și s-a tratat cu pronază în mediu de fuziune (0,3 M mannitol/D-sorbitol, 0,1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 și 1 mg/mL BSA) la temperatura camerei timp de 3 min. Reacția s-a stopat prin adăugarea de ser fetal de bovină (FBS, Invitrogen); apoi celulele s-au spălat, s-au resuspendat în 2 mL de mediu de fuziune rece și s-au fuzionat cu o mașină de electrofuziune BTX ECM 2001 (Harvard Apparatus). Celulele fuzionate au fost adăugate ușor la mediul de selecție RPMI-1640 conținând hipoxantină-aminopterin-timidină (HAT) (Sigma Aldrich), s-au incubat timp de 20 de minute la 37°C și apoi s-au însămânțat în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat la 200 μL /godeu. Plăcile au fost apoi incubate în incubator, la 37°C, cu 5% CO_2 până când clonele de hibridom au fost gata pentru screeningul anticorpilor. Pot fi utilizate și alte tehnici de imunizare și producere de hibridomi, inclusiv cele descrise în J. Langone and H. Vunakis (Eds, *Methods in Enzymology*, Vol. 121, *Immunochemical Techniques*, Part I, Academic Press, Florida); and E. Harlow and D. Lane (*Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).

Screeningul și selectarea hibridomului

- Screeningul hibridomului s-a efectuat folosind analiza de legare prin citometrie în flux cu CD123 uman care exprimă linii de celule 300-19 stabile și de celule 300-19 celule de tip sălbatic. Pe scurt, celulele 300-19 de tip sălbatic au fost marcate mai întâi cu CELLTRACE™ roșu îndepărtat DDAO-SE (Invitrogen), amestecate cu celule netratate la raport de 1:1 și incubate cu supernatantul hibridomului timp de 2 ore pe gheață. Celulele au fost apoi spălate, incubate cu IgG anti-șoarece etichetate cu PE (Jackson Immunoresearch), spălate, fixate cu formalină și analizate prin utilizarea matricei FACS (BD Bioscience). Hibridomul cu reactivitate specifică la antigenul CD123 uman a fost expandat și supernatantele au fost supuse din nou unui screening cu analiza de legare prin citometrie în flux utilizând trei linii celulare independente: CD123 uman care exprimă linia celulară 300-19 stabilă, CD123 de cynomolgus care exprimă linia celulară 300-19 stabilă și linia celulară 300-19 de tip sălbatic. Hibridomul cu legare pozitivă la antigenii CD123 umani și cynomolgus, dar negativă la celulele 300-19 de tip sălbatic, a fost subclonat în continuare prin diluție limitată. O singură clonă de la fiecare hibridom, care a prezentat o legare specifică la antigenii de CD123 umani și de cynomolgus, a fost selectată pentru analiza ulterioară.

- Pe parcursul acestei investigații au fost efectuate în total șase fuziuni. S-a efectuat screeningul a aproximativ 6.000 de hibridomi, au fost generați 33 hibridomi specifici pentru antigenii de CD123 uman și de cynomolgus și 18 hibridomi au fost subclonați. Subclonele stabile

au fost cultivate și izotipul anticorpului monoclonal a fost identificat utilizând reactivi comerciali de izotipare IgG de șoarece (cum ar fi kitul de izotipare a anticorpului monoclonal IsoStrip Mouse de la Roche Diagnostics GmbH, Germania, Produs nr. 11493027001).

5 **Purificarea anticorpilor**

Anticorpul au fost purificați din supernatantele subclonei hibridomului utilizând metode standard, cum ar fi, de exemplu, cromatografia de Proteină A sau G (HiTrap Protein A or G HP, 1 mL, Amersham Biosciences). Pe scurt, supernatantul a fost preparat pentru cromatografie prin adăugarea unui volum de 1/10 de tampon Tris/HCl 1 M, pH 8,0. Supernatantul cu pH ajustat s-a filtrat printr-o membrană filtrantă de 0,22 μm și s-a încărcat pe o coloană echilibrată cu tampon de legare (PBS, pH 7,3). Coloana s-a spălat cu tampon de legare până când s-a obținut o linie de bază stabilă fără absorbantă la 280 nm. Anticorpul s-a eluat cu tampon de acid acetic 0,1 M conținând 0,15 M NaCl, pH 2,8, utilizând un debit de 0,5 mL/min. S-au colectat fracții de aproximativ 0,25 mL și s-au neutralizat prin adăugarea a 1/10 volume de 1M Tris/HCl, pH 8,0. Fracția(iile) de pic s-a dializat peste noapte de două ori contra 1 × PBS și s-au sterilizat prin filtrare printr-o membrană de filtrare de 0,2 μm. Anticorpul purificat a fost cuantificat prin absorbantă la A280.

Fracțiile purificate de proteina A au fost lustruite în continuare utilizând cromatografia cu schimb de ioni (IEX) prin cromatografie cuaternară de amoniu (Q) pentru anticorpi murini. Pe scurt, probe de la purificarea proteinei A, au fost schimbate în tampon de legare (10 mM Tris, 10 mM clorură de sodiu, pH 8,0) și filtrate printr-o umplutură de 0,22 μm. Proba preparată a fost apoi încărcată pe o rășină Q cu flux rapid (GE Lifesciences) care a fost echilibrată cu tampon de legare la un debit de 120 cm/oră. Dimensiunea coloanei a fost aleasă pentru a avea o capacitate suficientă pentru a lega toate MAb-urile din probă. Coloana a fost apoi spălată cu tampon de legare până când s-a obținut o linie de bază stabilă fără absorbantă la 280 nm. Anticorpul s-a eluat prin inițierea unui gradient de la 10 mM la 500 mM de clorură de sodiu 20 volume de coloană (CV). Fracțiile de pic au fost colectate pe baza măsurării absorbantei la 280 nm (A280). Procentajul de monomer s-a evaluat cu ajutorul cromatografiei de excludere dimensională pe (SEC) pe un gel TSK G3000SWXL, 7,8 × 300 mm cu o coloană cu gradă SWXL, 6,0 × 40 mm (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) utilizând un sistem Agilent HPLC 1100 (Agilent, Santa Clara, CA). Fracțiile cu un conținut de monomer mai ridicat de 95% au fost comasate, schimbate prin tampon la PBS (pH 7,4) utilizând un sistem TFF, și sterilizate prin filtrarea printr-o membrană de filtrare de 0,2 μm. Concentrația de IgG a anticorpului purificat a fost determinată prin A280 utilizând un coeficient de extincție de 1,47. Metode alternative, cum ar fi hidroxiapatita ceramică (CHT), au fost, de asemenea, utilizate pentru lustruirea anticorpilor cu o selectivitate bună. Rășina CHT de tip II cu dimensiunea particulelor de 40 μm (Bio-Rad Laboratories) s-a utilizat cu un protocol similar celui descris pentru cromatografia IEX. Tamponul de legare pentru CHT corespunde la 20 mM fosfat de sodiu, pH 7,0 și anticorpul s-a eluat cu un gradient de 20-160 mM fosfat de sodiu peste CV 20.

40 **Exemplul 2 Clonarea și secvențierea regiunilor V_L și V_H ale anticorpilor anti-CD123**

Clonarea regiunilor V_L și V_H

ARN-ul celular total a fost preparat din 5 × 10⁶ celule de hibridomi de CD123 utilizând un kit RNeasy (QIAGEN) în conformitate cu protocolul producătorului. ADNc a fost sintetizat ulterior din ARN-ul total utilizând kitul de sinteză de ADNc SuperScript II (Invitrogen).

Procedurile PCR pentru amplificarea ADNc-urilor regiunii variabile a anticorpului derivate din celule hibridom s-au bazat pe metodele descrise în Wang și colab. ((2000) J Immunol Methods. 233:167-77) și Co și colab.((1992) J Immunol. 148:1149-54). Secvențele de V_L și V_H au fost amplificate de primeri degenerați pe capătul 5' și fie de primeri specifici regiunii constante kappa murine fie a IgG₁ respectiv pe capătul 3'. Ampliconii purificați au fost trimiși la Beckman Coulter Genomics pentru secvențiere.

Deoarece primerii degenerați utilizați pentru clonarea secvențelor de ADNc de V_L și V_H modifică capătul 5', au fost necesare eforturi de secvențiere suplimentare pentru verificarea secvențelor de ADNc complete. Secvențele preliminare au fost introduse într-o interogare de căutare a situsului NCBI IgBlast pentru a se identifica secvențele germinale murine din care au fost derivate secvențele de anticorpi. Primerii PCR au fost apoi concepuți pentru a se recombină cu secvența lider legată de linia germinativă a anticorpului murin, astfel încât această nouă reacție PCR să producă o secvență completă de ADNc a regiunii variabile, nealterate de primerii PCR.

Determinarea masei pentru confirmarea secvenței

- Secvențele ADNc ale regiunii variabile obținute pentru fiecare dintre anticorpii anti-CD123 au fost combinate cu secvențe ale regiunii constante a liniei germinale pentru a se obține secvențe de ADNc cu lungime completă ale anticorpului. Greutățile moleculare ale lanțurilor grele și ușoare au fost calculate apoi din translații ale secvențelor de ADNc și comparate cu greutatea moleculară obținută prin analize LC/MS ale anticorpilor anti-CD123 murini purificați. Greutățile moleculare observate pentru fiecare dintre lanțurile ușoare și grele au corespuns valorilor așteptate.

Exemplul 3 Umanizarea anticorpului**Exprimarea anticorpilor recombinanți**

- Secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile confirmate pentru anticorpii CD123 murini au fost optimizate cu codoni, sintetizate și clonate în cadru cu regiuni constante de anticorp uman de către Blue Heron Biotechnology pentru a se construi versiuni himerice ale anticorpilor CD123. Vectorii, regiunile constante și schemele de clonare utilizate pentru anticorpii himerici CD123 au fost identice cu cele utilizate pentru anticorpii CD123 umanizați descriși mai jos. Anticorpul himeric chCD123-6 este alcătuit din secvențe ale regiunii variabile de șoarece cu SECV ID NR: 28 și respectiv 29, împreună cu secvențele constante IgG1 și Kappa umane pentru lanțurile greu și respectiv ușor. Regiunea variabilă a lanțului ușor a fost clonată în situsurile EcoRI și BsiWI ale plasmidei pAbKZeo și regiunea variabilă a lanțului greu a fost clonată în situsurile HindIII și ApaI ale plasmidei pAbG1Neo. Aceste construcții de exprimare au fost produși tranzitoriu în celule HEK-293T aderente utilizând celule HEK-293T adaptate în suspensie utilizând o procedură PEI modificată în baloane de scuturare. Transfecțiile tranzitorii PEI au fost efectuate astfel cum a fost descris anterior (Durocher și colab, Nucleic Acids Res. 30(2):E9 (2002)), cu excepția celulelor HEK-293T crescute în Freestyle 293 (Invitrogen) și volumul de cultură a fost lăsat nediluat după adăugarea complexilor de PEI-ADN. Transfecțiile au fost incubate timp de o săptămână și apoi supernatantele limpezite au fost purificate prin cromatografie standard de proteină A urmată de proceduri cromatografice de lustruire.

Umanizarea anticorpului

- Anticorpul murin CD123-6 a fost umanizat utilizând proceduri de grefare a regiunii determinante complementare (CDR) substanțial astfel cum este descris în Jones și colab, Nature 321: 604-608, 1986, Verhoeven și colab, Science 239: 1534-1536, 1988, U.S. Brevet Nr. 5,225,539, și U.S. Brevet Nr. 5,585,089. Grefarea CDR constă în general în înlocuirea regiunilor cadru Fv (FR-uri) ale unui anticorp de șoarece cu regiuni cadru Fv de anticorp uman păstrând în același timp resturile CDR de șoarece critice pentru proprietățile specifice de legare la antigen ale anticorpului părinte CDR-uri exemplare ale anticorpului CD123-6 care urmează schema de numerotare Kabat și definițiile Kabat ale CDR sunt cele indicate în Tabelul A de mai jos.

Tabelul A

CD123-6 CDRs (grefare CDR)	
Lanț ușor	
CDR-L1:	
Murin: KASQDINSYLS (SECV ID NR: 19)	
CDR grefat: RASQDINSYLS (SECV ID NR: 20)	
CDR-L2: RVNRLVD (SECV ID NR: 21)	
CDR-L3: LQYDAFPYT (SECV ID NR: 22)	
Lanț greu	
CDR-H1: SSIMH (SECV ID NR: 5)	
CDR-H2: YIKPYNDGTTYNEKFKG (SECV ID NR: 8)	
CDR-H3: EGGNDYYDTMDY (SECV ID NR: 11)	

- Procedeul de grefare a CDR începe prin selectarea cadrelor acceptoare umane adecvate, tipic cele derivate din gene de anticorpi umani care împărtășesc cea mai mare omologie a secvenței cu anticorpul murin părinte. Secvențele de lanțului ușor și greu ale liniei germinale umane de imunoglobulină cu cea mai mare omologie cu anticorpul CD123-6 murin au fost identificate utilizând instrumentul interactiv, DomainGapAlign, de la International ImMunoGeneTics

5

```

1
hucD123-6 VL (1) GIKHTQSPSSMYASLCGERVYITIKASQDINSYLSWFGQKPKGKIPKYL IYRVNRLYDCVPSR (SECV ID NR: 79)
hucD123-6VLGv1 (1) ---Q-----LS---V-Q-----R-----A-----A-----S-----S----- (SECV ID NR: 80)
hucD123-6VLGv4 (1) ---Q-----LS---V-Q-----R-----A-----A-----S-----S----- (SECV ID NR: 81)
IGKV1-16*01 (1) ---Q-----LS---V-Q-----R---S-SN---A-----A---S---AASS-SS----- (SECV ID NR: 82)

61
hucD123-6 VL (62) FSGSGSGGGVSLTISLSLEYDMGSIYYCLQYDAFFPYTFGGSTKLEIKR (SECV ID NR: 83)
hucD123-6VLGv1 (62) ---T---FT---QF---FAT---Q---V--- (SECV ID NR: 84)
hucD123-6VLGv4 (62) ---N---N---QF---FAT---Q---V--- (SECV ID NR: 85)
IGKV1-16*01 (62) ---T---FT---QF---FAT---Q---NSY--- (SECV ID NR: 86)

108

```

muCD123-6 VH (1) EFQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTSSIMHWMKQKPGGLEWIGYIKPYNDGTKYN (SECV ID NR: 87)
huCD123-6VHGV1 (1) QV---V---A-VK-----V-----G-----VR-A-----M----- (SECV ID NR: 88)
huCD123-6VHGV6 (1) Q---V---A-VK-----V-----VR-A----- (SECV ID NR: 89)
huCD123-6VHGV7 (1) QV---V---A-VK-----V-----VR-A----- (SECV ID NR: 90)
IGHV1-46*03 (1) QV---V---A-VK-----V-----T---YY---VR-A-----M-I-N-SGG5-S-A (SECV ID NR: 91)

muCD123-6 VH (62) EKFKGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTVTS (SECV ID NR: 92)
huCD123-6VHGV1 (62) -----RV-M-R-T-T-VY---S-R---T-----L----- (SECV ID NR: 93)
huCD123-6VHGV6 (62) -----R-----R-T---Y---S-R---T-----L----- (SECV ID NR: 94)
huCD123-6VHGV7 (62) -----R-----R-T---Y---S-R---T-----L----- (SECV ID NR: 95)
IGHV1-46*03 (62) Q--Q-RV-M-R-T-T-T-VY---S-R---T----- (SECV ID NR: 96)

20 Este bine stabilit că resturile de cadru pot aduce, de asemenea, contribuții structurale la
legarea antigenului și pot fi reintroduse ca retro-mutații pentru a menține la maximum afinitatea de
legare a antigenului. Foote și Winter, J. Mol. Biol. 224: 487-499 (1992). O platformă de resturi
direct sub CDR-uri, denumită resturi ale zonei vernier, poate ajuta la conservarea conformației
25 buclelor de CDR care direcționează specificitatea și afinitatea anticorpului. Astfel s-au realizat
varianțe care conțin una sau mai multe retro-mutații ale resturilor zonei vernier și ulterior evaluate
în ceea ce privește legarea antigenului, precum și în ceea ce privește activitatea de inhibare a IL3
funcțional. Retro-mutațiile resturilor zonei vernier testate au inclus 3 resturi în V_L (poziția 46 în
FW-L2, și pozițiile 69, 71 în FW-L3) și 8 resturi în V_H (pozițiile 2, 28 în FW-H1, poziția 48 în
FW-H2, și pozițiile 67, 69, 71, 73, 78 în FW-H3). Unii anticorpi de CD123-6 greșați pe CDR
30 anticorpi cu retro-mutații ale zonei vernier au prezentat activitate de inhibare a IL3 pe celule TF-1
astfel cum este exemplificat prin versiunea 4.6 sau la care se face referire aici ca "Gv4.6" (V_L Gv4
și V_H Gv6) și versiunea 4.7 sau la care se face referire aici ca "Gv4.7" (V_L Gv4 și V_H Gv7) (FIG.
1).

CD123-6-V _L			
Poziție Kabat	Rest murin	Rest v1 uman (Grefat pe CDR)	Rest v4 uman (Grefat pe CDR)
3	K	Q	Q
11	M	L	L

CD123-6-V _L			
Poziție Kabat	Rest murin	Rest v1 uman (Grefat pe CDR)	Rest v4 uman (Grefat pe CDR)
12	Y	S	S
15	L	V	V
17	E	D	D
43	S	A	A
46	T	S	<u>T</u>
69	Q	T	<u>N</u>
71	Y	F	<u>Y</u>
72	S	T	T
79	E	Q	Q
80	Y	P	P
83	M	F	F
84	G	A	A
85	I	T	T
100	G	Q	Q
104	L	V	V
24	K	R	R

Tabelul C Grefarea V_H a anticorpului CD123-6 pe CDR

CD123-6-V _H				
Poziție Kabat	Rest murin	Rest uman v1 (Grefat pe CDR)	Rest v6 uman (Grefat pe CDR)	Rest v7 uman (Grefat pe CDR)
1	E	Q	Q	Q
2	F	V	<u>F</u>	V
5	Q	v	V	V
9	P	A	A	A
11	L	V	V	V
12	V	K	K	K
20	M	V	V	V
28	I	G	<u>I</u>	<u>I</u>
37	M	V	V	V
38	K	R	R	R
40	K	A	A	A
48	I	M	<u>I</u>	<u>I</u>
66	K	R	R	R
67	A	V	<u>A</u>	<u>A</u>
69	L	M	<u>L</u>	<u>L</u>
71	S	R	<u>S</u>	<u>S</u>
73	K	T	<u>R</u>	<u>R</u>

CD123-6-V _H				
Poziție Kabat	Rest murin	Rest uman v1 (Grefat pe CDR)	Rest v6 uman (Grefat pe CDR)	Rest v7 uman (Grefat pe CDR)
75	S	T	T	T
78	A	V	<u>A</u>	<u>A</u>
79	N	Y	Y	Y
82a	N	S	S	s
83	T	R	R	R
87	S	T	T	T
108	S	L	L	L

În plus, pentru a reduce la minimum îngrijorările cu privire la impactul lizinelor conjugate care se încadrează în CDR, lizina 24 din CDR-L1 a anticorpului CD123-6 murin a fost înlocuită cu arginina în grefarea CDR (a se vedea Tabelul A de mai sus).

5

Anticorpul CD123-6 a fost, de asemenea, umanizat prin refacerea la suprafață a domeniului variabil, urmand metodele descrise anterior, Roguska și colab, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(3):969-973, 1994 și Roguska și colab, Protein Eng. 9(10):895-904, 1996. Refacerea la suprafață implică în general identificarea resturilor de suprafață a cadrului regiunii variabile atât în lanțurile ușoare, cât și în lanțurile grele și înlocuirea acestora cu echivalenți umani. CDR-urile murine și resturile cadru îngropate sunt păstrate în anticorpul refăcut la suprafață. CDR-uri exemplare de anticorpi CD123-6 sunt definite astfel cum este indicat în Tabelul D.

10

Tabelul D

CD123-6 anticorp CDRs (Refăcut la suprafață)	
Lanț ușor	
CDR-L1:	
Murin: KASQDINSYLS (SECV ID NR: 19)	
Refăcut la suprafață: RASQDINSYLS (SECV ID NR: 20)	
CDR-L2: RVNRLVD (SECV ID NR: 21)	
CDR-L3: LQYDAFPYT (SECV ID NR: 22)	
Lanț greu	
CDR-H1: SSIMH (SECV ID NR: 5)	
CDR-H2:	
Murin și refăcut la suprafață v1.1: YIKPYNDGTK (SECV ID NR: 6)	
Refăcut la suprafață v1.0: YIRPYNDGTR (SECV ID NR: 7)	
CDR-H3: EGGNDYYDTMDY (SECV ID NR: 11)	
Kabat CD123-6 CDR-H2	
Murin CDR-H2: YIKPYNDGTKYNEKFKG (SECV ID NR: 8)	
Refăcut la suprafață v1.0 CDR-H2: YIRPYNDGTRYNQKFQG (SECV ID NR: 9)	
Refăcut la suprafață v1.1 CDR-H2: YIKPYNDGTKYNQKFQG (SECV ID NR: 10)	
* Secvența subliniată cu linie dublă marchează porțiunea Kabat a CDR-H2 a lanțului greu care nu a fost considerată o CDR pentru refăcut la suprafață.	

15

Pentru a reduce la minimum îngrijorările legate de impactul lizinelor conjugate care se încadrează în CDR-uri, lizina 24 a lanțului ușor CD123-6 anticorp CDR-L1 murin a fost înlocuită cu arginina. Similar, lizinele 52 și 59 ale CDR-H2 a lanțului greu al anticorpului CD123-6 murin cu au fost înlocuite cu arginina pentru versiunea 1.0 refăcută la suprafață. Definiția CDR-H2 a

lanțului greu de AbM a fost utilizată pentru refacerea la suprafață, astfel încât tabelul le redă pe acestea precum și secvențele de CDR-H2 ale lanțului greu definite conform Kabat, atât pentru versiunea murină cât și pentru cea umană a anticorpului CD123-6.

- 5 Pozițiile resturilor de suprafață au fost definite ca orice poziție cu o accesibilitate relativă de 30% sau mai mare (Pedersen și colab, J. Mol. Biol. 235: 959-973, 1994). Resturile de suprafață calculate au fost apoi aliniate cu secvențele de suprafață ale liniei germinale umane pentru a identifica cea mai omoloagă secvență de suprafață umană. Secvența liniei germinale umane utilizată ca suprafață de înlocuire pentru domeniul variabil al lanțului ușor al anticorpului CD123-6 a fost IGKV1-16*01 în timp ce IGHV1-69*10 a fost utilizat ca suprafață de înlocuire pentru domeniul variabil al lanțului greu. Modificările specifice ale resturilor de suprafață ale cadrului sunt redate în tabelele E și F de mai jos.

Tabelul E V_L a anticorpului CD123-6 refăcut la suprafață

CD123-6 V _L		
Poziție Kabat	Rest murin	Rest uman (refăcut la suprafață)
1	D	D
3	K	<u>Q</u>
5	T	T
9	S	S
12	Y	<u>S</u>
15	L	<u>V</u>
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	S	S
67	S	S
80	Y	<u>P</u>
81	E	E
100	G	<u>Q</u>
103	K	K
107	K	K
108	R	R
24	K	<u>R</u>

15

Tabelul F V_H a anticorpului CD123-6 refăcut la suprafață la suprafață

CD123-6 V _H			
Poziție Kabat	Rest murin	Rest v1.0 uman	Rest v1.1 uman (refăcut la suprafață)
1	E	<u>Q</u>	<u>Q</u>
2	F	<u>V</u>	F
3	Q	Q	Q
5	Q	<u>V</u>	<u>V</u>
9	P	<u>A</u>	<u>A</u>
11	L	<u>V</u>	<u>V</u>

CD123-6 V _H			
Poziție Kabat	Rest murin	Rest v1.0 uman	Rest v1.1 uman (refăcut la suprafață)
13	K	K	K
14	P	P	P
19	K	K	K
23	K	K	K
28	I	<u>T</u>	<u>T</u>
41	P	P	P
42	G	G	G
43	Q	Q	Q
61	E	<u>Q</u>	<u>Q</u>
62	K	K	K
64	K	<u>Q</u>	<u>Q</u>
65	G	G	G
73	K	<u>R</u>	K
74	S	S	S
82B	S	S	S
84	S	S	S
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S
52	K	<u>R</u>	K
59	K	<u>R</u>	K

Alinierile secvențelor de mai jos arată secvențele refăcute la suprafață ale domeniului variabil al anticorpului CD123-6 atât a lanțului ușor (V_L) cât și a celui greu (V_H) cu omologii lor murini. Vezi SECV ID NR: 41 pentru secvența de V_L a huCD123-6 refăcut la suprafață, și SECV ID NR: 39 și 40 pentru secvențele de V_H ale huCD123-6 refăcute la suprafață.

muCD123-6 VL	1	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRVNRLVDGVP	61	SR (SECV ID NR: 79)
huCD123-6 VL		--Q-----S--V-----R-----		(SECV ID NR: 74)
muCD123-6 VL	62	FSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIIYYCLQYDAFPYTFGGG	108	TKLEIKR (SEQ ID NO: 83)
huCD123-6 VL		-----P-----Q-----		(SEQ ID NO: 75)
muCD123-6 VH	1	EFQLQQSGPELVKPGASYKMSCKASGYIFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYIKPYNDG	61	TKYN (SECV ID NR: 87)
huCD123-6 VHv1.0		QV--V--A-V-----T-----R-----R-----		(SECV ID NR: 76)
huCD123-6 VHv1.1		Q--V--A-V-----T-----		(SECV ID NR: 77)
muCD123-6 VH	62	EKFKGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGT	121	SVTVSS (SECV ID NR: 92)
huCD123-6 VHv1.0		Q--Q-----R-----		(SECV ID NR: 78)
huCD123-6 VHv1.1		Q--Q-----		(SECV ID NR: 97)

5

Exemplul 4 Screening pentru anticorpi Anti-CD123 ca inhibă semnalizarea și proliferarea mediate de IL3

10 Capacitatea anticorpilor anti-CD123 de a inhiba semnalizarea și proliferarea mediate de IL3 a fost examinată în *vitro* utilizând linia celulară de eritroleucemie TF-1 care poate prolifera numai în prezența unuia dintre următorii factori de creștere, fie IL-3, fie GM-CSF. Celulele TF-1 au fost cultivate în mediu RPMI complet (RPMI-1640, 10% ser fetal bovin și 50 μg/mL sulfat de gentamicină; toți reactivii au fost de la Invitrogen) suplimentați cu GM-CSF (2 ng/mL). Înainte de

a stabili analizele de proliferare, celulele au fost spălate și apoi înfometate peste noapte de factorii de creștere. Pentru a bloca receptorii Fc de pe suprafața celulei, mediul de cultură a fost suplimentat cu 100 nM de anticorp chKTI (anticorp de același izotip care nu se leagă). Celulele TF-1 au fost depuse pe placă la 6.000 celule pe godeu în mediu RPMI complet fie în prezență, fie în absența a 10 μg/mL unui anticorp anti-CD123. Pentru a iniția proliferarea celulară la celule s-a adăugat un factor de creștere, fie IL-3 (1 ng/ml), fie GM-CSF (2 ng/ml). Celulele s-au incubat la 37°C într-un incubator umidificat cu 5% CO₂ timp de 3 zile. Apoi, s-a determinat numărul relativ de celule viabile din fiecare godeu printr-o analiză colorimetrică WST-8 assay (Dojindo Molecular Technologies, Inc, Rockville, MD, US). WST-8 este redus prin dehidrogenazele din celulele vii la un produs de formazan portocaliu care este solubil în mediul de cultură a țesutului. Cantitatea de formazan produsă este direct proporțională cu numărul de celule viabile. În godeuri s-a adăugat WST-8 la 10% din volumul final și plăcile au fost incubate la 37°C într-un incubator umidificat 5% CO₂ pentru un timp suplimentar de 2-6 ore. Apoi, a fost măsurată absorbanta pe un spectrofotometru cu cititor de plăci în modul lungime de undă dublă 450 nm/650 nm, și absorbanta la 650 nm (dispersie nespecifică a luminii de către celule) a fost scăzută din cea de la 450 nm. S-a calculat numărul relativ de celule mai întâi prin corecția pentru absorbanta de fundal a mediului, și apoi prin împărțirea valorii fiecărei probe la media valorilor din godeurile cu celule netratate (martor).

Rezultatele unei analize tipice sunt prezentate în FIG. 2A și 2B. În concordanță cu datele raportate anterior (Sun și colab. 1996), anticorpul 7G3 însă nu și 6H6 sau 9F5 a inhibat substanțial proliferarea dependentă de IL-3. Surprinzător, mai mulți anticorpi anti-CD123 generați în acest studiu au fost capabili să inhibe proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 chiar mai semnificativ decât 7G3 (FIG. 2A). De exemplu, anticorpul 3, 6 și 14 a redus numărul de celule TF-1 la mai puțin de 5% din cel din martor (celule TF-1 crescute în absența unui anticorp), în timp ce anticorpul 7G3 a redus numărul de celule până la 15% din cel din martor. Prin contrast, tratamentul cu ceilalți anticorpi anti-CD123 (de exemplu, anticorpii 2, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 18, 20, 21 și 22) a avut numai un efect minim asupra proliferării celulare sau nu a avut efect deloc.

Inhibarea proliferării celulelor TF-1 de către anticorpii 3, 6, 14 și 7G3 a fost dependentă de IL-3, deoarece acești anticorpi nu au avut efect inhibitor atunci când celulele au fost crescute în prezența altui factor de creștere GM-CSF (FIG. 2B).

În continuare, au fost determinate concentrațiile anticorpilor 3, 6, 14 (redenumiți muCD123-3, muCD123-6, respectiv muCD123-14) și 7G3 care au fost necesare pentru a inhiba proliferarea dependentă de IL3. Celulele TF-1 au fost depuse pe placă la 6.000 celule pe godeu în 100 μL de mediu de cultură. Anticorpii s-au diluat în mediul de cultură utilizând serii de diluții de 6-ori și s-au adăugat 50 μL de material diluat pe godeu. Apoi la celule s-a adăugat IL3 la concentrația finală 1 ng/ml. Concentrația finală de anticorp a variat tipic de la 6×10^{-8} M to 8×10^{-12} M. Celule s-au incubat la 37°C într-un incubator umidificat cu 5% CO₂ timp de 3 zile. Numărul relativ de celule în fiecare godeu s-a determinat prin analiza WST-8 astfel cum este descris mai sus. Valoarea relativă a numărului de celule a fost reprezentată grafic în funcție de concentrația de anticorpi și prezentată în FIG. 3. Este evident că muCD123-3, muCD123-6, muCD123-14 și 7G3 inhibă substanțial proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 și într-o manieră dependentă de doză, în timp ce un anticorp anti-CD123 nefuncțional martor nu a avut un astfel de efect. De exemplu, tratamentul cu 7G3 a redus numărul relativ de celule la 18% la cea mai ridicată concentrație de anticorpi testată, cu valoarea IC₅₀ de 0,33 nM. Tratamentul cu muCD123-3 a redus numărul relativ de celule la 2% la cea mai ridicată concentrație de anticorpi testată, cu valoarea IC₅₀ de 0,26 nM. Asemănător, tratamentul with muCD123-14 sau muCD123-6 a redus numărul relativ de celule la mai puțin de mai 1% la cea mai ridicată concentrație de anticorpi testată, cu valori IC₅₀ de 0,08 nM sau respectiv 0,05 nM. Prin urmare, muCD123-3, muCD123-6 și muCD123-14 inhibă proliferarea dependentă de IL-3 a celulelor TF-1 într-un grad semnificativ mai ridicat decât anticorpul 7G3.

Exemplul 5 Afinitatea de legare a anticorpilor anti-CD123 murini

Afinitatea de legare a fost testată prin citometrie în flux utilizând anticorpi purificați. Histogramele FACS care demonstrează legarea muCD123-3, muCD123-6, muCD123-14 și 7G3 la celulele TF-1 și HNT-34 care exprimă CD123 sunt prezentate în FIG. 4A și respectiv 4B. Celule TF-1 (5×10^4 celule pe probă) s-au incubat cu diferite concentrații de anticorpi murini în 200 μL tampon FACS (mediu DMEM suplimentat cu 2% ser normal de capră). Celulele au fost apoi peletizate, spălate de două ori și incubate timp de 1 oră cu 100 μL de anticorp de capră anti-IgG

uman conjugat cu ficoeritrină (PE) (Jackson Laboratory). Celulele au fost peletizate din nou, spălate cu tampon FACS și s-au resuspendat în 200 μ L de PBS conținând 1% formaldehidă. Probele au fost obținute utilizând un citometru de flux FACSCalibur cu ajutorul sampler-ului HTS cu multiple godeuri sau un citometru de flux FACS și analizate utilizând CellQuest Pro (toate de la BD Biosciences, San Diego, SUA). Pentru fiecare probă, intensitatea fluorescenței geomean-ului pentru FL2 a fost calculată și reprezentată în raport cu concentrația de anticorp într-o diagramă semi-log. A fost generată o curbă doză-răspuns prin regresie neliniară și valoarea EC_{50} a fiecărei curbe, care corespunde constantei de disociere aparente (K_d) a fiecărui anticorp, s-a calculat utilizând GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA). S-a observat o legare puternică pentru toți anticorpilor testați și valorile K_d corespund la 0,3 nM, 0,1 nM, 0,3 nM, și 0,9 nM pentru anticorpul muCD123-3, muCD123-6, muCD123-14, și respectiv 7G3 (FIG. 4A). Astfel, în acest experiment, legarea de către anticorpul CD123 murin în cauză este de cel puțin 3-9 ori mai bună decât cea a anticorpului 7G3.

Asemănător, s-a observat o legare puternică de asemenea și atunci când a fost utilizată o altă linie celulară de leucemie mieloidă acută pozitivă CD123, HNT-34, pentru aceeași analiză de citometrie în flux descrisă mai sus. Valorile K_d , calculate astfel cum este descris mai sus, au fost de 0,2 nM, 0,07 nM, 0,5 nM, și 2 nM pentru muCD123-3, muCD123-6, muCD123-14, și respectiv 7G3, (FIG. 4B). Astfel, în acest experiment, legarea de către anticorpul CD123 murin în cauză este de cel puțin 4-28 ori mai bună decât cea a anticorpului 7G3.

Aceste date demonstrează că muCD123-3, muCD123-6 și muCD123-14 au K_d mai scăzute (care reprezintă o afinitate mai mare) decât anticorpul 7G3 pentru celulele AML pozitive CD123.

Exemplul 6 Afinitatea de legare a anticorpilor himerici anti-CD123

Anticorpul himeric chCD123-3, chCD123-6 și chCD123-14 au fost testați în ceea ce privește afinitatea lor de legare la celulele HNT-34 în comparație cu un izotip control himeric martor IgG (chKTI). Analizele de legare prin citometrie în flux au fost efectuate și analizate astfel cum este descris în Exemplul 5 utilizând anticorpi capră-anti-umani conjugați la PE secundar. FIG. 5A ilustrează curbele doză-răspuns pentru fiecare anticorp. Valoarea pentru constanta de disociere aparentă (K_d) a fiecărui anticorp a fost calculat utilizând GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA). Datele arată că himerizarea a afectat numai moderat afinitățile de legare ale acestor anticorpi. Valorile K_d pentru chCD123-3, chCD123-6, și chCD123-14 au fost de 0,1 nM, 0,04 nM, și respectiv 0,2 nM. Aceste valori au fost de cel mult 2,5 diferite de cele pentru omologii lor murini raportate în Exemplul 5. Astfel cum s-a așteptat, anticorpul chKTI nu s-a legat la celule la concentrațiile testate (FIG. 5A).

Afinitatea ridicată a chCD123-3, chCD123-6 și chCD123-14 pentru celulele AML a fost confirmată utilizând o altă linie de celule de leucemie mieloidă acută pozitivă la CD123, MOLM-13. Analizele de legare prin citometrie în flux au fost efectuate și analizate astfel cum a fost descris mai sus. FIG. 5B ilustrează curbele doză-răspuns pentru fiecare anticorp. Valorile constantei de disociere aparente (K_d) a chCD123-3, chCD123-6, și chCD123-14 au fost de 0,2 nM, 0,08 nM, și respectiv 0,2 nM. Pentru martorul izotipului himeric IgG (anticorp chKTI) a fost observată numai legarea marginală la cea mai ridicată concentrație testată (10 nM).

Astfel, chCD123-3, chCD123-6, și chCD123-14 rețin afinitatea ridicată a omologilor lor murini.

Activitatea funcțională a anticorpilor himerici

chCD123-3, chCD123-6 și chCD123-14 și un anticorp anti-CD 123 nefuncțional, folosit ca martor negativ, au fost analizați în ceea ce privește capacitatea lor de a inhiba proliferarea dependentă de IL3 a celulelor TF-1. Analizele au fost efectuate și analizate astfel cum este descris în Exemplul 4. Tratamentul cu chCD123-3, chCD123-6, și chCD123-14 au redus numărul relativ de celule într-o manieră dependentă de doză cu valori ale IC_{50} de 0,1 nM, 0,03, și respectiv 0,05 nM, (FIG. 6). Anticorpul martor nefuncțional nu a afectat creșterea celulelor. Prin urmare, chCD123-3, chCD123-6, și chCD123-14 au reținut activitatea funcțională a omologilor lor murini.

Exemplul 7 Afinitatea de legare a anticorpilor anti-CD123 umanizați

Afinitatea de legare a exemplurilor anticorpilor anti-CD123 umanizați exemplari, huCD123-6Gv4.7S2 și huCD123-6Gv4.7S3, la celule HNT-34 a fost comparată cu cea a

omologilor lor murini și himerici, muCD123-6 și respectiv chCD123-6,. Anticorpul 7G3 și un martor al izotipului himeric IgG (chKTI) au fost testați în paralel. Analizele de legare prin citometrie în flux au fost efectuate și analizate astfel cum este descris în Exemplul 5. FIG. 7A ilustrează curbele doză-răspuns pentru fiecare anticorp. Aceste date arată că umanizarea nu a afectat afinitatea de legare a anticorpului deoarece K_d pentru huCD123-6Gv4.7S2, huCD123-6Gv4.7S3, chCD123-6, și muCD123-6 sunt de aproximativ 0,06 nM. K_d aparent pentru anticorpul 7G3 a fost semnificativ mai mare, aproximativ 2 nM. Anticorpul chKTI nu s-a legat la celule la concentrațiile testate. Prin urmare, ambele clone huCD123-6Gv4.7 rețin afinitatea ridicată a omologilor murini și himerici omologi și au o afinitate mai ridicată (*de exemplu*, cel puțin aproximativ de 30-ori mai ridicată) decât anticorpul 7G3 la celulele care exprimă CD123.

Similar, afinitățile de legare ale conjugatelor de ADC ale anticorpului huCD123-6Gv4.7 umanizat exemplar au fost analizate utilizând celule HNT-34, în comparație cu cea a huCD123-6Gv4.7 neconjugat. Analizele de legare prin citometrie în flux au fost efectuate și analizate astfel cum este descris în Exemplul 5 utilizând anticorpi capră-anti-umani conjugăți cu PE secundar. FIG. 7B și 7C ilustrează curbele doză-răspuns pentru fiecare anticorp și conjugății corespunzătoare. Datele arată că, conjugarea a afectat numai moderat afinitățile de legare ale acestor anticorpi.

Activitatea funcțională a anticorpilor anti-CD123 umanizați

Activitatea funcțională (capacitatea de a inhiba proliferarea dependentă de IL3 a celulelor TF-1) a anticorpilor anti-CD123 umanizați exemplari, huCD123-6Gv4.7S2 și huCD123-6Gv4.7S3, a fost comparat cu cea al omologului lor himeric, anticorpul chCD123-6. Anticorpul 7G3 a fost testat în paralel. Analizele au fost efectuate și analizate astfel cum este descris în Exemplul 4.

Tratamentul cu huCD123-6Gv4.7S2, huCD123-6Gv4.7S3, și chCD123-6 a inhibat similar proliferarea dependentă IL-3: proliferarea a fost complet inhibată la 1 nM cu o IC_{50} de 0,02 nM (FIG. 8A). Cu toate acestea, tratamentul cu 7G3 nu a avut un astfel de efect atât de profund asupra proliferării celulelor : anticorpul IC_{50} a fost 0,2 nM și nu a fost capabil să inhibe complet proliferarea celulelor, ci a redus numai numărul de celule la 18% la cea mai ridicată concentrație (10 nM).

Inhibarea proliferării celulelor TF-1 de către huCD123-6Gv4.7S2, huCD123-6Gv4.7S3, chCD123-6 și 7G3 a fost dependentă de IL-3, deoarece acești anticorpi nu au avut niciun efect inhibitor atunci când celulele au fost crescute în prezența unui alt factor de creștere GM-CSF (FIG. 8B).

Prin urmare, huCD123-6Gv4.7 reține activitatea funcțională a omologilor săi murini și himerici și este semnificativ mai activ decât anticorpul 7G3 în inhibarea proliferării dependente de IL-3.

Exemplul 8 Cartografierea epitopului

În antigenul de CD123, lanțul α al receptorului de IL-3 (IL-3R α), este compus din 378 aminoacizi, conținând un domeniu extracelular de 306 aminoacizi implicați în legarea IL-3, un domeniu transmembranar de 20 aminoacizi și o coadă citoplasmatică scurtă de 52 de aminoacizi. Domeniul extracelular poate fi împărțit în continuare într-un domeniu N-terminal (NTD) care cuprinde o regiune de la treonina din poziția 19 a proteinei mature (*de exemplu*, clivare peptidică post-semnal), la serina din poziția 100 și motivul de recunoaștere a citokinei (CRM) compus din două domenii de pliere discrete: domeniul 2 (aminoacizii 101-204) și domeniul 3 (aminoacizii 205-306). Epitopii pentru anumiți anticorpi anti-CD123 descriși aici au fost cartografiați prin ingineria proteinelor himerice utilizând combinații ale domeniului extracelular al IL-3R α și lanțul α al receptorului factorului de stimulare a coloniilor granulocite-macrofage (GMR α), care conservă topologia IL-3R α și are o subunitate β comună, esențială pentru semnalizare.

Variante de clonare și Exprimare a IL-3R α

Domeniul extracelular al CD123/IL-3R α (resturile 1-306) a fost exprimat ca o proteină etichetată cu histidină. Secvența de proteină a fost optimizată și sintetizată prin codon de Life Technologies și clonată în cadru cu o etichetă de 10-Histidină în vectorul de exprimare a pABLT la mamifere utilizând situsuri de restricții EcoRI și HindIII. Domeniul extracelular al proteinei GMR α martor (restul 1-325), care cuprinde, de asemenea, un domeniu N-terminal de la serina din poziția 25 până la serina din poziția 114 a proteinei mature și un domeniu CRM cuprinzând glicină

în poziția 115 până la valină în poziția 325, a fost sintetizat și clonat similar. Apoi vectorii de exprimare ai proteinei receptorului himeric IL3Rα/GMRα au fost construiți prin digestii de restricție înlocuind fie domeniul N-terminal (resturile 1-100), fie domeniul CRM (resturile 101-306) ale moleculei de IL-3Rα cu secvențele corespunzătoare ale moleculei GMRα. IL3Rα (1-100) codifică resturile IL3Rα 1-100 fuzionate la resturile GMRα 115-325, și IL3Rα (101-306) codifică resturile GMRα 1-114 fuzionate la resturile 101-306 IL3Rα, astfel cum este ilustrat în FIG. 9A.

IL3-Rα, GMRα și cele două proteine himerice IL-3Rα etichetate cu His, IL3-Rα (1-100) și IL3-Rα (101-306), au fost exprimate prin transfecția tranzitorie a celulelor HEK 293T și purificate din supernatantul celulelor transfectate utilizând cromatografie Ni Sepharose excel (GE healthcare) urmand instrucțiunile fabricantului.

Legarea anticorpului la diferiți construcții IL3R α

Anticorpii himerici și umanizați anti-IL3Rα au fost testați într-un format de analiză de imunosorbent legat de enzimă (ELISA) în ceea ce privește legarea la proteina IL-3Rα descrisă mai sus. Pe scurt, fiecare proteină IL-3Rα etichetată cu His purificată prin cromatografie Ni Sepharose excel a fost diluată la 1 ng/mL în 50 mM mai mult de tampon de bicarbonat de sodiu la pH 9,6 și la fiecare godeu s-au adăugat 100 μL. După o incubare de 16 ore la 4°C, plăcile s-au spălat cu soluție salină tamponată cu Tris cu 0,1% Tween-20 (TBST), apoi blocate cu 200 μL tampon de blocare (TBS cu 1% BSA). Apoi, 100 μL de anticorp primar, diluat în serie în tampon de blocare, s-au adăugat în duplicat la godeurile ELISA și s-au incubat la temperatura camerei timp de 1 oră. Plăcile s-au spălat apoi de 3 ori cu TBST înainte de a adăuga 100 μL de IgG (H+L)-HRP anti-uman (Jackson ImmunoResearch) la fiecare godeu. Plăcile au fost incubate încă o dată timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de trei spălări cu TBST. În final, s-au adăugat 100 μL de substrat de microgodeu HRP cu o componentă de TMB (Surmodics) la fiecare godeu și s-a incubat timp de 5 minute. Reacția s-a oprit prin adăugarea a 100 μL de soluție de stopare (Surmodics) și absorbanțele au fost citite la 450 nm.

Legarea anticorpilor CD123 de proteinele himerice IL-3Rα a fost evaluată în comparație cu IL-3Rα de tip sălbatic. FIG. 9B demonstrează că anticorpul huCD123-6 se leagă atât la IL-3Rα, cat și la IL-3Rα (101-306) cu afinități sub-nanomolare similare. Dimpotrivă, anticorpul huCD123-6 nu leagă constructul de GMRα și legarea este aproape eliminată pentru constructul proteinei himerice IL-3Rα (1-100). Aceste rezultate indică faptul că anticorpul huCD123-6 se leagă în primul rand la domeniul CRM, doar cu o contribuție minimă din domeniul N-terminal al IL-3Rα. Similar, anticorpul chCD123-3 se leagă în principal de domeniul de CRM IL-3Rα, deși cu o afinitate de legare redusă în comparație cu IL-3Rα de tip sălbatic (FIG. 9C). Reducerea afinității de legare la proteina receptorului himeric IL-3Rα (101-306) sugerează o posibilă implicare a domeniului N-terminal al IL-3Rα în legarea anticorpului CD123-3. Cu toate acestea, anticorpul chCD123-14 nu recunoaște receptorul himeric de IL-3Rα (101-306) (FIG. 9D); mai degrabă, se leagă atât la IL-3Rα, cat și la IL-3Rα (1-101) cu afinitate echivalentă. Aceste rezultate demonstrează că anticorpul chCD123-14 se leagă exclusiv de domeniul N-terminal al IL-3Rα. În comparație, anticorpul 7G3 împreună cu ceilalți doi anticorpi disponibili comercial, 6H6 și 9F5, se leagă, de asemenea, de domeniul N-terminal al IL-3Rα și la construcții de IL-3Rα de tip sălbatic, dar nu recunosc domeniul CRM al IL3Rα (FIG. 9E, 9F și respectiv 9G). Pe scurt, aceste date demonstrează că epitopii anticorpilor CD123-6 și CD123-3 sunt localizați în primul rând în domeniul de CRM al IL-3Rα și sunt distincți de epitopul anticorpului 7G3, care este restricționat la domeniul N-terminal de IL-3Rα. Anticorpul CD123-14 se leagă de asemenea și la un epitop închis în domeniul N-terminal al IL-3Rα.

Exemplul 9 Prepararea conjugatului DM1 și IGN legat prin lizină al anticorpului huCD123-6

a. Prepararea huCD123Gv4,7S3-sulfo-SPDB-D1

O masă de reacție care conține 2,0 mg/mL de anticorp CD123-6G4,7S3 și 3,5 echivalenți molari de sulfo-SPDB-D1 *in situ* amestecați prin linker în 15 mM HEPES (4-(acid 2-hidroxietil)-1-piperazin etansulfonic) pH 8,5 tampon și 15% v/v DMA (N,N Dimetilacetamidă) cosolvent a fost lăsată să se conjuge timp de 3-4 ore la 25°C. Amestecul *in situ* s-a preparat prin reacție a 3,0 mM sulfo-SPDB linker cu 3,9 mM de compus sulfonat D1 în DMA timp de 5 ore la 25°C în prezența a 20 mM de N,N Diizopropiletil amină (DIPEA).

Post-reacție, conjugatul s-a purificat și s-a schimbat prin tampon în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% gr/v zaharoză, 0,01% formulare tampon Tween-20, 50 μM bisulfid de

sodiu pH 6,2, utilizand coloane de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat in același tampon timp de 4 ore la temperatura camerei și apoi peste noapte la 4°C utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

5 S-a constatat că, conjugatul purificat are o concentrație finală de proteină de 1,2 mg/ml și o medie de 2,9 molecule de compus D1 legate per anticorp (prin UV Vis utilizand coeficienți de extincție molari $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru compusul D1, și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru anticorpul huCD123-6G4,7S3); 94,3% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională); și <2% compus neconjugat D1 (coloană UPLC Dual, analiză HPLC cu fază inversă).

b. Prepararea huCD123-6Gv4.7S3-D2

15 O masă de reacție care conține 2,0 mg/mL de anticorp huCD123-6Gv4.7S3 și 5,0 echivalenți molari de compus D2 (pretratată cu un exces de 5-ori de bisulfid de sodiu în 90:10 DMA:50 mM succinat pH 5,5 timp de 4 ore la 25 °C) în 15 mM tampon HEPES (acid 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etansulfonic) pH 8,5 și 10% v/v cosolvent DMA (N,N-Dimetilacetamidă) s-a incubat timp de 4 ore la 25°C.

20 Post-reacție, conjugatul s-a purificat și s-a schimbat prin tampon în 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% gr/v zaharoză, 0,01% formulare tampon Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu pH 6,2 utilizand coloane de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat in același tampon timp de 4 ore la temperatura camerei și apoi peste noapte la 4°C utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

25 S-a constatat că, conjugatul purificat are o concentrație finală de proteină de 1,2 mg/ml și o medie de 2,9 molecule de compus D2 legate per anticorp (prin UV Vis utilizand coeficienți de extincție molari $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru compusul D2, și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru anticorp huCD123-6Gv4.7S3); 99,3% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională); și <2% compus neconjugat D2 (coloană UPLC Dual, analiză HPLC cu fază inversă).

c. Prepararea huCD123-6Gv1.1-sulfo-SPDB-DGN462

35 NHS-sulfo-SPDB-sDGN462 s-a format *in situ* prin incubarea a 1,5 mM linker sulfo-SPDB, 1,95 mM DGN462 sulfonat (sDGN462) în DMA conținând 10 mM DIPEA (N,N-diizopropiletilamină) timp de 20 min înainte de adăugarea a 0,9 mM MPA (Acid 3-Maleimidopropionic) pentru a capta IGN tiolul nereacționat timp de 15 min la 25°C. O masă de reacție care conține 2,5 mg/mL anticorp huCD123-6Gv1.1 și 7,5 echivalenți molari de NHS-sulfo-SPDB-DGN462 rezultat în 15 mM tampon HEPES (acid 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etansulfonic) pH 8,5 și 15% v/v cosolvent DMA s-a incubat peste noapte la 25°C.

40 Post-reacție, conjugatul s-a purificat în 20 mM Histidină, 50 mM NaCl, 8,5% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μM formulare tampon de bisulfid de sodiu pH 6,2 utilizând coloane de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat in același tampon peste noapte la 4°C utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

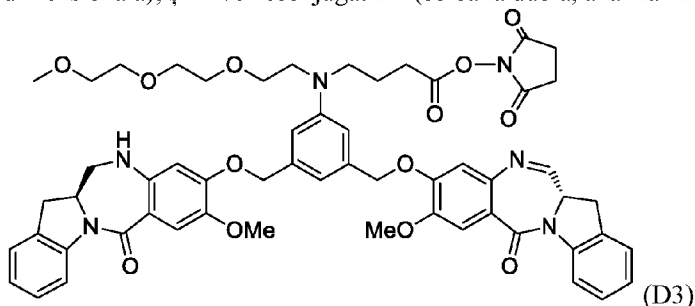
50 S-a constatat că, conjugatul purificat are o concentrație finală de anticorp de 0,95 mg/mL și o medie de 2,8 DGN462 molecule de linked per anticorp (prin UV-Vis utilizand coeficienți de extincție molari $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru DGN462, și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru huCD123-6Gv1.1 anticorp); 99,5% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională); și 0,6% DGN462 neconjugat (precipitare în acetonă, analiză HPLC cu fază inversă).

d. Prepararea huCD123-6Gv1.1-D3

55 O masă de reacție care conține 2,0 mg/mL de anticorp huCD123-6Gv1.1 și 3,5 echivalenți molari D3 (pretratată cu un exces de 5-ori de bisulfid de sodiu în 90:10 DMA:50 mM succinat pH 5,5 timp de 4 ore la 25°C) în 15 mM tampon HEPES (acid 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etansulfonic) pH 8,5 și 10% v/v cosolvent DMA (N,N-Dimetilacetamide) s-a incubat timp de 4 ore la 25°C. Post-reacție, conjugatul s-a purificat și s-a schimbat prin tampon în 20 mM histidină, formulare tampon 50 mM clorură de sodiu, 8,5% gr/v zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu pH 6,2 utilizând coloane de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA

Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat în același tampon timp de 4 ore la temperatura camerei și apoi peste noapte la 4°C utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

- 5 S-a constatat că, conjugatul purificat are o concentrație finală de proteină de 0,9 mg/mL și o medie de 3,4 D3 molecule legate per anticorp (prin UV-Vis utilizând coeficienți de extincție molară $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru D3, și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru anticorp huCD123-6Gv1.1); 96% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională); și <1% neconjugat D3 (coloană dublă, analiză HPLC cu fază inversă).



10

e. Prepararea conjugărilor de huCD123-6Rv1.1-CX1-1-maitansinoid

- Anticorp anti-CD123 umanizat (refăcut la suprafața huCD123-6Rv1.1) s-a conjugat la resturi de lizină cu o încărcătură de maitansinoid prin linker CX1-1, triglicil. Un amestec conținând 5 mM linker CX1-1 heterobifuncțional triglicil, (care poartă grupări de *N*-hidroxisuccinimidă și maleimidă) și 6,5 mM DM1 maitansinoid în *N,N*-dimetilacetamidă (DMA) conținând 20 mM *N,N*-diizopropiletilamină (DIPEA) s-a incubat timp de aproximativ 20 min la temperatura camerei. DM1 nereacționat s-a captat cu 2 mM acid maleimidopropionic (MPA) timp de aproximativ 20 min la temperatura camerei înainte de a se adăuga amestecul de reacție la anticorp anti-CD123 umanizat (huCD123-6Rv1.1) la 4 mg/mL în 140 mM tampon EPPS, pH 8, conținând aproximativ 8% DMA, la un exces de aproximativ 7,6? sau 15? CX1-1-DM1 aduct față de anticorp. Amestecurile reacției de conjugare s-au incubat peste noapte la 25°C, după care conjugății s-au purificat și s-au schimbat prin tampon în 10 mM tampon succinat, pH 5,5, conținând 250 mM glicină, 0,5% zaharoză, 0,01% Tween 20 utilizând coloane de desalinizare NAP (Illustra, Sephadex G-25, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat peste noapte la 4°C, în tamponul de succinate descris mai sus, utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (Thermo Scientific; membrană cu prag de greutate moleculară de 10.000).

- S-a constatat că, conjugății purificați conțin o medie de 4,3 și 6,7 molecule de maitansinoid legate per anticorp (prin spectrometrie UV/Vis și HPLC de excludere dimensională, utilizând coeficienți de extincție molară ϵ de $\epsilon_{252\text{ nm}} = 26350\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 5456\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru DM1, și $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207076\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pentru anticorp huCD123), 98% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională), și o concentrație finală de proteină de 2,1 mg/mL și respectiv 1,2 mg/mL. Nivelurile de maitansinoid neconjugat în conjugății purificați s-au estimat prin HPLC a fi mai scăzute de (<1%). Spectrometria de masă a conjugăților deglicozilați a indicat specii de maitansinoid legat.

Exemplul 10 Analize de citotoxicitate *in vitro*

- S-a măsurat capacitatea conjugărilor anticorp-medicament (ADC) ai huCD123-6, de a ucide celulele care exprimă CD123 pe suprafața lor celulară, utilizând analize de citotoxicitate *in vitro*. Liniile celulare au fost cultivate în mediu de cultură, astfel cum este recomandat de furnizorul de celule (ATCC sau DSMZ). La fiecare godeu al plăcilor cu fund plat cu 96 de godeuri, s-au adăugat 2.000 până la 10.000 de celule în 100 μL de mediu de cultură. Pentru a bloca receptorii Fc de pe suprafața celulară, mediul de cultură a fost suplimentat cu 100 nM de anticorp chKTI (anticorp cu același izotip). Conjugății s-au diluat în mediul de cultură utilizând serii de diluție de 3 ori și s-au adăugat 100 μL per godeu. Pentru a se determina contribuția citotoxicității independente de CD123, s-a adăugat CD123 bloc (*de exemplu*, 100 nM de anticorp chCD123-6) la unele godeuri înainte de conjugăți. În fiecare placă de testare s-au inclus godeuri martor care conțin celule și mediu, dar care nu conțin conjugăți, precum și godeuri care conțin doar mediu. Analizele au fost efectuate în triplicat pentru fiecare punct de date. Plăcile s-au incubat la 37°C într-un incubator umidificat 6% cu CO_2 timp de 4 până la 7 zile. Apoi s-a determinat numărul relativ de celule viabile din fiecare godeu utilizând un Kit-8 de numărare a celulelor pe bază de WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc, Rockville, MD) astfel cum este descris în

Exemplul 4. S-a calculat fracția de celule supraviețuitoare aparente din fiecare godeu, mai întâi prin corectarea corespunzătoare pentru absorbanta medie a fundalului și apoi prin împărțirea fiecărei valori la media valorilor din godeurile martor (celule netratate). Fracția de celule supraviețuitoare a fost reprezentată față de concentrația conjugatului în grafice semi-log.

5

Rezultatele unei analize de citotoxicitate tipice sunt ilustrate în FIG. 10. Linia de celule AML OCI-AML4 poate prolifera fără factori de creștere în mediul de cultură. Celulele au fost tratate cu conjugatul mitansinoid huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1. Tratamentul a avut ca rezultat o ucidere dependentă de doză cu o valoare IC_{50} de 0,07 nM. Pentru a se evalua dacă uciderea s-a datorat exprimării CD123, antigenul a fost blocat de un exces de anticorp chCD123-6 neconjugat (500 nM) și eficiența conjugatului a fost testat pe celule. Tratamentul ulterior nu a afectat viabilitatea celulelor la concentrații mai mici de 3 nM și a avut numai un efect moderat asupra viabilității celulare la 10 nM (cea mai mare concentrație testată). Astfel, conjugatul huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1 demonstrează citotoxicitate ridicată dependentă de CD123 pe celulele OCI-AML4.

15

Citotoxicitatea conjugatilor anticorpului huCD123-6 legat cu alți agenți citotoxici (DGN462, D3, D1 și D2) prin lizine a fost, de asemenea, testată *in vitro*. În studiu au fost utilizate cincisprezece linii celulare pozitive la CD123 de origine diferită (AML, B-ALL, CML și NHL) s-au utilizat în studiu (tabelul imediat de mai jos). Majoritatea liniilor de celule au fost derivate de la pacienți care poartă o malignitate cu cel puțin un factor prognostic negativ (*de exemplu*, supraexprimarea glicoproteinei P, supraexprimarea EVI1, alterări ale p53, mutația DNMT3A, duplicarea internă în tandem de FLT3). Conjugatii au demonstrat o eficiență ridicată asupra acestor linii celulare cu valori ale IC_{50} variind de la sub-pM to nM inferior (tabelul imediat de mai jos, FIG. 11A).

20

25

Citotoxicitatea *in vitro* a diferiților conjugati de huCD123-6-IGN legați la lizină asupra liniilor de celule pozitive la CD123 de diferite origini

Numele liniei de celule	Origine	Factor de prognostic negativ	IC_{50} , M			
			DGN462 ADC	D3 ADC	D2 ADC	D1 ADC
THP1	AML	deleție p53	1.9E-10	3.0E-11	6.7E-12	5.8E-11
SHI-1	AML	alterări ale genei p53	1.7E-10	2.9E-11	1.3E-11	3.2E-11
K052	AML	p53 mutant. supraexprimare Pgp	3.9E-10	2.4E-10	1.4E-11	4.1E-10
KASUMI-3	AML	EVI1 și supraexprimare Pgp	2.8E-09	2.3E-11	9.8E-12	1.4E-10
KG-1	AML	p53 mutant. supraexprimare Pgp	8.5E-10	6.6E-09	2.2E-10	4.1E-09
OCI-AML2	AML	mutație DNMT3A	1.4E-10	1.0E-10	8.8E-11	2.1E-10
HNT-34	AML	supraexprimare MECOM (EVI1)	2.3E-11	3.2E-12	2.0E-12	5.9E-12
MV4-11	AML	duplicare internă în tandem a FLT3	1.6E-12	5.4E-13	5.6E-13	1.3E-12
MOLM-13	AML	duplicare internă în tandem a FLT3	2.2E-12	4.6E-13	4.9E-13	1.2E-12
EOL-1	AML		9.0E-12	3.3E-12	2.5E-12	4.7E-12
MOLM-1	CML	EVI1 și Pgp supraexprimare	1.1E-09	7.1E-11	2.9E-11	2.1E-10
KOPN8	B-ALL		5.3E-11	2.2E-11	1.1E-11	3.0E-11
JM-1	B-ALL		3.2E-10	1.7E-10	2.4E-11	4.1E-10
KCL-22	CML		2.0E-09	9.5E-10	3.0E-11	2.9E-10
Granta519	NHL		1.2E-11	2.1E-12	1.2E-12	

Datele de mai sus par să sugereze că liniile de celule B-ALL (KOPN8 și JM-1) sunt foarte sensibile la compușii IGN. Pentru a valida în plus această constatare, citotoxicitatea conjugatilor anticorpului huCD123-6Gv4.7 legat cu D1 sau D2, prin lizine sau cisteine, a fost testată utilizând aceleași linii de celule B-ALL, KOPN8 și JM-1, plus o linie celulară B-ALL suplimentară "celule 380". Martorii negativi care utilizează conjugăți cu un anticorp care nu se leagă de aceste liniile de celule B-ALL - KTI - au fost incluși în analize. Rezultatele din FIG. 11B a confirmat constatarea de mai sus.

Tabelul de mai sus arată, de asemenea, că compușii huCD123-IGN sunt foarte activi împotriva diferitelor linii de celule AML. Datele reprezentative care utilizează compuși IGN legați la Lys și Cys sunt prezentate în FIG. 11C. În concordanță cu datele prezentate în FIG. 11C, date suplimentare (prezentate în tabelul de mai jos și FIG. 21) cu privire la citotoxicitatea conjugatului legat de Cys (huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5) demonstrează că, conjugatul este eficient împotriva diferitelor linii de celule AML pozitive la CD123, inclusiv cei cu factori prognostici slabi.

Linie de celule	Factor prognostic slab	huCD123-CysMab-D5 IC ₅₀ pmol	Ori-specificitatea ADC/IC ₅₀ huCD123-CysMab-D5	IC ₅₀ martor
Linii de celule negative la CD123				
Namalwa		10000	1	
K562		8000	1	
linii de celule AML pozitive la CD123				
SKM-1	P53		7	57
KO52			20	100
EOL-1			2	1000
UCSD-AML1	EVI OX		1	400
KG-1	P53, MDR1		60	95
THP-1	P53		30	167
SHI-1	P53		6	>3,333
MOLM-1	MDR1 și EVI1 OX		120	>167
Molm-13	FLT/ITD		0,5	2000
MV4-11	FLT/ITD		1	2000
KASUMI-3	P53 și MDR1		3	100
HNT-34	EVI1 OX		1	1100

Este interesant faptul că, datele preliminare sugerează că conjugatul D5 legat de Cys pare a fi deosebit de eficient asupra celulelor progenitoare ale AML, chiar și în comparație cu conjugăți eficienți ai D2 legați la Lys sau D1 legați la Lys. Vezi FIG. 11D, în care au fost utilizate 9 probe de pacienți AML pentru a se testa eficiența diferiților conjugăți IGN conform invenției.

Studii suplimentare de citotoxicitate *in vitro* arată că conjugatul D5 legat la Cys are o activitate de 74 ori mai ridicată decât Mylotarg în probele de pacienți AML neselectate. Vezi FIG. 18.

În plus, FIG. 11E și FIG. 19 arată că, conjugatul D5 huCD123 legat de Cys ucide celulele sanguine normale la concentrații care sunt > de 100 de ori mai mari decât cele necesare pentru a ucide progenitorii AML. În comparație, Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) nu prezintă un astfel de efect de ucidere preferențial, cu numai 10 ori diferență în citotoxicitate între celulele progenitoare normale și celulele progenitoare AML. În FIG. 19, au fost testate probe suplimentare de pacienți cu AML. În plus, a fost testat și conjugatul huCD123 al D5', un agent de legare încrucișată a ADN-ului și prezintă numai o diferență de 6 ori a citotoxicității între celulele progenitoare normale și celulele progenitoare AML (a se vedea FIG. 19).

Exemplul 11 Eficiența in vitro a conjugatilor de IGN legați la lizină pe probe de pacienți cu AML primar

Capacitatea diferiților conjugati de huCD123-6-IGN legați de lizină de a distruge celulele AML primare a fost măsurată utilizând analize ale unității de formare a coloniei (CFU). Celulele mononucleare din sangele periferic înghețat (PBMC) și celulele mononucleare ale măduvei osoase (BMMC) de la pacienții cu AML au fost achiziționate de la Conversant Biologics Inc. (Huntsville, AL) și AllCells, LLC (Alameda, CA). Celulele au fost decongelate conform recomandărilor furnizorilor, spălate și resuspendate în mediul de cultură RPMI (RPMI-1640, 10% ser fetal bovin, 50 ng/ml SCF și 50 ng/ml FLT3L). Pentru a bloca receptorii de Fc de pe suprafața celulelor, mediul de cultură a fost suplimentat cu 100 nM de anticorp chKTI (anticorp de același izotip). La fiecare godeu unor plăci cu fund plat cu 96 de godeuri, s-au adăugat 200.000 celule în 150 μ L de mediu de cultură. Conjugatii s-au diluat în mediu utilizând serii de diluții de 10-ori și s-au adăugat 50 μ L pe godeu. Godeurile martor au conținut celule și mediu, dar au fost lipsite de conjugati. Plăcile s-au incubat la 37°C într-un incubator umidificat 6% cu CO₂ timp de 18 ore. Apoi celulele s-au transferat în tuburi conținând 2,2 mL de METHOCULT™ H4534 fără EPO (StemCell Technologies, Vancouver, BC), s-au amestecat, și amestecurile s-au transferat în plăci cu 6 godeuri. Plăcile s-au incubat la 37°C într-un incubator umidificat 6% CO₂ până când s-au format coloniile (uzual 10 la 16 zile) și s-au numărat. Procentul de inhibare a formării coloniilor a fost determinat prin compararea numărului din probele tratate cu conjugat cu cele din martorul netratat. Procentul de inhibare a coloniei a fost reprezentat grafic în funcție de concentrația conjugatului și a fost determinată din curbe concentrația conjugatului care inhibă 90% din formarea coloniei (IC₉₀).

Rezultatul unei analize CFU tipice pentru o probă primar de la un pacient este prezentat în FIG. 12A. Conjugatii de huCD123-6-IGN au demonstrat o citotoxicitate dependentă de doză cu valori IC₉₀ de 0,1 nM, 0,01 nM, 0,03 nM, și 0,012 nM pentru huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462, huCD123-6Gv1.1-D3, huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1 și respectiv huCD123-6Gv1.1-D2. FIG. 12B redă valorile IC₉₀ pentru toate probele de la pacienți AML care au fost tratați cu conjugatii. Valorile IC₉₀ medii pentru fiecare conjugat sunt prezentate ca linii pline și egale cu 2 nM, 0,1 nM, 0,03 nM, și 0,02 nM pentru huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462, huCD123-6Gv1.1-D3, huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1, și respectiv huCD123-6Gv1.1-D2,. Astfel, conjugatii huCD123-6-IGN legați de lizină au demonstrat o eficacitate ridicată pe probe de la pacienții cu AML.

Exemplul 12 Prepararea conjugatilor anticorpului huCD123-6 specifici situsului Ser**a) Conjugarea anticorpului N-terminal - o abordare în două etape**

Anticorp huCD123-6Gv4,6/7S3 (având huCD123-6Gv4 LCVR (SECV ID NR: 37, incluzând un N-terminal Ser modificat) și HCVR Gv6/7 (SECV ID NR: 34)) ([1], în **Schema 1** astfel cum este ilustrat în FIG. 15; 3mg/mL în PBS, pH7,4) s-a tratat cu 5 mM periodat de sodiu apos (50 echivalenți, 25°C, 30 minute). Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) în tampon de acetat de sodiu, pH5,0.

Soluția rezultată s-a tratat cu alcool 4-aminofenetic (100 mM în DMA [N,N-Dimetilacetamidă]) la 10% v/v cosolvent. Linker1 heterobifuncțional([3] în **Schema 1**; 5 echivalenți) apoi s-a introdus, și vasul de reacție s-a sigilat și incubat la 37°C timp de 24 de ore.

Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) în tampon HEPES (acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etansulfonic), pH 8,5. Soluția s-a ajustat apoi cu cosolvent DMA (N,N-Dimetilacetamide) (10% v/v), și s-a tratat cu DGN462 sulfonat (sDGN462) ([5], **Schema 1**; tiol liber; 5 echivalenți), la 25°C timp de 6 ore.

Conjugatul rezultat s-a schimbat prin tampon în 250 mM Glicină, formulare tampon 10 mM Histidină, 1% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μ M bisulfid de sodiu la pH 6,2 utilizând o coloană de filtrare NAP (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat în același tampon timp de 4 ore la 25°C utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

S-a constatat că, conjugatul purificat ([6], **Schema 1**) are o medie omogenă de două molecule de linked DGN462 per anticorp (prin spectrometrie de masă Q-ToF), >98% monomer (prin cromatografie de excludere dimensională), <2% medicament liber (prin analiză HPLC cu

fază inversă cu precipitare din acetonă), și o concentrație finală de proteină de 0,18 mg/mL (prin UV-Vis utilizand coeficienți de extincție molari $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pentru anticorpu huCD123-6Gv4,6/7S3).

5 **b) Conjugarea anticorului N-terminal - IGN prin legătură directă**

Anticorp huCD123-6Gv4.7S2 conținând Ser modificat la N-terminal, modificat cu o serină N-terminală lanțului greu (huCD123-6Gv4.7S2, care cuprinde o secvență a lanțului greu SECV ID NR: 53 in care Xaa este Val, și o secvență a lanțului ușor SECV ID NR: 51) ([1] în **Schema 2**, FIG. 16; 3mg/mL in PBS, pH7,4) s-a tratat cu 5 mM periodat de sodiu apos (50 echivalenți molari) la 25°C timp de 30 minute. Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) in tampon de acetat de sodiu, pH5,0.

15 Soluția rezultată s-a tratat cu *p*-fenilendimină (100 mM în DMA [N,N-Dimetilacetamidă]) la 10% v/v cosolvent. Apoi, s-a introdus un D8 sulfonat *in situ* (sau sD8) ([3], **Schema 2**; 5 echivalenți molari), și vasul de reacție s-a sigilat și incubat la 37°C timp de 24 de ore.

20 Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) în tampon 250 mM Glicină, 10 mM Histidină, 1% zaharoză la pH 6,2. Dializa s-a efectuat in același tampon timp de 4 ore la 25°C, utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

25 S-a constatat că, conjugatul purificat ([4], **Schema 2**) are o medie omogenă de două molecule D8 legate per anticorp (prin Spectrometrie de masă Q-ToF), >96% monomer (prin Cromatografie de excludere dimensională), <3% medicament liber (prin analiză HPLC cu fază inversă HISEP), și o concentrație finală de proteină de 1,4 mg/mL (prin UV-Vis utilizand coeficienți de extincție molari $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pentru anticorpu huCD123-6Gv4.7S2).

30 D8 sulfonat *in situ* - (sau sD8) descris mai sus s-a preparat conform cu următoarea procedură: Reactivul D8, sub formă de solid alb liofilizat, s-a dizolvat in DMA (N,N-Dimetilacetamidă) la o soluție stoc având o concentrație de 10-20 mM. S-a adăugat bisulfid de sodiu proaspăt (500 mM soluție în apă, 5 echivalenți molari) și soluția rezultată a reacționat timp de 4-6 ore la 25°C înainte de o etapă de menținere de 15 ore la 4°C. S-a introdus o altă parte alicotă de bisulfid de sodiu proaspăt (soluție 500 mM în apă, 2 echivalenți molari) și s-a lăsat să reacționeze timp de 4 ore la 25°C înainte de depozitare la -80°C până la utilizarea ulterioară.

c) **Conjugarea anticorului N-terminal-protocol în două etape pentru CD123-6Gv4.7**

40 Anticorpu huCD123-6Gv4.7S3 (a se vedea mai sus) modificat cu o serină N-terminală pe lanțul ușor (huCD123-6Gv4.7S3) ([1] în **Schema 3**, FIG. 17; 3mg/mL in PBS, pH7,4) s-a tratat cu 5 mM periodat de sodiu apos (50 echivalenți molar) la 25°C timp de 30 minute. Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) in tampon de acetat de sodiu, pH5,0.

45 Soluția rezultată s-a tratat cu alcool 4-Aminofenetic (100 mM in DMA [N,N-Dimetilacetamidă]) la 10% v/v cosolvent. S-a introdus apoi Linker1 heterobifuncțional ([3], **Schema 3**; 5 echivalenți molari), și vasul de reacție s-a sigilat și s-a incubat la 37°C timp de 24 de ore.

50 Amestecul s-a schimbat apoi prin tampon printr-un coloană de desalinizare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) in tampon HEPES(acid 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etansulfonic) pH 8,5. Soluția s-a ajustat apoi cu, cosolvent DMA (N,N-Dimetilacetamide) (10% v/v), și s-a tratat cu DI sulfonat (sau sD1) ([5], **Schema 3**; tiol liber; 5 echivalenți molari) la 25°C timp de 6 ore.

55 Conjugatul rezultat s-a schimbat prin tampon în formulare tampon din 250 mM Glicină, 10 mM Histidină, 1% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu la pH 6,2, utilizând o coloană de filtrare NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Dializa s-a efectuat in același tampon timp de 4 ore la 25°C, utilizând casete de dializă Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

S-a constatat că, conjugatul purificat ([6], Schema 3) are o medie de 2,0 molecule de linked D1 per anticorp (prin Spectrometrie de masă Q-ToF), >96% monomer (prin Cromatografie de excludere dimensională), <3% medicament liber (prin analiză HPLC cu fază inversă cu precipitare în acetone), și o concentrație finală de proteină de 0,4 mg/mL (prin UV-Vis utilizând coeficienți de extincție molari $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pentru anticorpul huCD123-6Gv4.7S3).

Exemplul 13 Citotoxicitatea *in vitro* a conjugatilor anticorpului huCD123-6 specifică la situs

Capacitatea specifică la situs a conjugatilor de huCD123-6 cu diferiți compuși IGN (huCD123-6Gv4,6-CysMab-D5 și huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8) de a ucide celulele care exprimă CD123 pe suprafața lor s-a comparat cu aceea a conjugatilor legați de lizină care conțin anticorpul potrivit și încărcătura (huCD123-6Gv4,6-D2 și huCD123-6Rv1.1-D2) utilizând analize de citotoxicitate *in vitro*. S-au efectuat analize de citotoxicitate și s-au analizat astfel cum este descris în Exemplul 10.

Conjugatul de huCD123-6Gv4,6-CysMab-D5 (în care huCD123-6Gv4,6-CysMab are o secvență a lanțului greu de Ig cu SECV ID NR: 54, și o secvență a lanțului ușor cu SECV ID NR: 51) a fost cel puțin tot atât de activ ca și conjugatul huCD123-6Gv4,6-D2 legat la lizină (în care anticorpul huCD123-6Gv4,6 are o secvență a lanțului greu de Ig cu SECV ID NR: 50, și o secvență a lanțului ușor cu SECV ID NR: 51) pe multiple linii de celule. Câteva exemple de analiză de citotoxicitate utilizând linia de celule EOL-1 de AML, linia de celule B-ALL KOPN-8 și linia de celule MOLM-1 de CML sunt prezentate în FIG. 13A-13C, respectiv. Ambii conjugati au ucis celulele într-o manieră dependentă de doză cu valori ale IC_{50} de aproximativ 0,002 nM, 0,005 nM, și 0,02 nM pentru celule EOL-1, celule KOPN-8 și respectiv celule MOLM-1. Uciderea a fost dependentă de CD123, deoarece conjugati au fost de cel puțin 100 de ori mai puțin toxici pentru celule atunci când antigenul CD123 a fost blocat de anticorpul chCD123-6 neconjugat.

Conjugatul huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 (în care anticorpul huCD123-6Rv1.1S2 refăcut la suprafață are o secvență a lanțului greu de Ig cu SECV ID NR: 60 cu excepția faptului că restul cu N-terminal este Ser, și o secvență a lanțului ușor cu SECV ID NR: 61) și-a menținut legarea țintă (CD123), și a fost cel puțin tot atât de activ ca și conjugatul de huCD123-6Rv1.1-D2 legat la lizină (în care anticorpul huCD123-6Rv1.1 refăcut la suprafață are o secvență a lanțului greu de Ig cu SECV ID NR: 60, și o secvență a lanțului ușor cu SECV ID NR: 61) pe multiple linii de celule. Câteva exemple de analiză de citotoxicitate utilizând liniile de celule SHI-1 și HNT-34 de AML, precum și linia de celule CML MOLM-1 sunt prezentate în FIG. 14A-14C, respectiv. Ambii conjugati au ucis celulele într-o manieră dependentă de doză cu valori IC_{50} de aproximativ 0,01 nM, 0,002 nM, și 0,03 nM pentru celulele SHI-1, celulele HNT-34, și respectiv celulele MOLM-1. Uciderea a fost dependentă de CD123, deoarece conjugatii au fost de cel puțin 100 de ori mai puțin toxici pentru celule atunci când antigenul CD123 a fost blocat de anticorpul huCD123-6 neconjugat.

Intr-un alt experiment, s-a constatat că, compusul DGN462 legat la Ser cu anticorp huCD123 are o eficiență specifică antigenului de 3 ori mai mare decât versiunea legată la lizină cu DAR mai ridicat (datele nu sunt prezentate).

Exemplul 14 Studii de eficacitate *in vivo* utilizand conjugatii de CD123-IGN într-un model de șoarece de AML MV4-11 subcutanat

Celulele tumorale implantate subcutanat reprezintă un mijloc convenabil de a testa noi potențiale medicamente anticanceroase *in vivo*. O mare varietate de liniile de celule umane și murine derivate atât de la tumori solide, cât și de la leucemii, care acoperă o gamă largă de genotipuri și fenotipuri tumorale, au fost adaptate pentru a crește într-o gazdă murină și, astfel, permit testarea unui agent terapeutic în cauză într-un model adecvat de tumoare.

Un model de leucemie mieloidă subcutanată acută (AML), astfel cum este subliniat în protocolul de mai jos, se utilizează pentru a testa eficacitatea conjugatului anticorpului CD123 (ADC) în cauză în ceea ce privește capacitatea de a reduce sarcina tumorală *in vivo*. Specific, șoarecii SCID femele sunt inoculați subcutanat fiecare în flancul drept, cu aproximativ 1×10^7 celule MV4-11, o linie de celule AML umane. În ziua 14 post-inoculare, șoarecii sunt împărțiți aleatoriu în grupuri pe baza volumului tumorii și tratați cu 400 mg/kg de IgG umană prin injecție intraperitoneală pentru a bloca receptorii de Fc pe celulele MV4-11. ADC-urile anti-CD123 în cauză sau anticorpii martor care nu vizează (D1 legat prin lizină la chKTI, D2 legat prin lizină la chKTI și D2 legat la huKTI-CysMab în care anticorpul huKTI are un Cys modificat într-o poziție

corespunzătoare celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54) se administrează intravenos o dată, în ziua 15 post-inoculare, la o doză de 1 sau 3 µg/kg. Șoarecii s-au tratat din nou cu 100 mg/kg de IgG umană în ziua 20 după inoculare. Animalele sunt monitorizate zilnic, și volumul tumorii este măsurat de două ori pe săptămână. Grupurile de tratament și grupurile de martor sunt listate mai jos cu dozele respective.

5

Grup	Tratament	Doză (µg/kg) (Doză reală (µg/kg))	Cale și program
1	Vehicul	-	i.v., ?1
2	huCD123-sSPDB-D1	1 (0,78)	i.v., ?1
3	D2 legat la huCD123 prin lizină	1 (0,89)	i.v., ?1
4	huCD123-CysMab-D5	1 (0,91)	i.v., ?1
5	huCD123-sSPDB-D1	3 (2,35)	i.v., ?1
6	D2 legat la huCD123 prin lizină	3 (2,69)	i.v., ?1
7	huCD123-CysMab-D5	3 (2,88)	i.v., ?1
8	chKTI-sSPDB-D1	3	i.v., ?1
9	D2legat la chKTI prin lizină	3	i.v., ?1
10	huKTI-CysMab-D5	1 (0,91)	i.v., ?1
11	huKTI-CysMab-D5	3 (2,88)	i.v., ?1

Anticorpul huCD123 utilizat în studiu este anticorpul huCD123-6Gv4.7 umanizat, care este legat de D1 sau D2 prin legătura Lys sau prin legătura Cys modificată astfel cum este descris aici mai sus. Conjugatăi IGN bazate pe bază de anticorp KTi himeric legate de Lys și conjugatăi IGN bazate pe anticorp KTi uman legate de Cys sunt incluși, de asemenea, ca martori. Ultimul anticorp KTi CysMab are un Cys modificat în domeniul CH3 al lanțului greu într-o poziție corespunzătoare celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54.

10

Datele preliminare arată că, compușii IGN legați la Lys și Cys sunt foarte activi împotriva tumorilor cu xenogrefă MV4-11 *in vivo* într-un model de șoarece (a se vedea, FIG. 20).

15

Exemplul 15. Prepararea Conjugatilor anticorpului huCD123-6 secifici situsului Cys huCD123-6Gv1.1S2-CysMab-D7

huCD123-6Gv1.1S2-CysMab este un anticorp umanizat grefat la CDR cu secvențele LCVR ale SECV ID NR: 33 și secvență HC a SECV ID NR: 48 (cu excepția faptului că primul rest este Ser), și incluzând un Cys modificat corespunzător celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 sau 56.

20

Acest anticorp huCD123 care poartă două resturi de cisteină nepereche în stare redusă a fost preparat utilizând proceduri standard. La o soluție a acestui intermediar în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), s-au adăugat 5 mM *acid N,N,N',N'*-etilendiaminotetracetic (EDTA) pH 6,0 *N,N*-dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol, și 10 echivalenți molari de D7 ca o soluție stoc în DMA pentru a da un amestec de reacție cu o compoziție finală a solventului de 2% v/v DMA și 38% v/v propilenglicol în PBS 5 mM EDTA pH 6,0. Reacția a fost lăsată să se desfășoare timp de 24 de ore la 25°C.

25

30

Conjugatul s-a purificat în formulare tampon 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 µM bisulfid de sodiu pH 6,2 utilizând coloane de desalinizare Sephadex G25, s-a concentrat prin ultrafiltrare printr-o membrană cu un prag al greutatei moleculare de 10 kDa, și s-a filtrat printr-un filtru seringă de 0,22 µm. Conjugatul s-a dializat apoi față de același tampon utilizând o membrană cu un prag al greutatei moleculare 10 kDa.

35

S-a constatat prin UV-Vis că, conjugatul că are 2 mol D7/mol anticorp; 97,2% monomer prin SEC; și 1,9% D7 neconjugat prin SEC/ HPLC fază inversă. LC-MS a conjugatului deglicozilat nu este prezentat.

40

huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5

huCD123-6Gv4.7-CysMab este un anticorp umanizat grefat la CDR cu secvențele LCVR cu SECV ID NR: 34 (în care Xaa este Val) și secvență HCVR cu SECV ID NR: 35, și incluzând un Cys modificat corespunzător celui de-al 5^{-lea} la ultimul rest al SECV ID NR: 54 sau 56.

5

Acest anticorp huCD123 care poartă două resturi de cisteină nepereche în stare redusă a fost preparat utilizând proceduri standard. La o soluție a acestui intermediar în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), s-au adăugat 5 mM *acid N,N,N',N'*-etilendiaminotetracetic (EDTA) pH 6,0 *N,N*-dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol, și 10 echivalenți molari de D5 ca o soluție stoc in DMA pentru a da un amestec de reacție cu o compoziție finală a solventului de 2% v/v DMA și 38% v/v propilenglicol in PBS 5 mM EDTA pH 6,0. Reacția a fost lăsată să se desfășoare timp de 24 de ore la 25°C.

10

Conjugatul s-a purificat în formulare tampon din 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu pH 6,2 utilizând coloane de desalinizare Sephadex G25, s-a concentrat prin ultrafiltrare printr-o membrană cu prag al greutatei moleculare de 10 kDa, și s-a filtrat printr-un 0,22 μm filtru seringă. Conjugatul s-a dializat apoi față de același tampon utilizând o membrană cu prag al greutatei moleculare de 10 kDa.

15

S-a constatat prin UV-Vis că, conjugatul că are 2 mol D5/mol anticorp și 94,8% monomer prin SEC. LC-MS a conjugatului deglicozilat nu este prezentat.

20

huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4

Anticorpul huCD123 de mai sus care poartă două resturi de cisteină nepereche în stare redusă s-a preparat utilizând proceduri standard. La o soluție a acestui intermediar în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), s-au adăugat 5 mM *acid N,N,N',N'*-etilendiaminotetracetic (EDTA) pH 6,0 *N,N*-dimetilacetamidă (DMA), propilenglicol, și 5 echivalenți molari de D4 ca o soluție stoc în DMA pentru a da un amestec de reacție cu o compoziție finală a solventului de 2% v/v DMA și 38% v/v propilenglicol in PBS 5 mM EDTA pH 6,0. Reacția a fost lăsată să se desfășoare timp de 6 ore la 25°C.

25

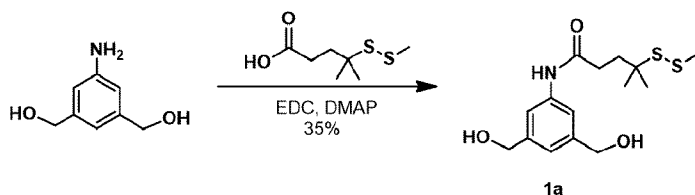
30

Conjugatul s-a purificat în formulare tampon din 20 mM histidină, 50 mM clorură de sodiu, 8,5% zaharoză, 0,01% Tween-20, 50 μM bisulfid de sodiu pH 6,2 coloane de desalinizare utilizând Sephadex G25, s-a concentrat prin ultrafiltrare printr-o membrană cu prag al greutatei moleculare de 10 kDa, și s-a filtrat printr-un 0,22 μm filtru seringă. Conjugatul s-a dializat apoi față de același tampon utilizând o membrană cu prag al greutatei moleculare de 10 kDa.

35

S-a constatat prin UV-Vis că, conjugatul are 1,8 mol D4/mol anticorp și 97,4% monomer prin SEC. LC-MS a conjugatului deglicozilat nu este prezentat.

40

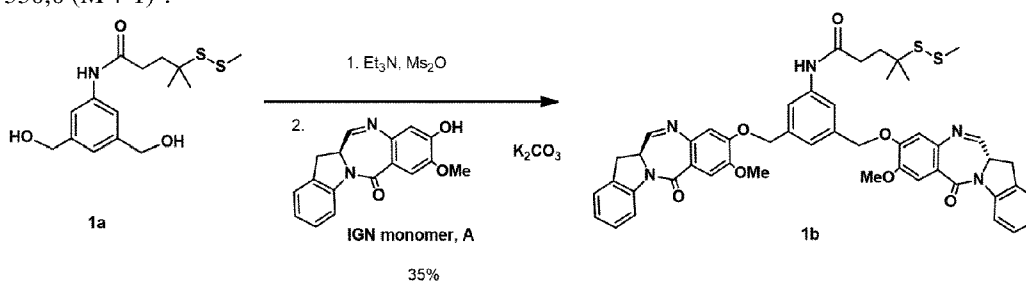
Exemplul 16. Sinteza compusului D1**Compusul 1a:**

La o soluție agitată de (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (1,01 g, 6,59 mmol) în dimetilformamidă anhidră (16,48 mL) și tetrahidrofuran anhidru (16,48 mL) s-a adăugat acid 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoic (1,281 g, 6,59 mmol), clorhidrat N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (2,53 g, 13,19 mmol), și 4-dimetilaminopiridină (0,081 g, 0,659 mmol). Amestecul rezultat s-a agitat timp de 18 ore la temperatura camerei. Reacția s-a stins cu soluție saturată de clorură de amoniu și s-a extras cu acetat de etil (3x 50 mL). Extractele organice s-au spălat cu apă și saramură, apoi s-au uscat peste sulfat de sodiu anhidru. Soluția s-a filtrat și s-a concentrat *in vid* și reziduul rezultat s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (acetat de etil/hexani) pentru a se obține compusul 1a ca un solid alb (0,70 g, randament 32%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆: δ 9,90 (s, 1H), 7,43 (s, 2H), 6,93 (s, 1H), 5,16 (t, 2H, *J* = 5,7 Hz), 4,44 (d,

45

50

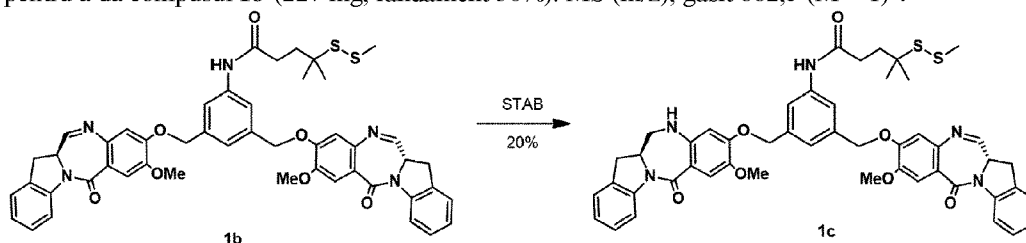
4H, $J = 5,7$ Hz), 2,43 (s, 3H), 2,41-2,38 (m, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,29 (s, 6H). MS (m/z), găsit 330,0 ($M + 1$)⁺.



Compus 1b:

5 La o soluție răcită (-10 °C) de compus **1a** (219 mg, 0,665 mmol) în diclormetan anhidru (6,65 mL) s-a adăugat trietilamină (463 μl, 3,32 mmol) urmată adăugarea în picături de anhidridă metansulfonică (298 mg, 1,662 mmol). Amestecul s-a agitat la -10 °C timp de 2 ore, apoi amestecul s-a stins cu apă cu gheață și s-a extras cu acetat de etil rece (2 x 30 mL). Extractele organice s-au spălat cu apă cu gheață, s-au uscat cu sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat și s-a concentrat sub presiune redusă pentru a se obține dimesilatul brut.

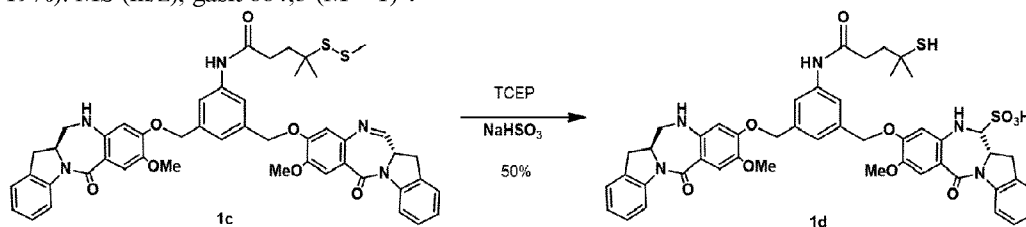
15 Dimesilatul brut (227 mg, 0,467 mmol) și monomer de IGN (sau indolinobenzodiazepină) **A** (303 mg, 1,028 mmol) s-au dizolvat în DMF anhidru (3,11 mL). S-a adăugat carbonat de potasiu (161 mg, 1,169 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 18 ore la temperatura camerei. S-a adăugat apă deionizată și precipitatul rezultat s-a filtrat și clătit cu apă. Solidul s-a redizolvat în diclormetan și s-a spălat cu apă. Stratul organic s-a uscat cu sulfat de magneziu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat. Reziduul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (Metanol/Diclormetan) pentru a da compusul **1b** (227 mg, randament 36%). MS (m/z), găsit 882,5 ($M + 1$)⁺.



20

Compus 1c:

25 La o suspensie de compus **1b** (227 mg, 0,167 mmol) în 1,2-diclorețan anhidru (3,346 mL) s-a adăugat triacetoxiborhidru de sodiu (37,3 mg, 0,167 mmol). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de o oră după care s-a stins cu soluție saturată de clorură de amoniu. Amestecul s-a extras cu diclormetan și s-a spălat cu saramură. Stratul organic s-a uscat cu sulfat de magneziu anhidru, s-a filtrat și s-a concentrat. Reziduul brut s-a purificat prin RP-HPLC (C18, Apă/Acetonitril). Frațiunile conținând produsul dorit s-au extras cu diclormetan, s-au uscat cu sulfat de magneziu anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat pentru a da compusul **1c** (35 mg, randament 19%). MS (m/z), găsit 884,3 ($M + 1$)⁺.



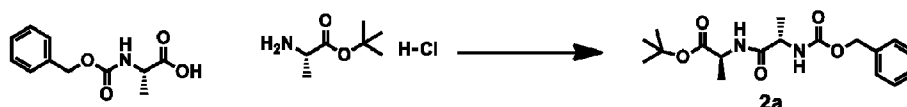
30

Compusul 1d:

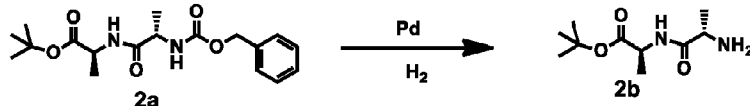
35 La o soluție de compus **1c** (18 mg, 0,017 mmol) în acetonitril (921 μL) și metanol (658 μL) s-a adăugat clorhidrat de tris(2-carboxietil)fosfină (17,51 mg, 0,060 mmol) (neutralizat cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu (0,2 mL) în tampon de fosfat de sodiu (132 μL, 0,75 M, pH 6,5). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 3,5 ore, apoi s-a diluat cu diclormetan și apă deionizată. Stratul organic s-a separat, s-a spălat cu saramură, s-a uscat cu sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat și s-a concentrat sub presiune redusă pentru a se obține tiolul brut. MS (m/z), găsit 838,3 ($M + 1$)⁺.

Tiolul brut (15,5 mg, 0,018 mmol) s-a dizolvat în 2-propanol (1,23 mL). S-au adăugat apă deionizată (617 µL) și bisulfid de sodiu (5,77 mg, 0,055 mmol) și amestecul s-a agitat timp de cinci ore la temperatura camerei. Reacția s-a înghețat într-o baie de acetonă/zăpadă carbonică, s-a liofilizat, și s-a purificat prin RP-HPLC (C18, apă deionizată/acetonitril). Fracțiunile conținând produsul dorit s-au înghețat și s-au liofilizat pentru a da compusul acid (12S, 12aS)-9-((3-(4-mercapto-4-metilpentanamido)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)benzil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfonic (compus D1 **sulfonat (sD1)**) (6,6 mg, randament 39%). MS (m/z), găsit 918,2 (M - 1).

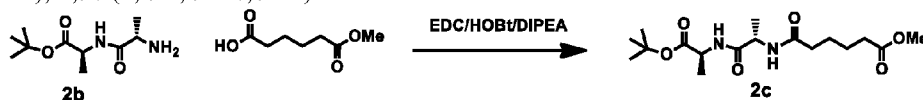
Exemplul 17. Sinteza 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoatului de 2,5-dioxopirolidin-1-il, compusul D2



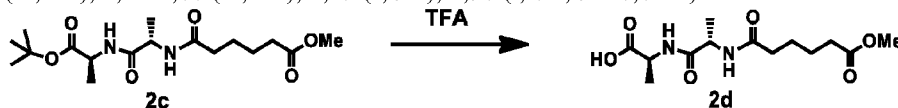
Etapa 1: acid (S)-2-((benziloxy)carbonyl)amino)propanoic (5 g, 22,40 mmol) și clorhidrat de 2-aminopropanoat de (S)-terț-butil (4,48 g, 24,64 mmol) s-au dizolvat în DMF anhidră (44,8 mL). S-au adăugat EDCI·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol), și DIPEA (9,75 mL, 56,0 mmol). Reacția a fost agitată în argon, la temperatura camerei, peste noapte. Amestecul de reacție a fost diluat cu diclorometan și apoi spălat cu clorură de amoniu saturată, bicarbonat de sodiu saturat, apă și soluție salină. Stratul organic s-a uscat peste sulfat de sodiu și s-a concentrat. Uleiul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (Hexani/Acetate de Etil) pentru a se obține compusul **2a** (6,7 g, randament 85%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,31 (m, 5H), 6,53-6,42 (m, 1H), 5,42-5,33 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,32-4,20 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,38 (d, 3H, J = 7,2 Hz).



Etapa 2: Compusul **2a** (6,7 g, 19,12 mmol) s-a dizolvat în metanol (60,7 mL) și apă (3,03 mL). Soluția s-a purtat cu argon timp de cinci minute. S-a adăugat lent paladiu pe carbon (umed, 10%) (1,017 g, 0,956 mmol). Reacția a fost agitată peste noapte în atmosferă de hidrogen. Soluția a fost filtrată prin celită, clătită cu metanol și concentrată. Aceasta s-a azeotropizat cu metanol și acetonitril și uleiul rezultat s-a introdus direct la vid înaintat pentru a da compusul **2b** (4,02 g, randament 97%) care s-a utilizat direct în următoarea etapă. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,78-7,63 (m, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 1,73 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

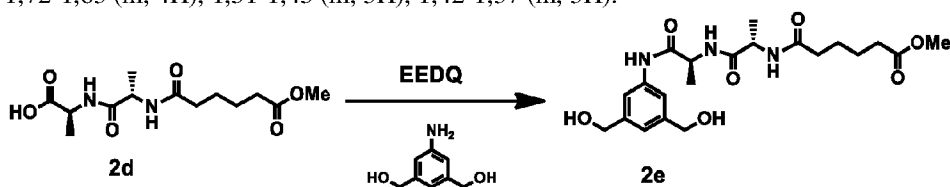


Etapa 3: Compusul **2b** (4,02 g, 18,59 mmol) și mono metiladipat (3,03 mL, 20,45 mmol) s-au dizolvat în DMF anhidră (62,0 mL). S-au adăugat EDCI·HCl (3,92 g, 20,45 mmol), HOBt (2,85 g, 18,59 mmol) și DIPEA (6,49 mL, 37,2 mmol). Amestecul a fost agitat peste noapte la temperatura camerei. Reacția a fost diluată cu diclorometan/metanol (150 mL, 5:1) și spălată cu clorură de amoniu saturată, bicarbonat de sodiu saturat și soluție salină. Acesta s-a uscat peste sulfat de sodiu, s-a filtrat și s-a stripat. Compusul s-a azeotropizat cu acetonitril (5x), apoi s-a pompat la vid înaintat la 35 °C pentru a da compusul **2c** (6,66 g, randament 100%). Materialul brut s-a preluat în etapa următoare fără purificare. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,75 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,44 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 4,52-4,44 (m, 1H), 4,43-4,36 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,35-2,29 (m, 2H), 2,25-2,18 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,36 (t, 6H, J = 6,0 Hz).

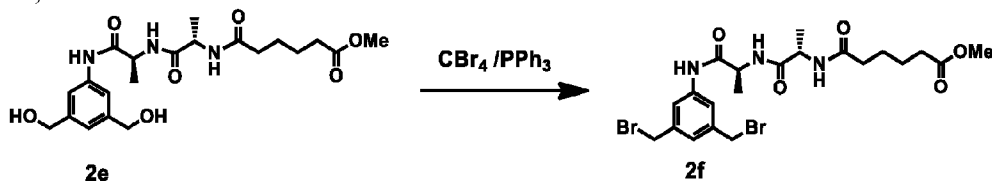


Etapa 4: Compusul **2c** (5,91 g, 16,5 mmol) s-a agitat în TFA (28,6 mL, 372 mmol) și apă deionizată (1,5 mL) la temperatura camerei timp de trei ore. Amestecul de reacție s-a concentrat cu acetonitril și introdus la vid înaintat pentru a da compusul **2d** brut ca un solid lipicios (5,88 g, randament 100%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,21 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,81 (d, 1H, J = 7,6

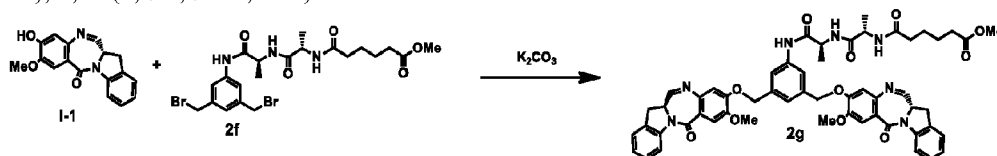
(Hz), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,40-2,33 (m, 2H), 2,31-2,24 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 4H), 1,51-1,45 (m, 3H), 1,42-1,37 (m, 3H).



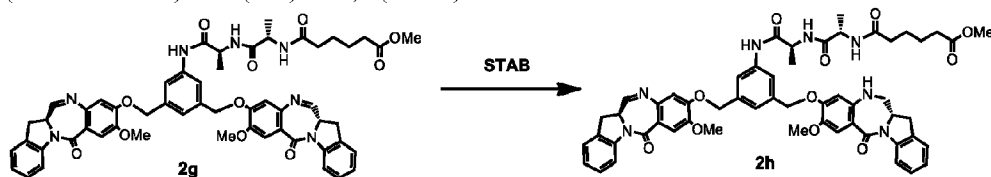
Etapa 5: Compusul **2d** (5,6 g, 18,52 mmol) s-a dizolvat în diclormetan anhidru (118 mL) și metanol anhidru (58,8 mL). S-au adăugat (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (2,70 g, 17,64 mmol) și EEDQ (8,72 g, 35,3 mmol) și reacția s-a agitat la temperatura camerei, peste noapte. Solvent s-a stripat și s-a adăugat acetat de etil. Suspensia rezultată s-a filtrat, s-a spălat cu acetat de etil și s-a uscat sub vid/N₂ pentru a da compusul **2e** (2,79 g, randament 36%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,82 (s, 1H), 8,05 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 8,01 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 7,46 (s, 2H), 6,95 (s, 1H), 5,21-5,12 (m, 2H), 4,47-4,42 (m, 4H), 4,40-4,33 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,33-2,26 (m, 2H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,54-1,46 (m, 4H), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,22 (d, 3H, *J* = 4,4 Hz).



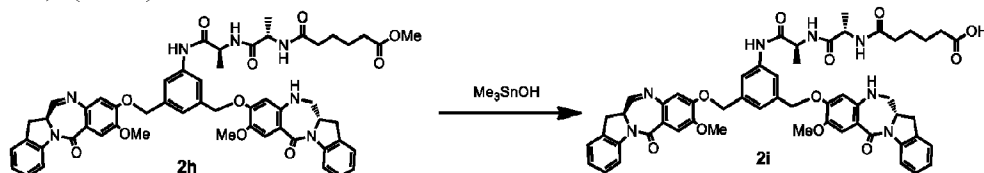
Etapa 6: Compusul **2e** (0,52 g, 1,189 mmol) și tetrabromură de carbon (1,183 g, 3,57 mmol) s-au dizolvat în DMF anhidru (11,89 mL). S-a adăugat trifenilfosfină (0,935 g, 3,57 mmol) și reacția agitată sub argon timp de patru ore. Amestecul de reacție s-a diluat cu DCM/MeOH (10:1) și s-a spălat cu apă și sare, s-a uscat peste sulfat de sodiu, s-a filtrat, și s-a concentrat. Materialul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (DCM/MeOH) pentru a da compusul **2f** (262 mg, randament 39%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,01 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,67 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,70-4,64 (m, 4H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,31-4,23 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,34-2,26 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).



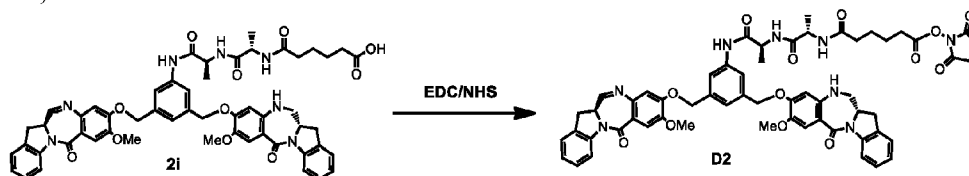
Etapa 7: Compusul de dibromură **2f** și compusul monomer IGN compus **1-1** s-au dizolvat în DMF. S-a adăugat carbonat de potasiu și s-a agitat la rt peste noapte. La amestecul de reacție s-a adăugat apă pentru a precipita produsul. Suspensia s-a agitat la rt timp de 5 min și s-a apoi filtrat și s-a uscat sub vid/N₂ timp de 1 h. Materialul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (diclormetan/metanol) pentru a da compusul **2g** (336 mg, randament 74%). LCMS = 5,91 min (metoda 15 min). MS (*m/z*): 990,6 (*M* + 1)⁺.



Etapa 8: Compusul diiminic **2g** s-a dizolvat în 1,2-dicloroetan. La amestecul de reacție s-a adăugat NaBH(OAc)₃ și s-a agitat la rt timp de 1 h. Reacția s-a diluat cu CH₂Cl₂ și s-a stins cu soluție apoasă saturată de NH₄Cl. Straturile s-au separat și s-au spălat cu sare, s-a uscat peste Na₂SO₄ și s-au concentrat. Materialul brut s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, acetonitril/apă) pentru a da compusul **2h** (85,5 mg, randament 25%). LCMS = 6,64 min (15 min metodă). MS (*m/z*): 992,6 (*M* + 1)⁺.

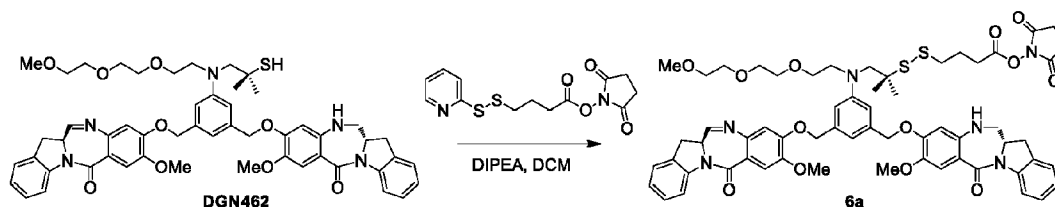


Etapa 9: Compusul metilesteric **2h** s-a dizolvat în 1,2-diclorețan. La amestecul de reacție s-a adăugat trimetilstananol și s-a încălzit peste noapte la 80 °C. Amestecul de reacție s-a răcit la rt și s-a diluat cu apă. Stratul apos s-a acidulat la pH $\square$ 4 cu HCl 1 M. Amestecul s-a extras cu CH₂Cl₂/MeOH (10:1, 3 x 20 mL). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură și s-a uscat peste Na₂SO₄ și s-au concentrat. Materialul brut s-a trecut printr-un dop de silice pentru a da compusul **2i** (48,8 mg, randament 80%). LCMS = 5,89 min (metodă 15 min). MS (m/z): 978,6 (M + 1)⁺.

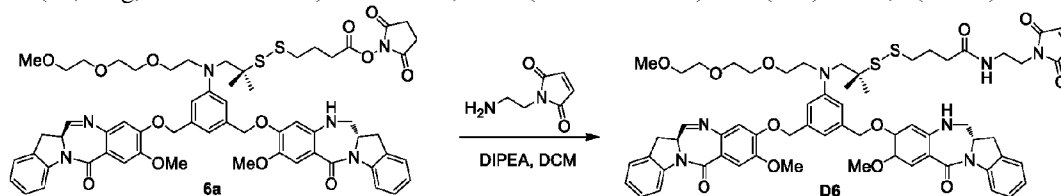


Etapa 10: EDC·HCl s-a adăugat la o soluție agitată de compus acid **2i** și N-hidroxisuccinamidă în CH₂Cl₂ la rt. Amestecul de reacție s-a agitat timp de 2 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu CH₂Cl₂ și s-a spălat cu apă (1 x 15 mL) și saramură (1 x 15 mL). Stratul organic s-a uscat peste Na₂SO₄, s-a filtrat și s-a concentrat. Materialul brut s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, acetonitril/apă) pentru a da 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-ilo)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-ilo)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoat de 2,5-dioxopirolidin-1-il, compus **D2** (8,2 mg, randament 30%). LCMS = 6,64 min (metoda 15 min). MS (m/z): 1075,4 (M + 1)⁺.

Exemplul 18. Sinteza N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-11-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-ilo)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-ilo)oxi)metil)fenil)-13,13-dimetil-2,5,8-trioxa-14,15-ditia-11-azanonadecan-19-amidei, Compus D6

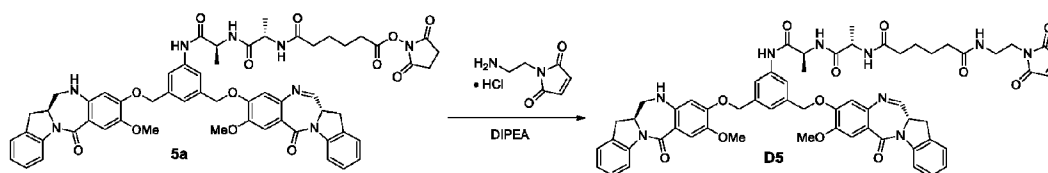


Etapa 1: La o soluție a tiolului liber **DGN462** (40 mg, 0,042 mmol) și 4-(2-piridilditio)butanat de NHS (35 mg, 80% puritate, 0,085 mmol) în diclormetan anhidru (0,5 mL) s-a adăugat diizopropiletilamină anhidră (0,015 mL, 0,085 mmol) și s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Amestecul de reacție s-a stins cu clorură de amoniu saturată și s-a diluat cu diclormetan. Amestecul obținut s-a separat într-o palmie de separare. Stratul organic s-a spălat cu saramură, s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru, filtrat și s-a stripat sub presiune redusă. Restul s-a purificat prin HPLC semi-preparativă cu fază inversă (coloană C18, CH₃CN/H₂O). Frațiunile care au conținut produsul pur s-au combinat, înghețat și liofilizat pentru a da esterul de NHS dorit, compusul **6a** (29,7 mg, randament 60%). LCMS = 9,1 min (metoda 15 min). MS (m/z): 1157,3 (M + 1)⁺.



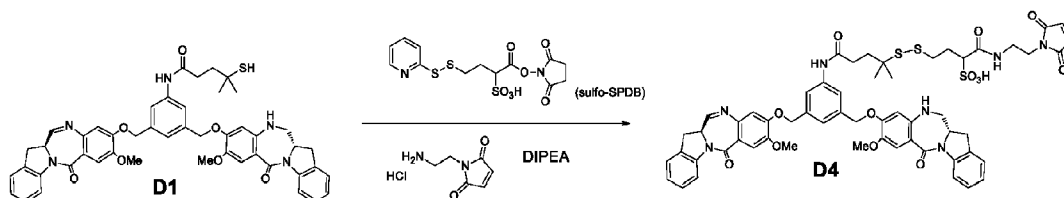
Etapa 2: La o soluție de ester de NHS, compus **6a** (12,3 mg, 0,011 mmol) și clorhidrat de N-(2-aminoetil)maleimidă (2,0 mg, 0,011 mmol) în diclormetan anhidru (0,3 mL) s-a adăugat DIPEA (0,0022 mL, 0,013 mmol). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 ore apoi s-a stripat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin HPLC semi-preparativă cu fază inversă (coloană C18, CH₃CN/H₂O). Frațiunile care au conținut produsul pur s-au combinat, înghețat și liofilizat pentru a da maleimida dorită, compus **D6** (10 mg, randament 80%). LCMS = 8,3 min (15 metoda min). MS (m/z): 1181,8 (M + 1)⁺.

Exemplul 19. Sinteza N1-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-N6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-ilo)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-

9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)adipamidei, compus D5

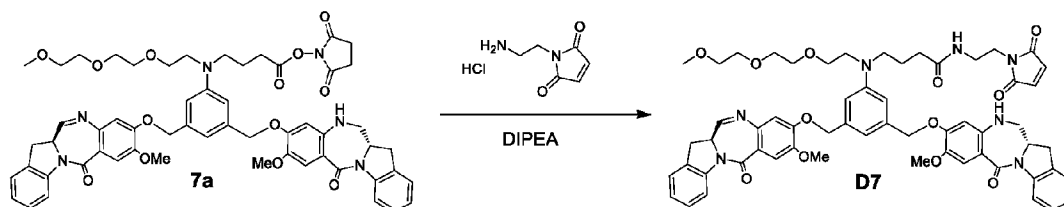
- 5 Ester NHS, compus **5a** (8,2 mg, 7,6 μ mol) și clorhidrat de 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (2,2 mg, 0,011 mmol) s-au dizolvat, la temperatura camerei, în diclormetan anhidru (305 μ L). S-a adăugat DIPEA (2,66 μ L, 0,015 mmol) și reacția și s-a agitat timp de 3,5 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat și s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, gradient, 35% la 55%).
- 10 Frațiunile de produs dorit s-au înghețat și liofilizat pentru a da maleimida, compus **D5** ca o pulbere albă solidă (5,3 mg, randament 58%). LCMS = 5,11 min (metoda 8 min). MS (m/z): 1100,6 ($M + 1$)⁺.

- Exemplul 20. Sinteza acidului 1-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)amino)-4-(((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-metil-5-oxopentan-2-il)disulfanil)-1-oxobutan-2-sulfonic, compus D4**



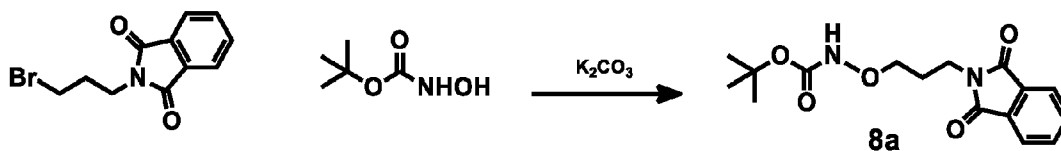
- 20 La o suspensie de tiol liber, **D1** (88 mg, 0,105 mmol) și acid 1-((2,5-dioxopirolidin-1-il)oxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfonic (sulfo-SPDB) (64,0 mg, 0,158 mmol) în diclormetan anhidru (2,10 mL) s-a adăugat DIPEA (55,0 μ L, 0,315 mmol) la temperatura camerei sub azot. Amestecul s-a agitat timp de 16 ore și apoi s-au adăugat clorhidrat 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (55,6 mg, 0,315 mmol), diclormetan anhidru (1,0 mL) și DIPEA (0,055 mL, 0,315 mmol).
- 25 Amestecul s-a agitat pentru un timp suplimentar de 5 ore la temperatura camerei după care reacția s-a concentrat *in vid*. Reziduul rezultat s-a purificat prin RP-HPLC (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Frațiunile conținând produsul dorit s-au înghețat și liofilizat pentru a da maleimida, **D4** (20 mg, randament 16%) ca un solid alb. LCMS = 4,92 min (metoda 8 min). MS (m/z): 1158,6 ($M + 1$)⁺.

- Exemplul 21. Sinteza N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etil)-11-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-2,5,8-trioxa-11-azapentadecan-15-amidei, compus D7**

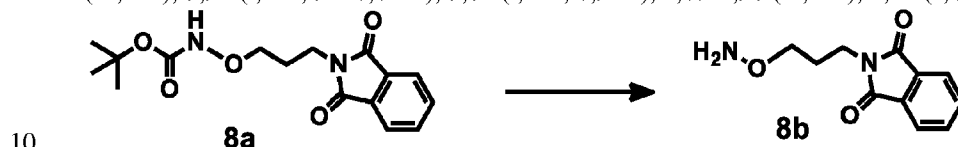


- 35 La o soluție de ester NHS, **7a** (5 mg, 4,82 μ mol) și clorhidrat 1-(2-aminoetil)-1H-pirol-2,5-dionă (1,7 mg, 9,64 μ mol) în diclormetan anhidru (200 μ L) s-a adăugat, sub azot, DIPEA (1,512 μ L, 8,68 μ mol). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 4 ore și apoi s-a concentrat *in vid*. Reziduul rezultat s-a purificat prin RP-HPLC (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Frațiunile conținând produsul dorit s-au înghețat și liofilizat pentru a da compusul de maleimidă, **D7** (3,5 mg, randament 68%). LCMS = 4,61 min (metoda 15 min). MS (m/z): 1062,8 ($M + 1$)⁺.

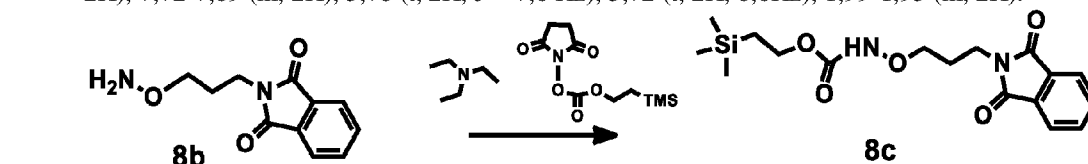
- Exemplul 22. Sinteza compusului D8**



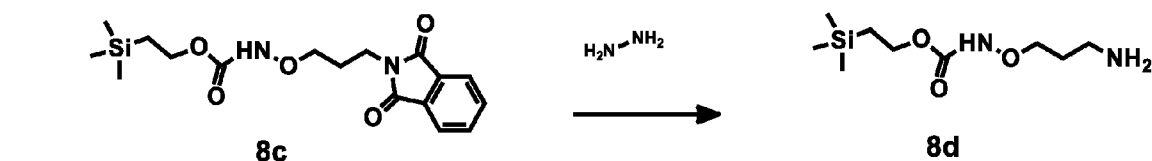
Etapa 1: Hidroxicarbamat de terț-butil (1,490 g, 11,19 mmol) s-a dizolvat în DMF anhidru (22,38 mL). S-au adăugat 2-(3-bromopropil)izoidolin-1,3-dionă (3g, 11,19 mmol) și carbonat de potasiu (3,09 g, 22,38 mmol) și reacția s-a agitat peste noapte la temperatura camerei. S-a diluat cu apă rece și s-a extras cu EtOAc. Partea organică s-a spălat cu saramură, s-a uscat peste sulfat de sodiu și reziduul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă pe silicagel (gradient EtOAc/Hex, 0% la 45%) pentru a se obține compusul **8a** ca un solid lipicios (2,41g, randament 67%). LCMS = 4,99 min (8 min metodă). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,86-7,83 (m, 2H), 7,73-7,77 (m, 2H), 7,28 (bs, 1H), 3,92 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 3,82 (t, 2H, 6,9Hz), 2,05-1,98 (m, 2H), 1,47 (s, 9H).



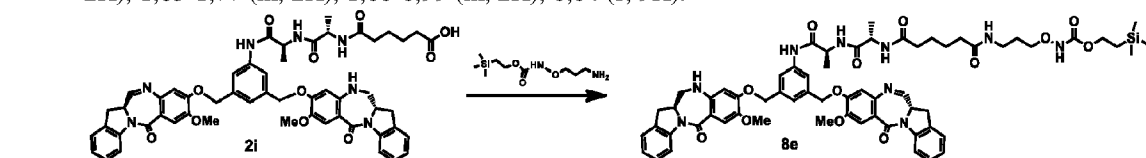
Etapa 2: Compusul **8a** (2,41 g, 7,52 mmol) s-a dizolvat în DCM anhidru (18,81 mL) și s-a răcit la $0^\circ C$ într-o baie de gheață. S-a adăugat o soluție proaspăt amestecată de DCM (9,40 mL) și TFA (9,40 mL) și s-a îndepărtat baia de gheață. Reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră și s-a diluat cu DCM și spălat cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu. Stratul organic s-a spălat cu saramură, s-a uscat, s-a filtrat și s-a concentrat pentru a da compus **8b** (1,32g, randament 80%). Materialul brut s-a utilizat fără purificare ulterioară. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,85-7,82 (m, 2H), 7,72-7,69 (m, 2H), 3,78 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 3,72 (t, 2H, 6,0Hz), 1,99-1,93 (m, 2H).



Etapa 3: Compus **8b** (100mg, 0,454 mmol) s-a dizolvat în DCM anhidru (4,5 mL) s-au adăugat TEA (127 μ L, 0,908 mmol) și carbonat de 2,5-dioxopirolidin-1-il (2-(trimetilsilil)etil) (177 mg, 0,681 mmol) și reacția s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Reacția s-a diluat cu DCM, s-a spălat cu saramură, s-a uscat, s-a filtrat, și s-a evaporat. Reziduul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă pe silicagel (EtOAc/Hex, gradient, 0% la 40%) pentru a se obține compusul **8c** (148mg, randament 89%). LCMS = 5,91 min (metoda 8 min). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,86-7,83 (m, 2H), 7,73-7,69 (m, 2H), 7,39 (bs, 1H), 4,26-4,20 (m, 2H), 3,94 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 3,83 (t, 2H, 6,9Hz), 2,06-1,98 (m, 2H), 1,05-0,98 (m, 2H), 0,04 (s, 9H).

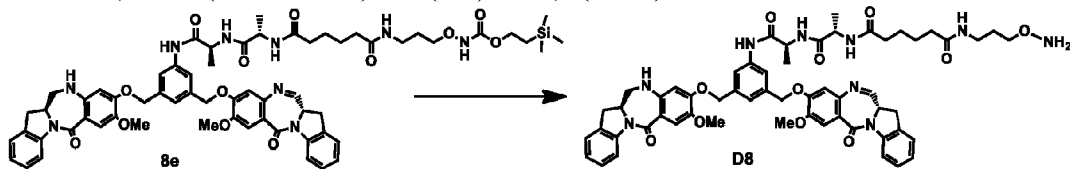


Etapa 4: Compusul **8c** (148mg, 0,406 mmol) s-a dizolvat în etanol (2,7mL) și agitat până la solubilizarea completă. S-a adăugat hidrazină (63,7 μ L, 2,030 mmol) și reacția s-a agitat la temperatura camerei până la formarea rapidă a unui precipitat alb la 1 oră. Reacția s-a filtrat printr-un celită și s-a clătit cu etanol suplimentar. Filtratul s-a evaporat și s-a purificat prin cromatografie rapidă pe silicagel (gradient A= MeOH, B= EtOAc, 100% la 10%). Frațiile de produs s-au detectat prin masă și s-a evaporat pentru a da compusul **8d** ca un solid lipicios (67,5mg, randament 71%). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4,27-4,21 (m, 2H), 3,98 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz), 2,92-2,87 (m, 2H), 1,85-1,77 (m, 2H), 1,06-0,99 (m, 2H), 0,04 (s, 9H).



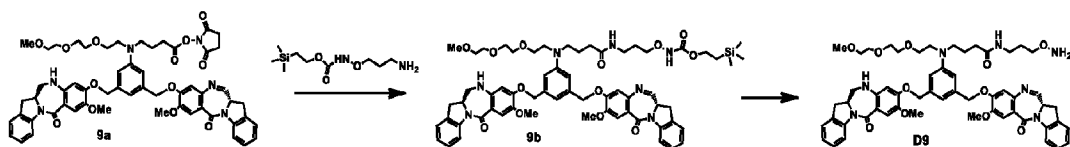
40

Etapa 5: Compusul **2i** (30mg, 0,031 mmol) descris mai sus în Exemplul 17 s-a suspendat în DCM anhidru (613 μ l). S-a adăugat în picături DMF anhidru până când soluția s-a limpezit. S-au adăugat compusul **8d** (21,57 mg, 0,092 mmol), EDC·HCl (29,4 mg, 0,153 mmol), și DMAP (0,749 mg, 6,13 μ mol) și reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. S-a diluat cu DCM/MeOH 10:1 și apoi s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras cu DCM/MeOH 10:1 și organicul combinat s-a uscat și s-a concentrat pentru a da Compusul **8e** (49mg) care s-a utilizat fără purificare ulterioară. LCMS = 5,94 min (8 min metodă). MS (m/z): 1194,4 (M + 1)⁺.



Etapa 6: Compusul **8e** (49mg, 0,041 mmol) s-a dizolvat în THF (820 μ l) și reacția s-a răcit la 0°C într-o baie de gheață. S-a adăugat TBAF (205 μ l, 0,205 mmol) și reacția s-a agitat timp de 15 minute înainte de a se îndepărta baia de gheață. S-a agitat la temperatura camerei până la terminare. Reacția s-a răcit la 0°C, s-a stins cu clorură de amoniu saturată și s-a extras cu DCM/MeOH 10:1. Organicul s-a spălat cu saramură, s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a evaporat. Materialul brut s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, acetonitril/apă) pentru a da compusul **D8** (17,6 mg, randament 54% pentru 2 etape). LCMS = 5,1 min (metoda 8 min). MS (m/z): 1050,4 (M + 1)⁺.

Exemplul 23. Sinteza compusului D9



Etapa 1: Compusul **9a** (17mg, 0,016 mmol) s-a dizolvat în DCM (328 μ l). Compusul **8d** (5,76 mg, 0,025 mmol) și DIPEA (5,71 μ l, 0,033 mmol) s-au adăugat la temperatura camerei și reacția s-a agitat până la terminare. S-a diluat cu 10:1 DCM:MeOH și s-a spălat cu saramură. Organicul s-a uscat și s-a concentrat pentru a da compusul **9b** care s-a utilizat direct.

Etapa 2: Compusul **D9** s-a preparat similar compusului **D8** din Exemplul 23. Materialul brut s-a purificat prin RPHPLC (coloană C18, acetonitril/apă) pentru a da compusul **D9** (5 mg, randament 31% pentru 2 etape). LCMS = 5,68 min (8 min metodă). MS (m/z): 1012,5 (M + 1)⁺.

Exemplul 24. Eficacitatea *in vivo* a huCD123-CysMab-D5 în modelul diseminat Kasumi-3-Luc-mCh-Puro

Pentru a se testa eficacitatea huCD123-CysMab-D5 în ceea ce privește reducerea încărcăturii tumorale diseminate *in vivo*, s-a utilizat un model de tumoare diseminată care exprimă luciferaza în combinație cu imagistica animalelor pe viu, astfel cum este descris în protocol de mai jos.

Șoarecii femele NSG (Jackson Labs) au fost injectați fiecare intravenos (IV) în vena cozii cu 5×10^6 celule Kasumi-3-Luc-mCh-Puro, o linie celulară AML umană concepută pentru a exprima luciferaza și mCherry (la Molecular Imaging, Ann Arbor, MI). Expresia luciferazei de către celulele Kasumi-3 permite cuantificarea încărcării tumorale utilizând un dispozitiv imagistic pe animal viu, care detectează semnalul de bioluminescență produs de luciferază la expunerea în vivola substratul de luciferază injectat, D-luciferină. În ziua 6 post-inoculare, s-au efectuat imagistica șoarecilor și au fost împărțiți aleatoriu în grupuri de studiu pe baza imagisticii bioluminescente (BLI). La 24 de ore înainte de fiecare administrare de conjugat, șoarecii au fost injectați intraperitoneal (IP) cu 400 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a bloca receptorii de Fc de pe celulele Kasumi-3 AML, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În zilele 7 și 41 post-inoculării Kasumi-3, șoarecii au primit injecții IV unice în vena laterală a cozii fie cu vehicul, 10 μ g/kg (de D5; 0,80 mg/kg cu huCD123) huCD123-CysMab-D5, 3 μ g/kg (de D5; 0,240 mg/kg cu huCD123) huCD123-CysMab-D5 sau 10 μ g/kg dintr-un conjugat martor nețintit KTI-CysMab-D5. În zilele 5 și 10 post-administrării conjugatului, șoarecii au primit o injecție IP de 100 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc de pe celulele tumorale AML.

S-a efectuat procedura imagistică a șoarecilor în zilele 11, 13, 17, 20, 24, 27, 31, 38, 41, 45, 52, 59, 66, 73 și 80 post-inoculare Kasumi-3. Imagistica de bioluminescență *in vivo* s-a efectuat la Molecular Imaging (Ann Arbor, MI) utilizand un dispozitiv imagistic optic IVIS 50 (Xenogen, Alameda, CA). Animalelor li s-a efectuat procedura imagistică, câte trei deodată, sub anestezie cu □ 1-2% izofluran gazos. Fiecare șoarece a fost injectat IP cu 150 mg/kg D-luciferină (substrat de luciferază) și i s-a efectuat procedura imagistică în poziție culcat pe burtă și culcat pe spate la 10 minute după injecție. S-a folosit un compartiment mare la mic al cipului CCD, și timpul de expunere a fost ajustat (2 secunde până la 2 minute) pentru a se obține cel puțin câteva sute de numere din tumorile care sunt observabile la fiecare mouse din imagine și pentru a se evita saturarea cip-ului CCD. Imaginile au fost analizate utilizand Matlab R2015a. Un script personalizat a plasat ROI-uri cu volum fix pe imaginile predispuse și supine ale întregului corp pentru fiecare animal, și au fost etichetate pe baza identificării animalului. Fluxul total (fotoni/sec) a fost calculat și exportat pentru toate ROI-urile pentru a facilita analizele între grupuri. ROI-urile predispuse și supine au fost însumate împreună pentru a se estima încărcătura tumorală a întregului corp.

%T/C s-a calculat după cum urmează = $[(T, \text{BLI median a grupului tratat}) / (C, \text{BLI median a grupului martor})] \times 100\%$. Conform standardelor NCI, o T/C $\leq 42\%$ este nivelul minim de activitate antitumorală, în timp ce o valoare T/C > 42% este inactivă, și o valoare T/C < 10% este considerată foarte activă.

Întârzierea încărcării tumorale (% TBD) a fost calculată după cum urmează: %TBD = $(T-C)/C \times 100\%$, în care T-C, în care T este timpul (în zile) pentru grupul tratat și C este timpul (în zile) pentru grupul martor, pentru a se obține semnalul BLI desemnat. Adaptând aceleași valori aplicate pentru la % ILS, considerăm că % TBD > 25 este minim activ, % TBD > 40 este activ și % TBD > 50 este foarte activ.

Șoarecii au fost cântăriți de două ori pe săptămână și au fost monitorizați în ceea ce privește semnele clinice pe toată durata studiului. Oricare dintre șoareci care au atins criteriile de eutanasiu au fost eutanasiați. Decesele spontane au fost înregistrate pe măsură ce au fost descoperite. Studiul a fost încheiat în ziua 115 inocularea celulelor post-tumorale.

Experimentele preliminare arată că tratamentul cu oricare dintre dozele de huCD123-CysMab-D5 a determinat o regresie inițială a încărcării tumorale în timp, ajungând la un nivel inferior în ziua 27, în timp ce încărcarea tumorală a crescut constant în grupurile tratate cu vehicul și KTI-CysMab-D5 în această perioadă de timp. Vezi, de exemplu, FIG. 22. Inhibarea creșterii tumorii (valoare T/C) calculată pentru aceste experimente preliminare a arătat că 10 μg/kg și 3 μg/kg de huCD123-CysMab-D5 sunt puternic active în ziua 27, cu valori %T/C de 0,20 și respectiv 0,25. De asemenea, a fost calculată întârzierea încărcării tumorale (% TBD), utilizând semnalul BLI în ziua 45 a grupului tratat cu vehicul ca BLI desemnat. Conform acestei metrici, ambele doze de huCD123-CysMab-D5 sunt puternic active, având ca rezultat %TBD de > 75% (10 μg/kg huCD123-CysMab-D5) și > 65% (3 μg/kg huCD123-CysMab-D5), în contrast cu 0% TBD observat cu 10 μg/kg de conjugat martor KTI-CysMab-D5. În plus, tratamentul cu huCD123-CysMab-D5 la ambele doze de 3 μg/kg și 10 μg/kg a extins supraviețuirea la șoareci 6/6 cu P53 mutat și AML rezistent la multiple medicamente în comparație cu martorul (a se vedea FIG. 23).

Supraviețuirea pentru fiecare dintre cele patru grupuri de studiu la finalul studiului este prezentată în FIG. 31 și este centralizată în tabelul de mai jos. Șoarecii tratați cu vehicul au avut o supraviețuire medie de 70 de zile. În contrast, șoarecii tratați cu 10 μg/kg (de D5, 0,80 mg/kg cu huCD123) de huCD123-CysMab-D5 au avut o supraviețuire medie de 115 zile, rezultând un ILS de 64% (puternic activ). Asemănător, șoarecii tratați cu 3 μg/kg (de D5, 0,240 mg/kg cu huCD123) de huCD123-CysMab-D5 au avut un timp de supraviețuire mediu de 105 zile, rezultând un ILS de 50% (puternic activ). Șoarecii tratați cu 10 μg/kg (de D5) de conjugat martor neîntit huKTI-CysMab-D5 au avut o supraviețuire medie de 65,5 zile, care a generat un ILS de 0% (inactiv), indicând că activitatea ridicată obținută cu huCD123-CysMab-D5 este dependentă de CD123.

Grup	Tratament	Doză (μg/kg D5)	Doză (mg/kg huCD123)	Supraviețuire medie (Zile)	T-C	%IL S	Activitate
1	Vehicul	-	-	70	-	-	-
2	huCD123-	10	0,80	115	45	64	Puternic

Grup	Tratament	Doză (µg/kg D5)	Doză (mg/kg huCD123)	Supravieţuire medie (Zile)	T-C	%ILS	Activitate
	CysMab-D5						activ
3	huCD123-CysMab-D5	3	0,240	105	35	50	Puternic activ
4	huKTI-CysMab-D5	10	0,80	65,5	0	0	Inactiv

Pentru N = 6, supravieţuirea medie (zile) este media zilelor când şoarecii al 3^{-lea} şi al 4^{-lea} sunt pierduţi. Utilizând valorile medii de supravieţuire, se calculează % ILS (creşterea duratei de viaţă) astfel: $\%ILS = (T-C)/C \times 100\%$, în care T este supravieţuirea medie (în zile) a grupului tratat şi C este supravieţuirea medie (în zile) a grupului martor. Standardele NCI pentru modelele diseminate sunt: $ILS \geq 25\%$ este minim activ, $ILS > 40\%$ este activ, şi $ILS \geq 50\%$ este puternic activ.

Exemplul 25. Conjugatul huCD123-CysMab-D5 induce distrugerea ADN-ului conducând la oprirea ciclului celular în faza S şi moartea celulară mediată de apoptoza mediată a celulelor MV4-11

Pentru a evalua mecanismul morţii celulare mediate de huCD123-CysMab-D5, celulele AML MV4-11 care exprimă CD123 au fost tratate cu 10 nM de huCD123-CysMab-D5 timp de o oră, urmată de o incubare suplimentară într-un mediu de cultură liber de conjugat timp de 48 de ore la 37°C. Celule MV4-11 netratate au fost utilizate ca martor. Celulele au fost recoltate şi colorate cu diverşi reactivi pentru a se cuantifica numărul de celule în diferite etape ale ciclului celular (iodură de propidiu), celule cu ADN deteriot (pH2AX), apoptoză (anexină-V şi caspază-3 scindată) şi membrană plasmatică perforată (TO-PRO-3). Astfel cum este demonstrat în FIG. 24, incubarea celulelor MV4-11 cu huCD123-CysMab-D5 conduce la deteriorarea ADN-ului, oprirea în faza S a ciclului celular şi moartea celulară mediată de apoptoză.

Exemplul 26. Eficacitatea in vivo a huCD123-CysMab-D5 în modelul diseminat Molm-13

Colectarea şi analiza datelor pentru toate modelele diseminate: Şoarecii au fost cântăriţi de două ori pe săptămână şi au fost monitorizaţi în ceea ce priveşte semnele clinice pe toată durata studiului. Punctul final măsurat a fost supravieţuirea. Animalele au fost eutanasiate când a fost prezentă paralizia piciorului din spate, greutatea corporală a scăzut cu > 20% din greutatea pre-tratament, a apărut o tumoare vizibilă sau au fost vizibile orice semne de suferinţă. Decesele spontane au fost înregistrate atunci când au fost descoperite. Pentru modelele diseminate, întârzierea creşterii tumorale este calculată ca T-C, în care T este timpul mediu de supravieţuire (în zile) al unui grup tratat şi C este timpul mediu de supravieţuire (în zile) al grupului martor cu vehicul. Procentul de creştere a duratei de viaţă (% ILS) pentru modelele diseminate este calculat utilizând următoarea formulă: $\%ILS = (T-C)/C \times 100\%$. Activitatea antitumorală a fost evaluată conform standardelor NCI pentru modelele diseminate: $ILS \geq 25\%$ este minimum activ, $ILS > 40\%$ este activ, şi $ILS \geq 50\%$ este puternic activ.

Pentru a se testa eficacitatea huCD123-CysMab-D5 în ceea ce priveşte capacitatea de a reduce încărcarea tumorală *in vivo*, a fost utilizat un model de tumoare diseminată astfel cum este descris în protocolul de mai jos.

Şoareci nuzi atimici femele au fost injectaţi fiecare intravenos în vena laterală a cozii cu 10×10^6 celule Molm-13, o linie de celule AML umane, în 100 µl de mediu liber de ser. În ziua 7 după inoculare, şoarecii au fost randomizaţi în grupurile de studiu. Cu 24 de ore înainte de administrarea conjugatului, şoarecii au fost injectaţi intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI neîntit pentru a bloca receptorii de Fc de pe celulele Molm-13 AML, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 7 post inoculare de Molm-13, şoarecii au primit o singură injecţie intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 0,1 µg/kg (de D5; 0,008 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 0,3 µg/kg (de D5; 0,024 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 1 µg/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 1 µg/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huKTI) huKTI-CysMab-D5 conjugat martor, 0,1 µg/kg (de D2; 0,0059 mg/kg de huCD123) D2 legat la huCD123 prin lizină, 0,3 µg/kg (de D2; 0,018 mg/kg by huCD123) a D2 legat prin lizină la huCD123, 1 µg/kg (de D2; 0,059 mg/kg de huCD123) D2 legat la huCD123 prin lizină sau 1 µg/kg (de D2; 0,059 mg/kg de chKTI) D2 legat la chKTI prin lizină drept

conjugat martor. În zilele 4 și 9 după administrarea conjugatului, șoarecii au primit injecții intraperitoneale de 100 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a se asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc de pe celulele tumorale AML. Rezultatele sunt centralizate în tabelul de mai jos și în FIG. 25.

5

Conjugatul huCD123-CysMab-D5 a fost puternic activ la toate cele trei doze testate, generând fiecare o %ILS de > 262,5 zile. În contrast, o doză 1 μg/kg (de D5) de conjugat martor huKTI-CysMab-D5 nețintit a fost inactivă, generând o ILS de 0%. Aceasta demonstrează activitatea dependentă de CD123 a huCD123-CysMab-D5. Similar, D2 legat la huCD123 prin lizină a fost puternic activ la toate cele trei doze testate, generând fiecare o %ILS de > 59. Cu toate acestea, o doză de 1 μg/kg (de D2) de conjugat martor nețintit de D2 legat la chKTI prin lizină a fost de asemenea inactiv, generând o ILS de 11%, demonstrând activitatea dependentă de CD123 a D2 legat prin lizină la huCD123. O diferență evidentă între huCD123-CysMab-D5 și D2 legat la huCD123 prin lizină poate fi observată atunci când se compară %ILS obținută cu doza de 0,1 μg/kg, cea mai scăzută doză testată, a fiecărui conjugat care țintește CD123. % ILS obținut cu 0,1 μg/kg de huCD123-CysMab-D5 a fost de 262,5 zile, în timp ce, cea obținută cu o doză de 0,1 μg/kg de D2 legat la huCD123 prin lizină a fost de 59 zile, indicând superioritatea huCD123-CysMab-D5 în acest model.

10

15

Grup de tratament	Timp de supraviețuire medie (Zile)	Intarzierea creșterii tumorii (T-C, Zile)	% ILS	Rezultat
Vehicul	28	0	0	---
huCD123-CysMab-D5 (0,1 μg/kg)	101,5	73,5	262,5	Puternic activ
huCD123-CysMab-D5 (0,3 μg/kg)	> 101,5	> 73,5	> 262,5	Puternic activ
huCD123-CysMab-D5 (1 μg/kg)	> 101,5	> 73,5	> 262,5	Puternic activ
huKTI-CysMab-D5 (1 μg/kg)	26,5	0	0	Inactiv
D2 legat la huCD123 prin lizină (0,1 μg/kg)	44,5	16,5	59	Puternic activ
D2 legat la huCD123 prin lizină (0,3 μg/kg)	> 101,5	> 73,5	> 262,5	Puternic activ
D2 legat la huCD123 prin lizină (1 μg/kg)	> 101,5	> 73,5	> 262,5	Puternic activ
D2 legat la chKTI prin lizină (1 μg/kg)	31	3	11	Inactiv

20 Exemplul 27. Eficacitatea in Vivo a huCD123-CysMab-D5 in modele subcutanate de EOL-1

Colectarea și analiza datelor pentru toate modelele subcutanate: Șoarecii au fost cântăriți de două ori pe săptămână și au fost monitorizați în ceea ce privește semnele clinice pe toată durata studiului. Animalele au fost eutanasiate când a fost prezentă paralizia piciorului din spate, greutatea corporală a scăzut cu > 20% din greutatea pre-tratament, s-au produs ulcerări tumorale sau când au fost vizibile semne de suferință. Volumele tumorale s-au măsurat o dată la de două ori pe săptămână în trei dimensiuni utilizând un șubler. Volumul tumoral a fost exprimat în mm³ utilizând formula $V = \text{Lungime} \times \text{Lățime} \times \text{Înălțime} \times \frac{1}{2}$. (Tomayko and Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol. 24: 148-54 (1989)). Activitatea a fost evaluată astfel cum este descris în Bissery și colab, Cancer Res. 51: 4845-52 (1991). Inhibarea creșterii tumorale (valoarea T/C) a fost determinată utilizând următoarea formulă: $T/C (\%) = (\text{Volumul tumoral median al individului tratat} / \text{Volumul tumoral median al individului martor}) \times 100\%$. Volumul tumoral a fost determinat simultan pentru grupurile tratate (T) și cu martor cu vehicul (C) atunci când volumul tumoral al matorului cu vehicul a atins o dimensiune predeterminată (Bissery și colab, Cancer Res. 51: 4845-52 (1991)). S-a determinat volumul tumoral median zilnic pentru fiecare grup tratat, inclusiv pentru șoarecii lipsiți de tumori (0 mm³). Conform standardelor NCI, $T/C \leq 42\%$ este nivelul minim al activității anti-tumorale. A $T/C < 10\%$ este considerat un nivel ridicat al activității anti-tumorale.

35

Pentru a testa eficacitatea huCD123-CysMab-D5 în ceea ce privește capacitatea de a reduce încărcarea tumorală *in vivo*, au fost utilizate trei studii pe un model de tumoare subcutanată, astfel cum este descris în protocoalele de mai jos.

5

Intr-un prim studiu, șoarecii atimici nuzi femele au fost inoculați subcutanat în flancul drept, fiecare cu 10×10^6 celule EOL-1, o linie de celule AML umane, în 100 μ l de mediu lipsit de ser/matrigel. În ziua 6 după inocularea cu EOL-1, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în grupurile de studiu. Cu 24 de ore înainte de administrarea conjugatului, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI neșintit pentru a bloca receptorii de Fc de pe celulele EOL-1 AML, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 7 post inoculare cu EOL-1, șoarecii au primit o singură injecție intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 1 μ g/kg (de D2; 0,050 mg/kg de huCD123) de D2 legat prin lizină la huCD123, 3 μ g/kg (de D2; 0,151 mg/kg de huCD123) de D2 legat prin lizină la huCD123, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huKTI) huKTI-CysMab-D5 conjugat martor, 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huKTI) huKTI-CysMab-D5 conjugat martor, 1 μ g/kg (de D2; 0,050 mg/kg de chKTI) D2 legat la chKTI prin lizină sau 3 μ g/kg (de D2; 0,151 mg/kg de chKTI) D2 legat la chKTI prin lizină conjugat martor. În zilele 4 și 9 după administrarea conjugatului, șoarecii au primit o injecție intraperitoneală de 100 mg/kg de anticorp chKTI neșintit pentru a asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc pe celulele tumorale AML. Rezultatele sunt reprezentate în tabelul de mai jos și în FIG. 26.

Dozele de 1 μ g/kg (de D5) și 3 μ g/kg de huCD123-CysMab-D5 au fost active și respectiv puternic active, generând 13% (3/6 CRs) și respectiv 2% T/C (5/6 CRs). În contrast, dozele de 1 μ g/kg (de D5) și 3 μ g/kg de huKTI-CysMab-D5 conjugat martor neșintit au fost inactiv, cu % T/C de ≥ 73 , demonstrând că activitatea huCD123-CysMab-D5 a fost dependentă de CD123. Dozele de 1 μ g/kg (de D2) și 3 μ g/kg de D2 legat la huCD123 prin lizină au fost active și respectiv puternic active, generând 30% (1/6 CRs) și respectiv 1% (6/6 CRs). În contrast, dozele de 1 μ g/kg (de D2) și 3 μ g/kg de conjugat martor de D2 legat la chKTI prin lizină neșintit au fost ambele inactiv, generând o T/C de 75% (0/6 CRs) și respectiv o T/C de 81% (0/6 CRs). Aceasta demonstrează că activitatea D2 legat la huCD123 prin lizină a fost dependentă de CD123. O diferență între cei doi conjugăți care țintesc CD123 devine evidentă atunci când se compară 1 μ g/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5 cu 1 μ g/kg (de D2) dintr-un D2 legat prin lizină la huCD123, în sensul că primul are ca rezultat un T/C de 13% și CR-uri de 3/6 și ultimul are ca rezultat un T/C de 30% și numai 1/6 CR, demonstrând superioritatea aparentă a huCD123-CysMab-D5 în acest model.

Grup de tratament	% T/C (Day 15)	PR	CR	Rezultat
Vehicul	---	1/6	1/6	-
huCD123-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	13	3/6	3/6	Activ
huCD123-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	2	5/6	5/6	Puternic activ
D2 legat la huCD123 prin lizină (1 μ g/kg)	30	1/6	1/6	Activ
D2 legat la huCD123 prin lizină (3 μ g/kg)	1	6/6	6/6	Puternic activ
huKTI-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	100	0/6	0/6	Inactiv
huKTI-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	73	1/6	1/6	Inactiv
D2 legat la chKTI prin lizină (1 μ g/kg)	75	0/6	0/6	Inactiv
D2 legat la chKTI prin lizină (3 μ g/kg)	81	0/6	0/6	Inactiv

Intr-un al doilea studiu, șoarecii nuzi atimici femele au fost inoculați fiecare subcutanat în flancul drept cu 10×10^6 celule EOL-1, o linie de celule AML umane, în 100 μ l mediu/matrigel liber de ser. În ziua 6 post-inoculare de EOL-1, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în grupuri de studiu. Cu 24 h înainte de administrarea conjugatului, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI neșintit pentru a bloca receptorii de Fc pe celulele AML EOL-1, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 7 post- inoculare de EOL-1, șoarecii au primit o singură injecție intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 0,5 μ g/kg (de D5; 0,04

45

mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5 sau 1 µg/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5. În zilele 4 și 9 după administrarea conjugatului, șoarecii au primit o injecție intraperitoneală de 100 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc pe celulele tumorale AML. Rezultatele sunt reprezentate în tabelul de mai jos și în FIG. 27.

Doza de 0,5 µg/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5 a fost activă, generând o T/C 11% și 3/6 CR-uri. Similar, doza de 1 µg/kg de huCD123-CysMab-D5 a fost puternic activă, generând o T/C de 3% și 6/6 CR-uri.

Grup de tratament	% T/C (Day 16)	PR	CR	Rezultat
Vehicul	---	0/6	0/6	---
huCD123-CysMab-D5 (0,5 µg/kg)	11	3/6	3/6	Activ
huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)	3	6/6	6/6	Puternic activ

Intr-un al treilea studiu, șoareci nuzi atimici femele au fost inoculați fiecare cu 10×10^6 celule EOL-1, o linie de celule de AML umane, în 100 µl mediu liber de ser/matrigel subcutanat în flancul drept. În ziua 6 post-inoculare de EOL-1, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în grupurile de studiu. Cu 24 h înainte de administrarea conjugatului, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a bloca receptorii de Fc pe celulele AML EOL-1, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 7 post-inoculare de EOL-1, șoarecii au primit o singură injecție intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 3 µg/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 3 µg/kg (de D5) FGN849 (forma liberă de medicament a încărcăturii), 0,24 mg/kg anticorp huCD123neconjugat (gol), sau 3 µg/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5. Șoarecii tratați cu citarabină au primit o singură injecție intraperitoneală în zilele 7, 8, 9, 10 și 11 post-inoculare de EOL-1, și șoarecii tratați cu azacitidină au primit o singură injecție intraperitoneală în zilele 7, 10, 13, 16 și 19 post-inoculare de EOL-1. În zilele 4 și 9 după administrarea conjugatului, șoarecii au primit o injecție intraperitoneală de 100 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a se asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc pe celulele tumorale AML. Rezultatele sunt reprezentate în tabelul de mai jos și în FIG. 28.

Dintre toate articolele testate, numai doza de 3 µg/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5 a demonstrat activitate, generând 1 %T/C puternic activ și 8/8 CR-uri, în contrast cu doza de 3 µg/kg (de D5) de conjugat martor nețintit huKTI-CysMab-D5, care a generat 69% T/C și 0/8 CR-uri. O doză de 3 µg/kg (de D5) de medicament liber neconjugat, FGN849, a fost de asemenea inactivă, cu o 92 % T/C și 0/8 CRs. Asemănător, o doză 0,24 mg/kg de anticorp huCD123 neconjugat ("gol"), care se potrivește cu doza de anticorp huCD123-CysMab-D5, a fost inactiv, cu 60% T/C și 0/8 CR-uri. Citarabina, administrată într-o doză de 75 mg/kg zilnic timp de 5 zile, a fost inactivă, cu 84% T/C și 0/8 CR-uri. Azacitidina, administrată într-o doză de 3,75 mg/kg o dată la fiecare trei zile pentru 5 doze, a fost inactivă, cu 59% T/C și 0/8 CR-uri.

Grup de tratament	% T/C (Day 16)	PR	CR	Rezultat
Vehicul	---	0/8	0/8	-
huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)	1	8/8	8/8	Puternic activ
FGN849 (3 µg/kg)	92	0/8	0/8	Inactiv
Anticorp gol (0,24 mg/kg)	60	0/8	0/8	Inactiv
huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)	69	0/8	0/8	Inactiv
Citarabină; 75 mg/kg, qd x 5	84	0/8	0/8	Inactiv
Azacitidină; 3,75 mg/kg, q3d x 5	59	0/8	0/8	Inactiv

Exemplul 28. Eficacitatea in Vivo a huCD123-CysMab-D5 și huCD123-SeriMab-sD1 într-un model diseminat MV4-11

Pentru a se testa eficacitatea huCD123-CysMab-D5 și huCD123-SeriMab-sD1 în ceea ce privește capacitatea de a reduce încărcarea tumorală in vivo, a fost utilizat un model de tumoare diseminată astfel cum este descris în protocolul de mai jos.

Șoarecii femele NOD SCID au fost pre-tratați cu 150 mg/kg ciclofosfamidă pentru a abla parțial măduva osoasă pentru a îmbunătăți grefarea celulelor MV4-11. Ciclofosfamidă (Baxter, Lot #4E011, Exp 05,2017) s-a reconstituit cu 0,9% NaCl și s-a administrat intraperitoneal la șoareci in ziua -3 și ziua -2 înainte de inocularea celulelor MV4-11 în ziua 0. După tratamentul cu ciclofosfamidă astfel cum este descris mai sus, șoarecii au fost injectați intravenos fiecare în vena laterală a cozii cu 3×10^6 celule MV4-11, o linie de celule de AML umane, în 100 μ l de mediu liber de ser. In ziua 7 post-inoculare de MV4-11, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în grupurile de studiu. Cu 24 h înainte de administrarea conjugatului, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI nețintit pentru a bloca receptorii de Fc pe celulele de AML MV4-11, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 7 post-inoculare de MV4-11, șoarecii au primit o singură injecție intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huCD123-CysMab-D5, 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg huCD123) huCD123-CysMab-D5, 1 μ g/kg (de D1; 0,054 mg/kg de huCD123) huCD123-SeriMab-sD1, 3 μ g/kg (de D1; 0,163 mg/kg de huCD123) huCD123-SeriMab-sD1, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5, 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5, 1 μ g/kg (de D1; 0,07 mg/kg de chKTI) conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1 sau 3 μ g/kg (de D1; 0,21 mg/kg de chKTI) conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1. Rezultatele sunt centralizate în tabelul de mai jos și în FIG. 29.

Ambele doze de 1 μ g/kg și de 3 μ g/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5 au fost puternic active, generând fiecare o %ILS de ≥ 70 . În contrast, doza de 1 μ g/kg (de D5) de conjugat martor huKTI-CysMab-D5 nețintit a fost minimal activă, generând un ILS de 28%. Doza de 3 μ g/kg de huKTI-CysMab-D5 a fost inactivă, cu o ILS de 0%, demonstrând activitatea dependentă de CD123 a huCD123-CysMab-D5. Dozele de 1 μ g/kg și 3 μ g/kg (cu sD1) de huCD123-SeriMab-sD1 au fost ambele puternic active, generând fiecare o %ILS de ≥ 101 . Cu toate acestea, atunci când se examinează activitatea conjugatelor martor chKTI-SeriMab-sD1 nețintiți, un grad ridicat de activitate nespecifică, neținând CD123 este evidentă din doza de 3 μ g/kg (de sD1), care generează o 65% ILS (puternic activ). Aceasta indică o parte din activitatea ridicată a dozei de 3 μ g/kg (de sD1) de huCD123-SeriMab-sD1 care țintește CD123 se datorează probabil mecanismelor nespecifice de preluare a medicamentelor care nu implică țintirea CD123. În contrast, doza de 1 μ g/kg (cu sD1) de conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1 este inactivă, cu o %ILS de 15, demonstrând că activitatea nespecifică a dozei de 3 μ g/kg doză de chKTI-SeriMab-sD1 este dependentă de doză și că activitatea ridicată a dozei de 1 μ g/kg (cu sD1) doză de huCD123-SeriMab-sD1 este într-adevăr dependentă de CD123.

Grup de tratament	Timp de supraviețuire medie (Zile)	Intarzierea creșterii tumorii (T-C, Zile)	% ILS	Rezultat
Vehicul	46	0	0	---
huCD123-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	81	35	76	Puternic activ
huCD123-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	78	32	70	Puternic activ
huCD123-SeriMab-sD1 (1 μ g/kg)	92,5	46,5	101	Puternic activ
huCD123-SeriMab-sD1 (3 μ g/kg)	>92,5	> 46,5	> 101	Puternic activ
huKTI-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	59	13	28	Minim Activ
huKTI-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	46	0	0	Inactiv
chKTI-SeriMab-sD1 (1 μ g/kg)	53	7	15	Inactiv
chKTI-SeriMab-sD1 (3 μ g/kg)	76	30	65	Puternic activ

Exemplul 29. Eficacitatea in vivo a huCD123-CysMab-D5 și huCD123-SeriMab-sD1 într-un model subcutanat MV4-11

Pentru a testa eficacitatea huCD123-CysMab-D5 și huCD123-SeriMab-sD1 în ceea ce privește capacitatea de a reduce încărcarea tumorală in vivo, s-a utilizat un model de tumoare subcutanată astfel cum este descris în protocolul de mai jos.

șoareci SCID CB.17 femele s-au inoculat fiecare subcutanat în flancul drept cu 10×10^6 celule MV4-11, o linie de celule de AML umane, în 100 μ l mediu liber de ser/matrigel. În ziua 14 post- inoculare MV4-11, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în grupurile de studiu. Cu 24 h înainte de administrarea conjugatului, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 400 mg/kg de anticorp chKTI neîntit pentru a bloca receptorii de Fc pe celulele de AML MV4-11, prevenind preluarea nespecifică a conjugatului. În ziua 15 post- inoculare MV4-11, șoarecii au primit o singură injecție intravenoasă, în vena laterală a cozii, cu vehicul, 0,3 μ g/kg (de D1; 0,016 mg/kg de huCD123) huCD123-SeriMab-sD1, 1 μ g/kg (de D1; 0,054 mg/kg de huCD123) huCD123-SeriMab-sD1, 3 μ g/kg (de D1; 0,16 mg/kg de huCD123) huCD123-SeriMab-sD1, 0,3 μ g/kg (de D5; 0,024 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huCD123) huCD123-CysMab-D5, 0,3 μ g/kg (de D1; 0,021 mg/kg de chKTI) conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1, 1 μ g/kg (de D1; 0,07 mg/kg de chKTI) conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1, 3 μ g/kg (de D1; 0,21 mg/kg de chKTI) conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1, 0,3 μ g/kg (de D5; 0,024 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5, 1 μ g/kg (de D5; 0,08 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5 sau 3 μ g/kg (de D5; 0,24 mg/kg de huKTI) conjugat martor huKTI-CysMab-D5. În ziua 20 post-inoculare MV4-11, șoarecii au fost injectați intraperitoneal cu 100 mg/kg de anticorp chKTI neîntit pentru a asigura blocarea continuă a receptorilor de Fc pe celulele tumorale AML. Rezultatele sunt reprezentate în tabelul de mai jos și în FIG. 30.

Dozele de 1 μ g/kg și de 3 μ g/kg (cu sD1) de huCD123-SeriMab-sD1 au fost ambele puternic active, generând fiecare o %T/C de 0 și 6/6 CR-uri. Cea mai scăzută doză de huCD123-SeriMab-sD1 testată, 0,3 μ g/kg (cu sD1) a fost inactivă, cu o %T/C de 43 și 0/6 CR-uri. Cu toate acestea, atunci când se examinează activitatea conjugatilor martor chKTI-SeriMab-sD1 neîntiți un grad ridicat de activitate nespecifică, neîntită la CD123 este evidentă din doza de 3 μ g/kg (cu sD1), care generează 6 %T/C (puternic activ) și 3/6 CR-uri. Aceasta indică faptul că o parte din activitatea ridicată a dozei de 3 μ g/kg (cu sD1) de huCD123-SeriMab-sD1 care țintește CD123 se datorează probabil mecanismelor de preluare nespecifică a medicamentului care nu implică țintirea CD123. În contrast, ambele doze de 1 μ g/kg (cu sD1) și 0,3 μ g/kg de conjugat martor chKTI-SeriMab-sD1 au fost inactive, generând 73% T/C și respectiv 83% T/C, demonstrând că activitatea nespecifică ridicată a dozei de 3 μ g/kg doză (cu sD1) de chKTI-SeriMab-sD1 este dependentă de doză și că activitatea ridicată a dozei de 1 μ g/kg (cu sD1) de huCD123-SeriMab-sD1 este într-adevăr dependentă de CD123.

Dozele de 1 μ g/kg și cele de 3 μ g/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5 au fost ambele puternic active, generând fiecare 0% T/C, și 5/6 și respectiv 6/6 CR-uri. Doza de 0,3 μ g/kg (de D5) de huCD123-CysMab-D5, cea mai scăzută doză testată, a fost inactivă, cu 69% T/C și 0/6 CR-uri. În contrast, toate cele trei doze (de D5) de conjugat martor huKTI-CysMab-D5 neîntit au fost inactive, generând fiecare $\geq 43\%$ T/C și 0/6 CR-uri; demonstrând activitatea dependentă de CD123 a huCD123-CysMab-D5.

Grup de tratament	% T/C (Day 49)	PR	CR	Rezultat
Vehicul	---	0/6	0/6	---
huCD123-SeriMab-sD1 (0,3 μ g/kg)	43	1/6	0/6	Inactiv
huCD123-SeriMab-sD1 (1 μ g/kg)	0	6/6	6/6	Puternic activ
huCD123-SeriMab-sD1 (3 μ g/kg)	0	6/6	6/6	Puternic activ
huCD123-CysMab-D5 (0,3 μ g/kg)	69	0/6	0/6	Inactiv
huCD123-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	0	5/6	5/6	Puternic activ
huCD123-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	0	6/6	6/6	Puternic activ
chKTI-SeriMab-sD1 (0,3 μ g/kg)	83	0/6	0/6	Inactiv

Grup de tratament	% T/C (Day 49)	PR	CR	Rezultat
chKTI-SeriMab-sD1 (1 µg/kg)	73	0/6	0/6	Inactiv
chKTI-SeriMab-sD1 (3 µg/kg)	6	5/6	3/6	Puternic activ
huKTI-CysMab-D5 (0,3 µg/kg)	102	0/6	0/6	Inactiv
huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)	79	0/6	0/6	Inactiv
huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)	43	0/6	0/6	Inactiv

Exemplul 30. Tolerabilitatea *in vivo* a conjugatilor huCD123-IGN la șoareci

Pentru a testa tolerabilitatea huCD123-CysMab-D5 și a altor conjugăți de huCD123-IGN *in vivo*, s-a utilizat un model de șoarece astfel cum este descris în protocolul de mai jos.

5

Șoareci CD-1 femele au primit o singură injecție intravenoasă în vena laterală a cozii cu vehicul, 150 µg/kg (de D5, 12 mg/kg de huCD123) de huCD123-CysMab-D5, 125 µg/kg (de D5, 10 mg/kg de huCD123) de huCD123-CysMab-D5, 100 µg/kg (de D5, 8 mg/kg de huCD123) de huCD123-CysMab-D5, 150 µg/kg (cu sD1, 14,3 mg/kg de huCD123) de huCD123-SeriMab-sD1 sau 125 µg/kg (cu sD1, 11,9 de huCD123) de huCD123-SeriMab-sD1. Anticorpul huCD123 nu reacționează încrucișat cu CD123 de șoarece, care face acest model șoarece *in vivo* numai un indicator al toxicității în afara țintei. Șoarecii au fost ținuți sub observație zilnic timp de 33 zile, și s-au determinat greutatea corporale. Dacă un animal a suferit mai mult de 20% pierdere a greutății corporale sau a devenit muribund, animalul a fost eutanasiat. În afară de greutatea corporală, nu au fost efectuate alte observații clinice pe parcursul studiului în oricare dintre tratamente.

15

Șoarecii CD-1 femele au primit o singură injecție intravenoasă în vena laterală a cozii cu vehicul, 75 µg/kg (de D2, 4,4 mg/kg de huCD123) dintr-un D2 legat prin lizină la huCD123, 100 µg/kg (de D2, 5,9 mg/kg de huCD123) de D2 legat prin lizină la huCD123 sau 125 µg/kg (de D2, 7,4 mg/kg de huCD123) de D2 legat prin lizină la huCD123. Anticorpul huCD123 nu reacționează încrucișat cu CD123 de șoarece, ceea ce face ca acest model *in vivo* de șoarece să fie un indicator numai al toxicității în afara țintei. Șoarecii au fost ținuți sub observație zilnic timp de 22 zile, și s-au determinat greutatea corporale. Dacă un animal a suferit o pierdere în greutate corporală mai mare de 20% sau a devenit muribund, animalul a fost eutanasiat.

25

Rezultatele sunt centralizate în tabelele de mai jos și în FIG. 32 și FIG. 33.

huCD123-CysMab-D5 nu a fost tolerat la 150 µg/kg (de D5, 12 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 12, cu o scădere de 11%. Unul din opt șoareci a fost eutanasiat în ziua 12 din cauza pierderii în greutate corporală > 20%. huCD123-CysMab-D5 nu a fost bine tolerat la 125 µg/kg (de D5, 10 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 10, cu o scădere de 8,6%. Unul din opt șoareci au fost eutanasiați în ziua 9 din cauza pierderii greutății corporale. huCD123-CysMab-D5 a fost tolerat la 100 µg/kg (de D5, 8 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 6, cu o 7% scădere. Niciunul dintre șoarecii din acest grup de tratament nu a fost eutanasiat din cauza pierderii greutății corporale.

30

35

huCD123-SeriMab-sD1 nu a fost tolerat la 150 µg/kg (14,3 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 10, cu o 17,3% scădere. Doi din opt șoareci au fost eutanasiați în ziua 10 din cauza pierderii în greutatea corporală. huCD123-SeriMab-sD1 nu a fost bine tolerat la 125 µg/kg (cu sD1, 11,9 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 10, cu o scădere de 6,7%. Unul din opt șoareci a fost eutanasiat în ziua 12 din cauza pierderii greutății corporale.

40

D2 legat la huCD123 prin lizină a fost tolerat la 75 µg/kg (de D2, 4,4 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 5, cu o scădere de 6%. Niciunul dintre șoarecii din acest grup de tratament nu a fost eutanasiat din cauza pierderii greutății corporale. D2 legat la huCD133 prin lizină a fost tolerat la 100 µg/kg (de D2, 5,9 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutății corporale a avut loc în ziua 7, cu o scădere de 8 %. Niciunul dintre șoarecii din acest grup de tratament nu a fost eutanasiat din cauza pierderii greutății corporale. D2 legat la huCD123 prin lizină nu a fost tolerat la 125 µg/kg

45

50

(de D2, 7,4 mg/kg de huCD123). Limita inferioară a modificării medii a greutateii corporale a avut loc în ziua 9 (când N = 6), cu o scădere de 17%. Următoarele numere de șoareci, din cele opt inițiale, au fost eutanasiați în zilele indicate, din cauza pierderii în greutate corporală > 20%: unul în ziua 8, unul în ziua 9, doi în ziua 10, unul în ziua 11 și unul în ziua 13.

Tratament	μg/kg încărcătură de medicament	mg/kg de huCD123	Număr de șoareci eutanasiați pentru > 20 pierdere BW	Limita inferioară a greutateii corporale (zi)	% scădere a greutateii corporale medii la limita inferioară
Vehicul	----	----	0/8	----	----
huCD123-CysMab-D5	150	12	1/8	12	11
huCD123-CysMab-D5	125	10	1/8	10	8,6
huCD123-CysMab-D5	100	8	0/8	6	7
huCD123-SeriMab-sD1	150	14,3	2/8	10	17,3
huCD123-SeriMab-sD1	125	11,9	1/8	10	6,7
Vehicul	----	----	0/8	----	----
D2 legat prin lizină la huCD 123	75	4,4	0/8	5	6
D2 legat prin lizină la huCD 123	100	5,9	0/8	7	8
D2 legat prin lizină la huCD 123	125	7,4	6/8	9	17
BW: Greutate corporală					

LISTA DE SECVENȚE

- <110> IMMUNOGEN, INC.
 5 <120> ANTICORPI ANTI-CD123 ȘI CONJUGAȚI ȘI DERIVAȚI AI ACESTORA
 <130> 121162-02820
 <150> 62/346.730
 <151> 2016-06-07
 <150> 62/338.203
 10 <151> 2016-05-18
 <150> 62/186.161
 <151> 2015-06-29
 <160> 97
 <170> PatentIn versiune 3.5
 15 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Peptidă sintetică
 <400> 1
 Ser Tyr Val Met His
 1 5
 <210> 2
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 2
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys
 30 1 5 10
 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 3
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 40 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Peptidă sintetică
 <400> 4
 Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 5
 Ser Ser Ile Met His
 55 1 5
 <210> 6
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 5 <400> 6
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 7
 Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg
 1 5 10
 15 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Peptidă sintetică
 <400> 8
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 9
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 9
 Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 30 Gly
 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 10
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 11
 40 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 45 <400> 11
 Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 12
 Asn Tyr Ala Met Ser
 5 1 5
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 13
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 20 <400> 14
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 15
 Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr
 1 5 10

 <210> 16
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 35 <400> 16
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 17
 Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
 1 5
 45 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Peptidă sintetică
 <400> 18

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 19
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 10 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Peptidă sintetică
 <400> 20
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 21
 Arg Val Asn Arg Leu Val Asp
 1 5
 25 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 22
 Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr Thr
 1 5
 35 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 40 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser Ile His
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 24
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 50 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Peptidă sintetică
 <400> 25

Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 26
 Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

 Val Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Ser Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 10 <210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Peptidă sintetică
 <400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 28

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 29

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 30

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 30

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr Trp Phe
100 105 110

10 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 31

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Thr Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 32

<211> 82

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 32

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn
1 5 10 15

Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr
20 25 30

Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
35 40 45

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp
50 55 60

Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
65 70 75 80

10 Ser Ser
<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 34

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

10 <220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Phe sau Val

<400> 34

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 35

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Arg	Val	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Ala	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105			

5 <210> 36

<211> 378

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Peptidă sintetică

<400> 36

Met	Val	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Pro	Cys	Leu
1				5					10					15	

Leu	Gln	Thr	Lys	Glu	Asp	Pro	Asn	Pro	Pro	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Met
			20					25					30		

Lys	Ala	Lys	Ala	Gln	Gln	Leu	Thr	Trp	Asp	Leu	Asn	Arg	Asn	Val	Thr
		35					40					45			

Asp	Ile	Glu	Cys	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Tyr	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Asn
	50					55					60				

Asn	Ser	Tyr	Cys	Gln	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Asn
65					70					75					80

```

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe
      85                      90                      95

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys
      100                      105                      110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro
      115                      120                      125

Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn
      130                      135                      140

Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly
145                      150                      155                      160

Thr Arg Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly
      165                      170                      175

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly
      180                      185                      190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu
      195                      200                      205

Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met
      210                      215                      220

His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu
225                      230                      235                      240

Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp
      245                      250                      255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile
      260                      265                      270

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro
      275                      280                      285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp
      290                      295                      300

Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys
305                      310                      315                      320

Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro
      325                      330                      335
Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp
      340                      345                      350

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu
      355                      360                      365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr
      370                      375
<210> 37
<211> 108
5 <212> PRT

```

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 37

Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Peptidă sintetică

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

15 <223> Phe sau Val

<400> 38

Ser Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 121

<212> **PRT**

<213> Artificial

5 <220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 40

<211> 121

<212> **PRT**

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 40

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

10 <210> 42

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 42

MD/EP 3313884 T2 2021.04.30

183

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Ser Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

184

85

90

95

Ala Arg Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 43

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100

105

110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 44

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 44

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
 20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

MD/EP 3313884 T2 2021.04.30

187

Ala	Arg	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser
		115					120					125			
Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val
	130					135					140				
Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Met	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro
		195					200					205			
Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly
	210					215					220				
Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu
	290					295					300				
Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
305					310					315					320
Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro

340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 45
<211> 214
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> Peptidă sintetică
<400> 45

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 46

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 46

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala	Arg	Gln	Ser	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Lys	Arg	Thr	Trp	Phe	100	105	110	
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	115	120	125	
Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	130	135	140	
Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	145	150	155	160
Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	165	170	175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	180	185	190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	195	200	205	
Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	210	215	220	
Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	245	250	255	
Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	275	280	285	
Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	290	295	300	
Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
370 375 380

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
385 390 395 400

Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
405 410 415

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 47

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 47

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Thr Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 48

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Ser
 20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
      100                      105                      110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115                      120                      125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
      130                      135                      140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
      145                      150                      155                      160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165                      170                      175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
      180                      185                      190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
      195                      200                      205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
      210                      215                      220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
      225                      230                      235                      240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
      245                      250                      255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
      260                      265                      270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
      275                      280                      285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      290                      295                      300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
      305                      310                      315                      320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
      325                      330                      335

```

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 49

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 50

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<220>

<221> Xaa

10 <222> (2)..(2)

<223> Phe sau Val

<400> 50

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 51

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 52

<211> 1713

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 52

Gly Thr Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
1 5 10 15

Cys Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys
20 25 30

Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly
 35 40 45
 Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Cys Thr
 50 55 60
 Cys Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Cys Thr Cys Cys Cys Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr
 85 90 95
 Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly
 100 105 110
 Thr Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys
 115 120 125
 Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala
 130 135 140
 Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr
 165 170 175
 Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly
 180 185 190
 Cys Thr Gly Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Cys Ala Cys Ala
 195 200 205
 Cys Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Ala
 210 215 220
 Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Ala Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Ala Cys Ala Cys Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr
 245 250 255
 Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala
 260 265 270
 Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Ala
 275 280 285

Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys
 290 295 300

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr
 305 310 315 320

Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Gly Gly
 325 330 335

Ala Gly Cys Thr Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Cys Gly Ala Thr Gly
 340 345 350

Gly Thr Cys Cys Thr Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala
 355 360 365

Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys
 370 375 380

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly
 385 390 395 400

Cys Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys
 405 410 415

Cys Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys
 420 425 430

Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala
 435 440 445

Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr
 450 455 460

Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Thr Thr Ala Ala
 465 470 475 480

Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Thr
 485 490 495

Ala Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Gly
 500 505 510

Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Cys Thr Ala Thr
 515 520 525

Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Thr
 530 535 540

Ala	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly
545					550					555					560
Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly
				565					570					575	
Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys
				580				585					590		
Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala
		595					600					605			
Ala	Cys	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys
	610						615				620				
Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr
625					630					635					640
Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys
				645					650					655	
Cys	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Ala
			660					665					670		
Gly	Ala	Ala	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly
		675					680					685			
Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr
	690					695					700				
Thr	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly
705					710					715					720
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly
				725					730					735	
Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Thr	Cys	Cys
			740					745					750		
Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Gly	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr
		755					760					765			
Gly	Ala	Ala	Cys	Gly	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly
	770					775					780				
Cys	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr

MD/EP 3313884 T2 2021.04.30

202

785		790		795		800
Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys						
		805		810		815
Gly Gly Ala Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala						
		820		825		830
Cys Gly Thr Ala Thr Cys Gly Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr						
		835		840		845
Thr Cys Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly						
		850		855		860
Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr						
		865		870		875
						880
Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys						
		885		890		895
Thr Gly Gly Thr Gly Cys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly						
		900		905		910
Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys						
		915		920		925
Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Thr						
		930		935		940
Thr Thr Gly Thr Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala						
		945		950		955
						960
Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr						
		965		970		975
Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly						
		980		985		990
Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Ala Cys						
		995		1000		1005
Ala Cys Ala Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala						
		1010		1015		1020
Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly						
		1025		1030		1035

Thr Cys 1040	Ala Thr Thr Thr	Cys 1045	Ala Ala Thr Cys Gly	Cys Ala Ala
Ala Thr 1055	Thr Thr Cys Gly	Cys 1060	Thr Ala Thr Gly	Ala Gly Cys Thr
Thr Cys 1070	Ala Gly Ala Thr	Ala 1075	Cys Ala Ala Ala	Ala Gly Ala Gly
Ala Ala 1085	Thr Gly Cys Ala	Gly 1090	Cys Cys Thr Gly	Thr Ala Ala Thr
Cys Ala 1100	Cys Ala Gly Ala	Ala 1105	Cys Ala Gly Gly	Thr Cys Ala Gly
Ala Gly 1115	Ala Cys Ala Gly	Ala 1120	Ala Cys Cys Thr	Cys Cys Thr Thr
Cys Cys 1130	Ala Gly Cys Thr	Ala 1135	Cys Thr Cys Ala	Ala Thr Cys Cys
Thr Gly 1145	Gly Ala Ala Cys	Gly 1150	Thr Ala Cys Ala	Cys Ala Gly Thr
Ala Cys 1160	Ala Ala Ala Thr	Ala 1165	Ala Gly Ala Gly	Cys Cys Cys Gly
Gly Gly 1175	Ala Ala Ala Gly	Ala 1180	Gly Thr Gly Thr	Ala Thr Gly Ala
Ala Thr 1190	Thr Cys Thr Thr	Gly 1195	Ala Gly Cys Gly	Cys Cys Thr Gly
Gly Ala 1205	Gly Cys Ala Cys	Cys 1210	Cys Cys Cys Cys	Ala Gly Cys Gly
Cys Thr 1220	Thr Cys Gly Ala	Gly 1225	Thr Gly Cys Gly	Ala Cys Cys Ala
Gly Gly 1235	Ala Gly Gly Ala	Gly 1240	Gly Gly Cys Gly	Cys Ala Ala Ala
Cys Ala 1250	Cys Ala Cys Gly	Thr 1255	Gly Cys Cys Thr	Gly Gly Cys Gly
Gly Ala 1265	Cys Gly Thr Cys	Gly 1270	Cys Thr Gly Cys	Thr Gly Ala Thr

Cys Gly 1280	Cys Gly Cys Thr 1285	Gly Gly Gly Ala Cys 1290	Gly Cys Thr
Gly Cys 1295	Thr Gly Gly Cys 1300	Cys Thr Gly Gly 1305	Cys Thr Gly
Thr Gly 1310	Thr Cys Thr Thr Cys 1315	Gly Thr Gly Ala Thr 1320	Cys Thr Gly
Cys Ala 1325	Gly Ala Ala Gly Gly 1330	Thr Ala Thr Cys Thr 1335	Gly Gly Thr
Gly Ala 1340	Thr Gly Cys Ala Gly 1345	Ala Gly Ala Cys Thr 1350	Cys Thr Thr
Thr Cys 1355	Cys Cys Cys Gly Cys 1360	Ala Thr Cys Cys Cys 1365	Thr Cys Ala
Cys Ala 1370	Thr Gly Ala Ala Ala 1375	Gly Ala Cys Cys Cys 1380	Cys Ala Thr
Cys Gly 1385	Gly Thr Gly Ala Cys 1390	Ala Gly Cys Thr Thr 1395	Cys Cys Ala
Ala Ala 1400	Ala Cys Gly Ala Cys 1405	Ala Ala Gly Cys Thr 1410	Gly Gly Thr
Gly Gly 1415	Thr Cys Thr Gly Gly 1420	Gly Ala Gly Gly Cys 1425	Gly Gly Gly
Cys Ala 1430	Ala Ala Gly Cys Cys 1435	Gly Gly Cys Cys Thr 1440	Gly Gly Ala
Gly Gly 1445	Ala Gly Thr Gly Thr 1450	Cys Thr Gly Gly Thr 1455	Gly Ala Cys
Thr Gly 1460	Ala Ala Gly Thr Ala 1465	Cys Ala Gly Gly Thr 1470	Cys Gly Thr
Gly Cys 1475	Ala Gly Ala Ala Ala 1480	Ala Cys Thr Thr Gly 1485	Ala Gly Ala
Cys Thr 1490	Gly Gly Gly Gly Thr 1495	Thr Cys Ala Gly Gly 1500	Gly Cys Thr
Thr Gly 1505	Thr Gly Gly Gly Gly 1510	Gly Thr Cys Thr Gly 1515	Cys Cys Thr

Cys Ala Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly
1520 1525 1530

Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala
1535 1540 1545

Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly
1550 1555 1560

Ala Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Cys
1565 1570 1575

Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr
1580 1585 1590

Cys Cys Thr Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
1595 1600 1605

Gly Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys Thr
1610 1615 1620

Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Gly
1625 1630 1635

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala
1640 1645 1650

Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly Thr
1655 1660 1665

Gly Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala
1670 1675 1680

Thr Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
1685 1690 1695

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala
1700 1705 1710

<210> 53

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<220>

<221> Xaa

10 <222> (2)..(2)

<223> Phe sau Val

<400> 53

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 54

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<220>

<221> Xaa

10 <222> (2)..(2)

<223> Phe sau Val

<400> 54

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 55

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 55

Ala Leu Ala Leu

10 1

<210> 56
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 56
 Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala
 1 5 10 15

 Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 20 25 30

 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly
 35 40 45

 Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 50 55 60

 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 65 70 75 80

 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 85 90 95

 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 100 105 110

 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 115 120 125

 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 130 135 140

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
145 150 155 160

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
165 170 175

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
210 215 220

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
225 230 235 240

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
340 345 350

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
370 375 380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly
385 390 395

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<220>

<221> Xaa

10 <222> (1)..(1)

<223> beta-Ala

<400> 57

Xaa Leu Ala Leu
 1
 <210> 58
 <211> 214
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 58
 Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 10 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 59
 <211> 450
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 59

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser
			20					25					30		
Ile	Met	His	Trp	Met	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Arg	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Asn
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser

115					120					125					
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
130						135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 60

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 60

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115					120					125					
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
130						135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	195						200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
210						215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 61

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

5

Gly Cys Gly Cys Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr
 115 120 125
 Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys
 130 135 140
 Gly Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala
 145 150 155 160
 Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly
 165 170 175
 Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala
 180 185 190
 Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Ala Thr
 195 200 205
 Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Gly Gly Thr Cys Gly Thr Gly Thr
 260 265 270
 Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr
 275 280 285
 Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly
 290 295 300
 Thr Cys Thr Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Gly
 305 310 315 320
 Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly
 325 330 335
 Gly Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Ala Thr Ala Thr Thr
 340 345 350
 Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly

220

355

360

365

Ala Gly Gly Cys Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys
 370 375 380

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr
 385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Cys Thr
 405 410 415

Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Cys
 420 425 430

Gly Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys
 435 440 445

Cys

<210> 63

<211> 396

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 63

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Ala Ala Thr
 20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr
 35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Thr Cys
 50 55 60

Ala Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr
 85 90 95

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly
 100 105 110

10

Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Ala Cys
115 120 125

Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Ala
130 135 140

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr Thr
145 150 155 160

Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Thr
165 170 175

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala
180 185 190

Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Ala Ala Thr Cys Thr Cys
195 200 205

Thr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Cys Cys Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala
210 215 220

Cys Cys Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Ala
225 230 235 240

Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Thr Thr Ala
245 250 255

Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly
260 265 270

Thr Ala Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys
275 280 285

Ala Cys Cys Ala Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Cys
305 310 315 320

Ala Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Thr Thr Gly
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Ala
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Ala Ala
370 375 380

Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Gly
385 390 395

<210> 64

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 64

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr
 20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala
 35 40 45

Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys
 50 55 60

Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys
 85 90 95

Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly
 100 105 110

Gly Cys Gly Cys Thr Ala Gly Thr Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr
 115 120 125

Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala
 130 135 140

Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala
 145 150 155 160

Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly
 165 170 175

Gly Gly Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr
 195 200 205
 Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala
 210 215 220
 Gly Cys Cys Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys
 260 265 270
 Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr
 275 280 285
 Cys Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly
 290 295 300
 Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly
 305 310 315 320
 Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Ala
 325 330 335
 Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr
 340 345 350
 Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
 355 360 365
 Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys
 370 375 380
 Gly Ala Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 405 410 415
 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys
 420 425 430
 Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys
 435 440 445

Cys
 <210> 65
 <211> 396
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 65

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr
 20 25 30

Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala
 35 40 45

Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys
 50 55 60

Ala Thr Ala Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr
 85 90 95

Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly
 100 105 110

Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys
 115 120 125

Thr Ala Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys
 130 135 140

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr
 145 150 155 160

Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Thr
 165 170 175

225

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly
180 185 190

Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Ala Cys
195 200 205

Thr Gly Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala
210 215 220

Thr Cys Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr
225 230 235 240

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr Thr
245 250 255

Cys Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly
260 265 270

Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys
275 280 285

Ala Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys
305 310 315 320

Ala Ala Cys Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Gly
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Cys Ala
355 360 365

Gly Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala
370 375 380

Ala Thr Thr Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Cys Gly
385 390 395

<210> 66

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 66

Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	
			20					25					30			
Cys	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Gly	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	
			35					40					45			
Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Cys	
	50						55				60					
Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	
65						70				75					80	
Thr	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	
				85					90						95	
Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	
			100					105						110		
Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	
		115					120					125				
Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	
	130						135					140				
Gly	Gly	Cys	Thr	Ala	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	
145					150					155					160	
Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	
				165					170						175	
Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	
			180					185					190			
Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	
		195					200					205				
Gly	Gly	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala	
	210					215					220					
Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	
225					230					235					240	

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys
260 265 270

Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr
275 280 285

Cys Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly
290 295 300

Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly
305 310 315 320

Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Ala
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
355 360 365

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys
370 375 380

Gly Ala Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
405 410 415

Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys
420 425 430

Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys
435 440 445

Cys

<210> 67

<211> 396

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 67

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr
 20 25 30
 Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Ala
 35 40 45
 Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys
 50 55 60
 Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Ala Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr
 85 90 95
 Thr Cys Thr Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly
 100 105 110
 Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys
 115 120 125
 Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Thr
 130 135 140
 Thr Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Thr
 165 170 175
 Cys Cys Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys
 180 185 190
 Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Thr Cys
 195 200 205
 Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Cys Gly Gly Gly Thr Thr Ala Ala
 210 215 220
 Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr
 225 230 235 240

229

Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr
245 250 255

Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly
260 265 270

Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly
275 280 285

Ala Cys Ala Ala Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Gly
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ala Ala Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Gly
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala
355 360 365

Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala
370 375 380

Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Cys Gly
385 390 395

<210> 68

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 68

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Ala Thr
20 25 30

Thr Cys Thr Gly Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly Cys Cys
35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys
 50 55 60

Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala
 85 90 95

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly
 100 105 110

Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr
 115 120 125

Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys
 130 135 140

Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Thr
 145 150 155 160

Cys Thr Ala Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly
 165 170 175

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 180 185 190

Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr
 195 200 205

Gly Gly Ala Thr Ala Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly
 210 215 220

Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Ala Cys Thr Cys Gly Ala Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala
 245 250 255

Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys
 260 265 270

Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys
 275 280 285

Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly
 290 295 300

Cys Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala
305 310 315 320

Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Gly Thr Thr Thr Ala Cys Thr
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
355 360 365

Thr Gly Gly Cys Ala Ala Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr
370 375 380

Gly Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys
405 410 415

Thr Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Cys
420 425 430

Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys
435 440 445

Cys

<210> 69

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 69

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr
20 25 30

Thr Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys
35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Thr Cys
 50 55 60

Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys
 85 90 95

Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly
 100 105 110

Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Ala Ala Ala Gly Ala Thr
 115 120 125

Gly Thr Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys
 130 135 140

Gly Gly Cys Thr Ala Thr Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr
 145 150 155 160

Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly
 165 170 175

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 180 185 190

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr
 195 200 205

Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala
 210 215 220

Ala Cys Cys Thr Thr Ala Thr Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Ala
 245 250 255

Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys
 260 265 270

Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys
 275 280 285

Ala Ala Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Gly
 290 295 300

Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Ala Ala
305 310 315 320

Thr Ala Gly Thr Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly
325 330 335

Gly Ala Thr Thr Cys Cys Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys
370 375 380

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly
405 410 415

Thr Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys
420 425 430

Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys
435 440 445

Cys

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 70

Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

10 <210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 71

Arg Val Asn Arg Leu Val Ser
1 5

<210> 72

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 72

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

25 <210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 73
 Gly Phe Leu Gly
 1
 5 <210> 74
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Peptidă sintetică
 <400> 74
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 <210> 75
 <211> 47
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 75
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 1 5 10 15

 Leu Glu Pro Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala
 20 25 30

 Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 35 40 45
 20 <210> 76
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 76
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30

 Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn
 50 55 60
 30 <210> 77
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 77
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 5 Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 50 55 60
 <210> 78
 <211> 60
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 78
 Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser
 1 5 10 15

 Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 20 25 30

 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
 35 40 45

 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 50 55 60
 15 <210> 79
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Peptidă sintetică
 <400> 79
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 <210> 80
 <211> 61
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Peptidă sintetică
 <400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

<210> 81

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 81

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Val Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

10 <210> 82

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

20 <210> 83

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

25 <400> 83

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
35 40 45

<210> 84

<211> 47

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 84

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
35 40 45

10 <210> 85

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 85

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
35 40 45

<210> 86

<211> 34

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 86

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser
20 25 30

25 Tyr Pro

<210> 87

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 87

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
50 55 60

<210> 88

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
50 55 60

10 <210> 89

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 89

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
50 55 60

<210> 90

<211> 61

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
50 55 60

<210> 91

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 91

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala
50 55 60

10 <210> 92

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 92

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

20 <210> 93

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Peptidă sintetică

<400> 93

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
1 5 10 15

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

<210> 94

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 94

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser
1 5 10 15

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

10 <210> 95

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Peptidă sintetică

<400> 95

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser
1 5 10 15

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

<210> 96

<211> 37

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 96

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
1 5 10 15

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg
35

<210> 97

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Peptidă sintetică

<400> 97

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp
35 40 45

10

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

(56) Referințe bibliografice citate in raportul de documentare:

- EP-A1- 2 426 148
- DU X ET AL: "New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINGS INC, US, vol. 30, no. 6, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 607-613, XP008116347, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0B013E318053ED8E
- WO-A1-2008/127735
- Huang Liang: "Generation and Functional Assays of Acute Myeloid Leukemic Stem Cells Targeted Anti-CD123 Monoclonal Antibody", , 1 May 2011 (2011-05-01), XP008181668, Huazhong University of Science and Technology Retrieved from the Internet: URL:<http://www.dissertationtopic.net/doc/1504548>
- WO-A1-2012/021934
- WO-A1-2015/026892
- WO-A1-2015/044386
- WO-A1-2016/036794
- WO-A1-2016/036801
- WO-A1-2016/036937

(57) Revendicări:

1. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde:

(i) (a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 1; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 2 sau SECV ID NR: 3; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 4; și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 18;

(ii) (a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 5; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 6, SECV ID NR: 7, SECV ID NR: 8, SECV ID NR: 9, sau SECV ID NR: 10; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 11; și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 20, sau SECV ID NR: 72; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 21 sau SECV ID NR: 71; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; sau

(iii) a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13 sau SECV ID NR: 14; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15 sau SECV ID NR: 70; și b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; o CDR2 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; și o CDR3 având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25.

2. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

opțional în care:

(i) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34, este Phe; sau

(ii) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34, este Val.

3. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 37.

4. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, care cuprinde:

a) o regiune a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

opțional în care:

(i) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54, este Phe; sau

(ii) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54, este Val.

5. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 5, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 6, 7, 8, 9, sau 10, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 11; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 19 sau 20, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 21, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 22.

6. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 5, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 8, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 11; și o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 20, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 21, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 22.

7. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, în care anticorpul cuprind un lanț greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54 și un lanț ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 51, opțional în care Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54, este Val.

8. Polipeptidă care cuprinde V_H și V_L secvențele oricăreia dintre revendicări 1-7.

9. Celulă care produce un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-7, sau polipeptida conform revendicării 8.

10. Metodă de producere a unui anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-7, sau polipeptida conform revendicării 8, care cuprinde:

(a) cultivarea celulei conform revendicării 9; și,

(b) izolarea anticorpului menționat, fragmentului de legare la antigen al acestuia, sau polipeptidei din cultura de celule menționată.

11. Imunoconjugat având următoarea formulă:

$CBA(Cy^{L1})_{WL}$,

$CBA(Cy^{L2})_{WL}$;

sau

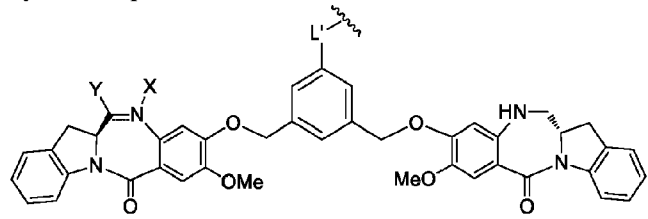
$CBA(Cy^{L3})_{WL}$,

in care:

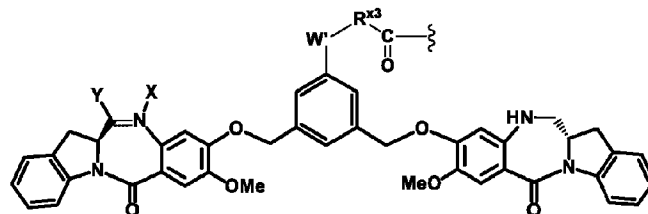
CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform revendicării 2, sau polipeptida acestuia conform revendicării 8, care este legată covalent printr-un rest de lizină la Cy^{L1} , Cy^{L2} sau Cy^{L3} ;

W_L este un număr întreg de la 1 la 20;

Cy^{L1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, in care:

linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil (C_1-C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau - SO_3M ;

W' este $-NR^{e'}$,

$R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un alchil(C_1-C_6);

L' este reprezentat de următoarea formulă:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');

sau

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-$ (B3');

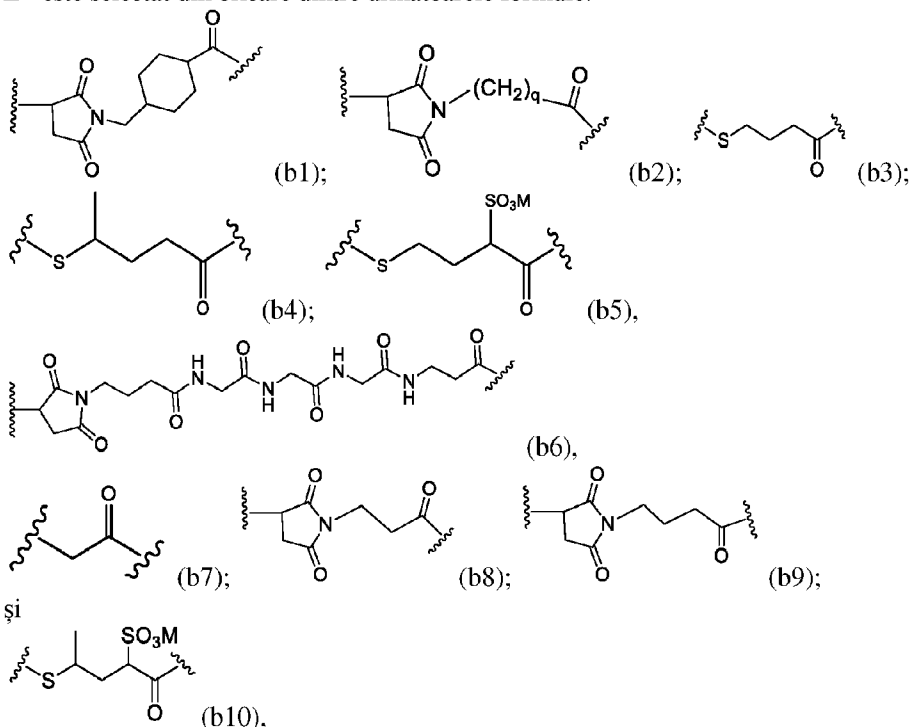
R_5 este -H sau un alchil(C_1-C_3);

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

R_a și R_b , la fiecare apariție, sunt fiecare independent -H, alchil(C_1-C_3), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

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

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

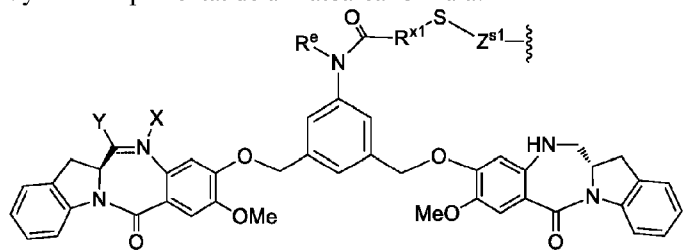


in care:

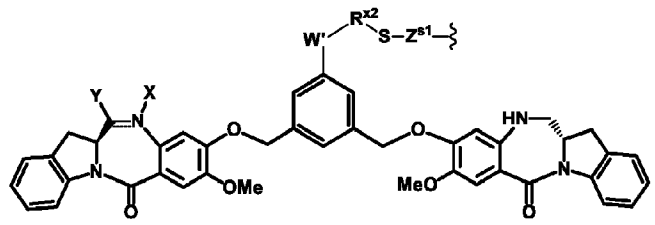
q este un număr întreg de la 1 la 5; și

M este H^+ sau un cation,

Cy^{L2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:

linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C_1-C_4); și atunci când

este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau -SO₃M;

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

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

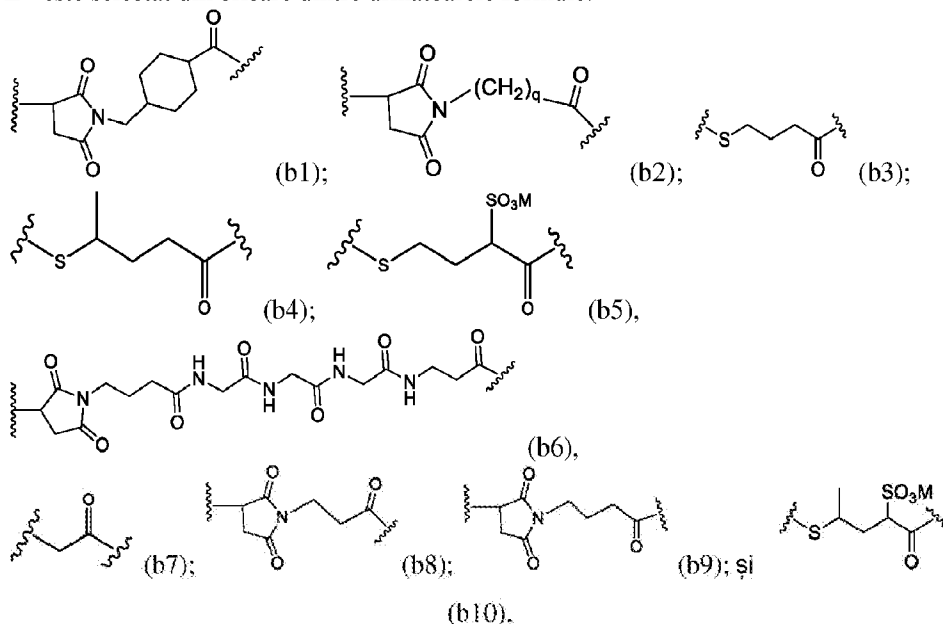
W' este -NR^{e'},

R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

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

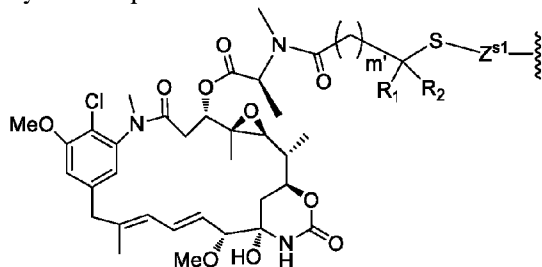


in care:

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

M este -H⁺ sau un cation; și

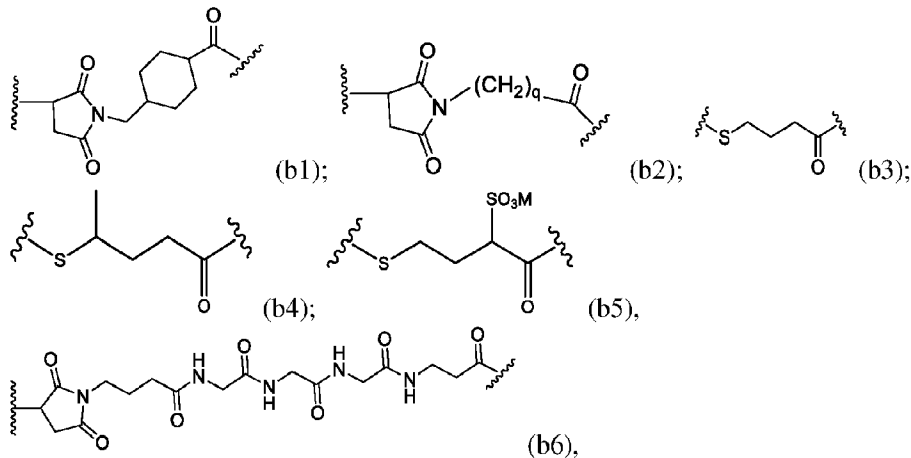
Cy^{L3} este reprezentat de următoarea formulă:

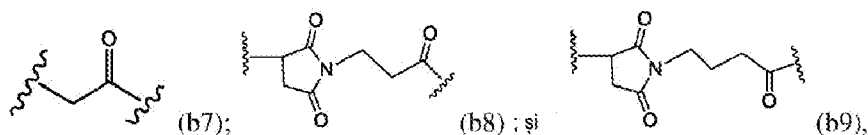


m' este 1 sau 2;

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

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



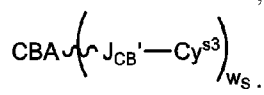
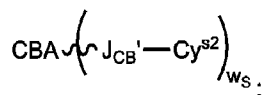
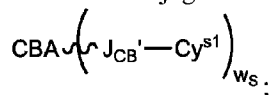


în care:

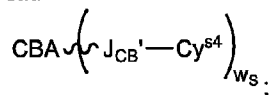
q este un număr întreg de la 1 la 5; și

M este H^+ sau un cation.

12. Imunoconjugat care are următoarea formulă:



sau

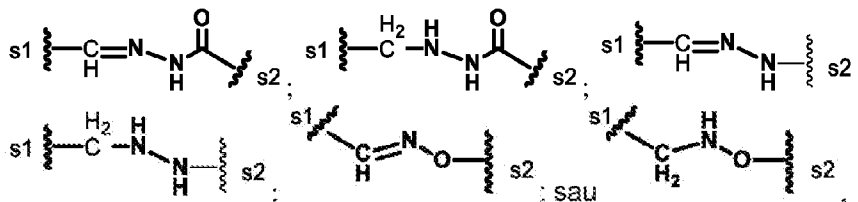


în care:

CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform revendicării 3, sau polipeptida acestuia conform revendicării 8, legată covalent la o grupare $J_{CB'}$;

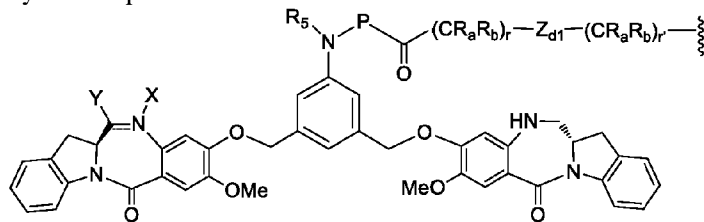
Ws este 1, 2, 3, sau 4;

$J_{CB'}$ este un fragment format prin reacția unei grupări aldehidice derivate de la oxidarea unui fragment de 2-hidroxiethylamină de pe un N-terminal a anticorpului menționat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform revendicării 3, sau polipeptida acestuia conform revendicării 8, și o grupare reactivă cu aldehida de pe Cy^{s1} , Cy^{s2} , Cy^{s3} , sau Cy^{s4} , și este reprezentat de următoarea formulă:

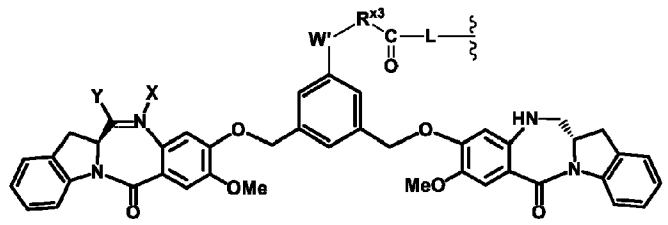


în care s1 este locul legat covalent la CBA; și s2 este locul legat covalent la Cy^{s1} , Cy^{s2} , Cy^{s3} , sau Cy^{s4} ;

Cy^{s1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil (C_1-C_4); și atunci când

este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R₅ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;

Z_{d1} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

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

r și r' sunt independent un întreg de la 1 la 6;

W' este -NR^{e'},

R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

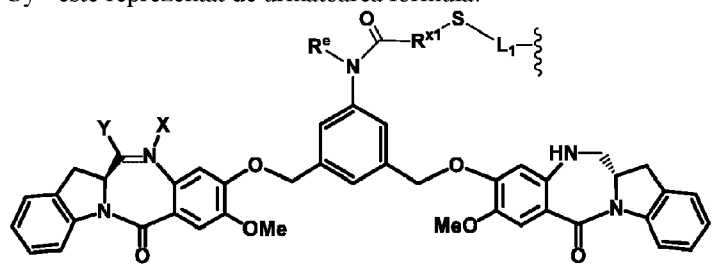
R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un alchil(C₁-C₆);

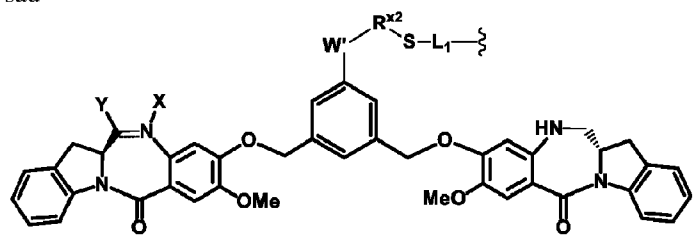
L este -NR₉-(CR_aR_b)_{r''} sau absent; și

r'' este un număr întreg de la 0 la 6;

Cy^{s2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, și Y este -OH sau -SO₃M;

M este H⁺ sau un cation;

R^{x1} este un alchil(C₁-C₆);

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

W' este -NR^{e'},

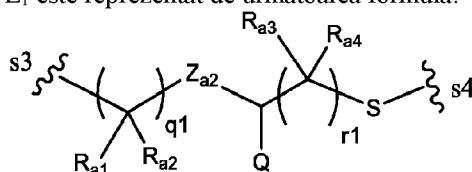
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un alchil(C₁-C₆);

L₁ este reprezentat de următoarea formulă:



in care:

s3 este locul legat covalent la gruparea J_{CB}';

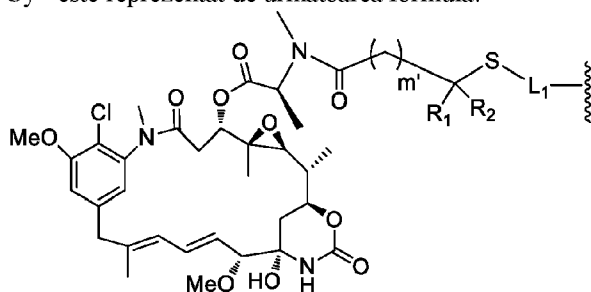
s4 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{s2};

Z_{a2} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

R₉ este -H sau un alchil(C₁-C₃);

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

R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} , la fiecare apariție, sunt independent H sau alchil(C_1 - C_3); și
 q_1 și r_1 sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 10, cu condiția ca
 q_1 și r_1 să nu fie ambii 0;
 Cy^{s3} este reprezentat de următoarea formulă:

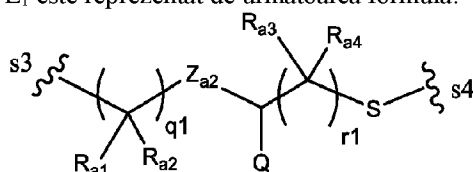


in care:

m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare independent H sau un alchil(C_1 - C_3);

L_1 este reprezentat de următoarea formulă:



in care:

s_3 este locul legat covalent la gruparea $J_{CB'}$;

s_4 este locul legat covalent la gruparea -S- pe Cy^{s3} ;

Z_{a2} este absent, -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

R_9 este -H sau un alchil(C_1 - C_3);

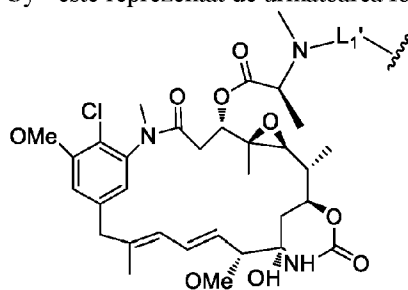
Q este H, un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă;

R_{a1} , R_{a2} , R_{a3} , R_{a4} , la fiecare apariție, sunt independent H sau un alchil(C_1 - C_3); și

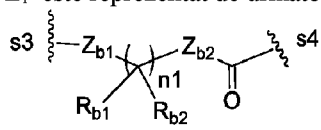
q_1 și r_1 sunt fiecare independent un întreg de la 0 la 10, cu condiția ca

q_1 și r_1 să nu fie ambii 0;

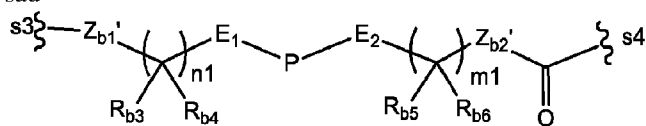
Cy^{s4} este reprezentat de următoarea formulă:



L_1' este reprezentat de următoarea formulă:



sau



in care:

s_3 este locul legat covalent la gruparea $J_{CB'}$;

s_4 este locul legat covalent la -NMe- gruparea pe Cy^{s4} ;

Z_{b1} și Z_{b2} sunt ambii absenți, sau unul dintre Z_{b1} și Z_{b2} este absent și celălalt este -CH₂-O- sau -O-CH₂-;

Z_{b1}' și Z_{b2}' sunt fiecare independent absent, -CH₂-O-, -O-CH₂-, -NR₉-C(=O)-CH₂-, sau -CH₂-C(=O)-NR₉-;

R_9 este H sau alchil(C_1 - C_3);

n_1 și m_1 sunt fiecare independent un întreg de la 1 la 6;
 unul dintre E_1 și E_2 este $-C(=O)-$, și celălalt este $-NR_9-$; sau unul dintre E_1 și E_2 este $-C(=O)-$ sau $-NR_9-$, și celălalt este absent;

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține între 2 și 20 resturi de aminoacid; și R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} și R_{b6} , la fiecare apariție, sunt fiecare independent H sau un alchil(C_1-C_3).

13. Imunoconjugat reprezentat de următoarea formulă:

$CBA(Cy^{C1})_{WC}$;

$CBA(Cy^{C2})_{WC}$;

sau

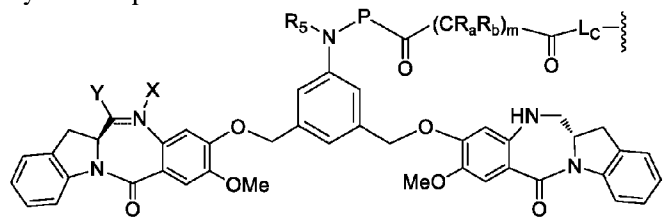
$CBA(Cy^{C3})_{WC}$,

în care:

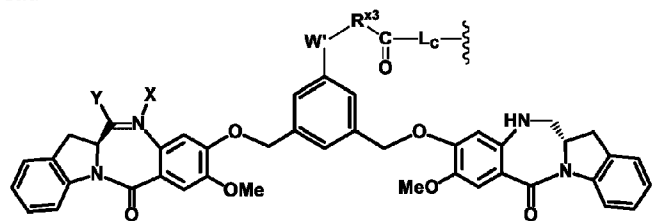
CBA este un anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform revendicării 4, sau polipeptida acestuia conform revendicării 8, legată covalent la Cy^{C1} , Cy^{C2} sau Cy^{C3} printr-un rest de cisteină;

W_C este 1 sau 2;

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care:

linia dublă $=$ dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C_1-C_4); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau $-SO_3M$, și M este H^+ sau un cation;

R_5 este -H sau un alchil(C_1-C_3);

P este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid;

R_a și R_b , la fiecare apariție, sunt independent -H, alchil(C_1-C_3), sau un substituent cu sarcină sau o grupare ionizabilă Q;

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

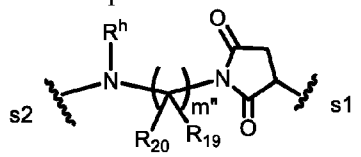
$R^{e'}$ este $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x3} este un alchil(C_1-C_6); și,

L_c este reprezentat de



s_1 este locul

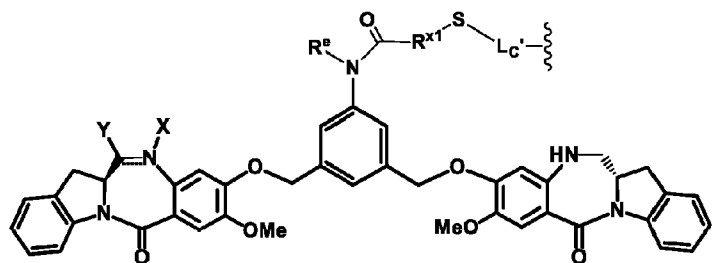
legat covalent la CBA, și s_2 este locul legat covalent la gruparea $-C(=O)-$ de pe Cy^{C1} ; în care:

R_{19} și R_{20} , la fiecare apariție, sunt independent -H sau un alchil(C_1-C_3);

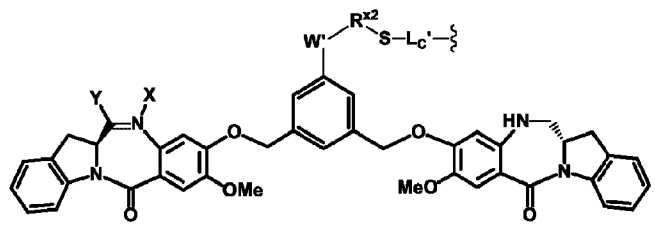
m'' este un număr întreg între 1 și 10; și

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

Cy^{C2} este reprezentat de următoarea formulă:



sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

linia dublă - - dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H sau un alchil(C₁-C₄); și atunci când este o legătură simplă, X este -H sau un fragment de protecție pentru o amină, Y este -OH sau -SO₃M, și M este H⁺ sau un cation;

R^{x1} este un alchil(C₁-C₆);

R^e este -H sau un alchil(C₁-C₆);

W' este -NR^{e'};

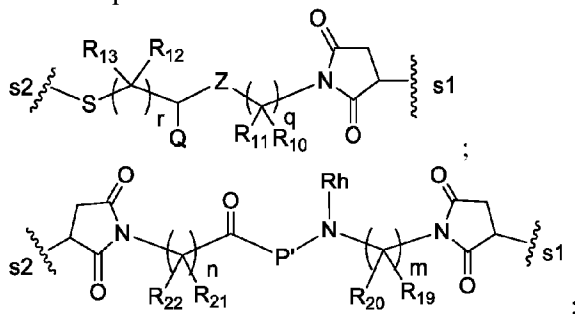
R^{e'} este -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n este un număr întreg de la 2 la 6;

R^k este -H sau -Me;

R^{x2} este un alchil(C₁-C₆);

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



in care:

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

Z este -C(=O)-NR₉-, sau -NR₉-C(=O)-;

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

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

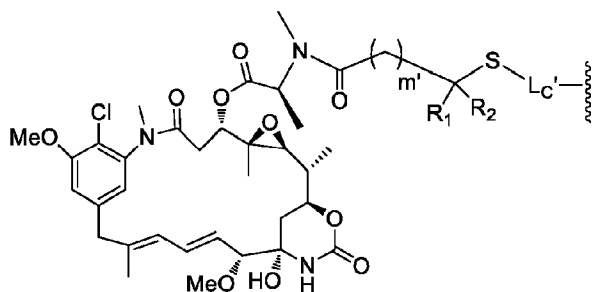
q și r, la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

R^h este -H sau un alchil(C₁-C₃); și

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

Cy^{C3} este reprezentat de următoarea formulă:

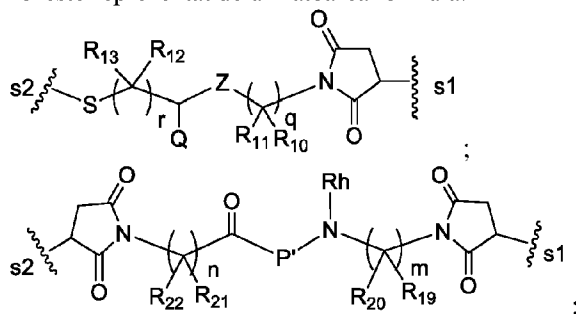


in care:

m' este 1 sau 2;

R_1 și R_2 , sunt fiecare independent -H sau un alchil(C_1-C_3);

Lc' este reprezentat de următoarea formulă:



in care:

s_1 este locul legat covalent la CBA și s_2 este locul legat covalent la gruparea -S- de pe Cy^{C3} ;

Z este $-C(=O)-NR_9-$, sau $-NR_9-C(=O)-$;

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

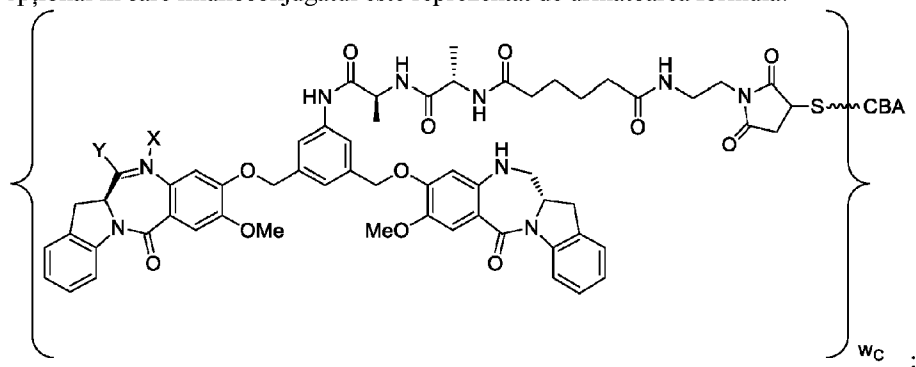
R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{19} , R_{20} , R_{21} și R_{22} , la fiecare apariție, sunt independent -H sau un alchil(C_1-C_3);

q și r , la fiecare apariție, sunt independent un întreg între 0 și 10;

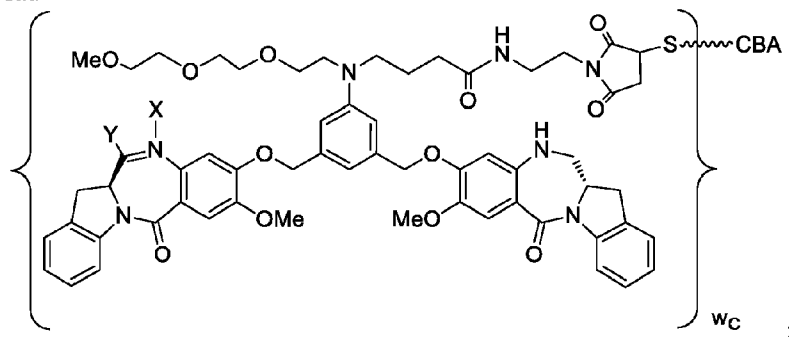
m și n sunt fiecare independent un întreg între 0 și 10;

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

P' este un rest de aminoacid sau o peptidă care conține 2 la 20 resturi de aminoacid; opțional în care imunoconjugatul este reprezentat de următoarea formulă:



sau



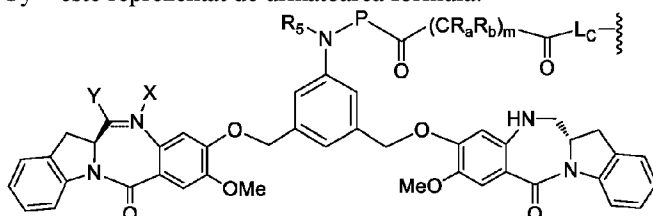
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă -- -- dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -OH sau -SO₃M.

14. Imunoconjugat conform revendicării 13, care este reprezentat de formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

Cy^{C1} este reprezentat de următoarea formulă:



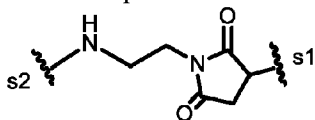
15. Imunoconjugat conform revendicării 14, în care:

R_a și R_b sunt ambii H;

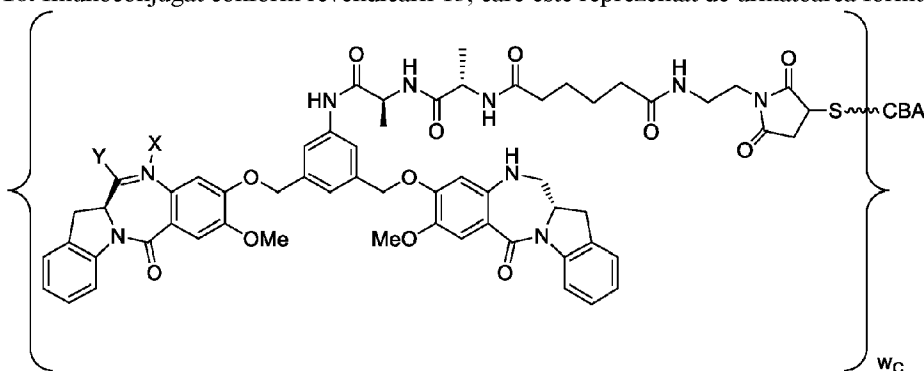
R₅ este H sau Me;

P este o peptidă care conține 2 la 5 resturi de aminoacid; și

-Lc- este reprezentat de următoarea formulă:



16. Imunoconjugat conform revendicării 13, care este reprezentat de următoarea formulă:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care linia dublă -- -- dintre N și C reprezintă o legătură simplă sau o legătură dublă, cu condiția ca, atunci când este o legătură dublă, X este absent și Y este -H, și atunci când este o legătură simplă, X este -H, și Y este -SO₃M, M este H⁺, Na⁺ sau K⁺; și în care CBA este un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 5, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 8, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 11; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde o CDR1 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 20, o CDR2 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 21, și o CDR3 având o secvență de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 22.

17. Imunoconjugat conform revendicării 16, în care CBA este un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde:

a) o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 34; și

b) o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 35,

opțional în care:

(i) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34, este Phe; sau

(ii) Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 34, este Val.

18. Imunoconjugat conform revendicării 16, în care CBA este un anticorp care cuprinde:

a) un lanț greu de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 54; și

b) un lanț ușor de imunoglobulină având secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 51.

19. Imunoconjugat conform revendicării 18, în care Xaa, al doilea rest de pe N-terminalul SECV ID NR: 54 este Val.

20. Compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-7, sau polipeptida conform revendicării 8, sau imunoconjugatul conform oricăreia dintre revendicările 11-19, și un purtător acceptabil farmaceutic.

21. Metodă *in vitro* sau *ex vivo* pentru inhibarea creșterii unei celule care exprimă CD123, care cuprinde contactarea celulei cu anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-7, sau polipeptida conform revendicării 8, sau imunoconjugatul conform oricăreia dintre revendicările 11-19, sau compoziția farmaceutică conform revendicării 20, opțional în care:

(i) celula este o celulă tumorală; sau

(ii) celula este o celulă de leucemie sau o celulă de limfom.

22. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-7, sau polipeptida conform revendicării 8, sau imunoconjugatul conform oricăreia dintre revendicările 11-19, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 20, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a unui subiect care are cancer sau pentru utilizarea într-o metodă pentru tratarea unei tulburări proliferative celulare la un subiect, în care celule de cancer sau tulburarea proliferativă celulară exprimă CD123, în care, opțional:

(i) cancerul este leucemie sau limfom;

(ii) cancerul este selectată din grupul care constă din: leucemia mieloidă acută (AML), leucemia limfoblastică acută (ALL), și leucemia limfocitară cronică (CLL);

(iii) cancerul este leucemie limfoblastică acută cu celule B (B-ALL),

(iv) cancerul este leucemia mieloidă acută (AML);

(v) tulburarea proliferativă celulară este selectată din grupul care constă din: leucemie mieloidă acută (AML), leucemie mieloidă cronică (CML), leucemie limfoblastică acută (ALL), Leucemia limfoblastică acută a liniei de celule B (B-ALL), leucemia limfocitară cronică (CLL), leucemia cu celule păroase (HCL), sindromul mielidisplazic, leucemie de neoplasm DC bazic plasmacitoid (BPDCN), limfoame non-Hodkin (NHL), limfom cu celule manta, și leucemia Hodgkin (HL);

(vi) tulburarea proliferativă celulară este neoplasm DC plasmacitoid bazic (BPDCN); sau

(vii) tulburarea proliferativă celulară este mastocitoză sistemică.

23. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia, polipeptidă, imunoconjugat sau compoziție farmaceutică pentru utilizarea conform revendicării 22, care este pentru tratarea unui subiect având leucemie de neoplasm DC bazic plasmacitoid (BPDCN).

24. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia, polipeptidă, imunoconjugat sau compoziție farmaceutică pentru utilizarea conform revendicării 22, care este pentru tratarea unui subiect având leucemia limfoblastică acută (ALL).

25. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia, polipeptidă, imunoconjugat sau compoziție farmaceutică pentru utilizarea conform revendicării 22, care este pentru tratarea unui subiect având leucemia mieloidă acută (AML).

FIG. 2A

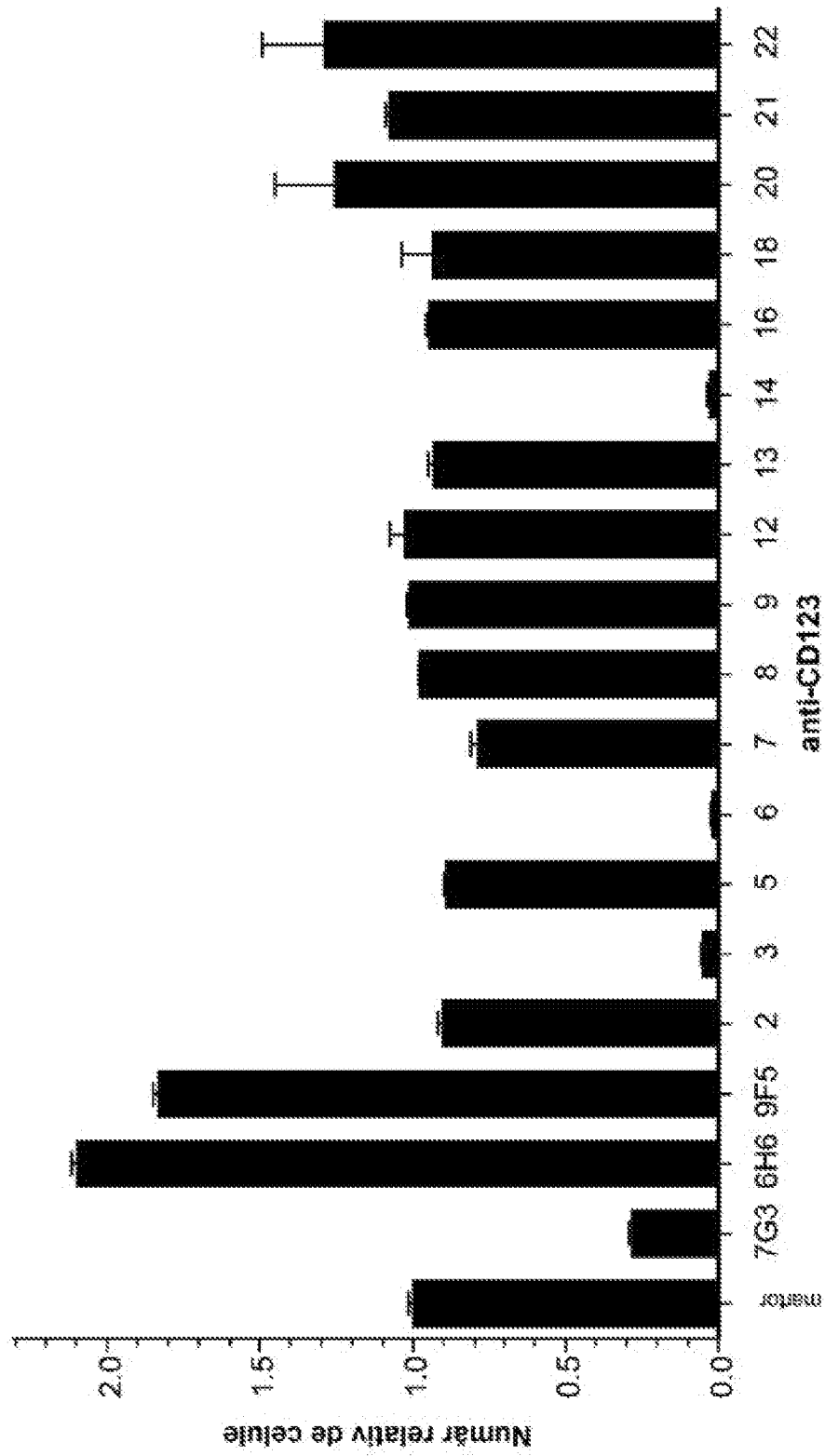


FIG. 2B

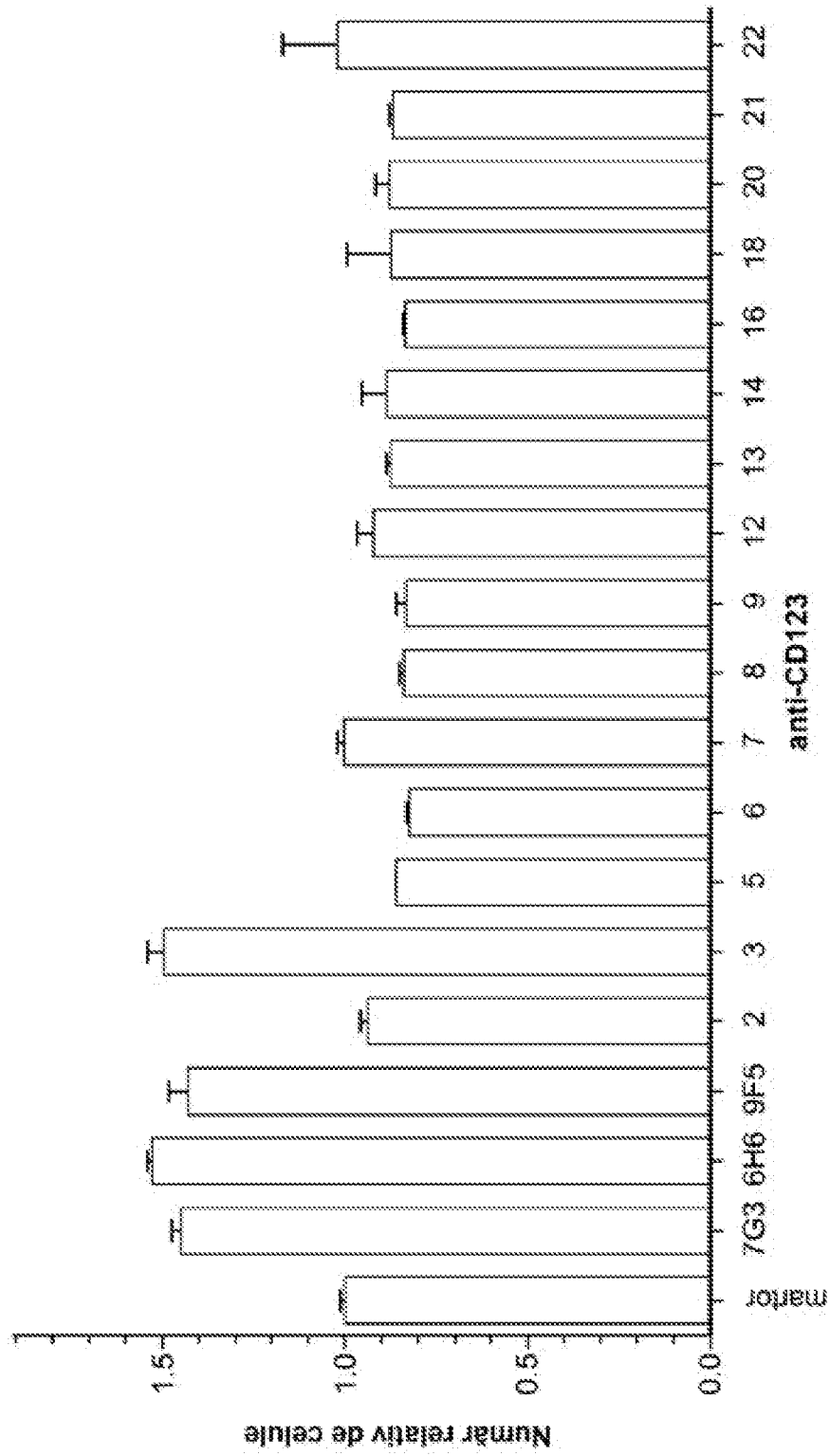


FIG. 3

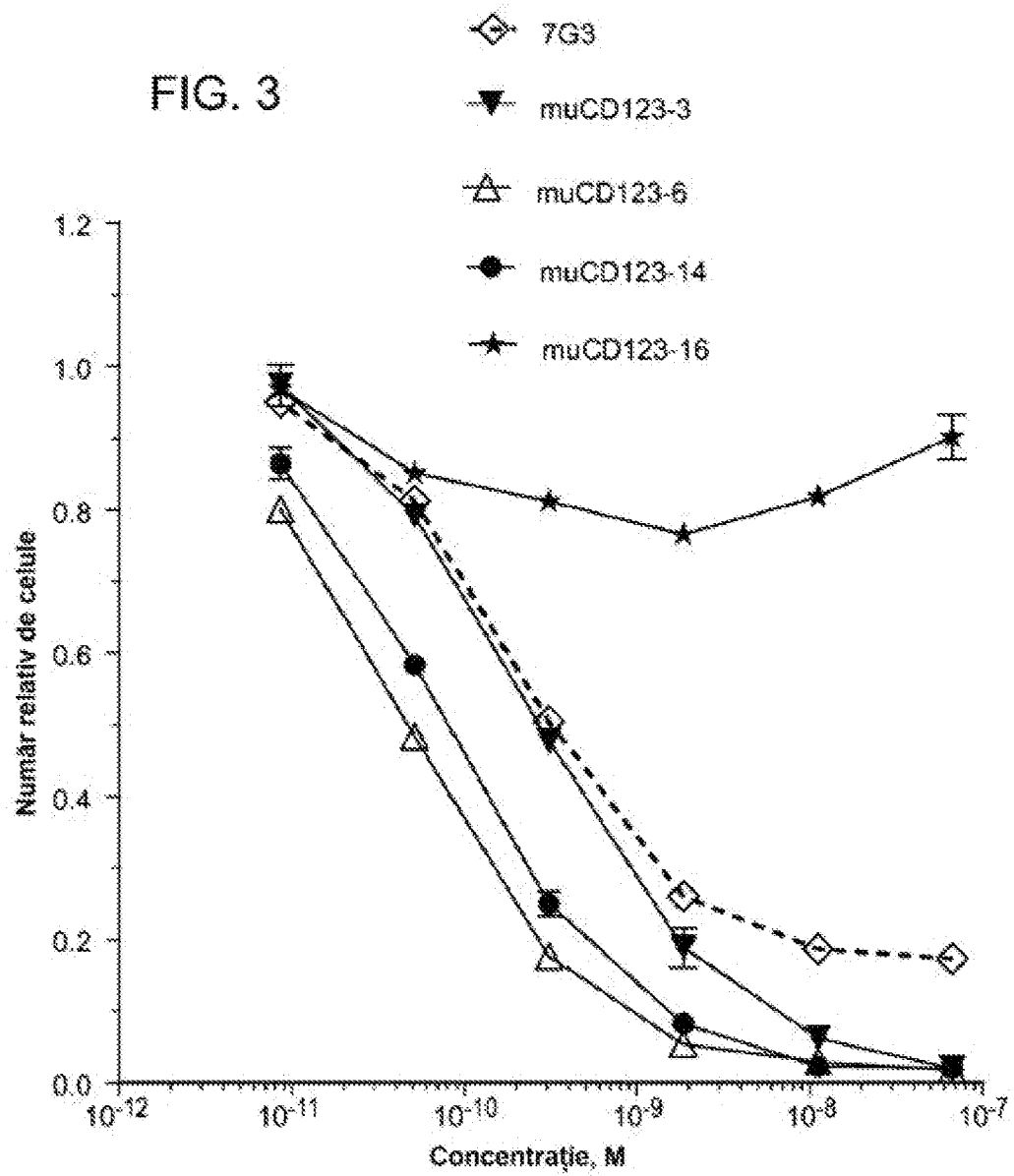


FIG. 4A

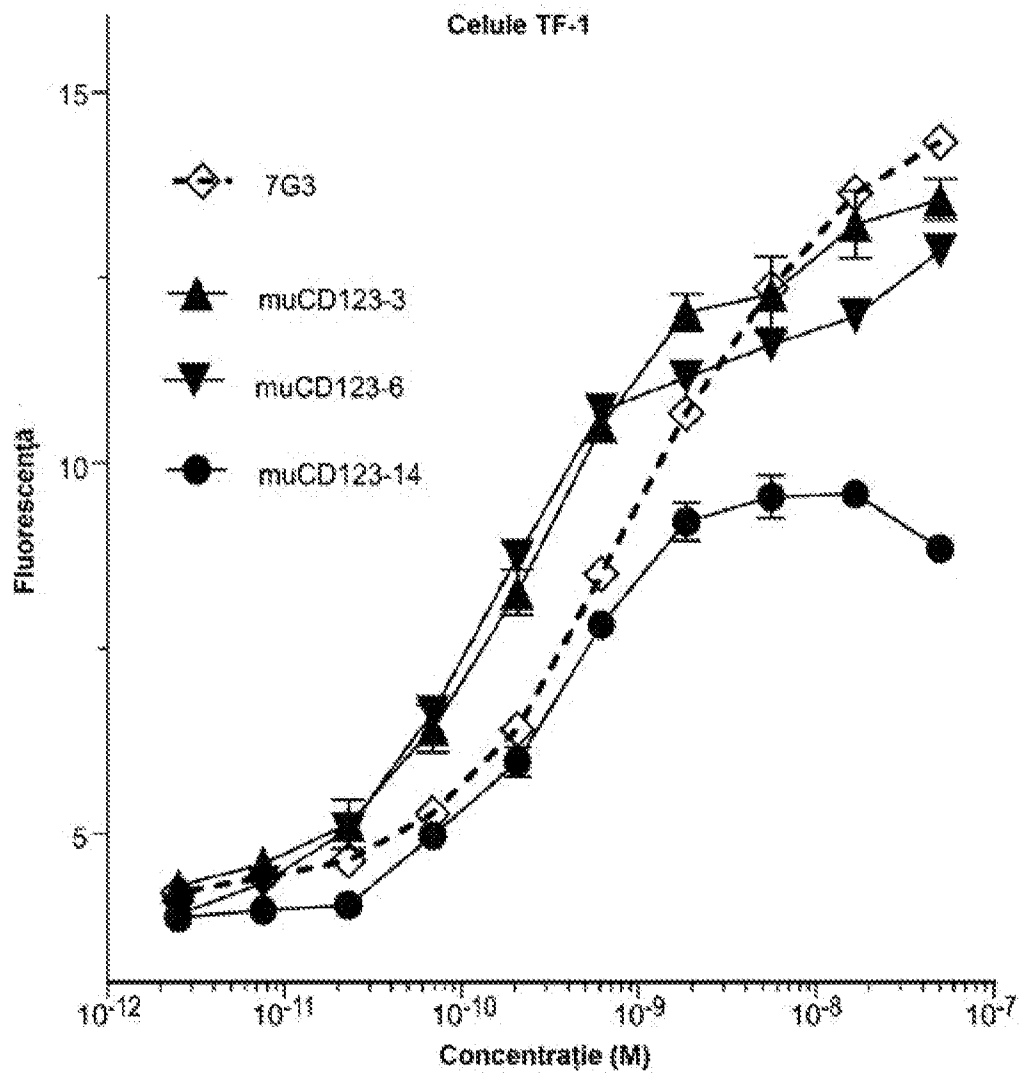


FIG. 4B

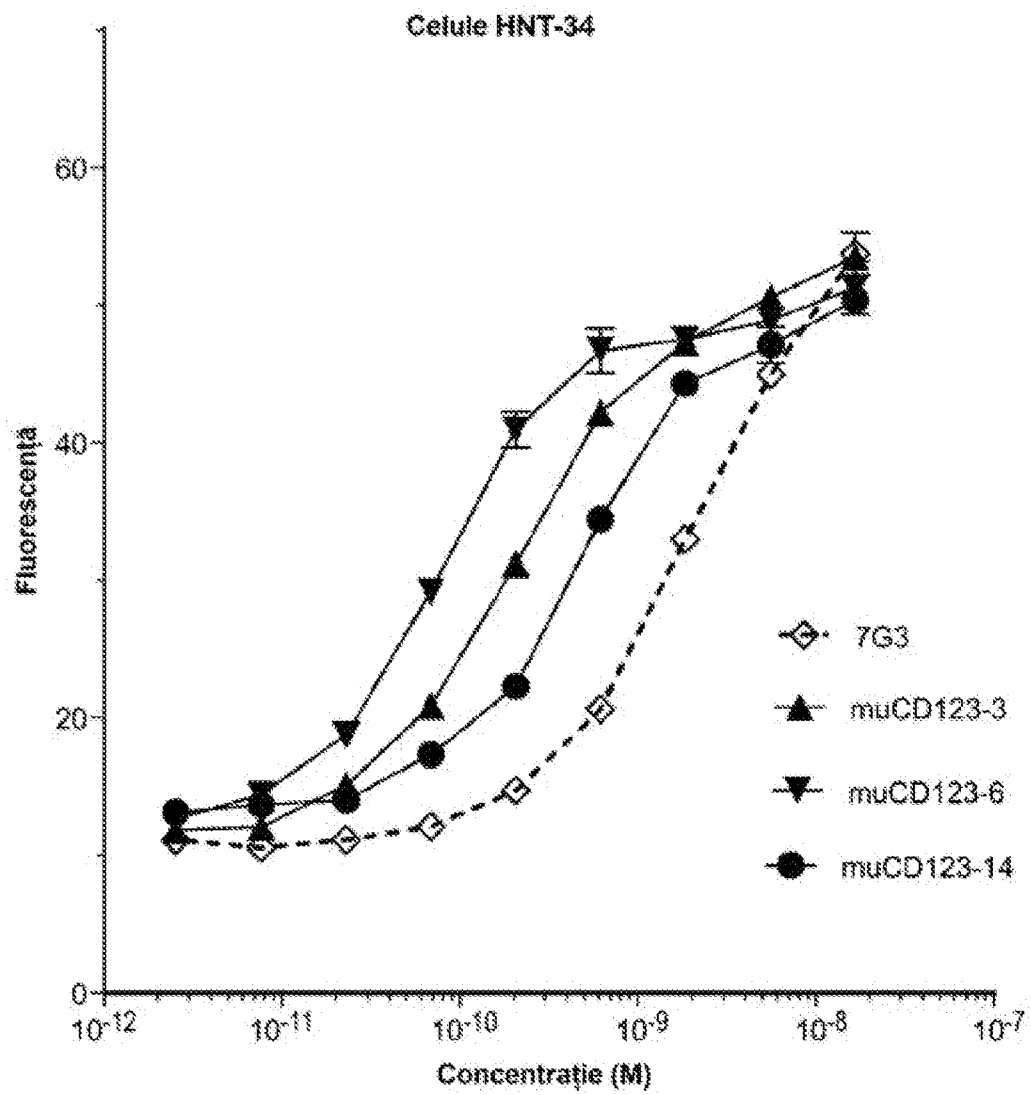


FIG. 5A

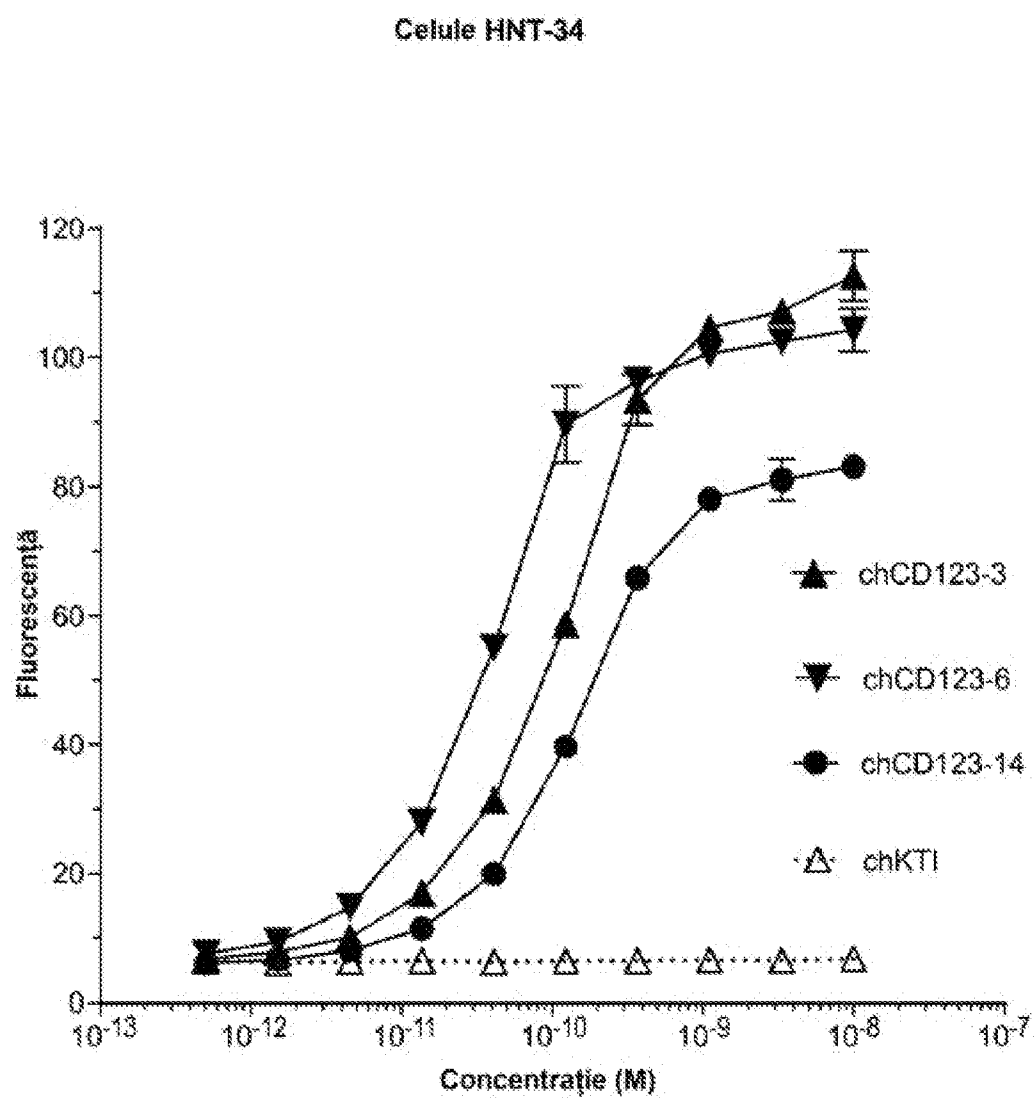


FIG. 5B

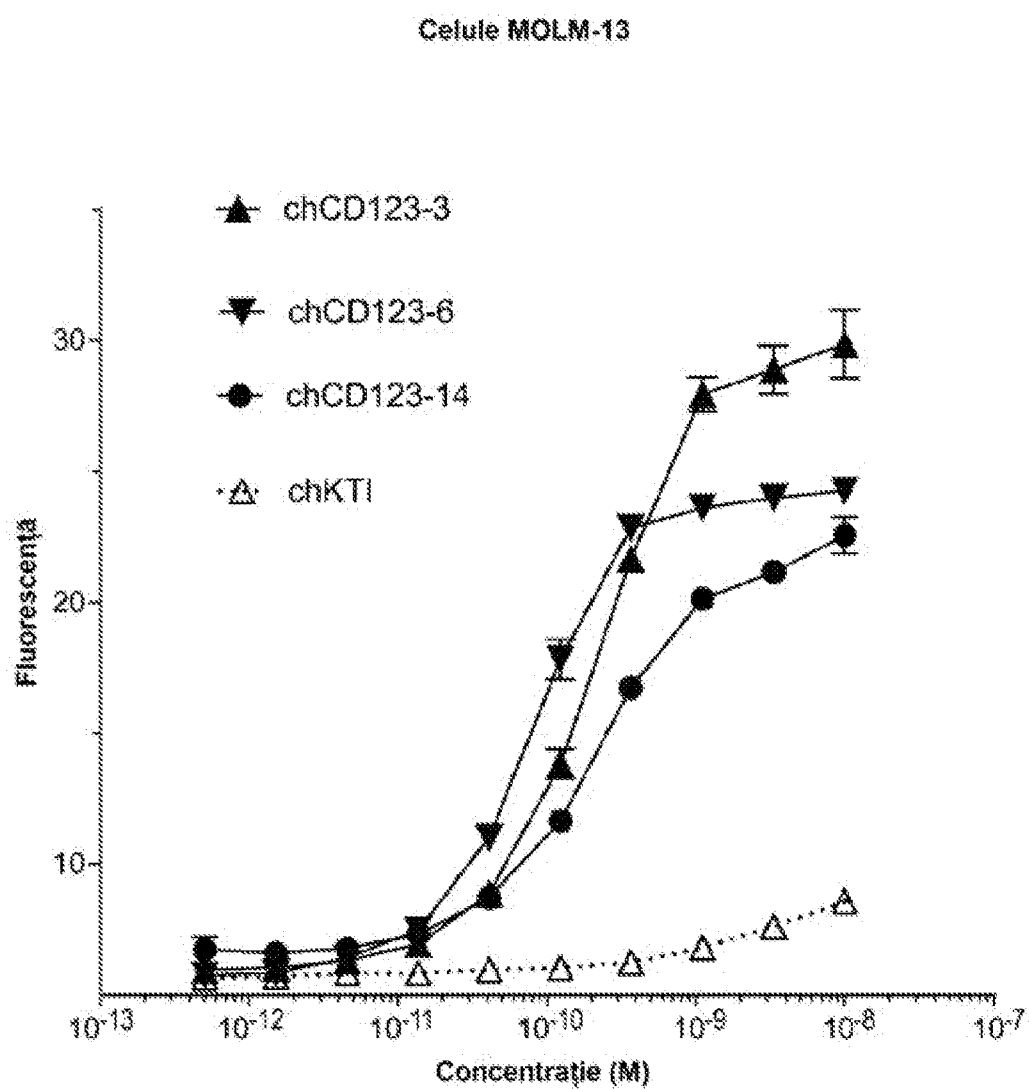


FIG. 6

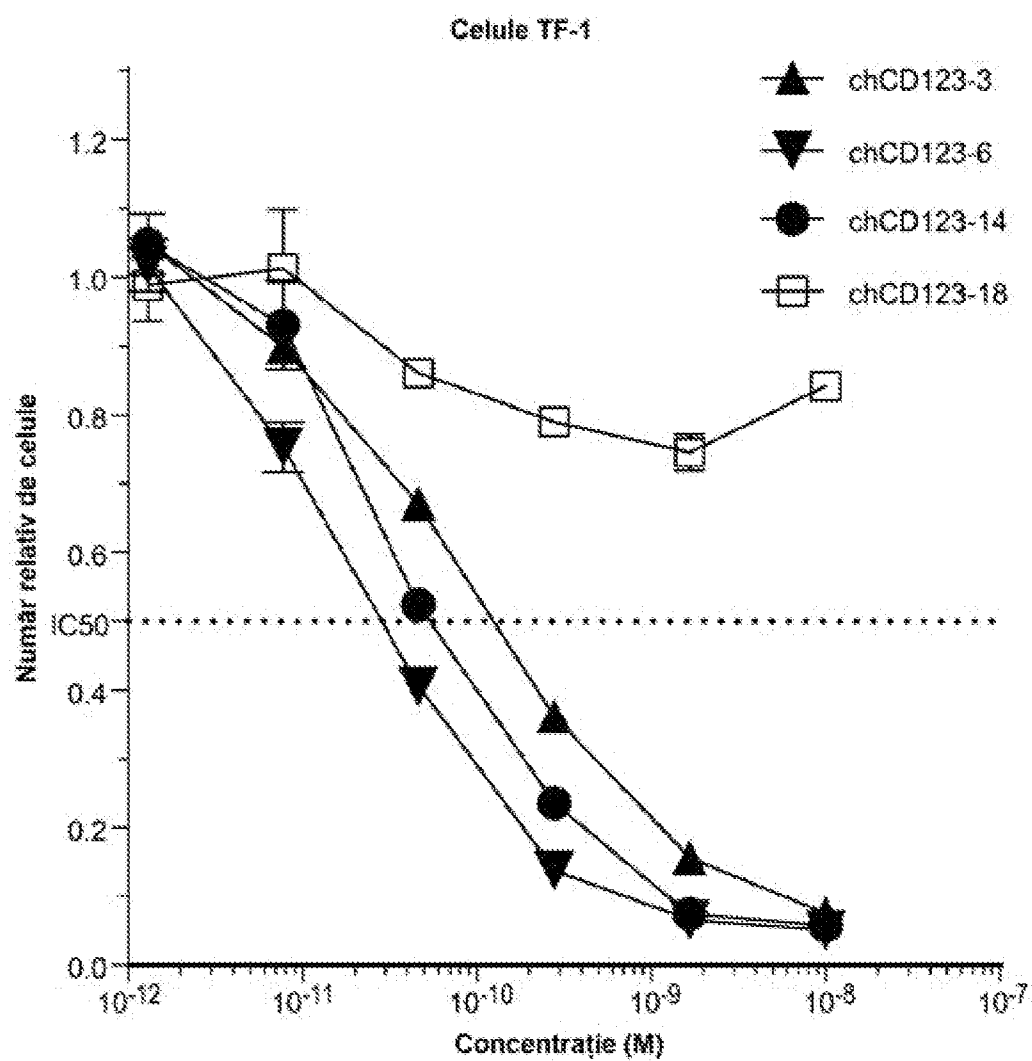


FIG. 7A

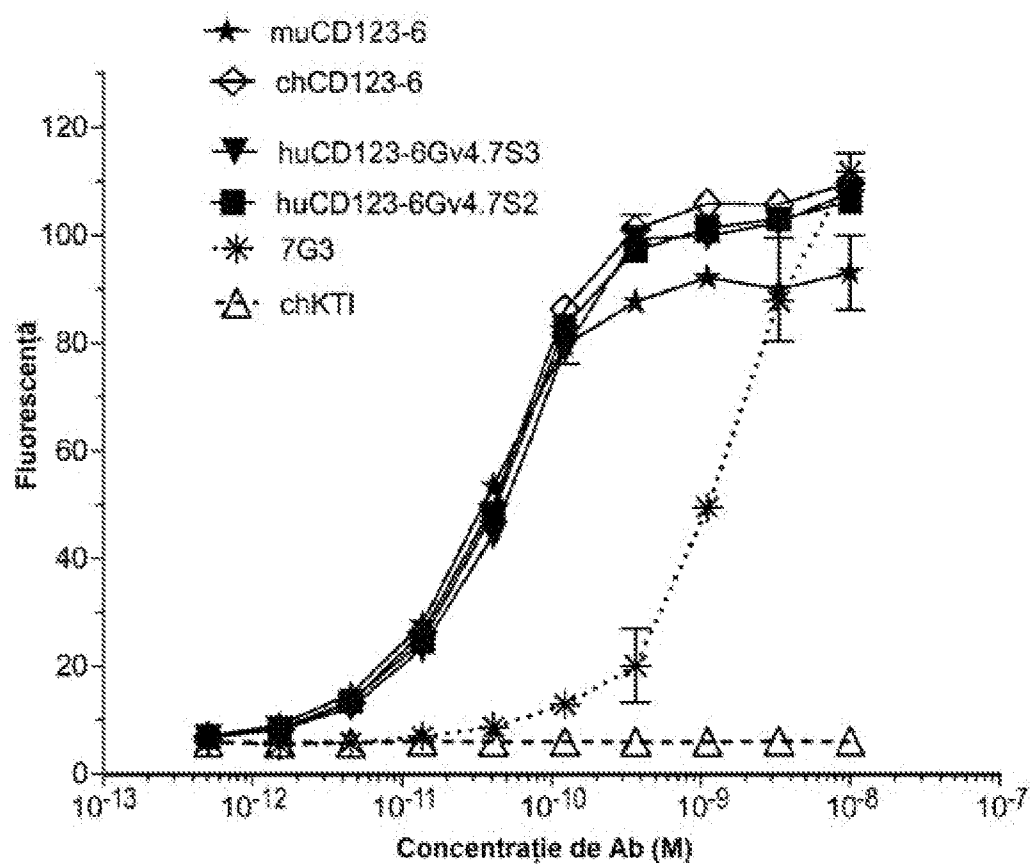


FIG. 7B

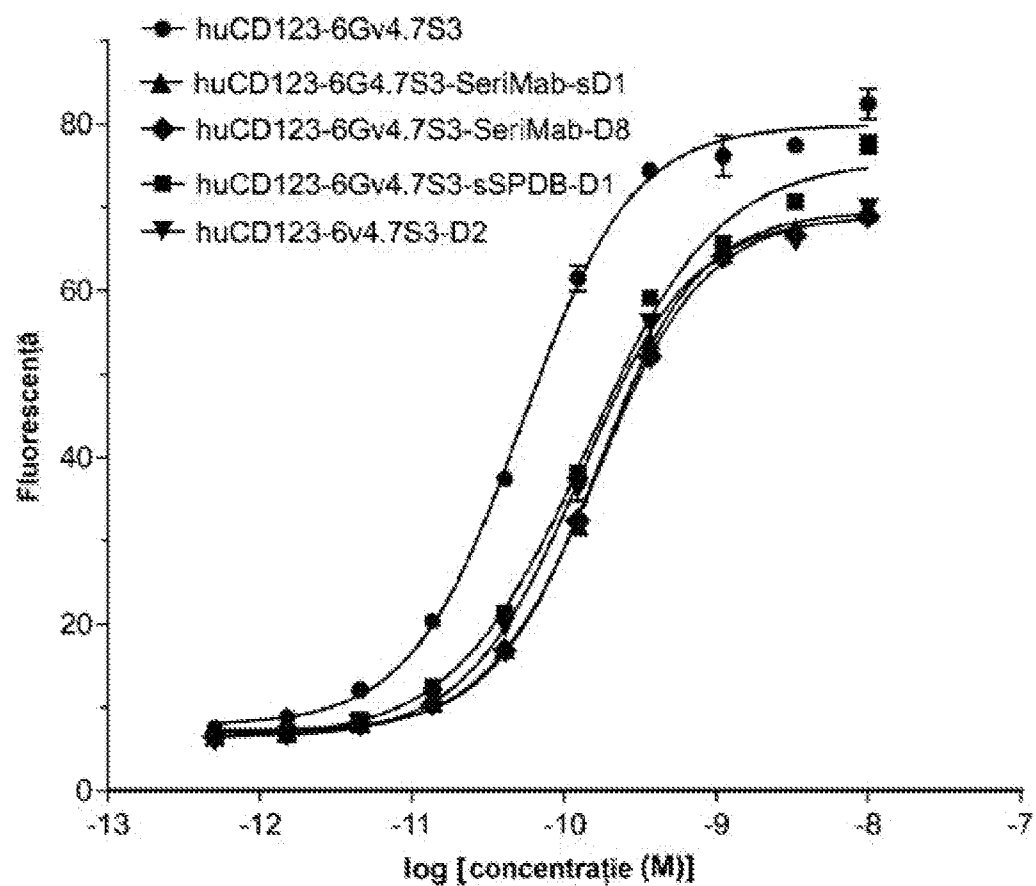


FIG. 7C

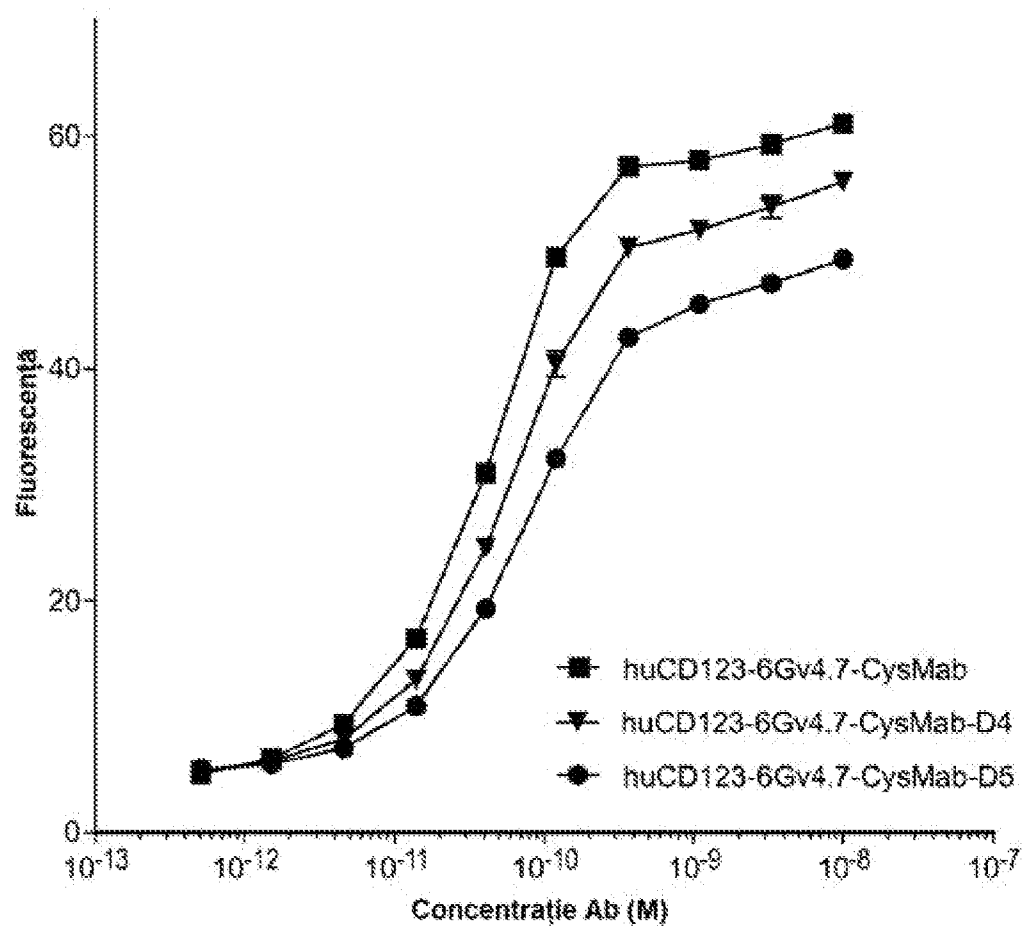


FIG. 8A

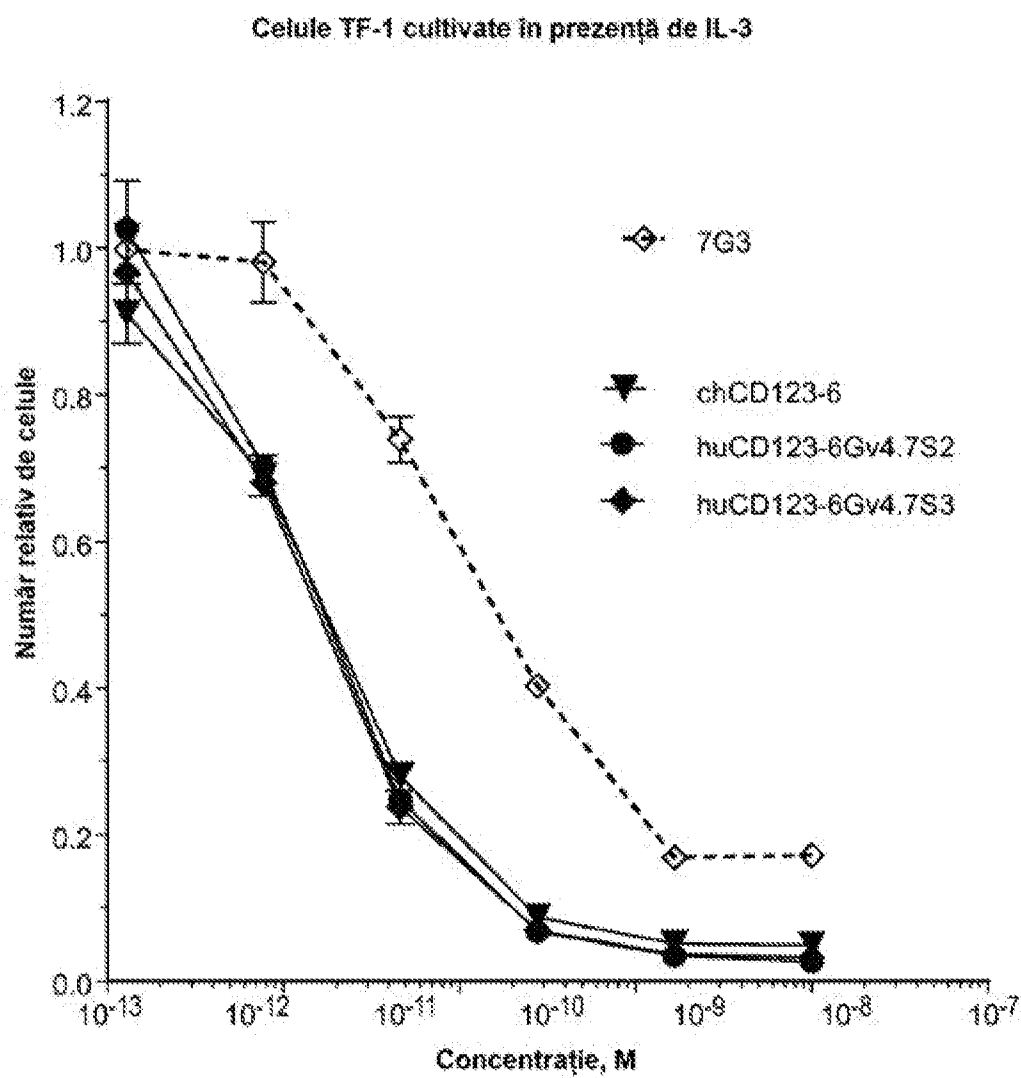


FIG. 8B

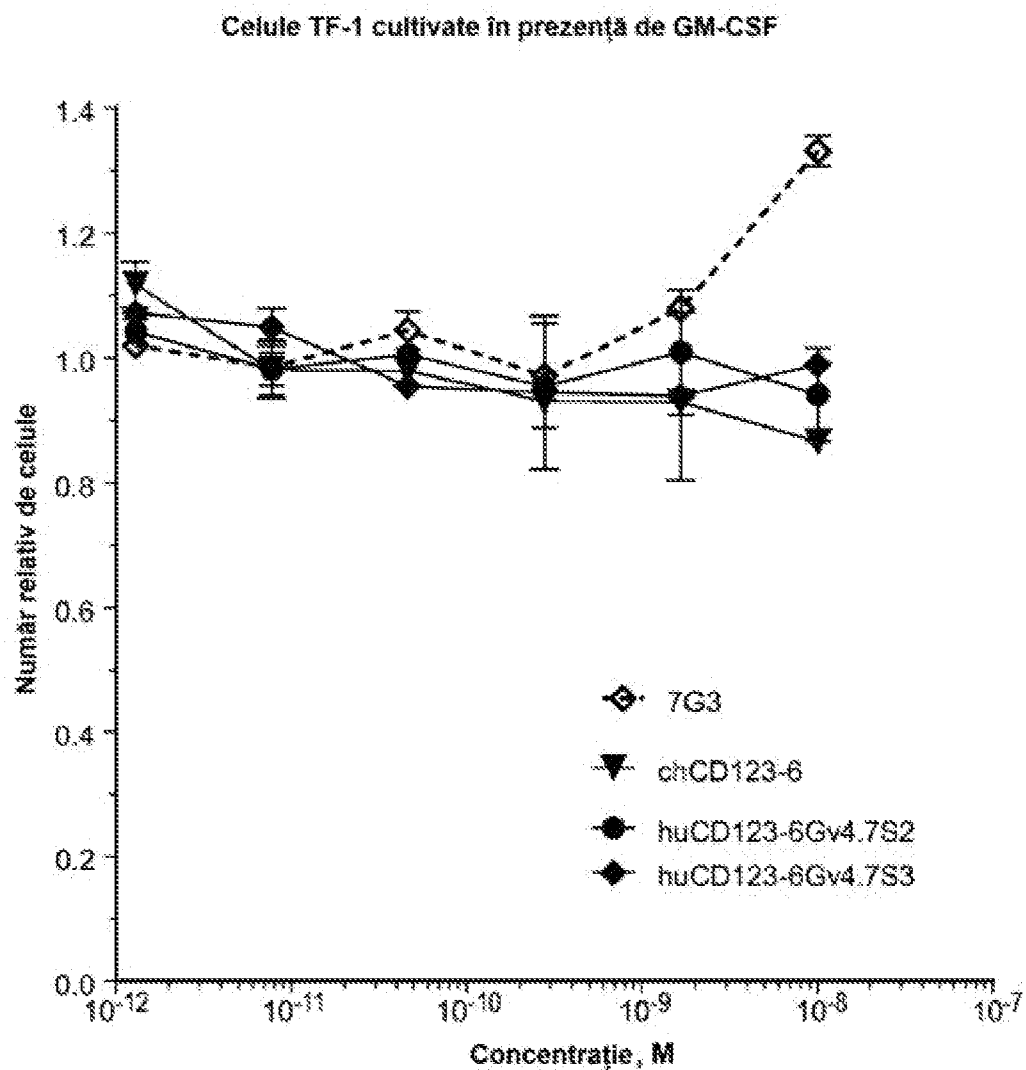


FIG. 9A

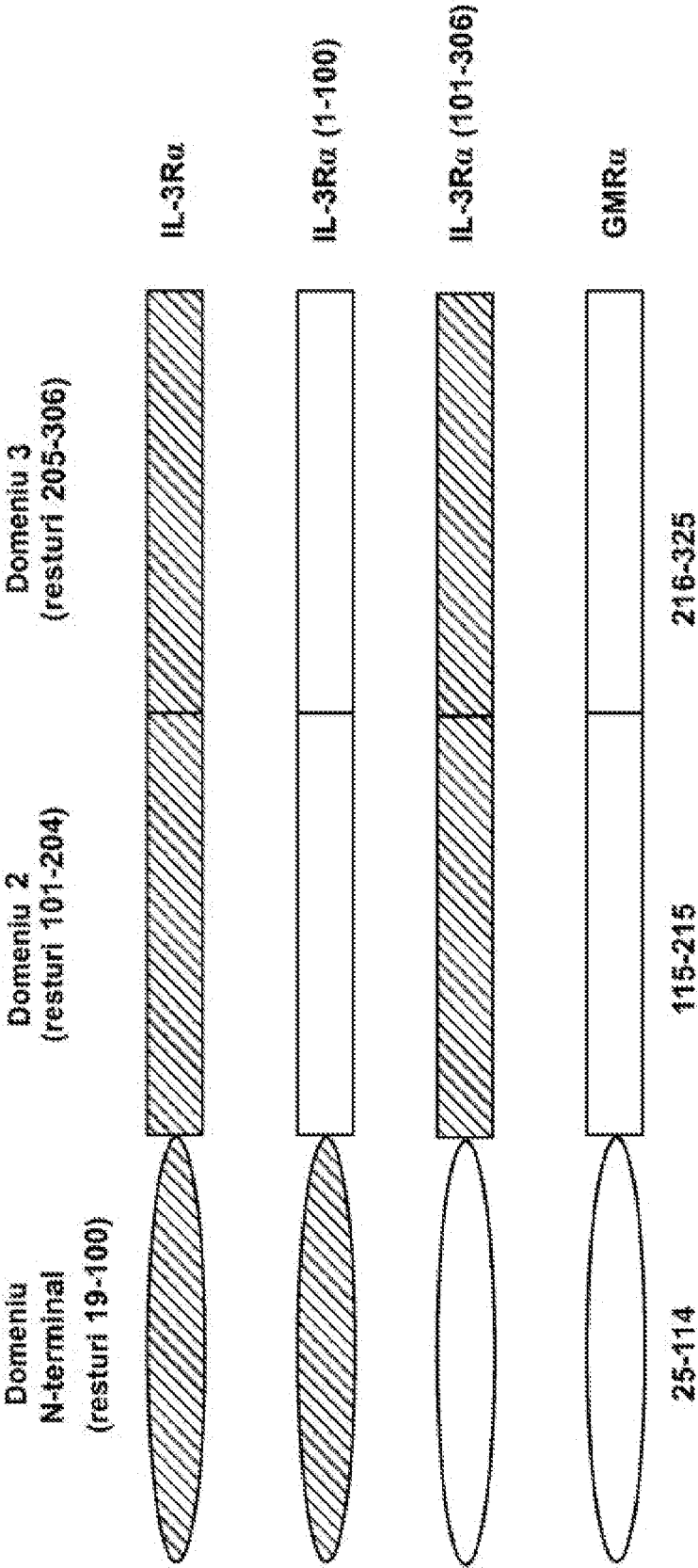
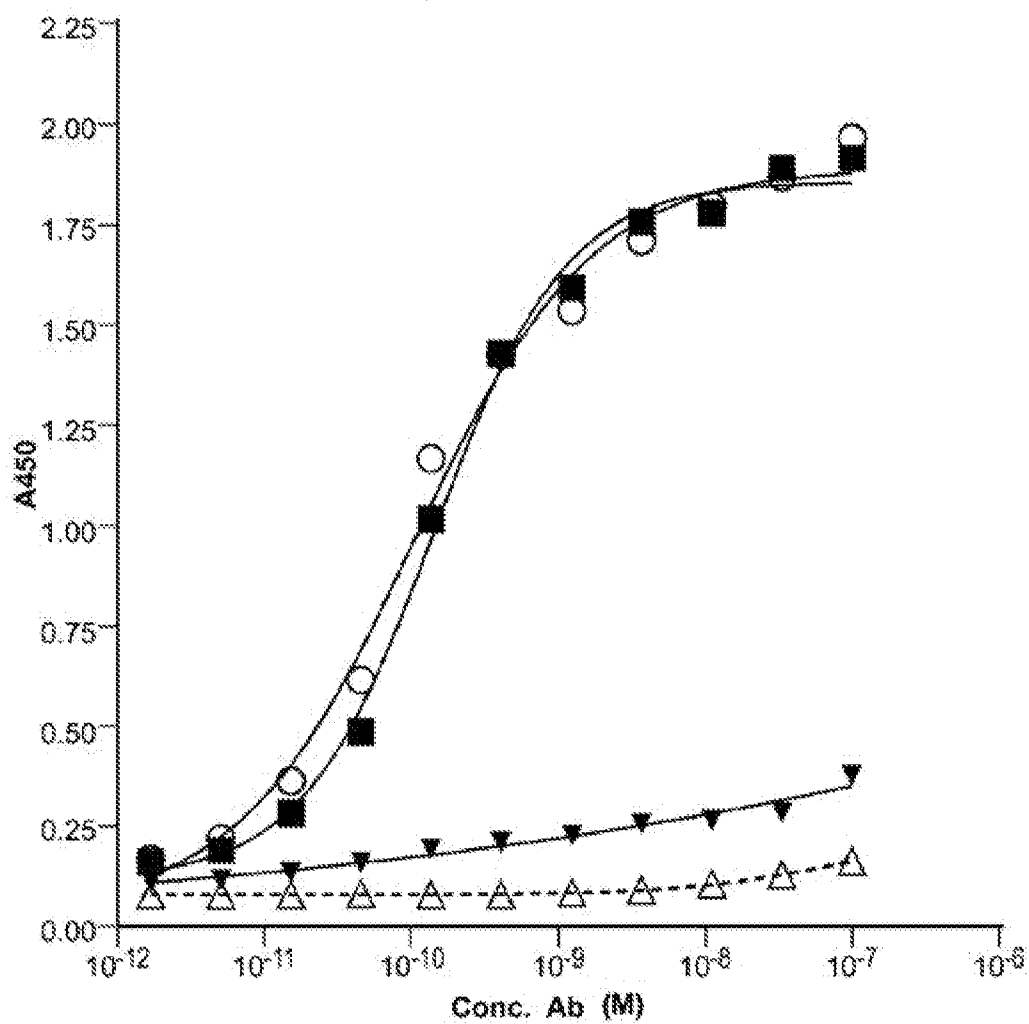


FIG. 9B

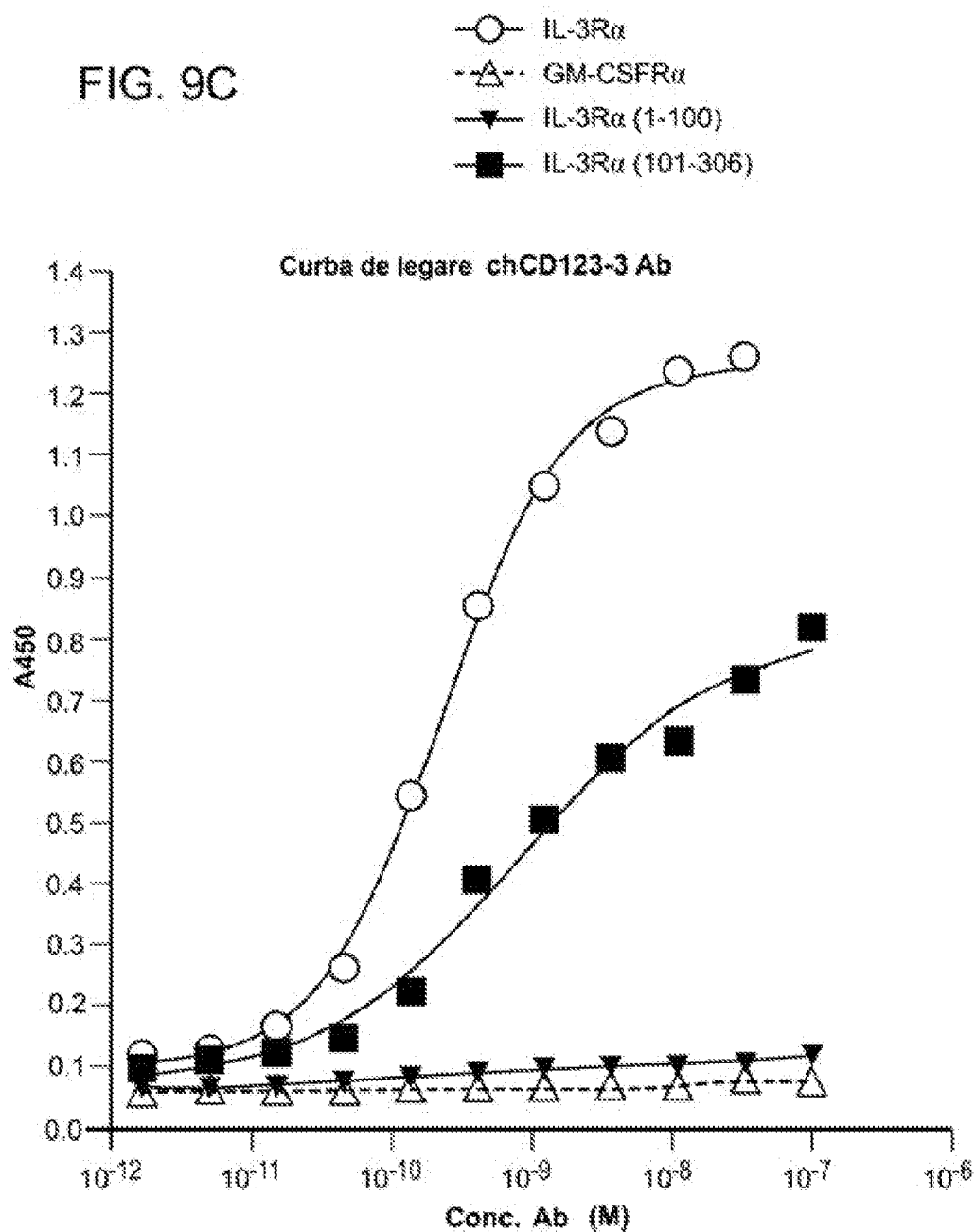
- IL-3R α
- △ GM-CSFR α
- ▼ IL-3R α (1-100)
- IL-3R α (101-306)

Curba de legare huCD123-6Gv4.7 Ab



	EC ₅₀
IL-3R α	1.06E-10
IL-3R α (101-306)	1.45E-10

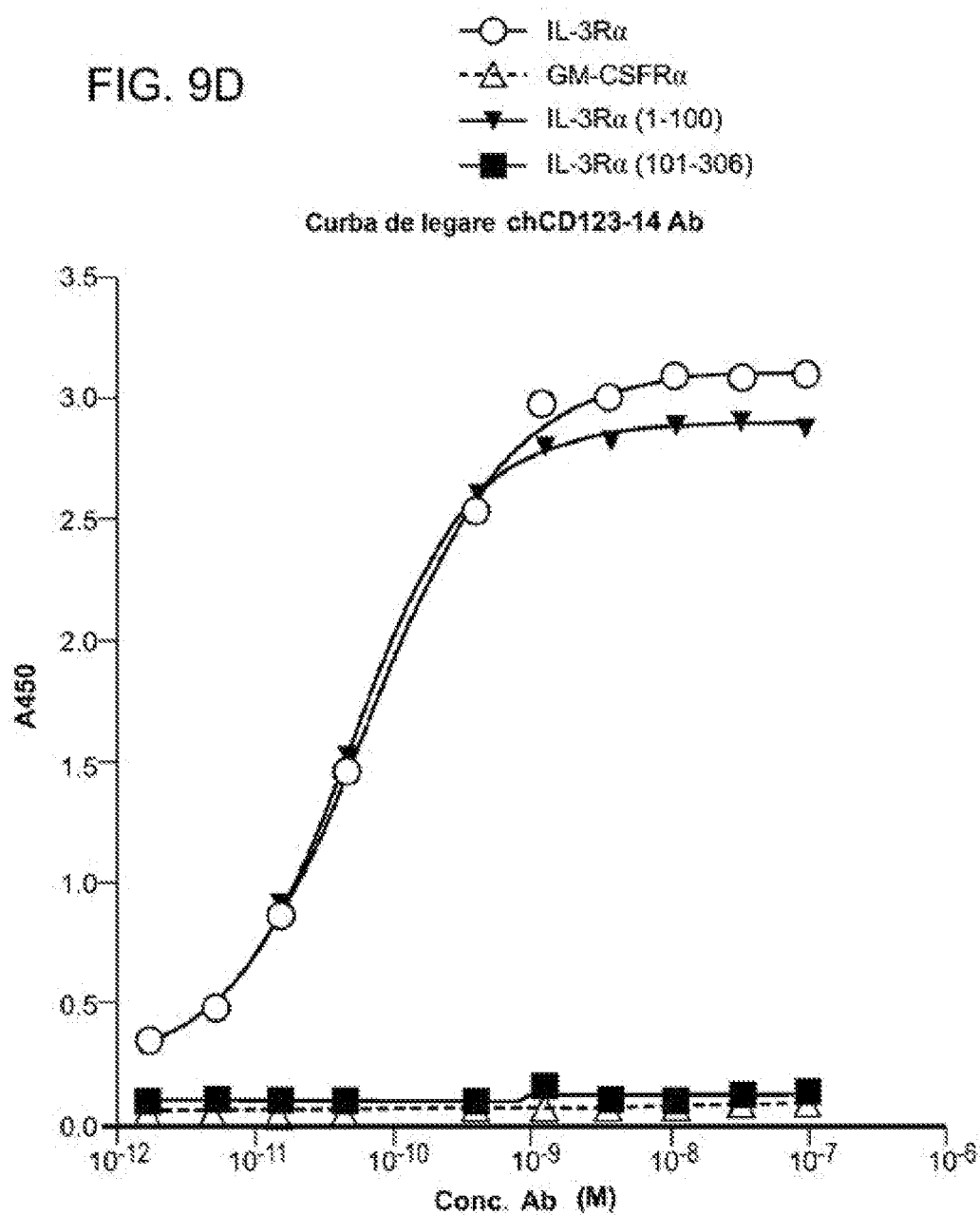
FIG. 9C



	EC ₅₀
IL-3R α	2.74E-10
IL-3R α (101-306)	8.52E-10

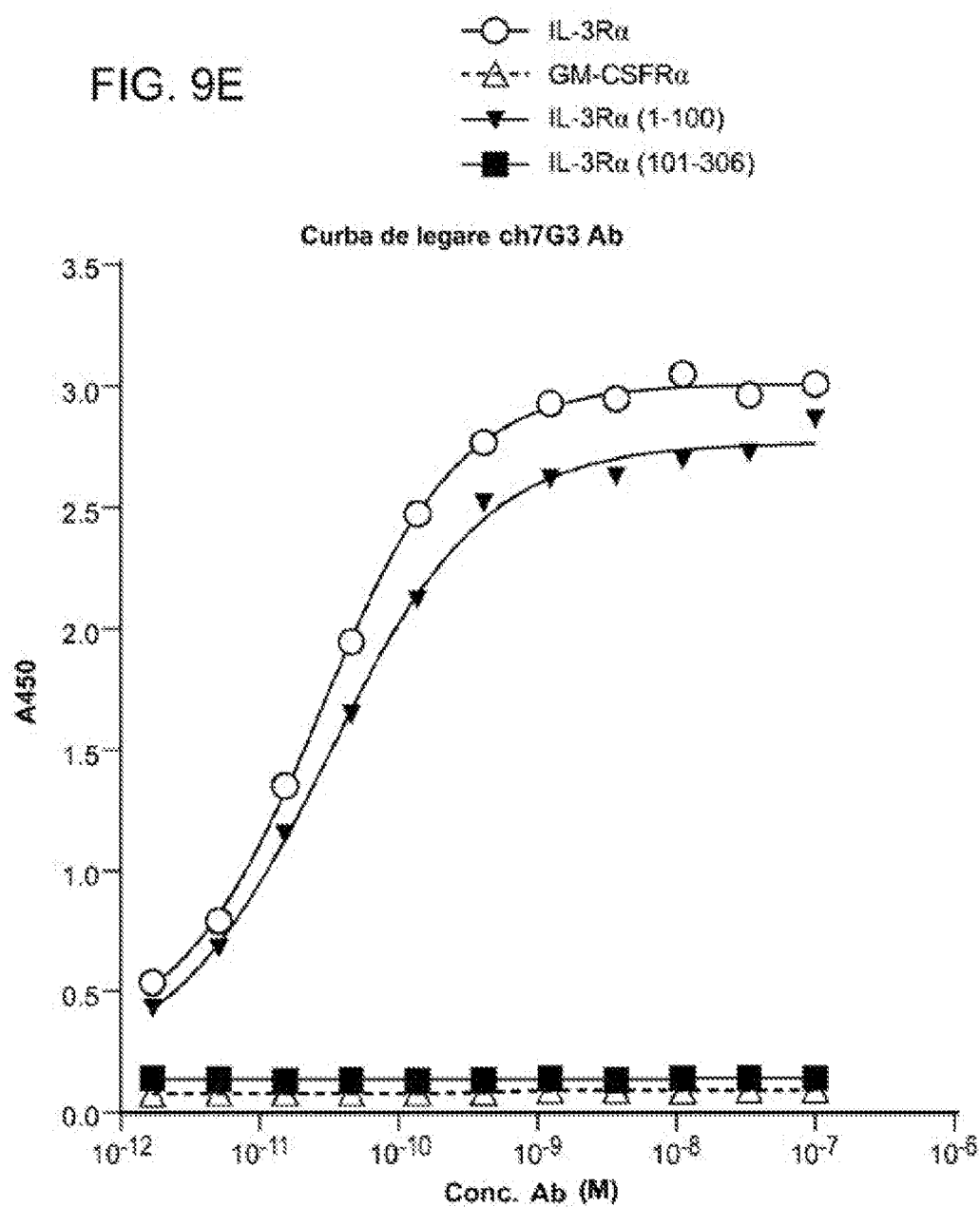
270

FIG. 9D



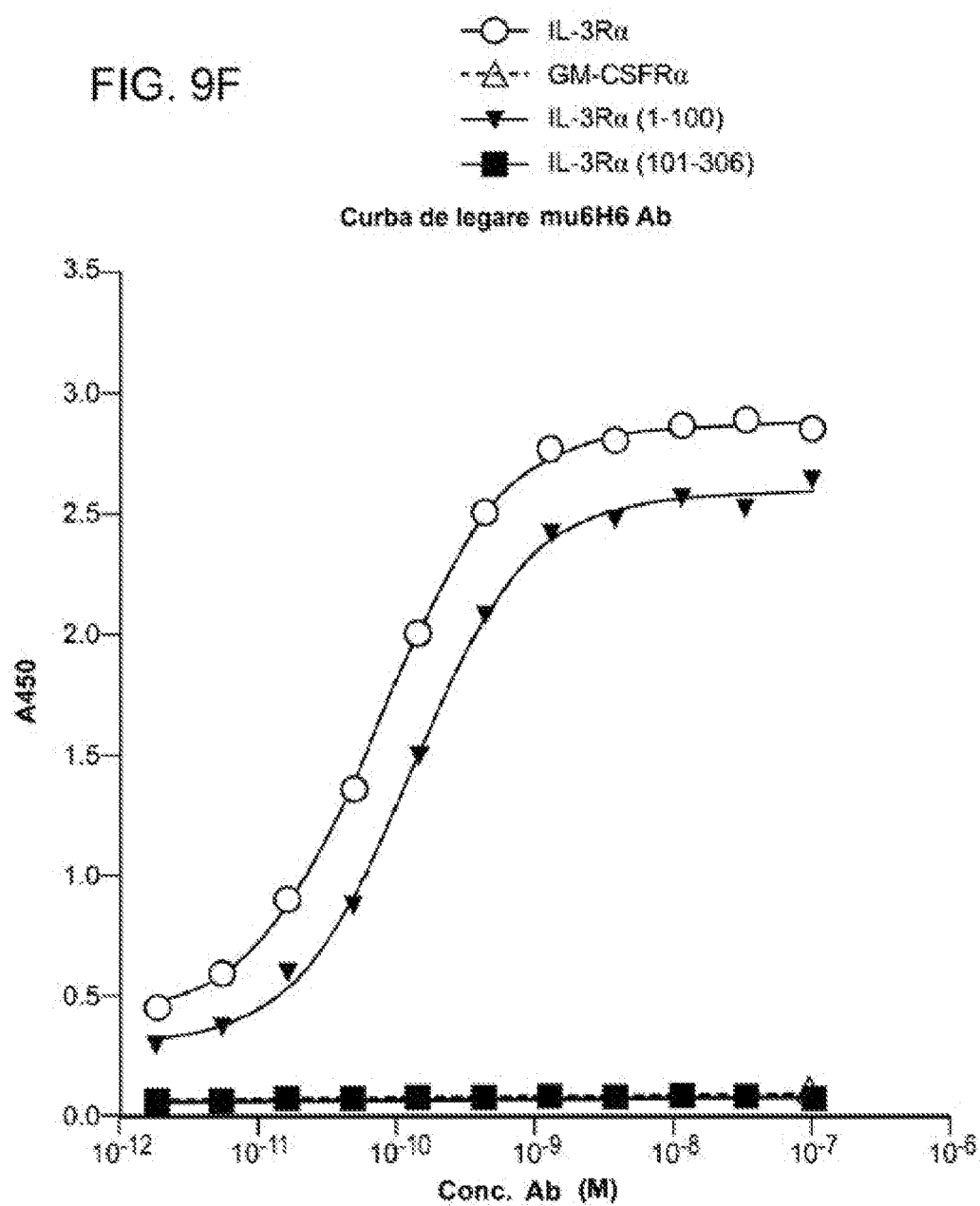
	EC ₅₀
IL-3R α	6.55E-10
IL-3R α (1-100)	4.79E-10

FIG. 9E



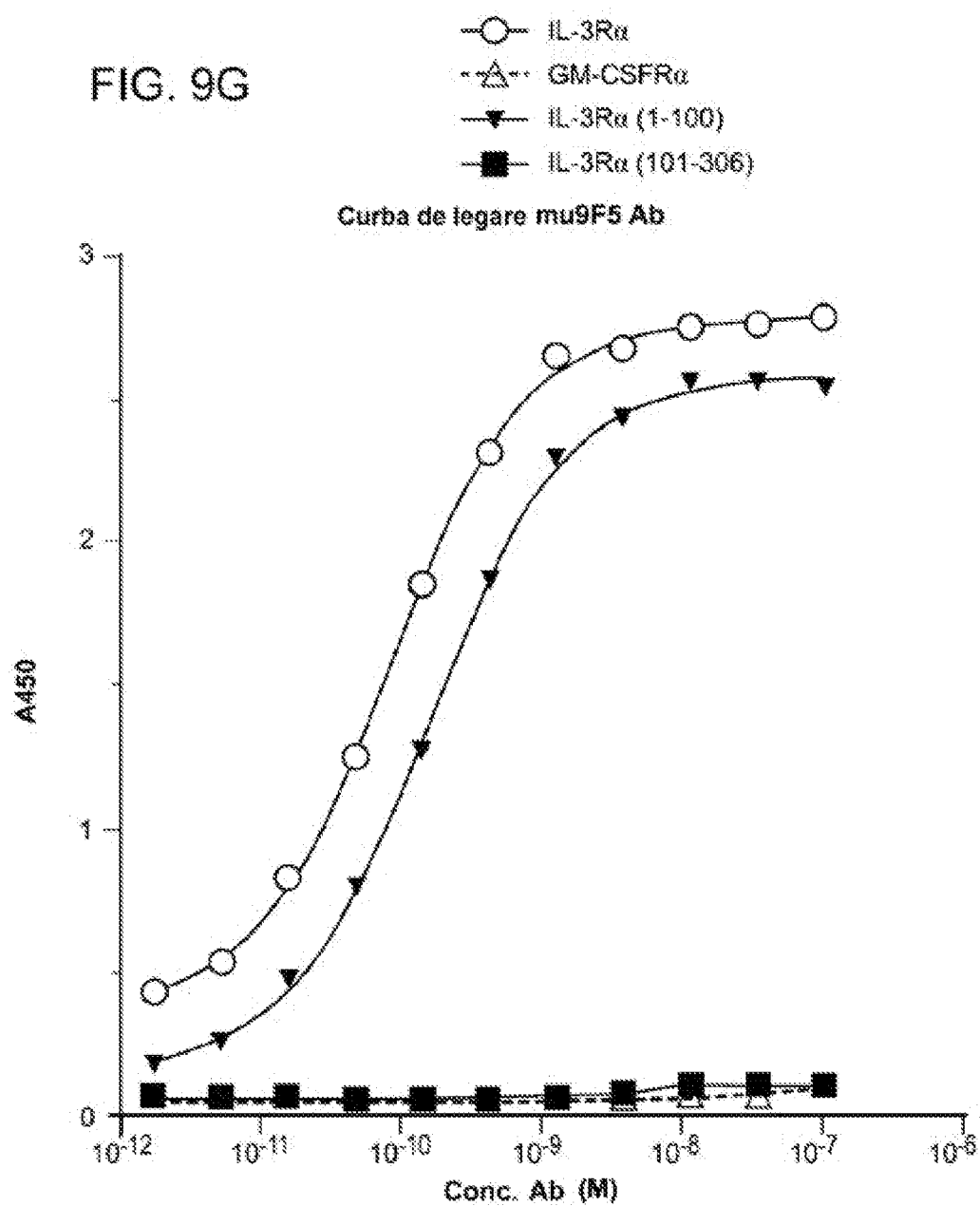
	EC ₅₀
IL-3R α	2.701E-11
IL-3R α (1-100)	3.061E-11

FIG. 9F



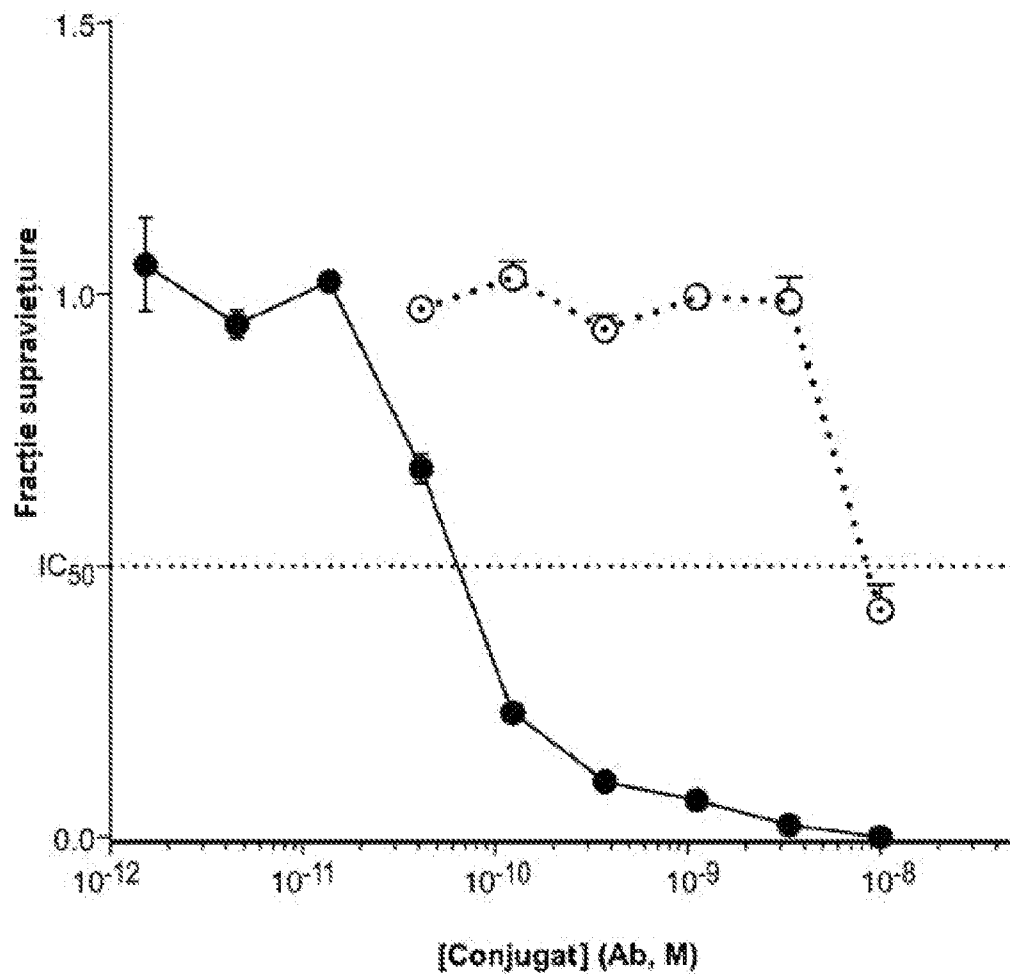
	EC ₅₀
IL-3Ra	7.2E-11
IL-3Ra (1-100)	1.22E-10

FIG. 9G



	EC ₅₀
IL-3Ra	8.12E-11
IL-3Ra (1-100)	1.52E-10

FIG. 10



● huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1

○ huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1 cu concentrație de blocare (500nM) de huCD123-6

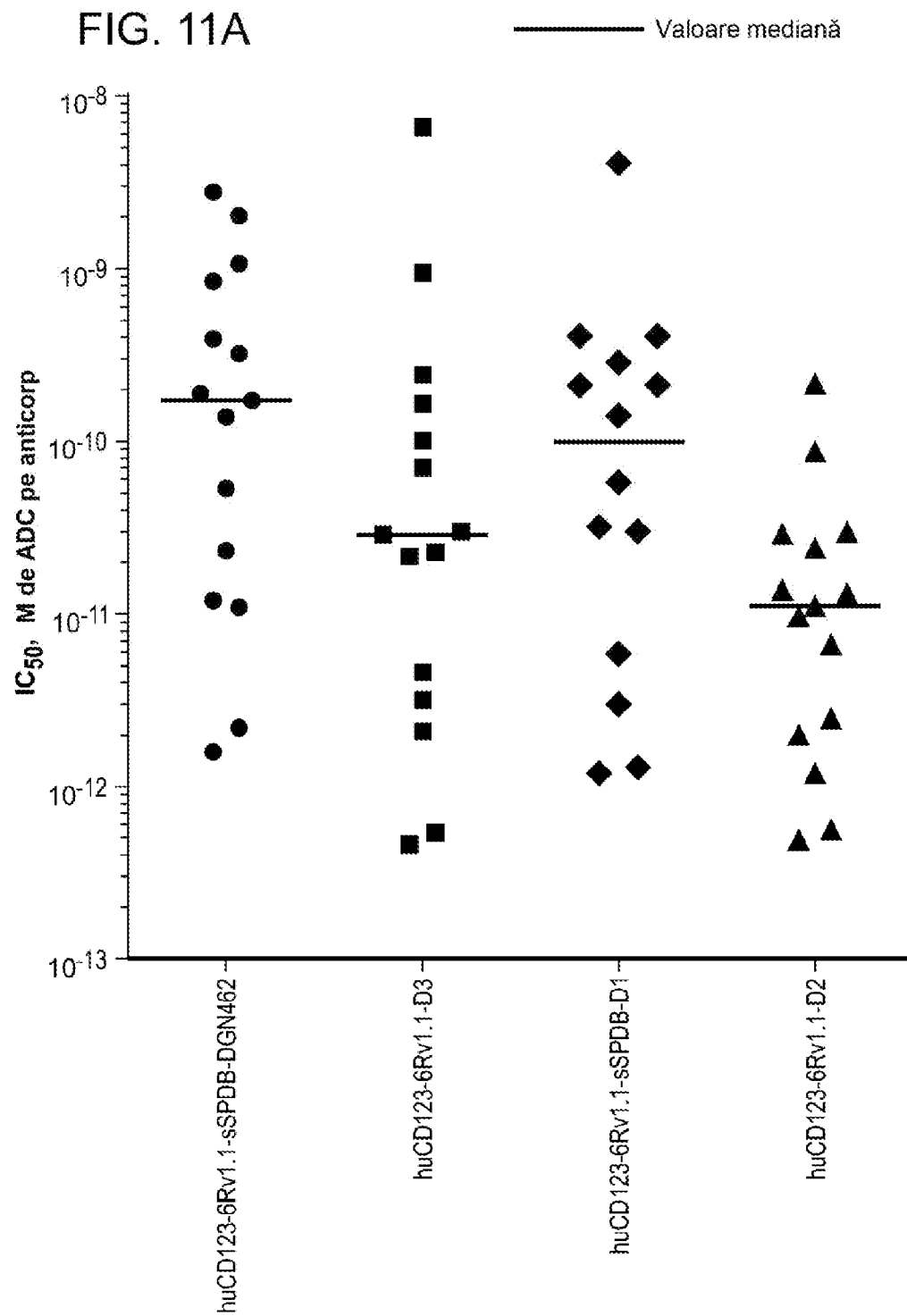


FIG. 11B

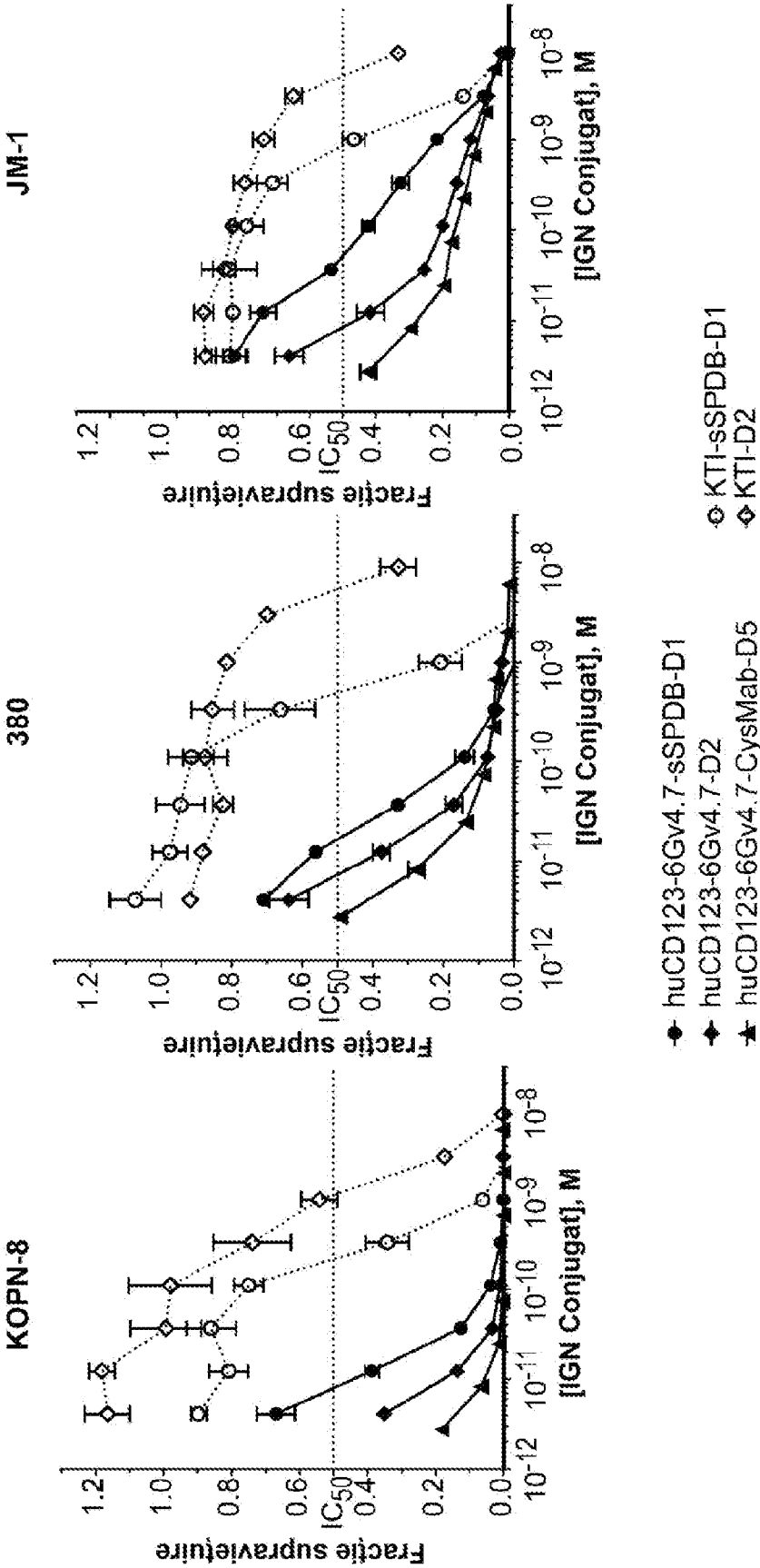
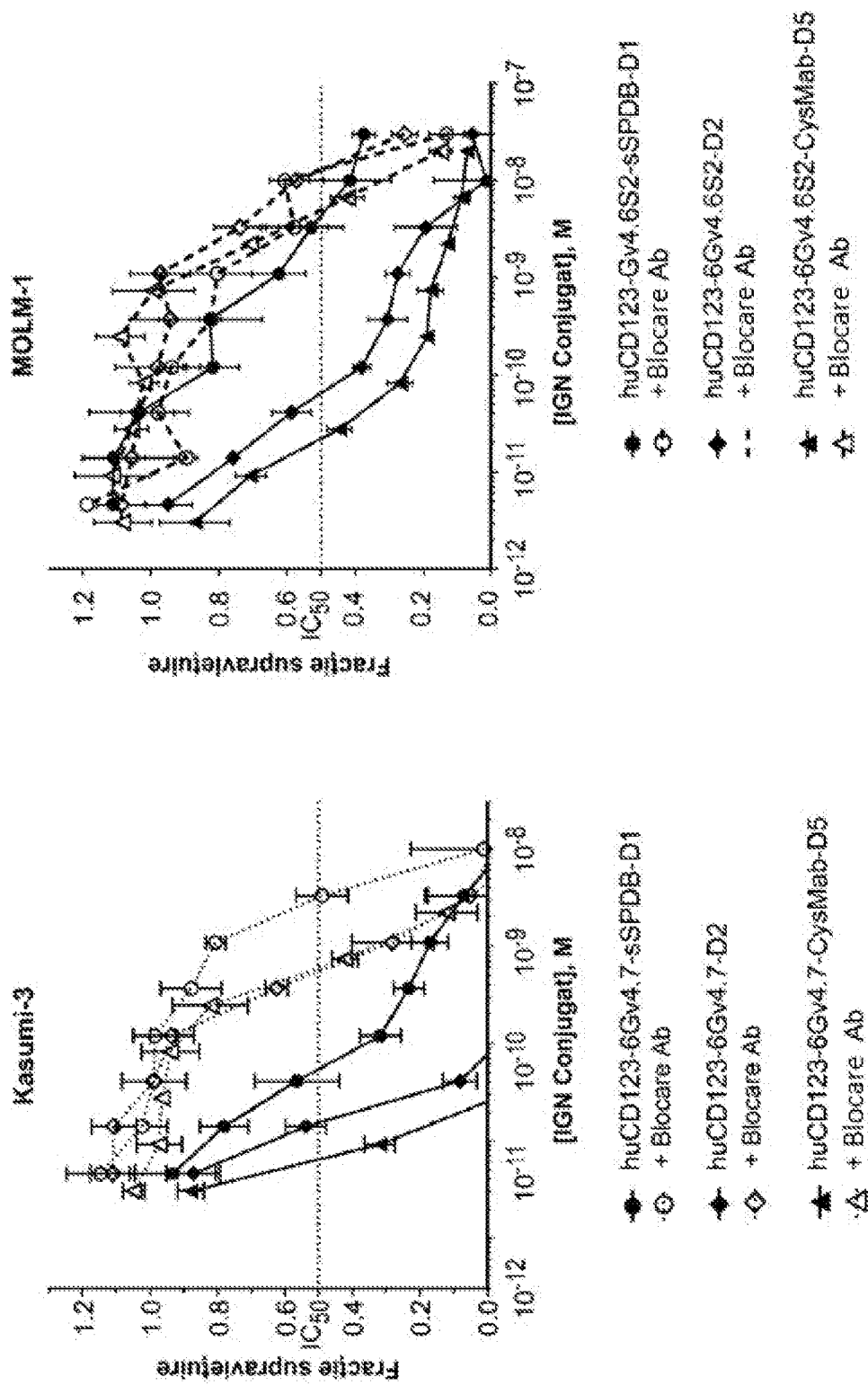
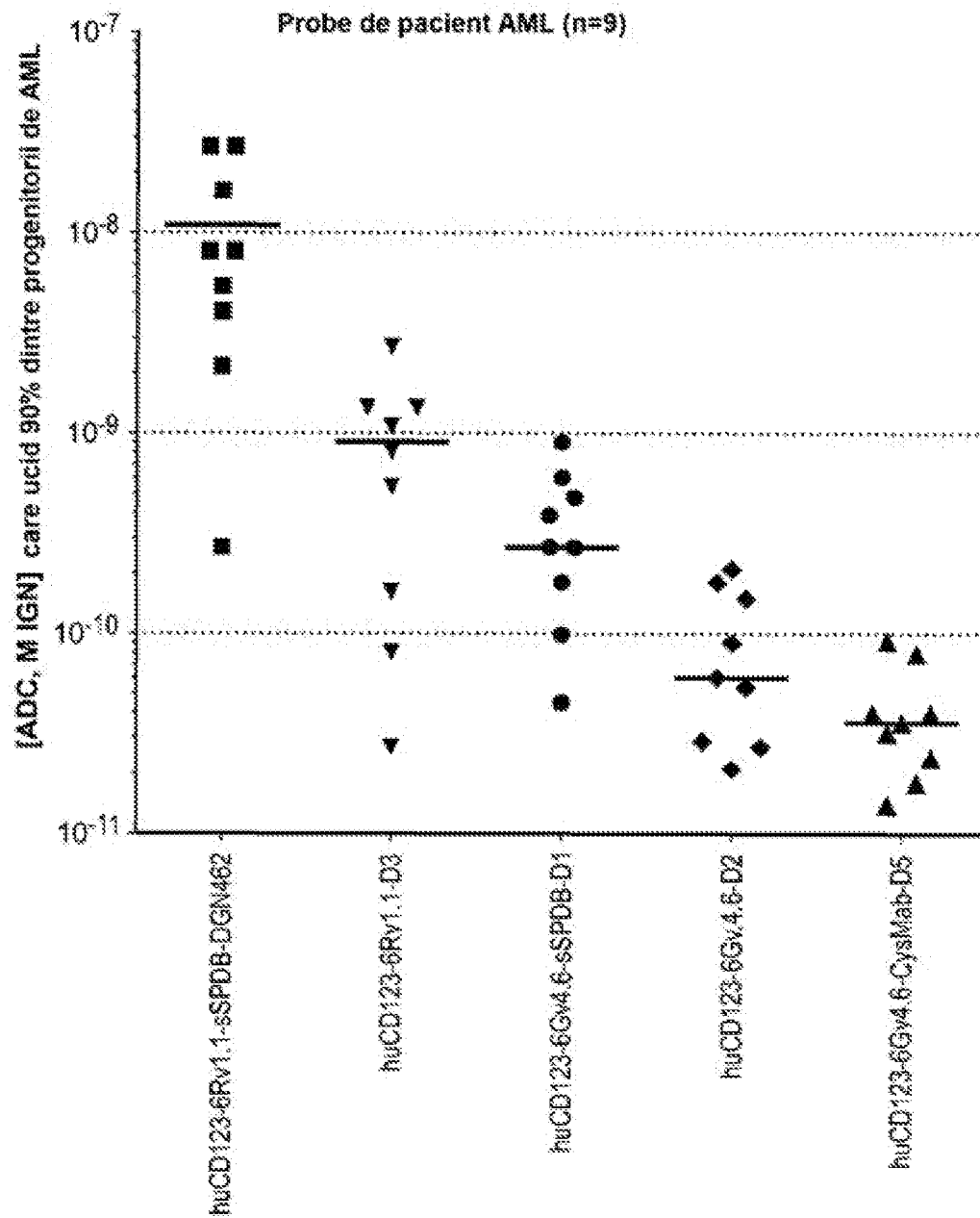


FIG. 11C





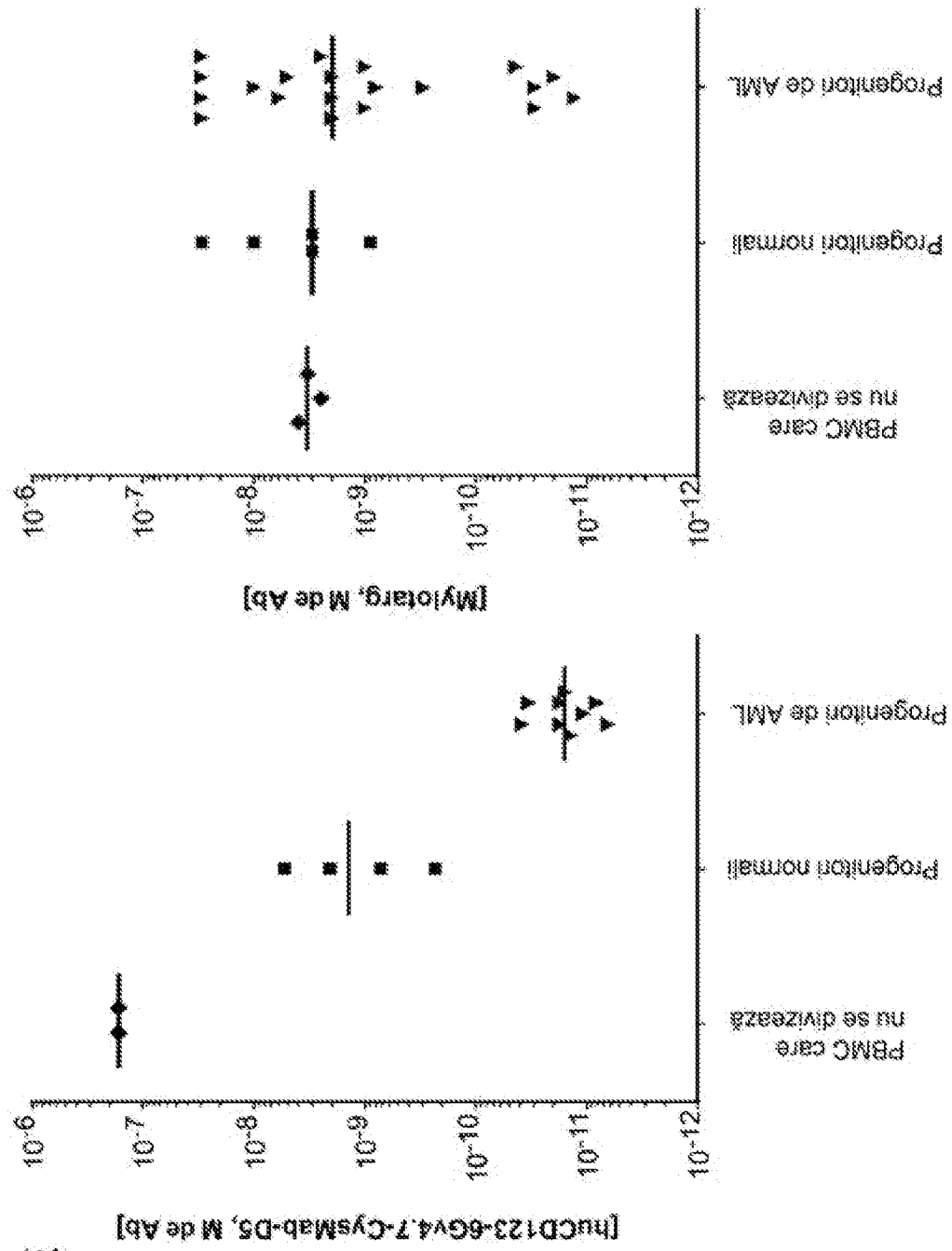


FIG. 12A

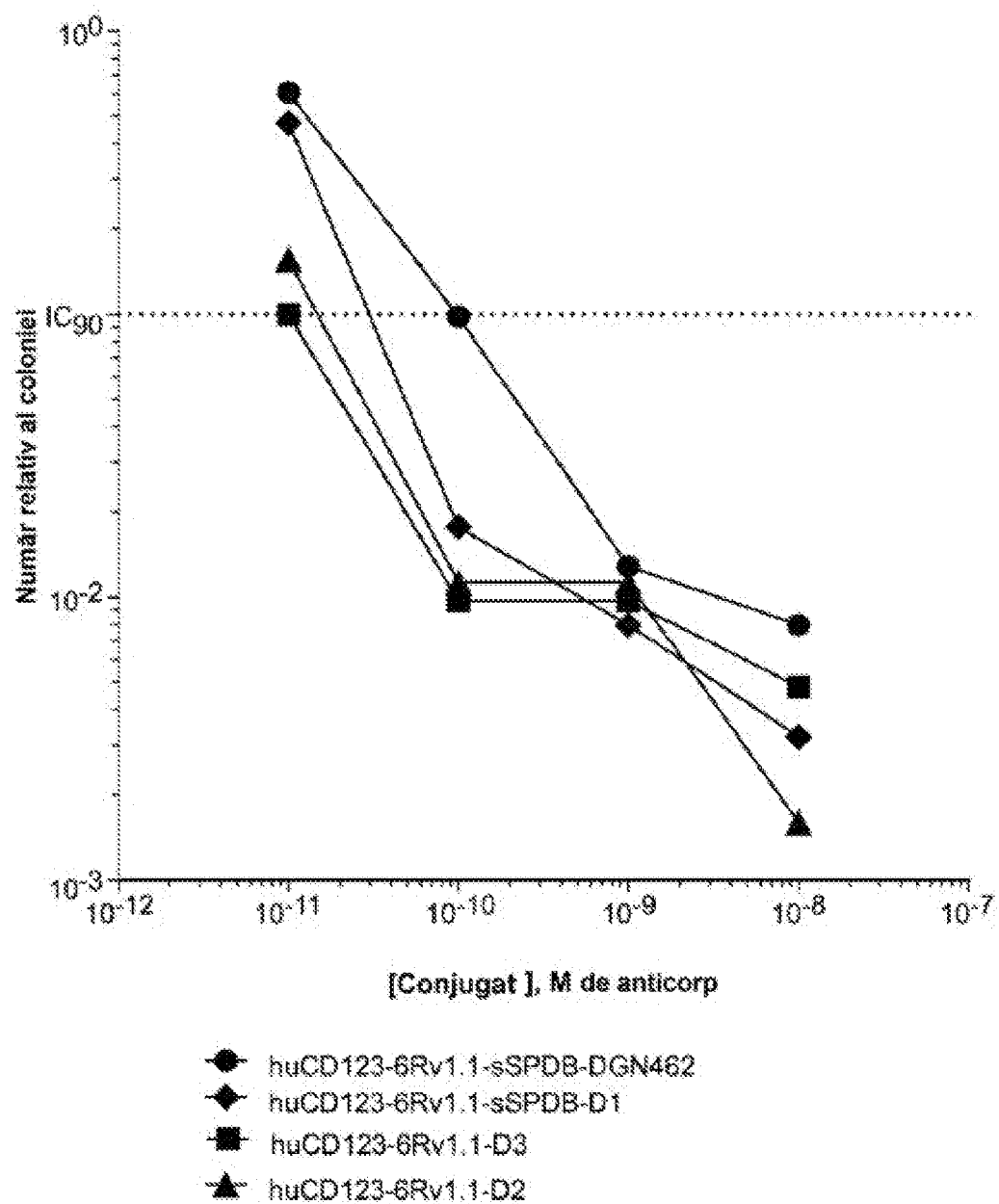


FIG. 12B

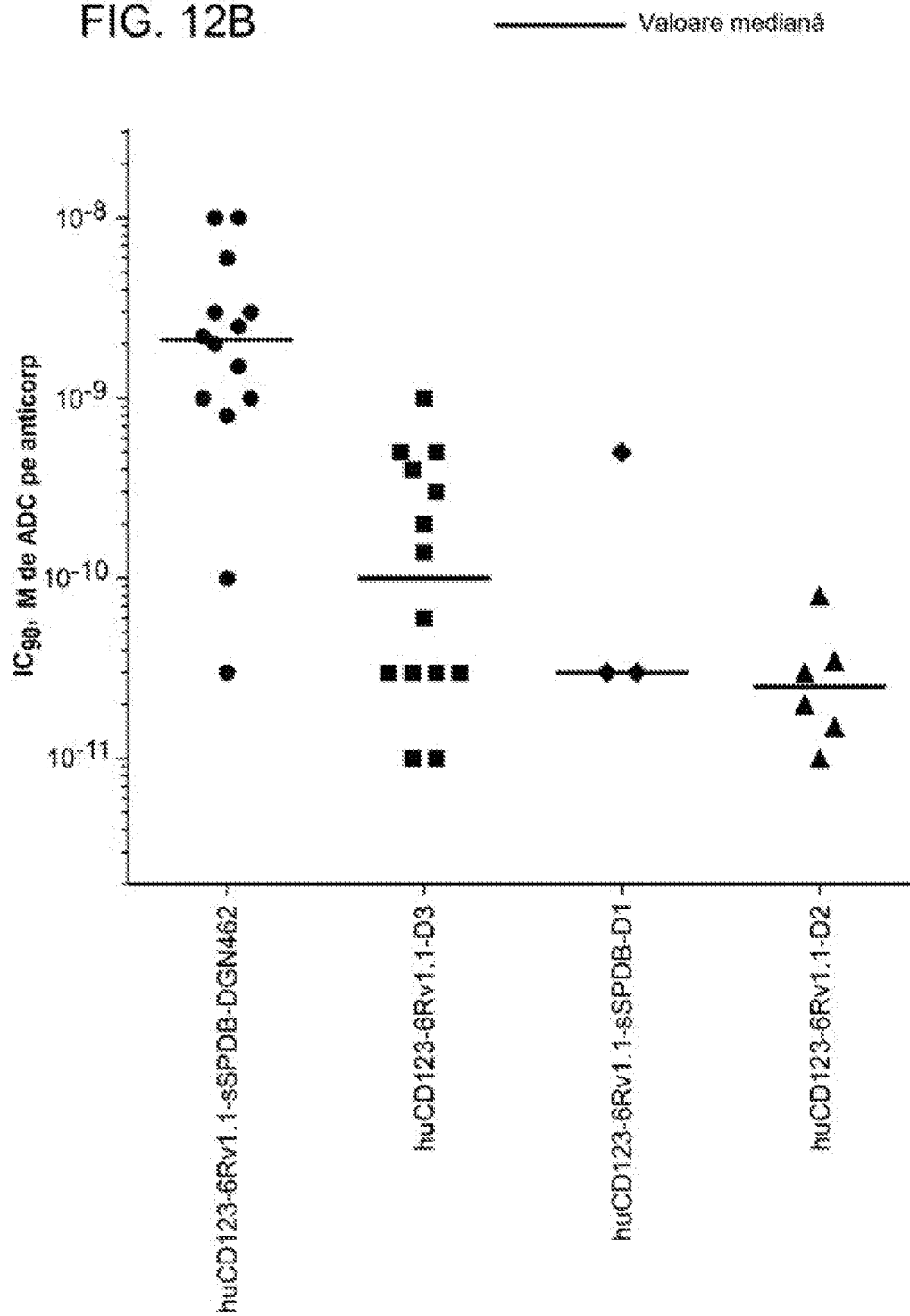


FIG. 13A

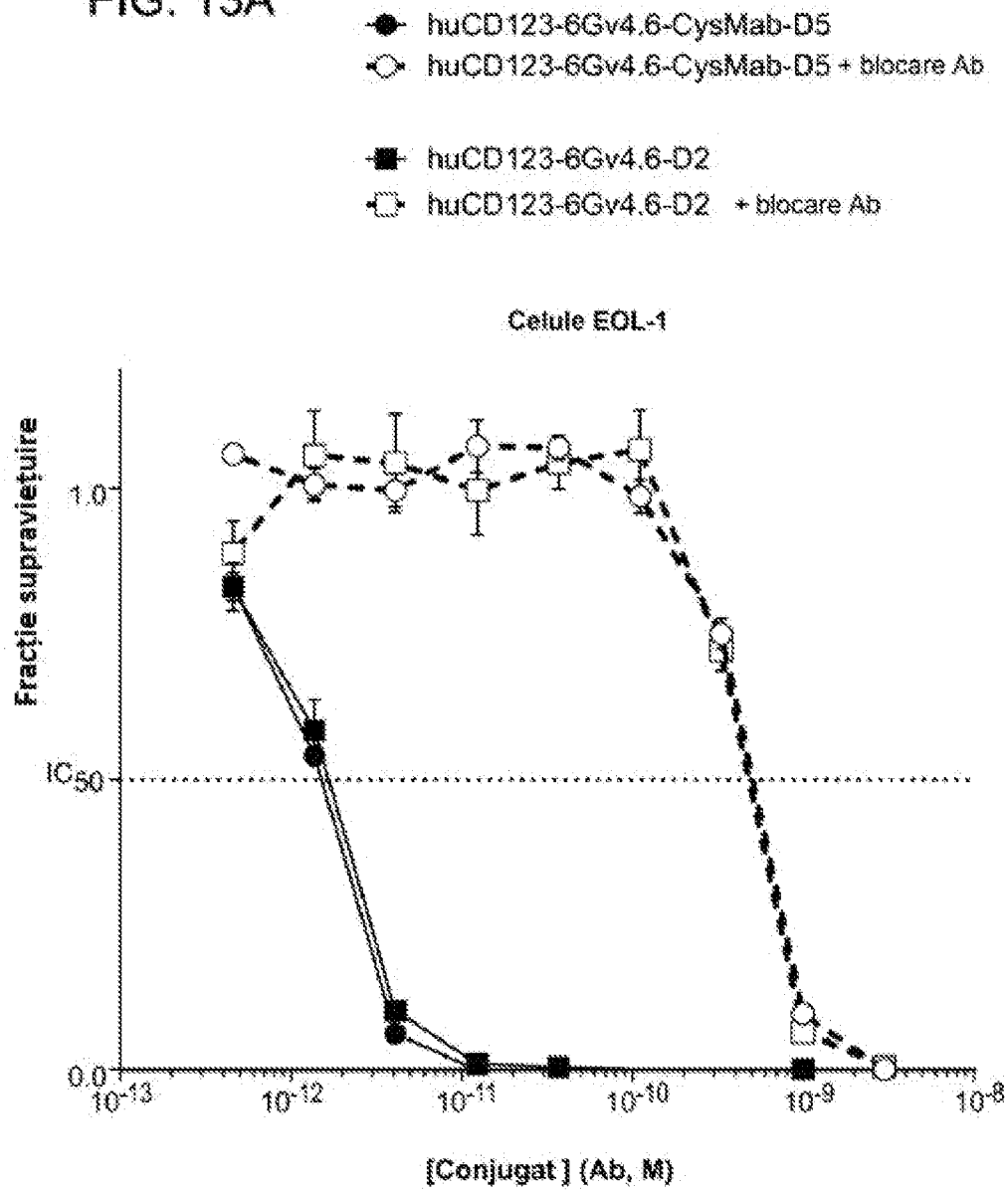


FIG. 13B

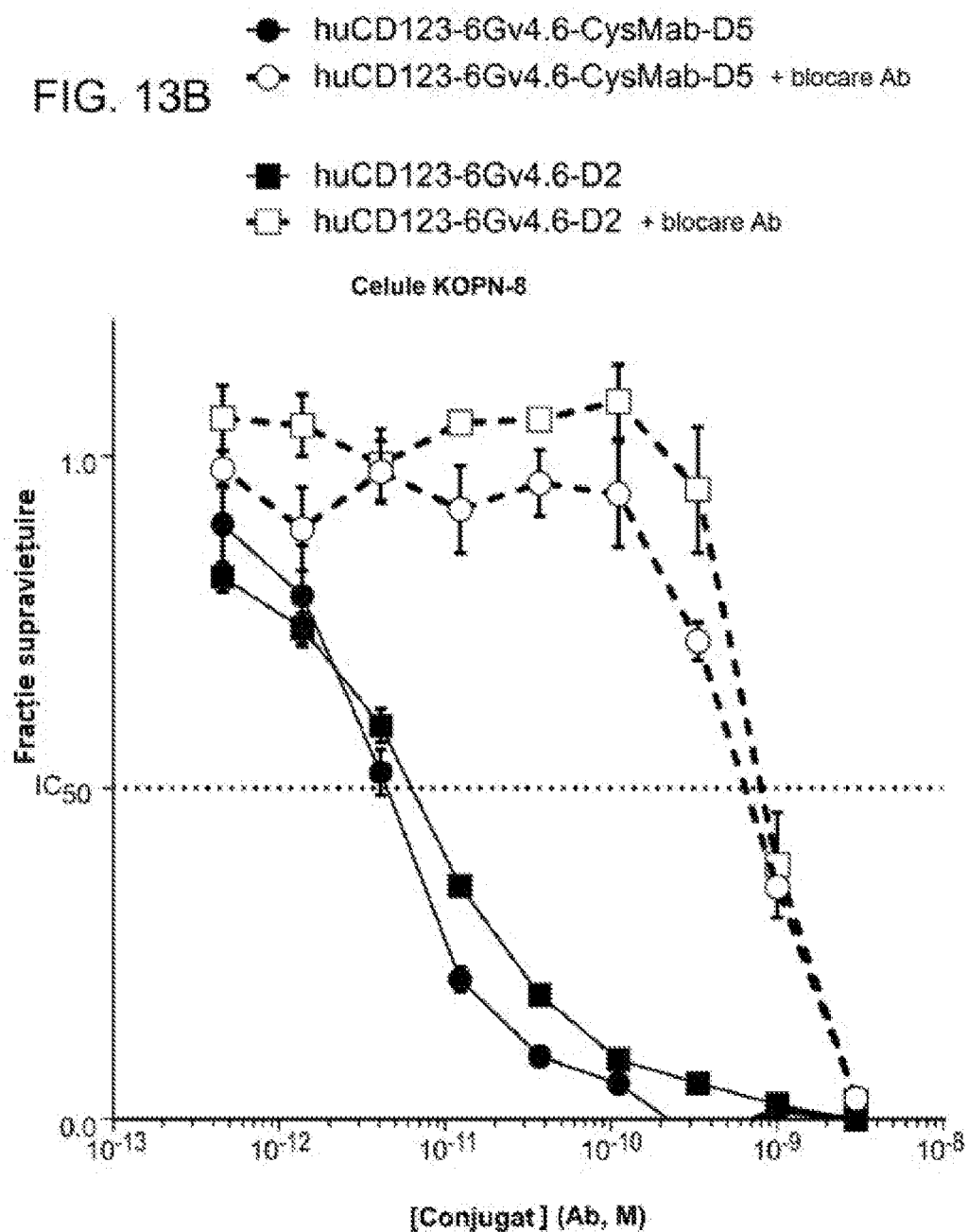


FIG. 13C

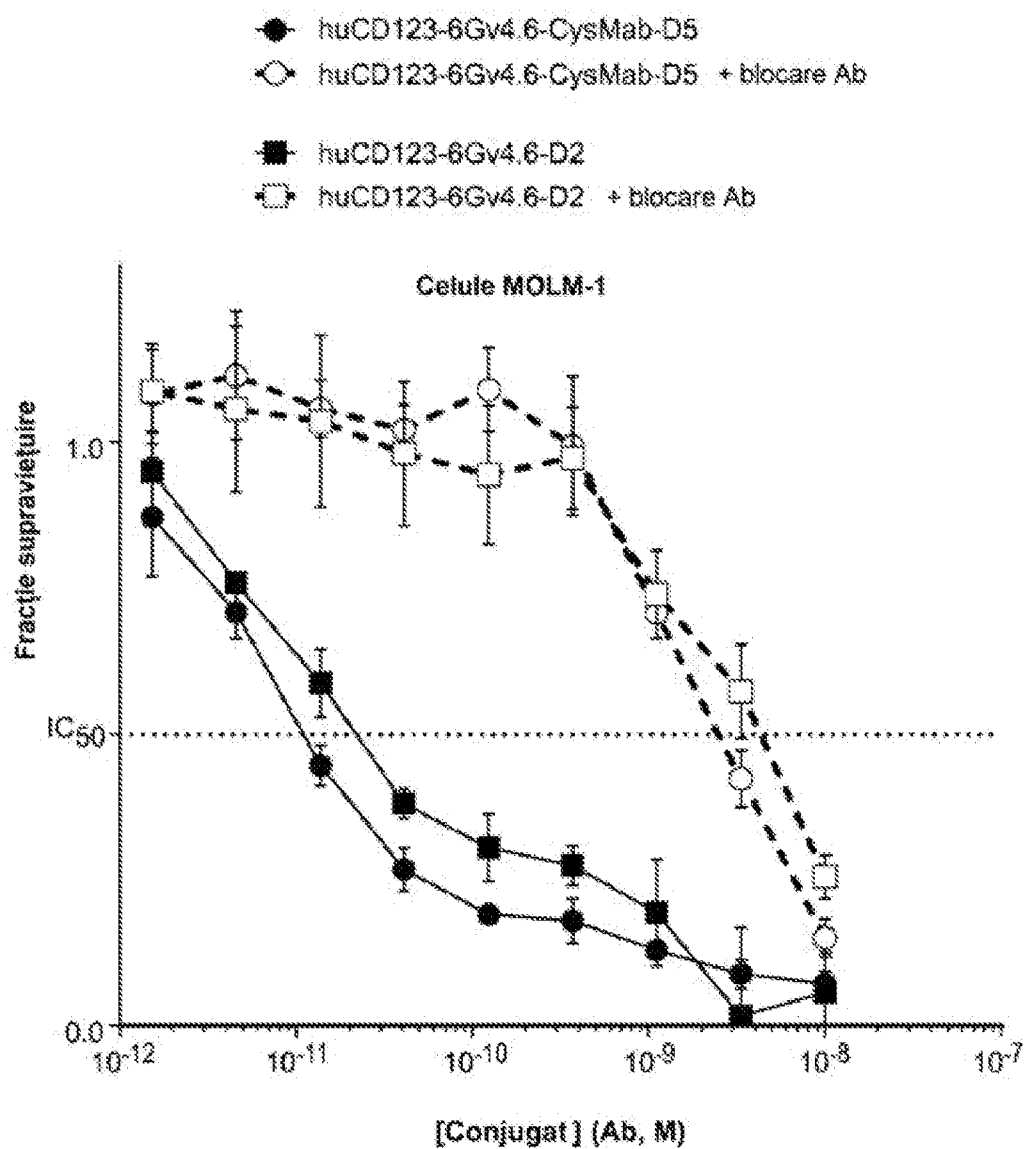


FIG. 14A

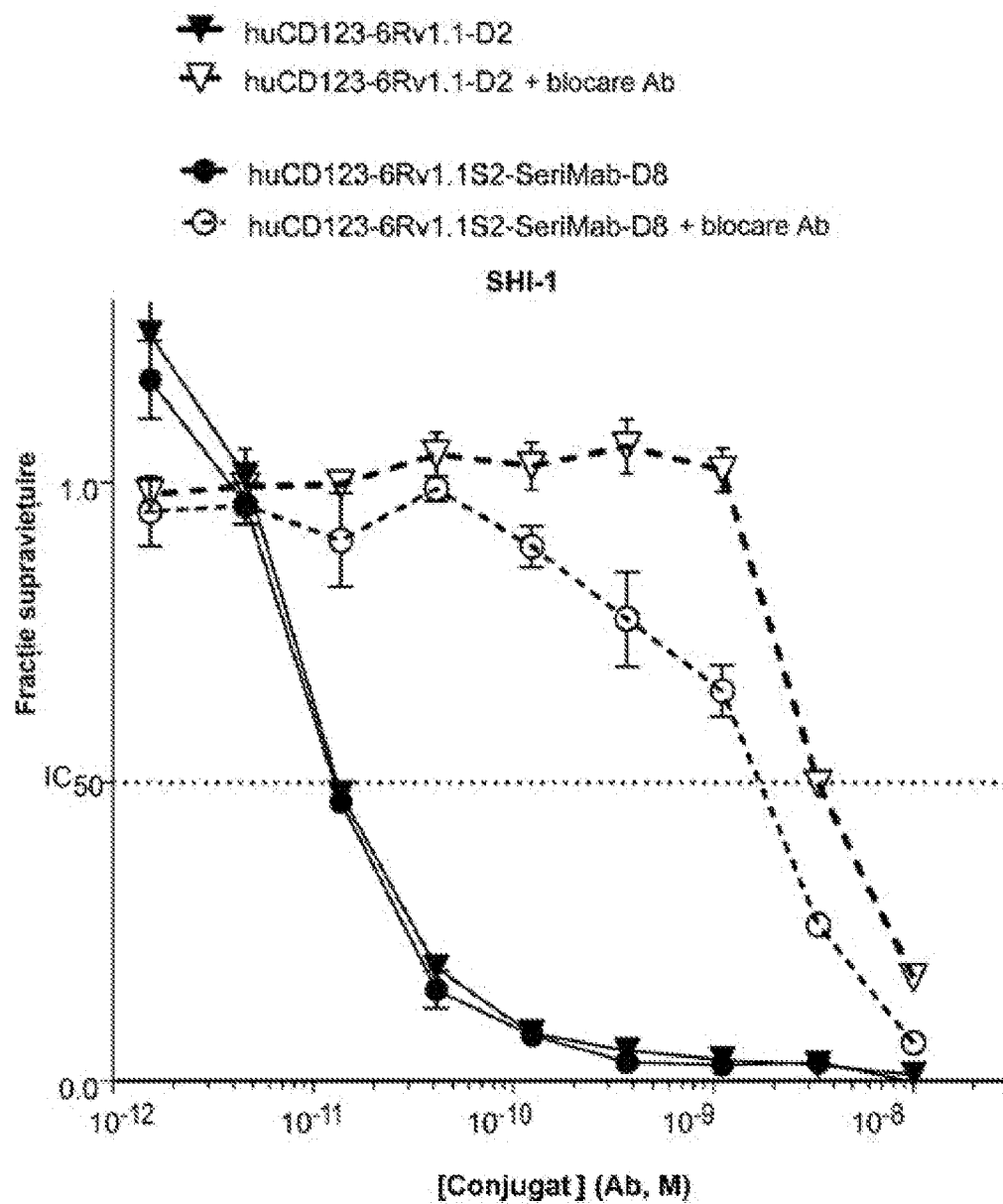


FIG. 14B

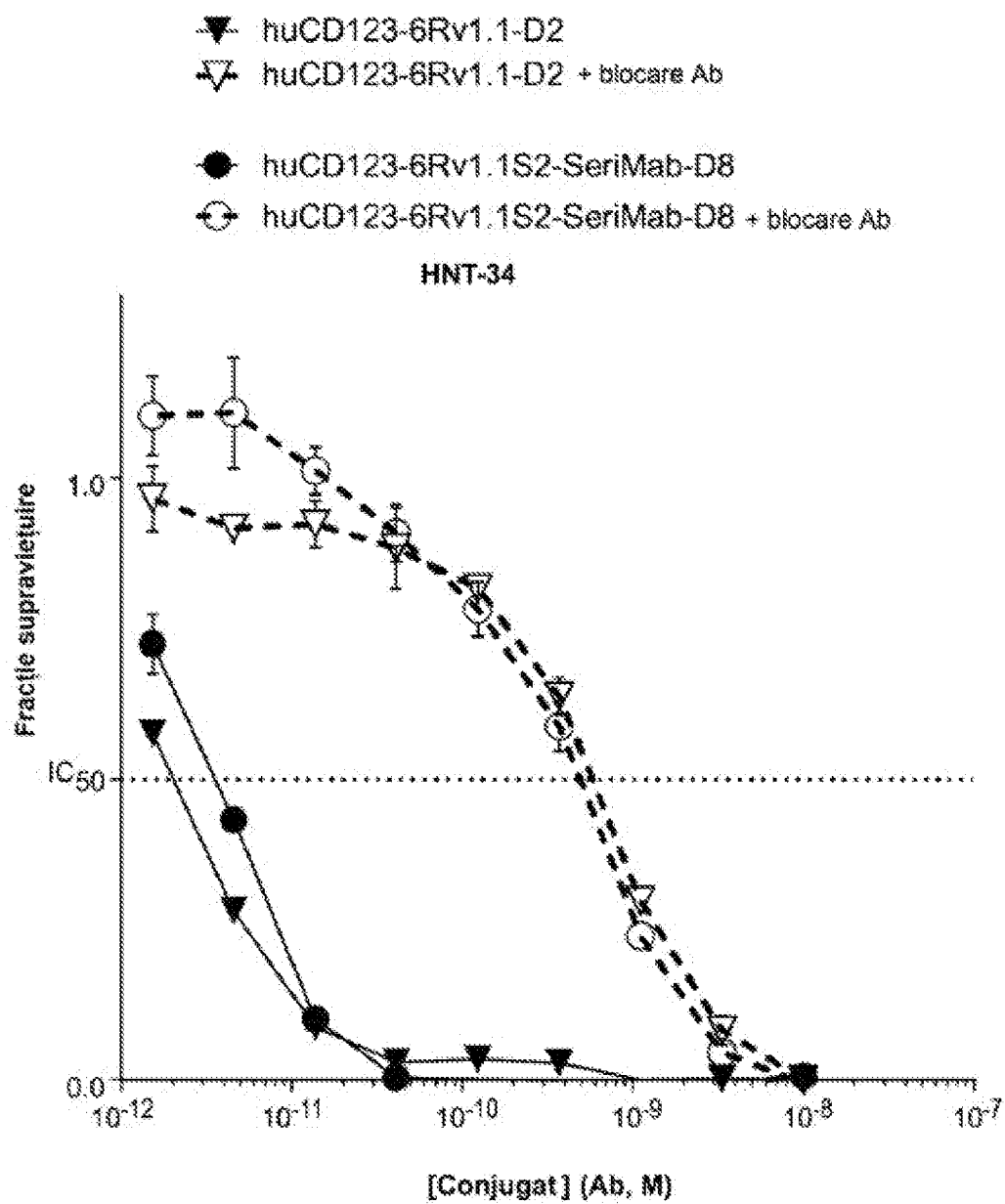
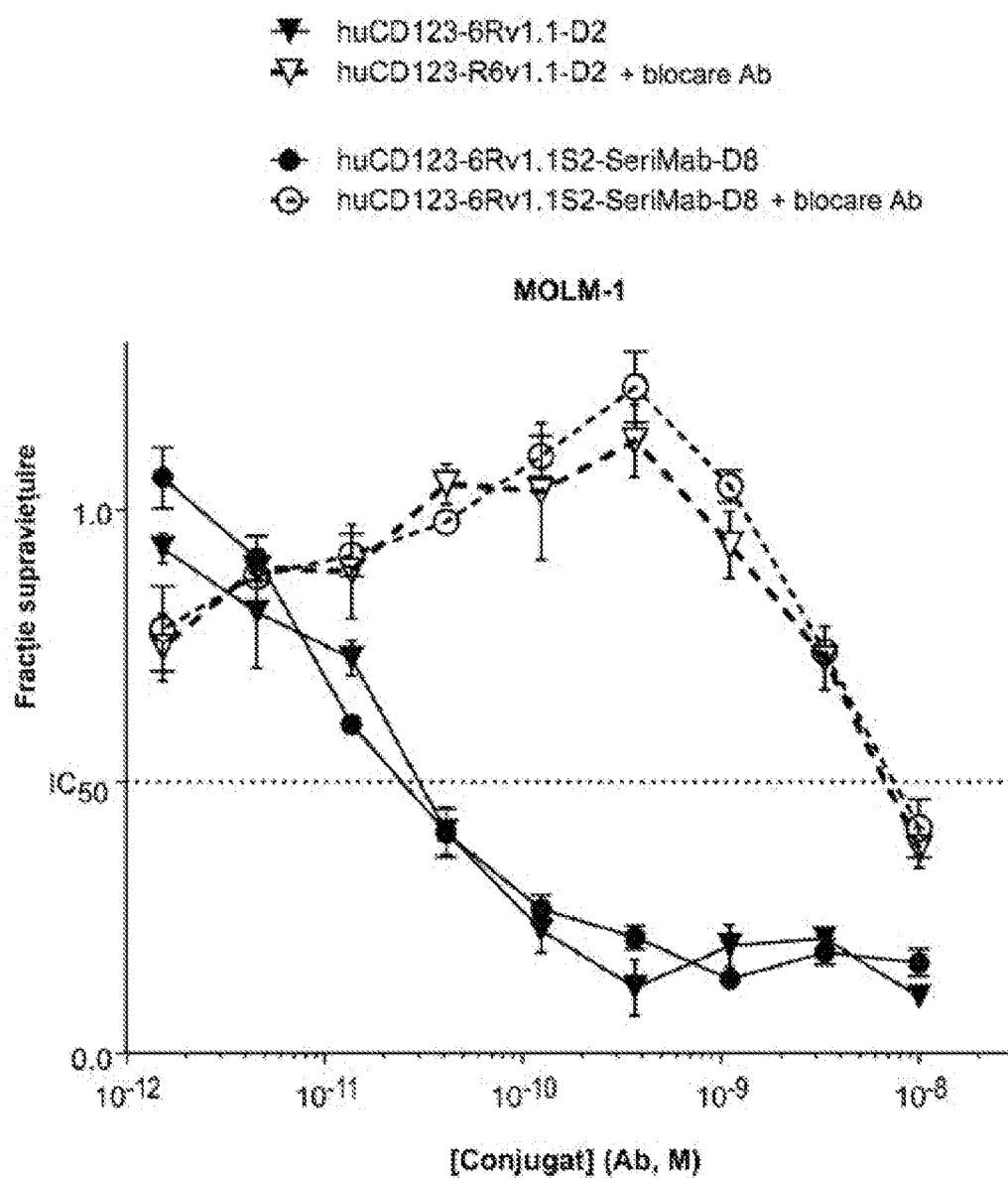
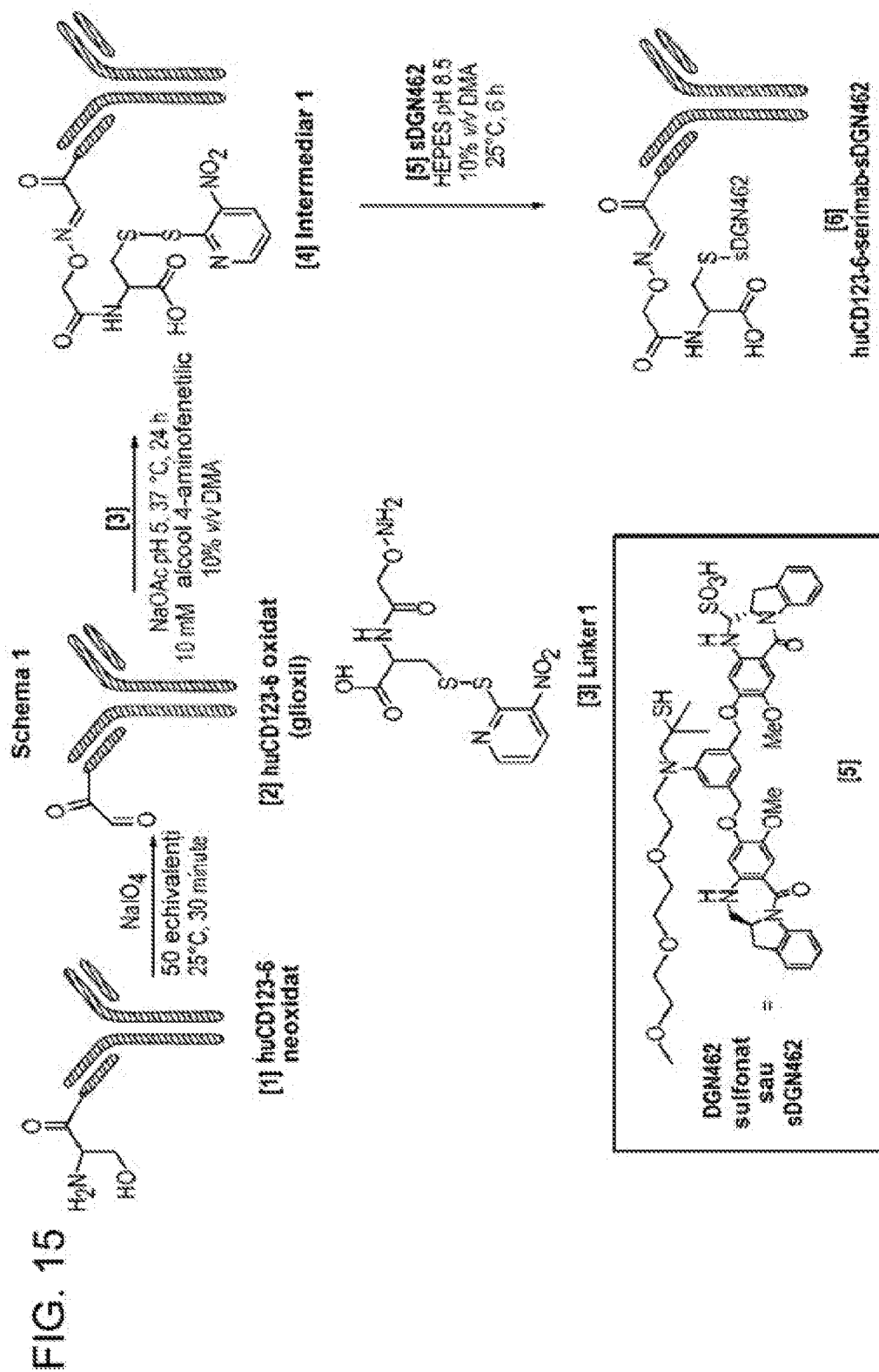
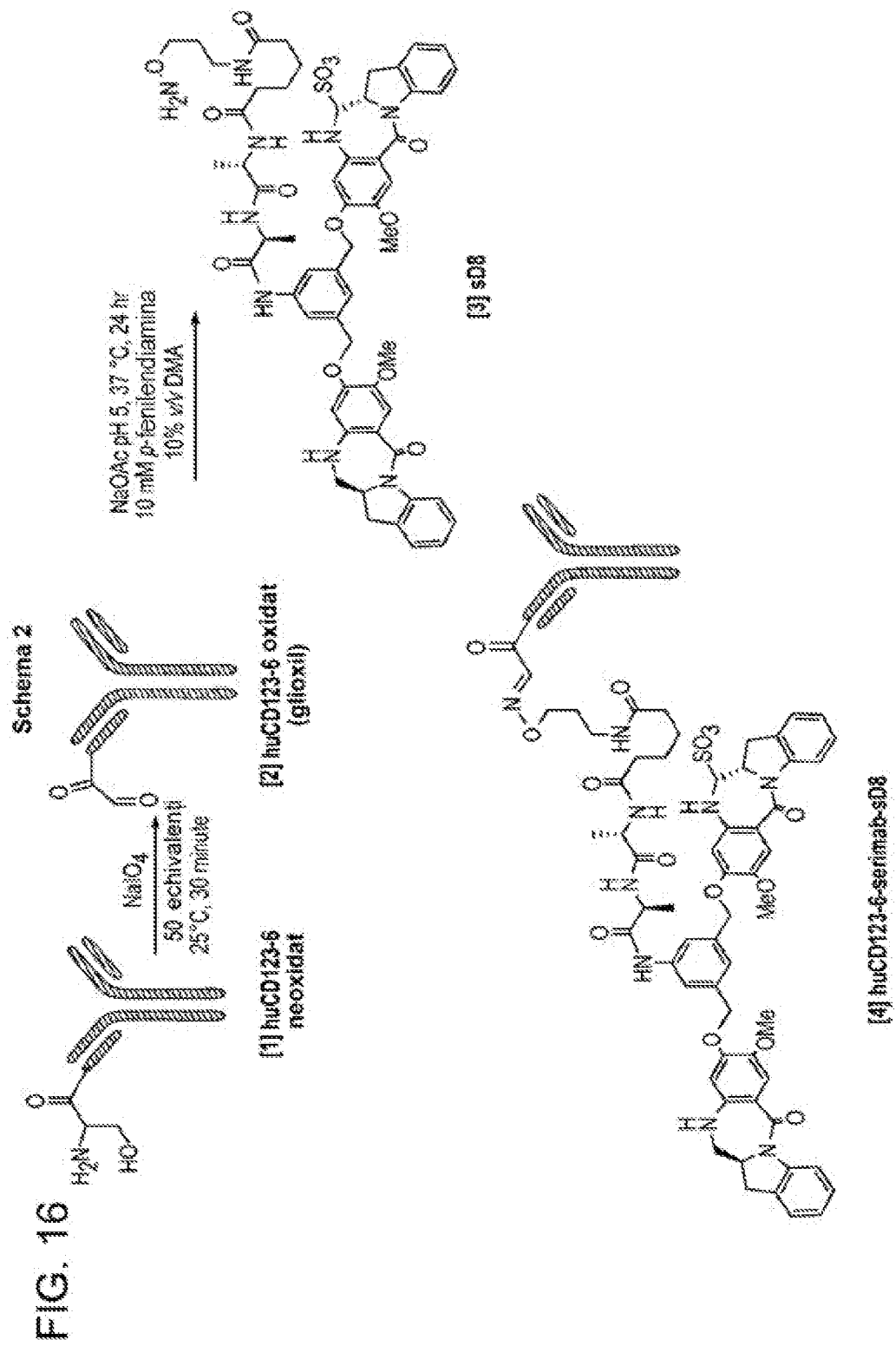


FIG. 14C







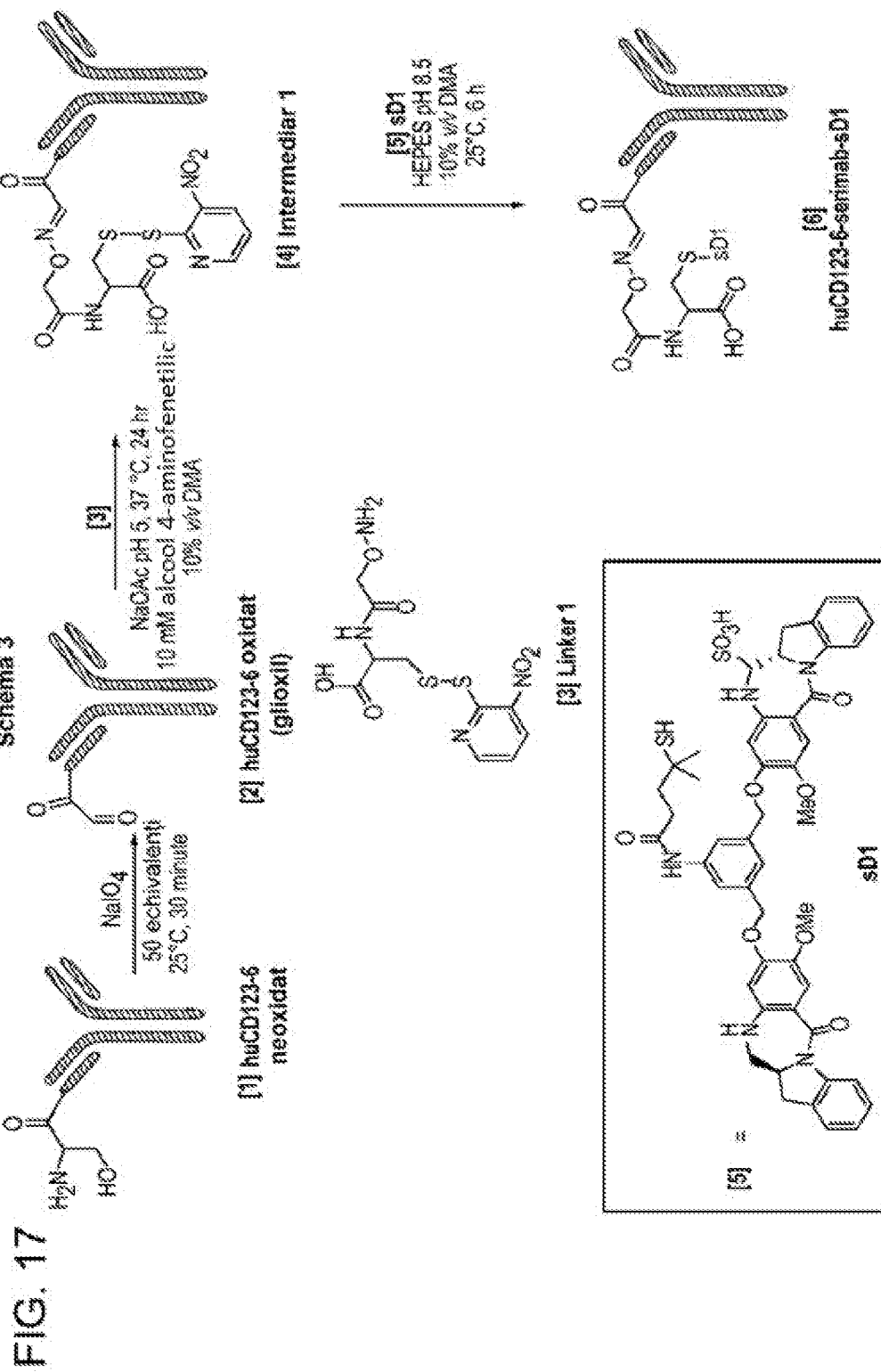


FIG. 18

Stare tratament	Stare MDR	CD33 ABC	CD123 ABC
Pretratament	neg	11,391	8,930
Pretratament	NT	4,320	2,000
Pretratament	poz	740	3,800
Pretratament	poz	3,500	4,200
Pretratament	neg	1,000	4,600
Pretratament	neg	6,111	1,360
Pretratament	poz	700	1,000
Pretratament	neg	10,500	2,600
Pretratament	poz	20,820	2,174
Pretratament	neg	10,513	16,118
Pretratament	poz	640	3,400
F Refractor	poz	600	1,400
Recidivat	neg	28,907	6,793
Recidivat/Refractor	poz	28,782	2,252
Recidivat/Refractor	poz	9,268	11,132
Median		6,111	3,400

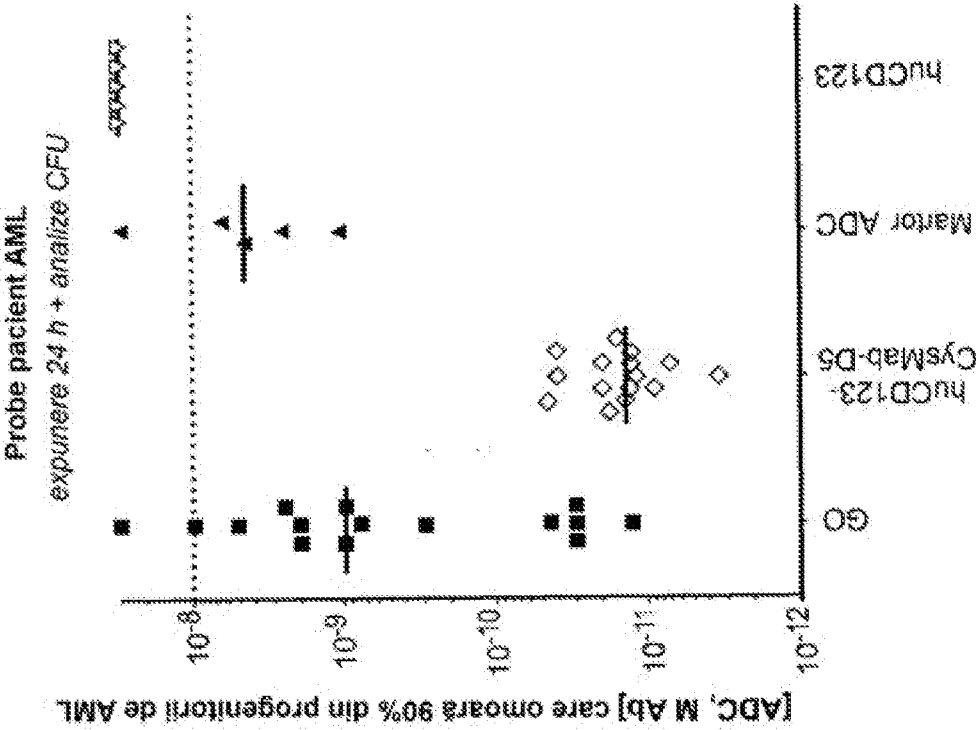
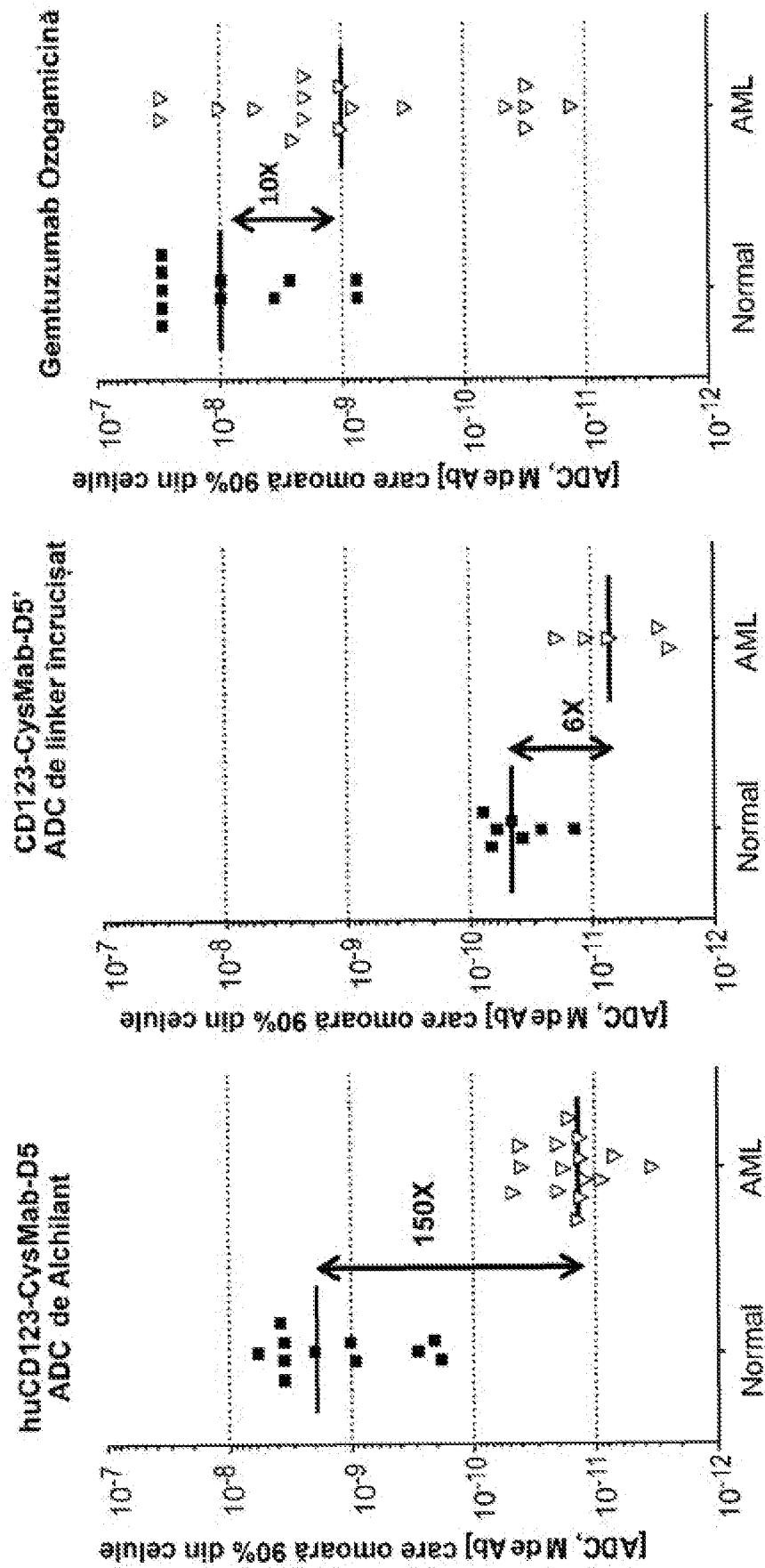
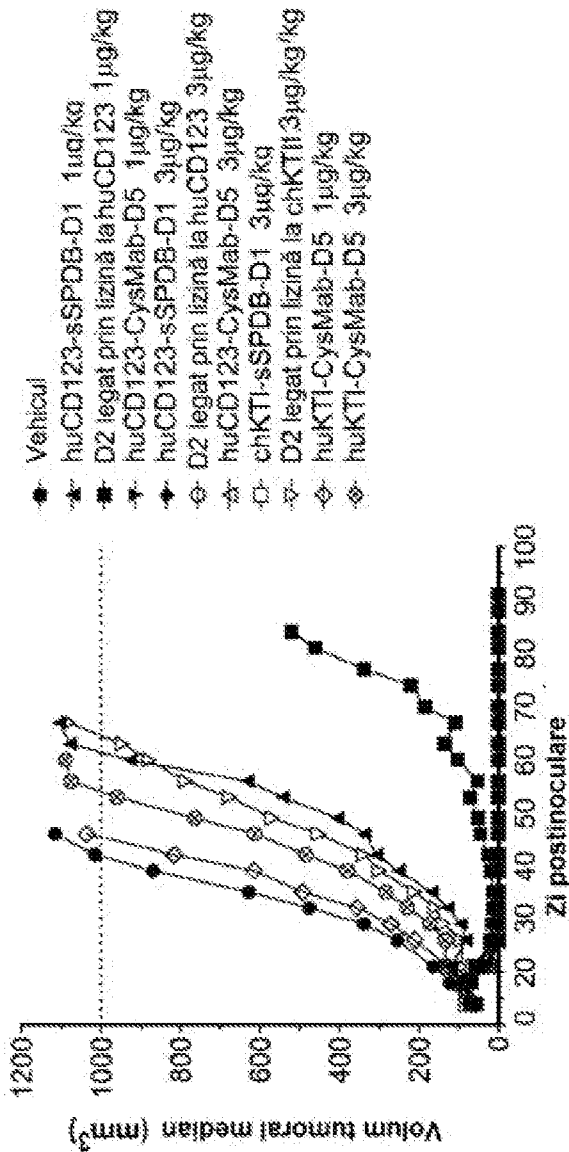


FIG. 19





Grup de tratament	T/C	PR	CR
Vehicul	-	0/6	0/6
huCD123-sSPDB-D1 (1 µg/kg)	30%	0/6	0/6
D2 legat prin lizina la huCD123 (1 µg/kg)	3%	4/6	3/6
huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)	0%	6/6	5/6
huCD123-sSPDB-D1 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
D2 legat prin lizina la huCD123 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
chKTI-sSPDB-D1 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
D2 legat prin lizina la chKTI (3 µg/kg)	34%	1/6	1/6
huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)	80%	0/6	0/6
huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)	48%	1/6	1/6

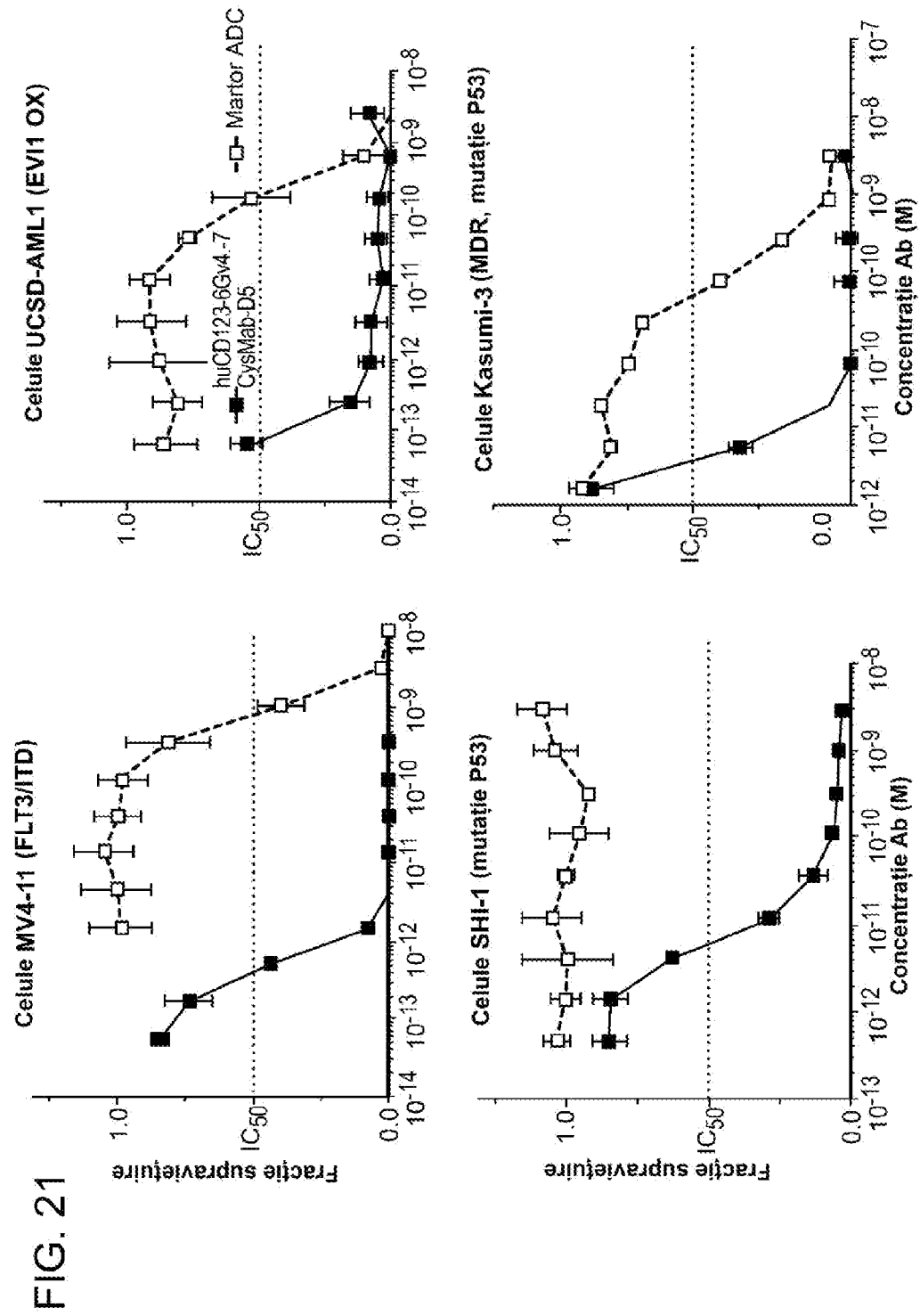


FIG. 22

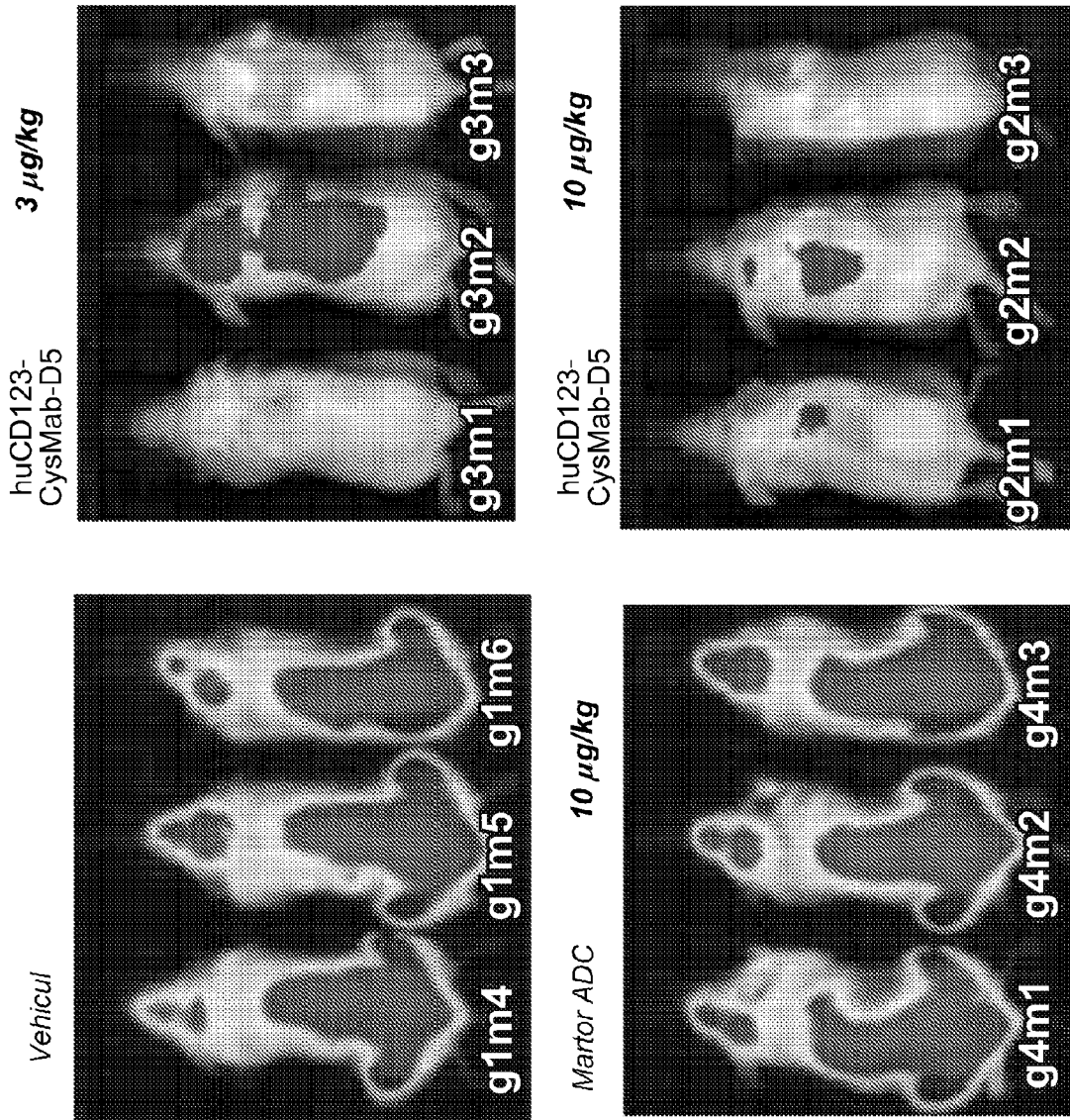


FIG. 23

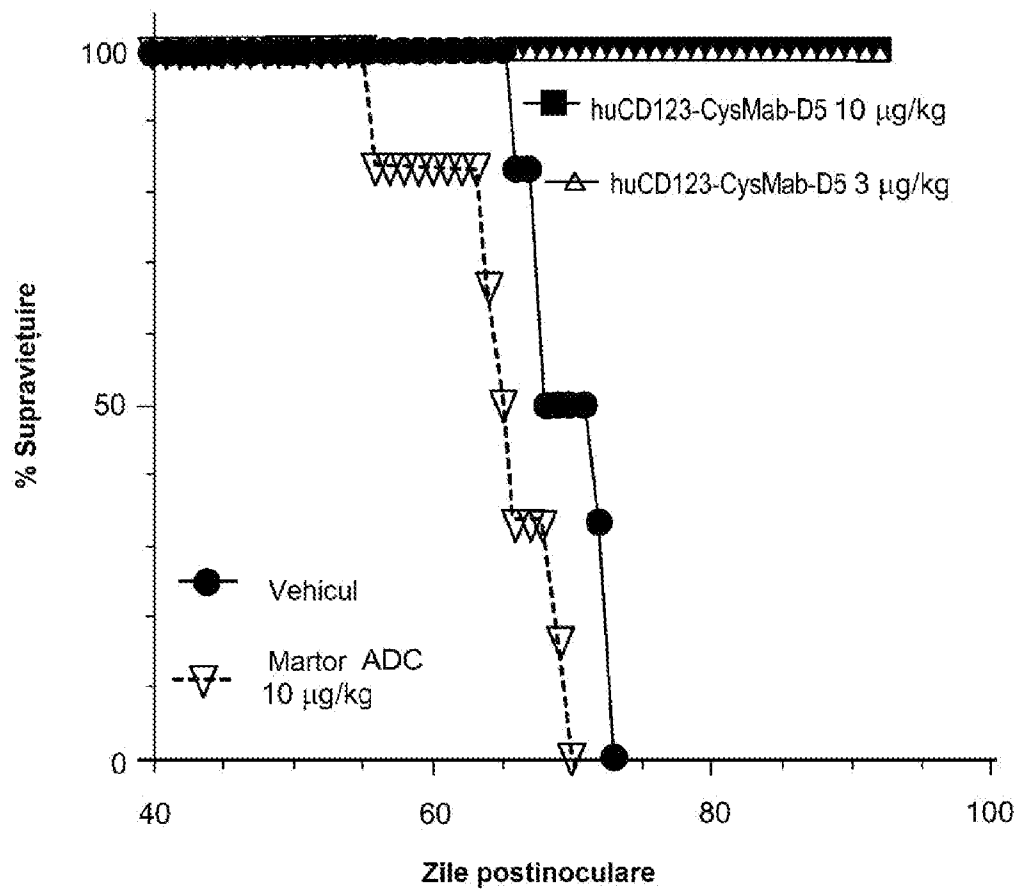
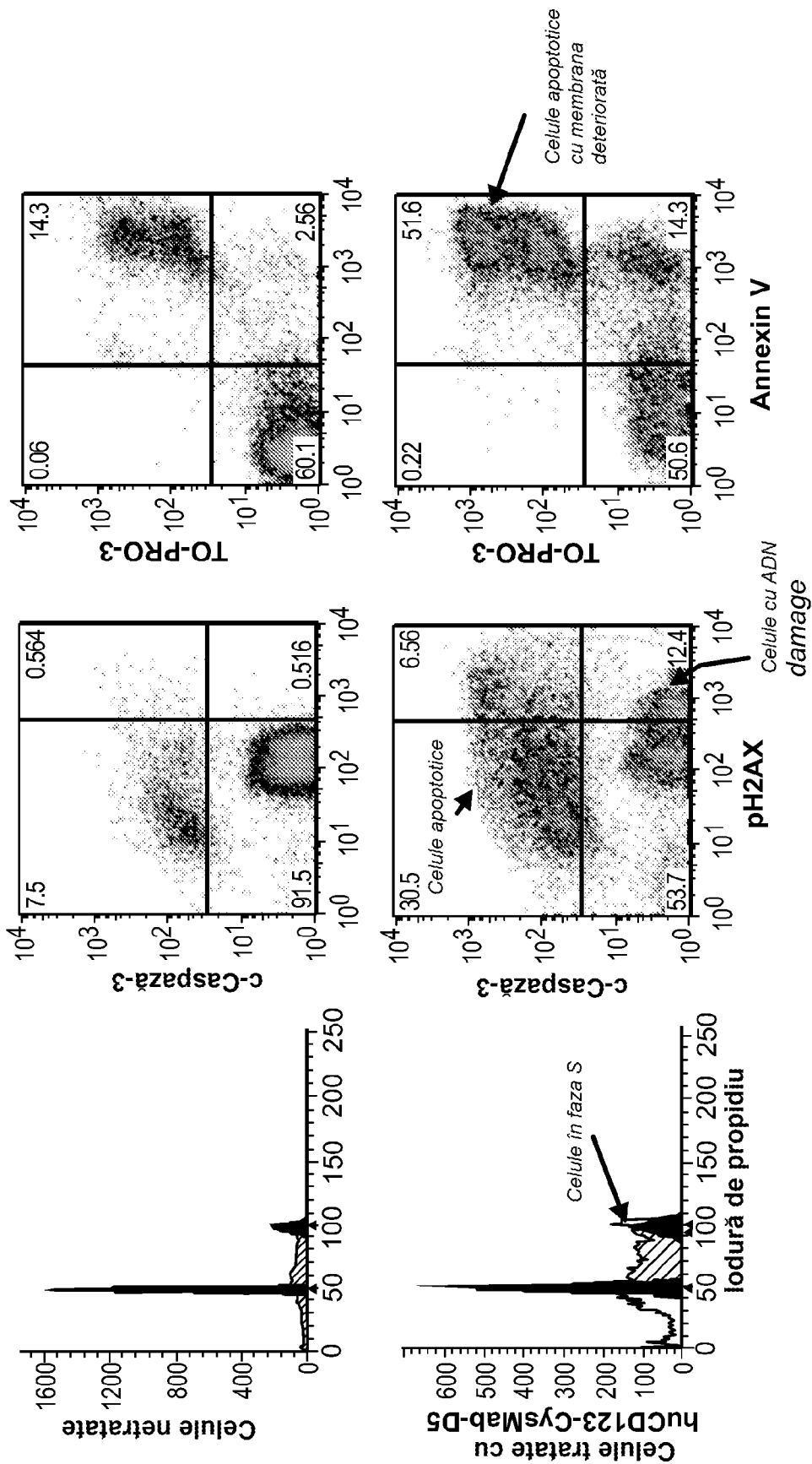
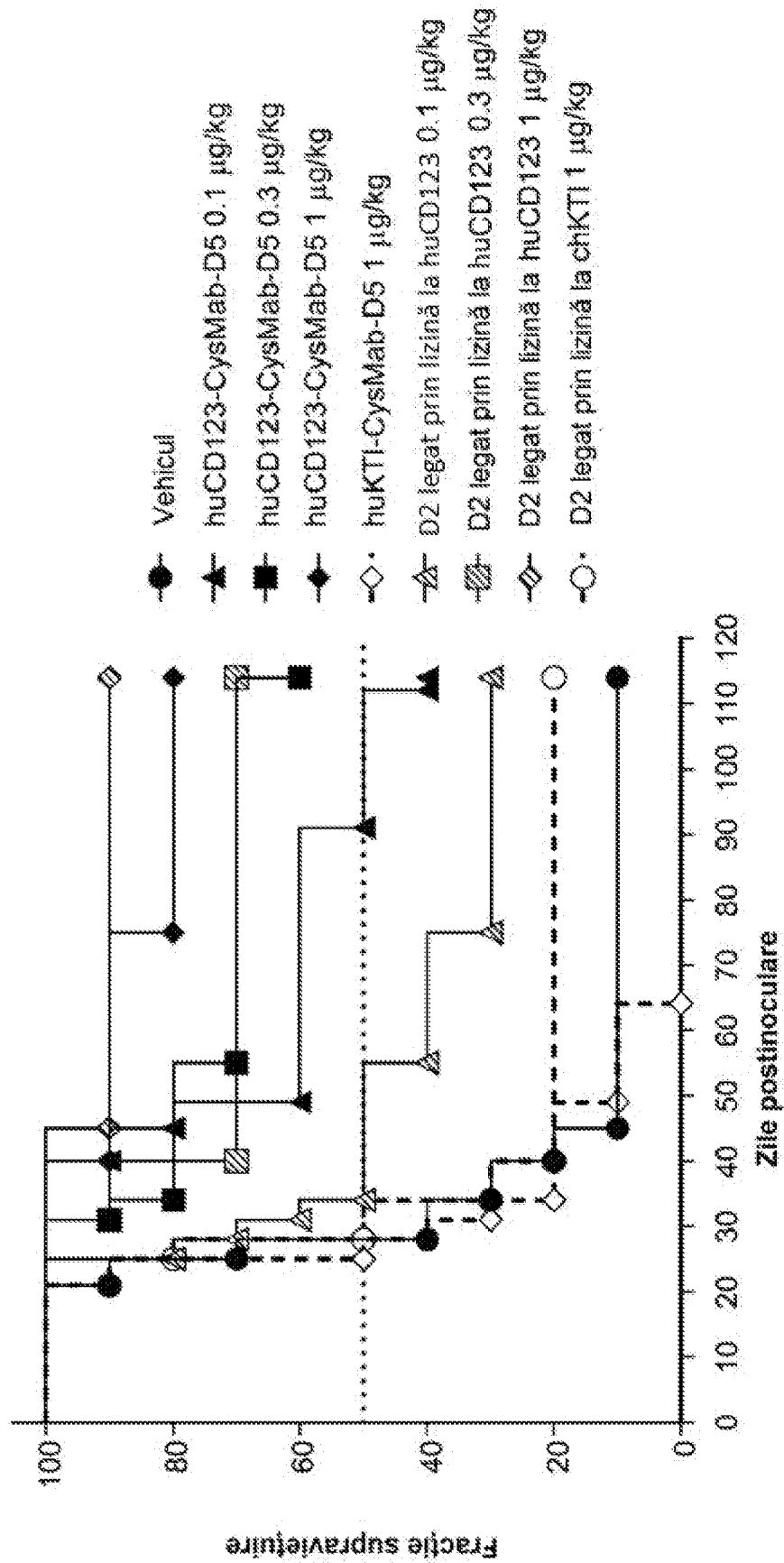


FIG. 24



Fractie supraieșire



Legend:

- Vehicul
- ▲ huCD123-CysMab-D5 1 µg/kg
- ▼ huCD123-CysMab-D5 3 µg/kg
- ◆ D2 legat prin lizină la huCD123 1 µg/kg
- D2 legat prin lizină la huCD123 3 µg/kg
- △ huKTI-CysMab-D5 1 µg/kg
- ▽ huKTI-CysMab-D5 3 µg/kg
- ◇ D2 legat prin lizină la hKTI 1 µg/kg
- D2 legat prin lizină la hKTI 3 µg/kg

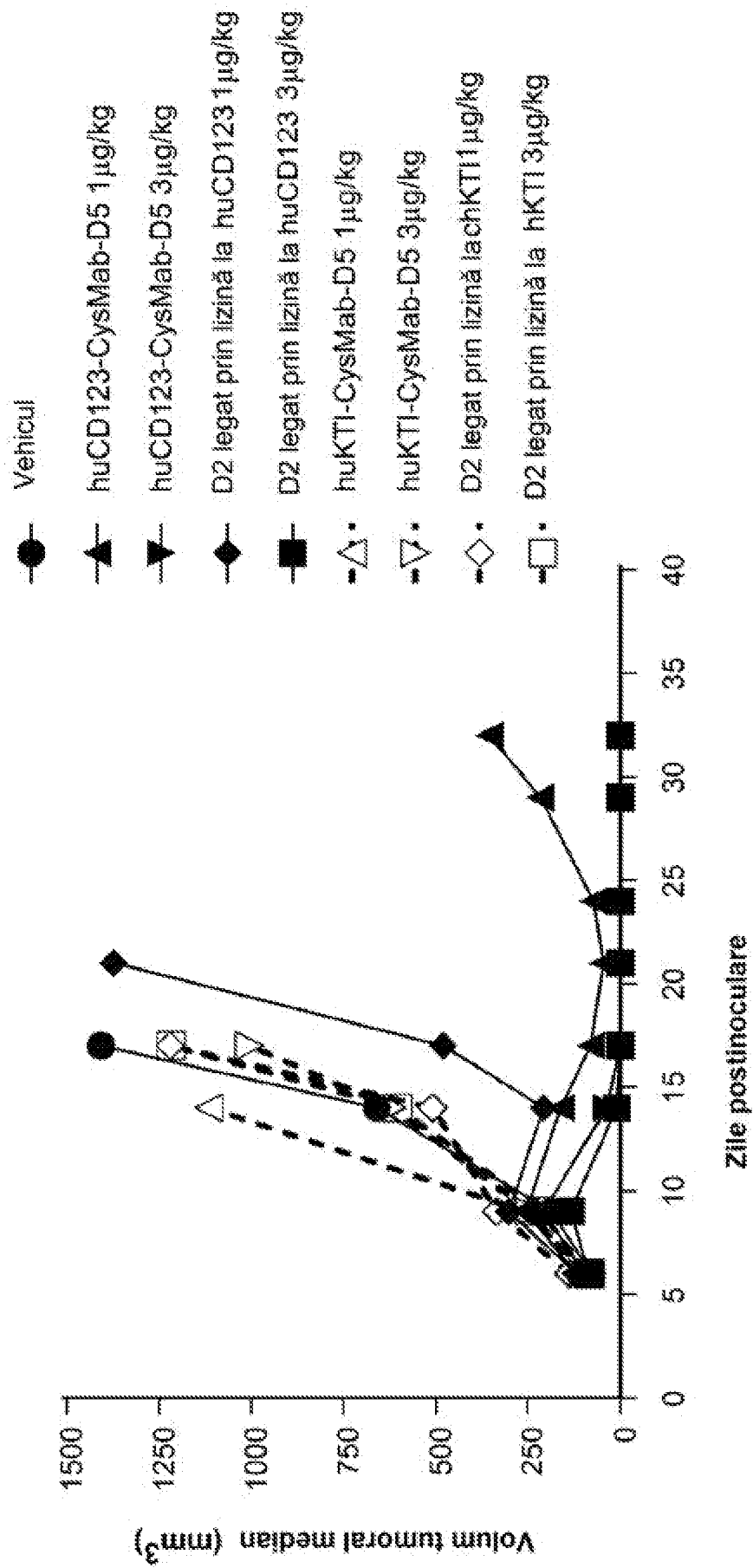
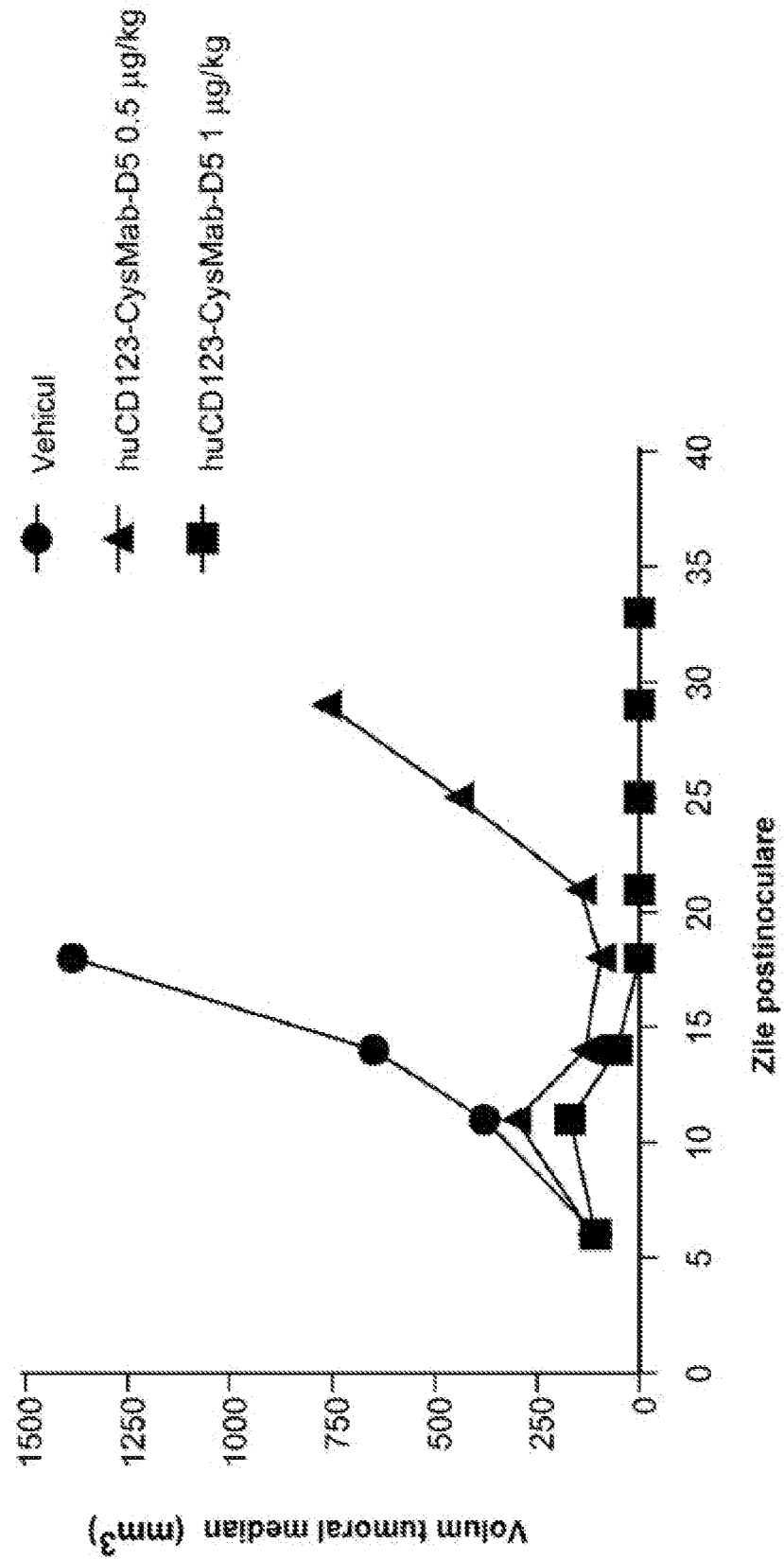
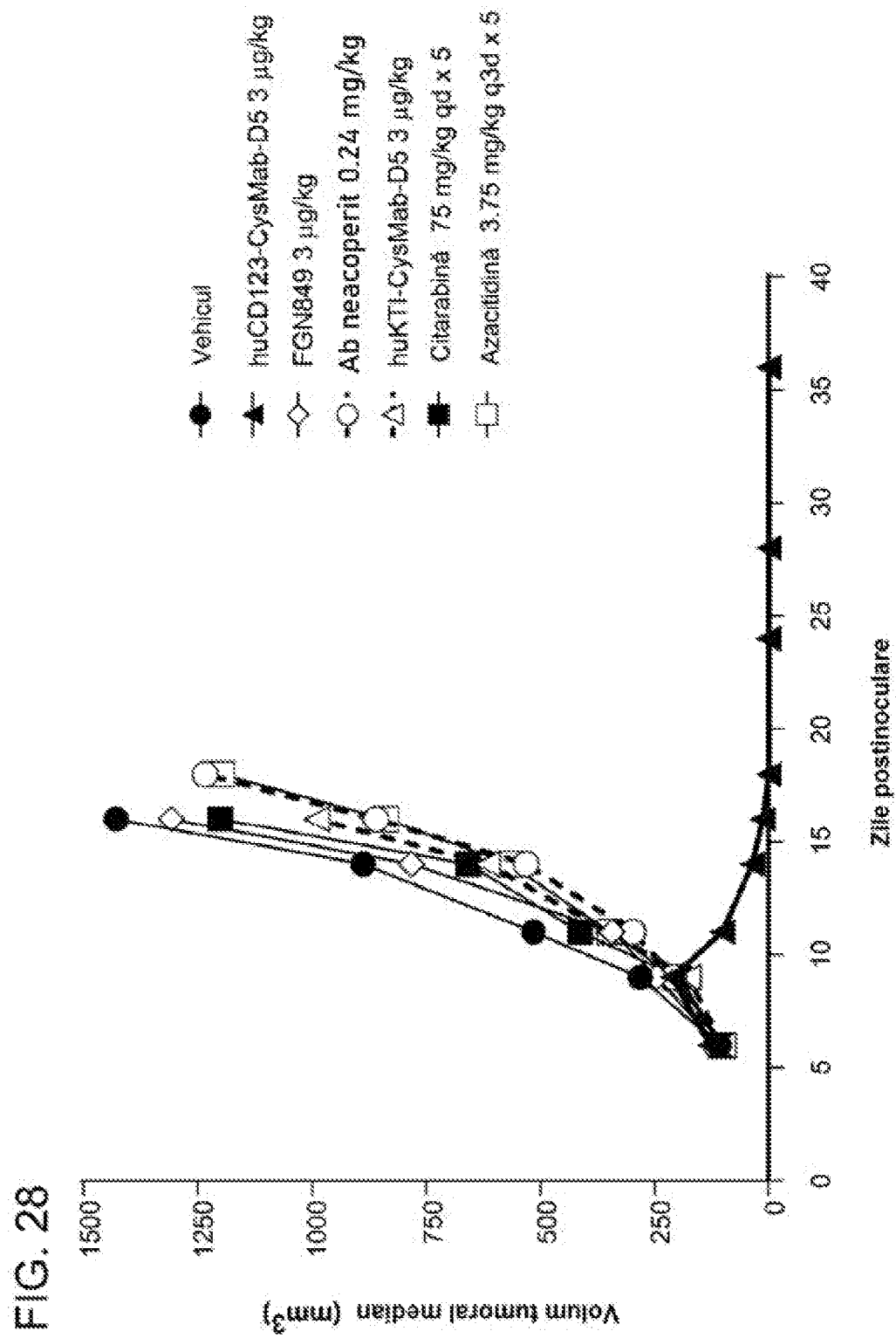


FIG. 27





Vehicle	huCD123-CysMab-D5 1 µg/kg	huCD123-CysMab-D5 3 µg/kg	huCD123-SeriMab-sD1 1 µg/kg	huCD123-SeriMab-sD1 3 µg/kg	huKTI-CysMab-D5 1 µg/kg	huKTI-CysMab-D5 3 µg/kg	chKTI-SeriMab-sD1 1 µg/kg	chKTI-SeriMab-sD1 3 µg/kg
●	■	▲	▼	◆	□	△	▽	◇

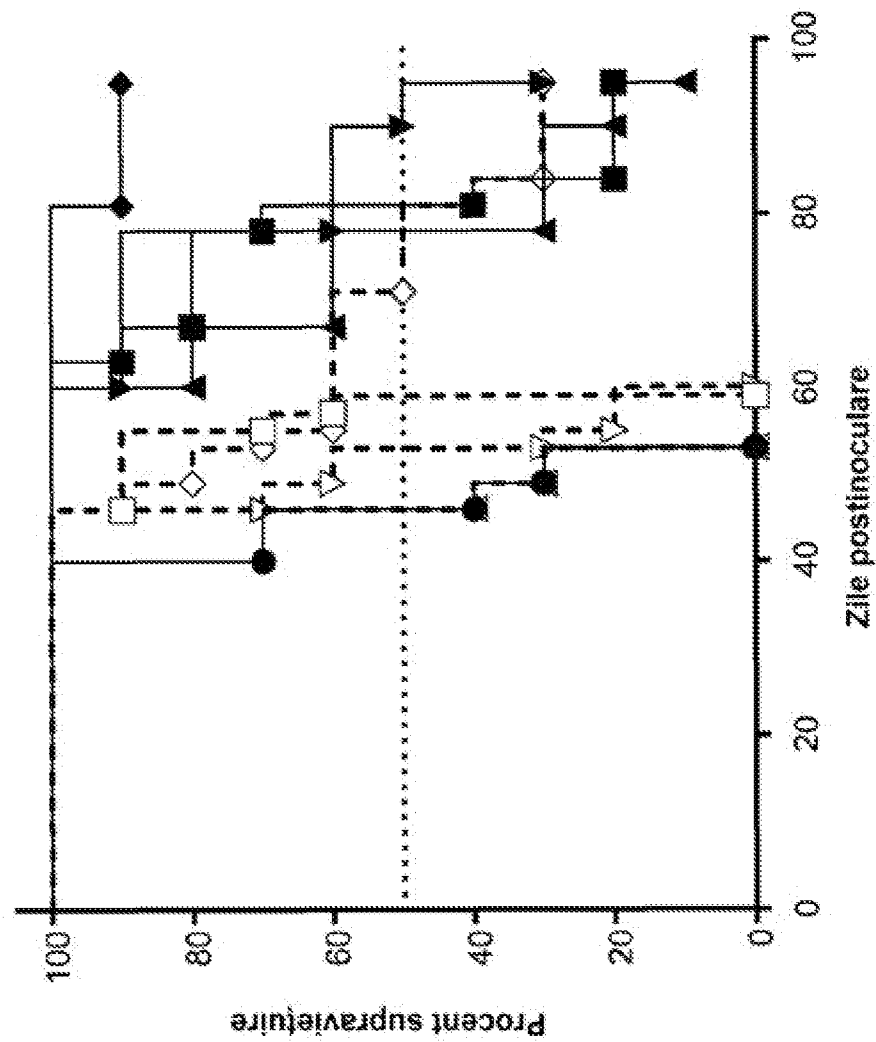


FIG. 30

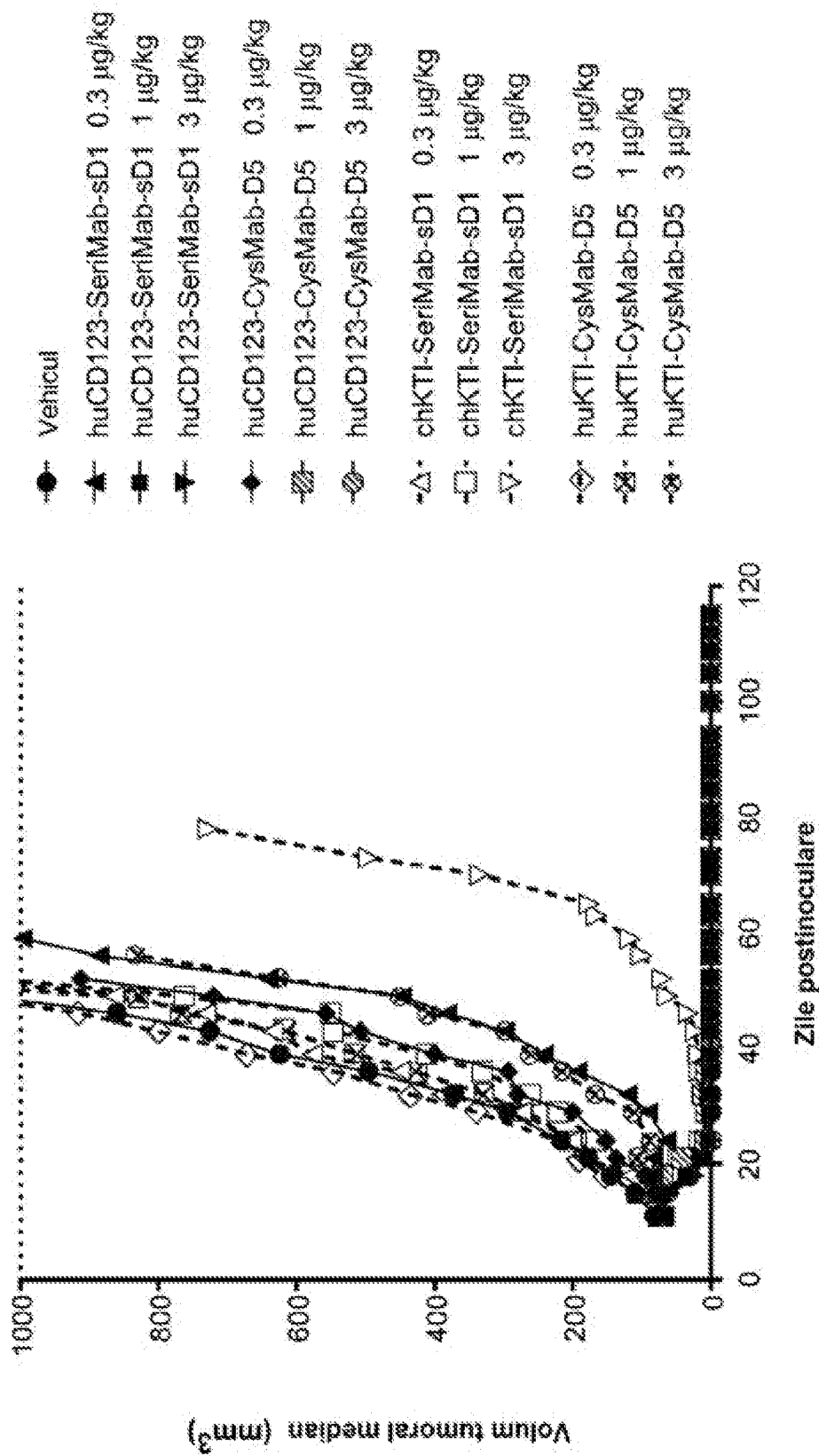


FIG. 31

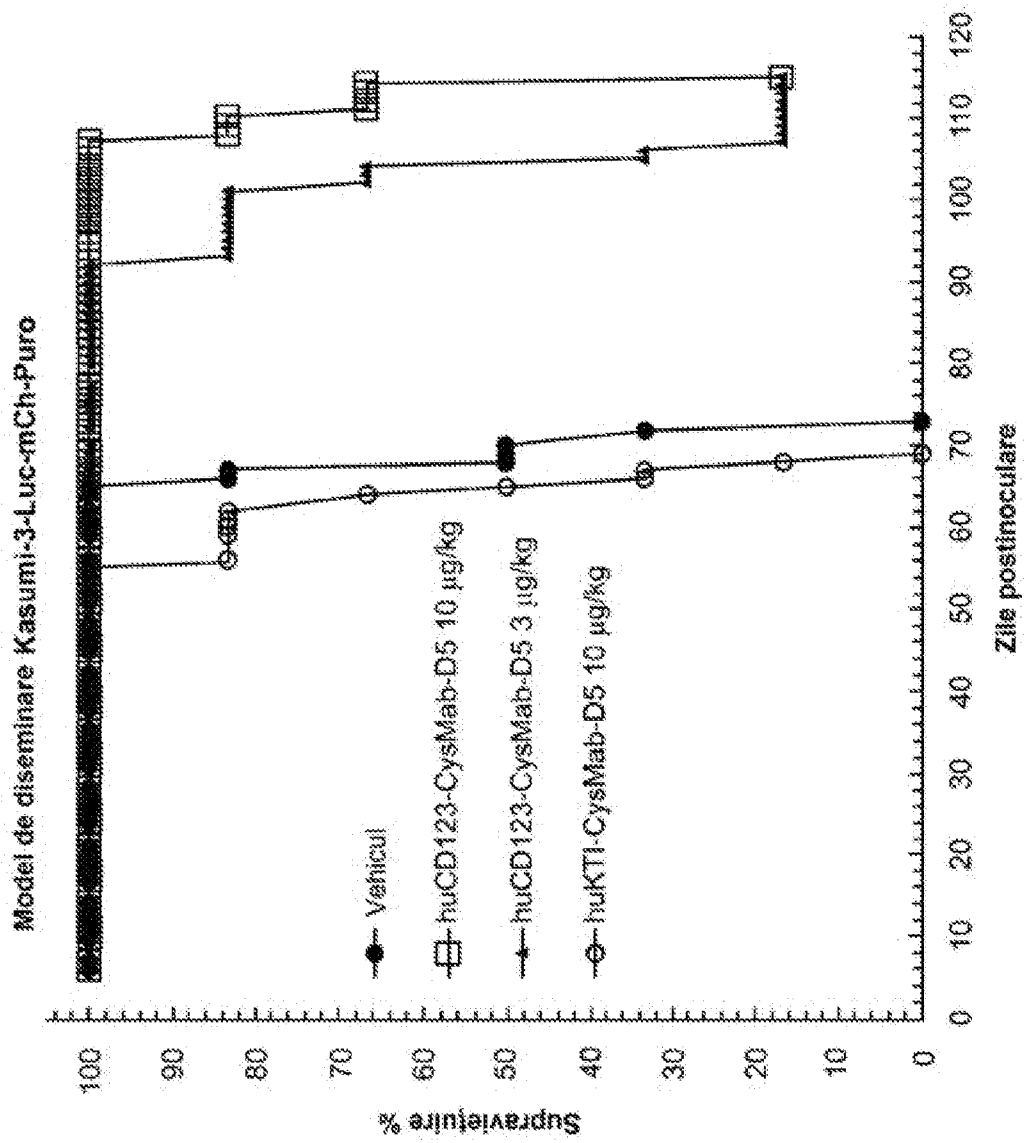


FIG. 32

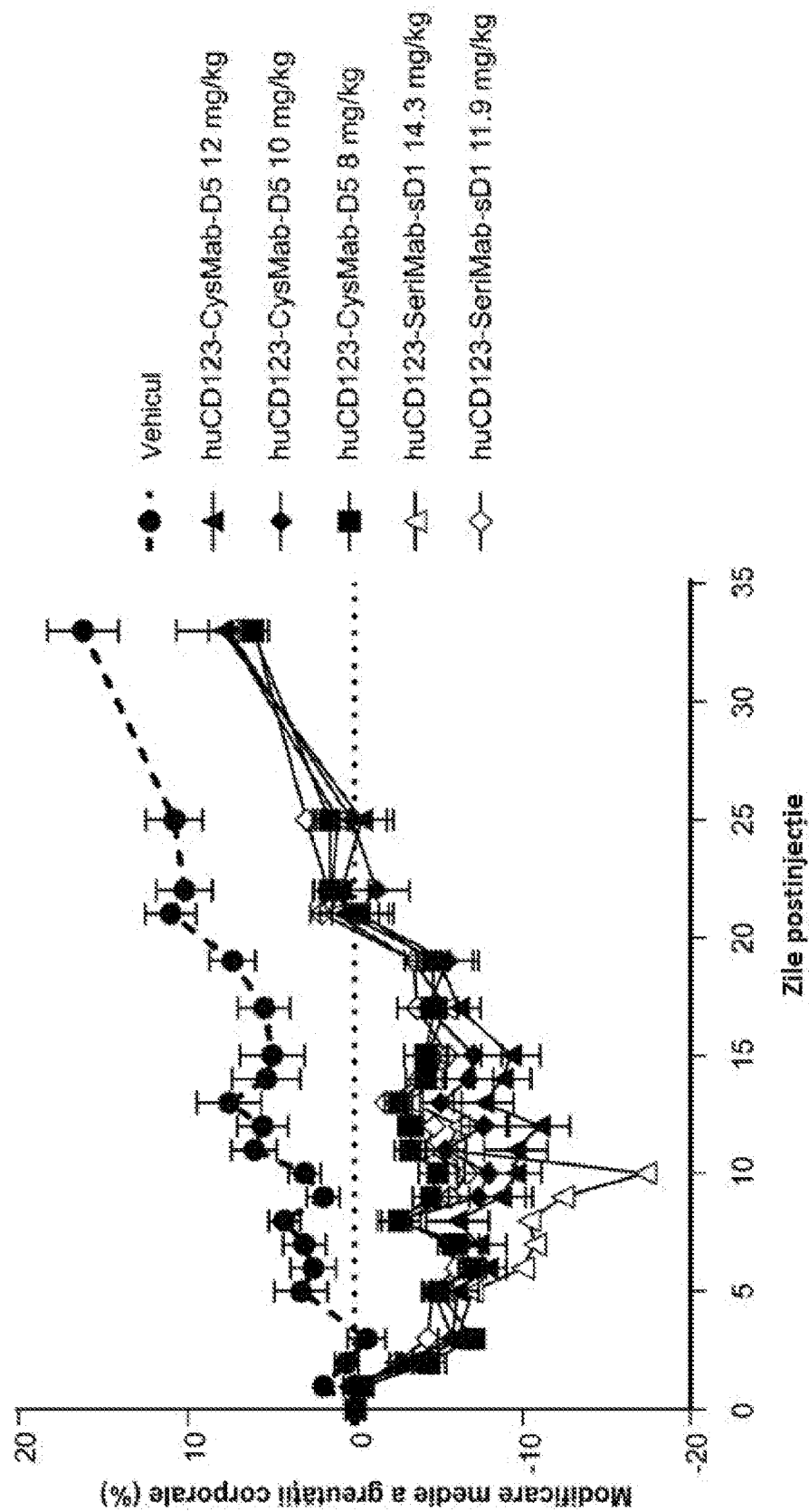


FIG. 33

