



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126813** (13) **C2**  
(51) МПК (2023.01)

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)  
A61P 35/00  
**A61K 31/202** (2006.01)  
**A61K 31/4741** (2006.01)  
**A61K 31/551** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61K 39/00**  
**C12N 15/62** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

|                                                                                               |                                  |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Номер заявки:                                                                            | а 2020 00974                     | (72) Винахідник(и):                                   | Кіннір Кріста (US),<br>Варкі Ріна (US),<br>Сяо Сяодун (US),<br>Герт Елейн М. (US),<br>Тайс Дейвід (US)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (22) Дата подання заявки:                                                                     | 31.07.2018                       | (73) Володілець (володільці):                         | МЕДІММ'ЮН, ЛЛК,<br>One Medimmune Way, Gaithersburg, Maryland<br>20878, United States of America (US)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| (24) Дата, з якої є чинними<br>права інтелектуальної<br>власності:                            | 09.02.2023                       | (74) Представник:                                     | Кукшина Тетяна Архипівна, реєстр. №88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| (31) Номер попередньої<br>заявки відповідно до<br>Паризької конвенції:                        | 62/539,825,<br>62/596,194        | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 2016166629 A1, 20.10.2016<br>WO 2014089335 A2, 12.06.2014<br>WO 2012163805 A2, 06.12.2012<br>WO 2010104949 A1, 16.09.2010<br>Ryan Maureen C et al, Antibody targeting of B-cell<br>maturation antigen on malignant plasma cells /<br>Maureen C. Ryan, Michelle Hering, David Peckham,<br>Charlotte F. McDonagh, Lindsay Brown, Kristine M.<br>Kim, Damon L. Meyer, Roger F. Zabinski, Iqbal S.<br>Grewal, and Paul J. Carter // Molecular cancer<br>therapeutics, American association for cancer<br>research. - US. - 01.11.2007. - vol. 6. - no. 11. - P.<br>3009 - 3018<br>Cohen Adam D et al, First in human study with<br>GSK2857916, an Antibody Drug Conjugated to<br>microtubule-disrupting agent directed against B-Cell<br>Maturation Antigen (BCMA) in patients with<br>relapsed/refractory multiple myeloma (MM): Results<br>from Study BMA117159 Part 1 Dose Escalation /<br>Adam D. Cohen, Rakesh Popat, Suzanne Trudel,<br>Paul G Richardson, Ed N. Libby et al. // Blood, &<br>58th annual meeting and exposition of the american-<br>society-of-hematology (ash). - San Diego. - CA. -<br>USA. - 02.12.2016. - vol. 128. - no. 22. - P. 1-16 |
| (32) Дата подання<br>попередньої заявки<br>відповідно до<br>Паризької конвенції:              | 01.08.2017,<br>08.12.2017        |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| (33) Код держави-учасниці<br>Паризької конвенції,<br>до якої подано<br>попередню заявку:      | US,<br>US                        |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| (41) Публікація відомостей<br>про заявку:                                                     | 12.05.2020, Бюл.№ 9              |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| (46) Публікація відомостей<br>про державну<br>реєстрацію:                                     | 08.02.2023, Бюл.№ 6              |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| (86) Номер та дата<br>подання міжнародної<br>заявки, поданої<br>відповідно до<br>Договору РСТ | PCT/IB2018/055753,<br>31.07.2018 |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## (54) МОНОКЛОНАЛЬНИЙ КОН'ЮГАТ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ ДО ВСМА

(57) Реферат:

UA 126813 C2

Винахід спрямований на кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), який містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA), кон'юговані з цитотоксином. Винаходом також передбачені композиції, які містять кон'югат антитіла та лікарського засобу, і способи знищення клітин множинної мієломи, в тому числі стовбурових клітин множинної мієломи, що експресують BCMA, шляхом приведення клітин множинної мієломи в контакт з ADC.

У даний документ включений за допомогою посилання у всій своїй повноті машиночитаний перелік нуклеотидних/амінокислотних послідовностей, поданий одночасно з даною заявкою та визначений наступним чином: (текстовий) файл у форматі ASCII розміром 16498 байтів за назвою "BCMA-100-WO-PCT-SeqListing.TXT", створений 31 липня 2018 р.

## 5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Множинна мієлома (ММ) являє собою злоякісне новоутворення, що характеризується накопиченням клональних плазматичних клітин (див., наприклад, Palumbo et al., *New England J. Med.*, 364(11): 1046-1060 (2011) та Lonial et al., *Clinical Cancer Res.*, 77(6): 1264-1277 (2011)). Наявні засоби терапії ММ включають хіміотерапію, опромінення, хірургічне втручання, бісфосфонати та трансплантацію аутологічних стовбурових клітин (ASCT). Хоча ці засоби терапії часто викликають ремісію, майже всі пацієнти зрештою зазнають рецидиву та вмирають (див., наприклад, Lonial et al., вище, та Rajkumar, *Nature Rev. Clinical Oncol.*, 5(8): 479-491 (2011)).

Антиген дозрівання В-клітин (BCMA) є представником родини рецепторів фактора некрозу пухлини (TNFR), що експресується на клітинах В-клітинної лінії диференціювання (Laabi et al., *Nucleic Acids Research*, 22(7): 1147-1154 (1994)). Експресія BCMA є найвищою на термінально диференційованих В-клітинах. BCMA залучений в опосередкування виживання плазматичних клітин для підтримання довготривалого гуморального імунітету. Було встановлено зв'язок експресії BCMA з низкою видів раку, аутоімунних порушень та інфекційних захворювань. Декількома дослідниками РНК BCMA була виявлена повсюдно в клітинах множинної мієломи, а білок BCMA був виявлений на поверхні плазматичних клітин у пацієнтів із множинною мієломою (див., наприклад, Novak et al., *Blood*, 103(2): 689-694 (2004); Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909 (2007); Bellucci et al., *Blood*, 105(10): 3945-3950 (2005) та Moreaux et al., *Blood*, 703(8): 3148-3157 (2004)). У зв'язку з цим BCMA був досліджений як можлива терапевтична мішень у разі множинної мієломи.

Як і раніше, існує потреба в композиціях, які можуть застосовуватися у способах лікування множинної мієломи. У даному винаході передбачені такі композиції та способи.

## КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході передбачений кон'югат антитіла та лікарського засобу (ADC), який містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA), кон'юговані з цитотоксином. Моноклональне антитіло містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), під SEQ ID NO: 1, амінокислотну послідовність HCDR2 під SEQ ID NO: 2 та амінокислотну послідовність HCDR3 під SEQ ID NO: 3, та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), під SEQ ID NO: 4, амінокислотну послідовність LCDR2 під SEQ ID NO: 5 та амінокислотну послідовність LCDR3 під SEQ ID NO: 6.

Крім того, у даному винаході передбачені композиції, які містять вищевказаний кон'югат антитіла та лікарського засобу, і способи знищення клітин множинної мієломи (в тому числі стовбурових клітин множинної мієломи), що експресують BCMA, шляхом приведення клітин множинної мієломи в контакт з ADC.

У даному винаході також передбачені моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти BCMA, які містять (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), під SEQ ID NO: 1, амінокислотну послідовність HCDR2 під SEQ ID NO: 2 та амінокислотну послідовність HCDR3 під SEQ ID NO: 3, та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), під SEQ ID NO: 4, амінокислотну послідовність LCDR2 під SEQ ID NO: 5 та амінокислотну послідовність LCDR3 під SEQ ID NO: 6.

## КОРОТКИЙ ОПИС ДЕКИЛЬКОХ ВИГЛЯДІВ ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1 являє собою низку графіків (Фіг. 1A-1C), які ілюструють FACS-аналіз зв'язування очищених антитіл з адгезивними клітинами 293 (Ad293), що експресують huBCMA, суноBCMA, BAFF-R та TACI, як описано в прикладі 1. Моноклональне антитіло 15B2GL являло собою єдине протестоване антитіло, що перехресно реагує з антигенами макаки-краббідда, яке не зв'язувалося з BAFF-R та/або TACI.

Фіг. 2 являє собою графіки, що ілюструють здатність кон'югатів антитіла до BCMA-лікарський засіб знищувати клітини множинної мієломи (ММ) та плазмоклітинного лейкозу (PCL) *in vitro*, як описано в прикладі 4. На Фіг. 2A-2H показана життєздатність специфічних ліній клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу, що експресують BCMA, оброблених вказаними ADC, у той час як на Фіг. 2I та 2J показана життєздатність ліній клітин, що не експресують BCMA.

На Фіг. 3 містяться графіки, що ілюструють знищення ліній клітин множинної мієломи у присутності розчинного BCMA за допомогою кон'югату антитіла та лікарського засобу 15B2GL-SG3249 порівняно з ADC I09-SG3249 у кондиціонованих середовищах, зібраних від клітин Ad293, що експресують BCMA людини (Фіг. 3A), або порівняно з ADC J6M0-мс-MMAF та J6M0-SG3249 у кондиціонованих середовищах, зібраних від клітин Ad293, що експресують BCMA людини (Фіг. 3B), як описано в прикладі 4.

Фіг. 4 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі множинної мієломи з клітин H929 у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 та J6M0-мс-MMAF, що націлюються на BCMA, порівняно з необробленими мишами.

Фіг. 5 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі множинної мієломи з клітин JJN3 у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, J6M0-мс-MMAF та IgG1 ізотипового контролю-SG3249 порівняно з необробленими мишами.

Фіг. 6 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі плазмоклітинного лейкозу з клітин MM.1S у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249 та J6M0-мс-MMAF порівняно з необробленими мишами.

Фіг. 7 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі плазмоклітинного лейкозу з клітин MM.1R у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3249 та J6M0-мс-MMAF порівняно з необробленими мишами.

На Фіг. 8 міститься низка графіків і проточно-цитометричних діаграм, на яких проілюстрована експресія BCMA на стовбурових клітинах MM. Експресію BCMA виявили як на плазматичних клітинах MM (CD19-CD138+, сіра осцилограма), так і на стовбурових клітинах MM (CD19+CD138-, чорна осцилограма).

На Фіг. 9 міститься низка графіків, що ілюструють чутливість стовбурових клітин MM у зразках від пацієнтів MM263 (Фіг. 9A), MM276 (Фіг. 9B), MM277 (Фіг. 9C) та MM284 (Фіг. 9D) стосовно ADC 15B2GL-SG3249 порівняно з ADC J6M0-мс-MMAF в аналізі клоногенності. Контролі включають необроблені клітини та неспецифічний кон'югат IgG1-SG3249 у найвищій дозі 400 нг на мл. Кількість утворених колоній нормалізували стосовно кількості, утвореної в необробленій культурі, яку було встановлено як 100 %.

Фіг. 10 являє собою графіки, що ілюструють здатність кон'югату антитіла до BCMA-лікарський засіб знищувати клітини множинної мієломи (MM) та плазмоклітинного лейкозу (PCL) *in vitro*, як описано в прикладі 7. На Фіг. 10A-10H показана життєздатність специфічних ліній клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу, що експресують BCMA, оброблених вказаним ADC, у той час як на Фіг. 10I та 10J показана життєздатність ліній клітин, що не експресують BCMA.

Фіг. 11 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі множинної мієломи з клітин H929 у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400 та IgG1 ізотипового контролю-SG3400, що націлюються на BCMA, порівняно з необробленими мишами.

Фіг. 12 являє собою графік, що ілюструє зміну об'єму пухлини в ксенотрансплантатній мишачій моделі плазмоклітинного лейкозу з клітин MM.1S у відповідь на обробку за допомогою ADC 15B2GL-SG3400, J6M0-SG3400 та IgG1 ізотипового контролю-SG3400, що націлюються на BCMA, порівняно з необробленими мишами.

Фіг. 13 являє собою графіки, що ілюструють вимірювання афінності та показників кінетики зв'язування антитіл 15B2GL, I09, P10 та L15 із BCMA людини із застосуванням системи ProteOn на основі SPR.

Фіг. 14 являє собою графіки, що ілюструють вимірювання афінності та показників кінетики зв'язування антитіл N22, M02 та J6M0 із BCMA людини із застосуванням системи ProteOn на основі SPR.

Фіг. 15 являє собою графіки, що ілюструють зв'язування антитіл 15B2GL, L15, I09 або J6M0 із лініями клітин NCI-H929, MM.1S та Ad293+huBCMA, виміряне за допомогою проточної цитометрії.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході передбачений кон'югат антитіла та лікарського засобу (ADC), який містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA), кон'юговані з цитотоксином. Термін "кон'югат антитіла та лікарського засобу", використовуваний у даному документі, стосується сполуки, яка містить моноклональне антитіло (mAb), приєднане до цитотоксичного засобу (зазвичай

низькомолекулярного лікарського засобу з високою системною токсичністю) за допомогою хімічних лінкерів. У деяких варіантах здійснення ADC може містити низькомолекулярний цитотоксин, який був хімічно модифікований таким чином, щоб він містив лінкер. Лінкер потім застосовують для кон'югування цитотоксину з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом. Після зв'язування з антигеном-мішенню на поверхні клітини ADC інтерналізується та транспортується в лізосому, де цитотоксин вивільняється в результаті протеолізу розщеплюваного лінкера (наприклад, за допомогою катепсину В, що перебуває в лізосомі) або в результаті протеолітичного розкладання антитіла, якщо воно приєднане до цитотоксину за допомогою нерозщеплюваного лінкера. Цитотоксин потім переміщується з лізосоми в цитозоль або ядро, де він потім може зв'язуватися зі своєю мішенню залежно від його механізму дії.

Термін "моноклональні антитіла", використовуваний у даному документі, стосується антитіл, які продукуються одним клоном В-клітин і зв'язуються з одним і тим самим епітопом. На відміну від цього, термін "поліклональні антитіла" стосується популяції антитіл, які продукуються різними В-клітинами та зв'язуються з різними епітопами одного й того самого антигену. Кон'югат антитіла та лікарського засобу, описаний у даному документі, може містити ціле антитіло або фрагмент антитіла. Ціле антитіло зазвичай складається з чотирьох поліпептидів: двох ідентичних копій поліпептидного важкого (H) ланцюга та двох ідентичних копій поліпептидного легкого (L) ланцюга. Кожен із важких ланцюгів містить одну N-кінцеву варіабельну (VH) ділянку та три C-кінцеві константні (CH1, CH2 та CH3) ділянки, і кожен легкий ланцюг містить одну N-кінцеву варіабельну (VL) ділянку та одну C-кінцеву константну (CL) ділянку. Варіабельні ділянки кожної пари легкого та важкого ланцюгів утворюють антигензв'язувальний центр антитіла. Ділянки VH та VL мають однакову загальну структуру, при цьому кожна ділянка містить чотири каркасні ділянки, послідовності яких є порівняно консервативними. Каркасні ділянки з'єднані трьома ділянками, які визначають комплементарність (CDR). Три CDR, відомі як CDR1, CDR2 та CDR3, утворюють "гіперваріабельну ділянку" антитіла, яка відповідає за зв'язування антигену.

ADC може містити антигензв'язувальний фрагмент антитіла. Терміни "фрагмент антитіла", "антигензв'язувальний фрагмент", "функціональний фрагмент антитіла" та "антигензв'язувальна частина" використовуються в даному документі взаємозамінно та стосуються одного або декількох фрагментів або частин антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (див. загалом Holliger et al., *Nat. Biotech.*, 23(9): 1126-1129 (2005)). Фрагмент антитіла може містити, наприклад, одну або декілька CDR, варіабельну ділянку (або її частини), константну ділянку (або її частини) або їх комбінації. Приклади фрагментів антитіл включають без обмеження (i) Fab-фрагмент, який являє собою одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL та CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, який являє собою двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, зв'язані дисульфідним містком у шарнірній ділянці; (iii) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL та VH одного плеча антитіла; (iv) одноланцюговий Fv (scFv), який являє собою одновалентну молекулу, що складається з двох доменів Fv-фрагмента (тобто VL та VH), з'єднаних синтетичним лінкером, який дає змогу синтезувати два домени у вигляді одного поліпептидного ланцюга (див., наприклад, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988) та Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998)); і (v) діатіло, яке являє собою димер з поліпептидних ланцюгів, де кожен поліпептидний ланцюг містить VH, з'єднаний з VL пептидним лінкером, який є надто коротким, щоб забезпечувати утворення пар між VH та VL в одному і тому самому поліпептидному ланцюзі, внаслідок чого забезпечується керування утворенням пар між комплементарними доменами в різних поліпептидних ланцюгах VH-VL з утворенням димерної молекули, що має два функціональні антигензв'язувальні центри. Фрагменти антитіл відомі з рівня техніки та описані більш докладно, наприклад, у публікації заявки на патент США 2009/0093024 A1.

В одному варіанті здійснення кон'югат антитіла та лікарського засобу, описаний у даному документі, містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA, також відомого як CD269). BCMA є представником надродини рецепторів фактора некрозу пухлини (див., наприклад, Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135 (2000) та Mackay et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 21: 231-264 (2003)). BCMA зв'язується з фактором активації В-клітин (BAFF) і лігандом А, що індукуює проліферацію (APRIL) (див., наприклад, Mackay et al., вище, та Kalled et al., *Immunological Reviews*, 204: 43-54 (2005)). Повідомлялося, що серед незлоякісних клітин BCMA експресується переважно в плазматичних клітинах і субпопуляціях зрілих В-клітин (див., наприклад, Laabi et al., *EMBO J.*, 77(11): 3897-3904 (1992); Laabi et al., *Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154 (1994); Kalled et al., вище; O'Connor et al., *J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97 (2004) та Ng et al., *J. Immunol.*, 173(2): 807-817 (2004)). Миші з дефіцитом BCMA є здоровими та мають нормальні показники

кількості В-клітин, але виживаність довгоживучих плазматичних клітин погіршується (див., наприклад, O'Connor et al, вище; Xu et al., *Mol. Cell. Biol.*, 21(12): 4067-4074 (2001) та Schiemann et al., *Science*, 293(5537): 2111-2114 (2001)). Декількома дослідниками РНК ВСМА була виявлена повсюдно в клітинах множинної мієломи, а білок ВСМА був виявлений на поверхні

плазматичних клітин у пацієнтів із множинною мієломою (див., наприклад, Novak et al, *Blood*, 103(2): 689-694 (2004); Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909 (2007); Bellucci et al., *Blood*, 105(10): 3945-3950 (2005) та Moreaux et al., *Blood*, 703(8): 3148-3157 (2004)).

У деяких варіантах здійснення в даному винаході передбачені моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти ВСМА, описаного вище, незалежно від кон'югату антитіла та лікарського засобу. Моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можуть містити (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), під SEQ ID NO: 1, амінокислотну послідовність HCDR2 під SEQ ID NO: 2 та амінокислотну послідовність HCDR3 під SEQ ID NO: 3, та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), під SEQ ID NO: 4, амінокислотну послідовність LCDR2 під SEQ ID NO: 5 та амінокислотну послідовність LCDR3 під SEQ ID NO: 6. В іншому варіанті здійснення моноклональне антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7, та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

Моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти ВСМА, можуть передбачати будь-яку придатну афінність зв'язування з ВСМА або його епітопом. Термін "афінність" стосується константи рівноваги для оборотного зв'язування двох засобів і виражається як константа дисоціації ( $K_D$ ). Афінність антитіла або його антигензв'язувального фрагмента до антигену або епітопа, що становлять інтерес, може бути виміряна за допомогою будь-якого способу, відомого з рівня техніки. Такі способи включають, наприклад, сортування клітин з активацією флуоресценції (FACS), поверхневий плазмонний резонанс (наприклад, Biacore, ProteOn), біошарову інтерферометрію (BLI, наприклад Octet), аналіз кінетичного виключення (наприклад, KinExA), застосування відокремлюваних гранул (наприклад, магнітних гранул), пенінг з антигеном та/або ELISA (див., наприклад, Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, N.Y., 2001). З рівня техніки відомо, що афінність зв'язування конкретного антитіла буде варіюватися залежно від способу, який застосовують для аналізу афінності зв'язування.

Розчинна форма ВСМА (sBCMA) була виявлена в сироватці крові пацієнтів із множинною мієломою, при цьому зареєстровані значення перебували в діапазоні від 3,8 до 1062 нг/мл (Lee et al, *Br J Haematol* 2016, Sanchez et al *Br J Haematol* 2012), та складалася з повного позаклітинного домену молекули (Laurent et. al. *Nat Commun* 2015). Отже, sBCMA може послабляти ефекти засобів терапії на основі антитіл. Функціональні особливості sBCMA та рекомбінантного мономерного ВСМА людини є подібними (Laurent et. al. *Nat Commun* 2015). Отже, для зменшення потенційних ефектів sBCMA щодо ефективності кон'югату антитіло до ВСМА-лікарський засіб бажано вибрати компонент антитіла, який має слабе зв'язування з рекомбінантним мономерним ВСМА людини та сильне зв'язування із мембранозв'язаним ВСМА.

Афінність зв'язувального засобу до ліганду, як, наприклад, афінність антитіла до епітопа, може становити, наприклад, від приблизно 1 пікомоль/л (пМ) до приблизно 1 мікромоль/л (мкМ) (наприклад, від приблизно 1 пікомоль/л (пМ) до приблизно 1 наномоль/л (нМ) або від приблизно 1 нМ до приблизно 1 мікромоль/л (мкМ)). В одному варіанті здійснення моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можуть зв'язуватися з ВСМА з  $K_D$ , що становить менше 100 наномоль/л або дорівнює цьому значенню (наприклад, становить 100 нМ, приблизно 90 нМ, приблизно 80 нМ, приблизно 70 нМ, приблизно 60 нМ, приблизно 50 нМ, приблизно 40 нМ, приблизно 30 нМ, приблизно 20 нМ, або приблизно 10 нМ або перебуває в діапазоні, визначеному будь-якими двома з вищевказаних значень). В іншому варіанті здійснення моноклональне антитіло може зв'язуватися з ВСМА з  $K_D$ , що становить менше 10 наномоль/л або дорівнює цьому значенню (наприклад, становить приблизно 9 нМ, приблизно 8,5 нМ, приблизно 8 нМ, приблизно 7,5 нМ, приблизно 7 нМ, приблизно 6,5 нМ, приблизно 6 нМ, приблизно 5,5 нМ, приблизно 5 нМ, приблизно 4,5 нМ, приблизно 4 нМ, приблизно 3,5 нМ, приблизно 3 нМ, приблизно 2,5 нМ, приблизно 2 нМ, приблизно 1,5 нМ, приблизно 1 нМ, приблизно 0,9 нМ, приблизно 0,8 нМ, приблизно 0,7 нМ, приблизно 0,6 нМ, приблизно 0,5 нМ, приблизно 0,4 нМ, приблизно 0,3 нМ, приблизно 0,2 нМ, приблизно 0,1 нМ, приблизно 0,05 нМ, приблизно 0,025 нМ, приблизно 0,01 нМ, приблизно 0,001 нМ або перебуває в діапазоні,

визначеному будь-якими двома з вищевказаних значень). В іншому варіанті здійснення моноклональне антитіло може зв'язуватися з ВСМА з  $K_D$ , що становить менше 200 пМ або дорівнює цьому значенню (наприклад, становить приблизно 190 пМ, приблизно 175 пМ, приблизно 150 пМ, приблизно 125 пМ, приблизно 110 пМ, приблизно 100 пМ, приблизно 90 пМ, приблизно 80 пМ, приблизно 75 пМ, приблизно 60 пМ, приблизно 50 пМ, приблизно 40 пМ, приблизно 30 пМ, приблизно 25 пМ, приблизно 20 пМ, приблизно 15 пМ, приблизно 10 пМ, приблизно 5 пМ, приблизно 1 пМ або перебуває в діапазоні, визначеному будь-якими двома з вищевказаних значень).

В одному варіанті здійснення афінність антитіла до ВСМА або його антигензв'язувального фрагмента до мономерного ВСМА, виміряна за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR), становить приблизно 90 нМ, приблизно 80 нМ, приблизно 70 нМ, приблизно 60 нМ, приблизно 50 нМ, приблизно 40 нМ, приблизно 30 нМ або перебуває в діапазоні, визначеному будь-якими двома з вищевказаних значень, наприклад, від приблизно 50 нМ до приблизно 70 нМ, від приблизно 55 нМ до приблизно 65 нМ або від приблизно 58 нМ до приблизно 62 нМ.

В одному варіанті здійснення афінність антитіла до ВСМА або його антигензв'язувального фрагмента до мембранозв'язаного ВСМА, виміряна за допомогою FACS, становить менше 10 наномоль/л або дорівнює цьому значенню (наприклад, становить приблизно 9 нМ, приблизно 8,5 нМ, приблизно 8 нМ, приблизно 7,5 нМ, приблизно 7 нМ, приблизно 6,5 нМ, приблизно 6 нМ, приблизно 5,5 нМ, приблизно 5 нМ, приблизно 4,5 нМ, приблизно 4 нМ, приблизно 3,5 нМ, приблизно 3 нМ, приблизно 2,5 нМ, приблизно 2 нМ, приблизно 1,5 нМ, приблизно 1 нМ, приблизно 0,9 нМ, приблизно 0,8 нМ, приблизно 0,7 нМ, приблизно 0,6 нМ, приблизно 0,5 нМ, приблизно 0,4 нМ, приблизно 0,3 нМ, приблизно 0,2 нМ, приблизно 0,1 нМ, приблизно 0,05 нМ, приблизно 0,025 нМ, приблизно 0,01 нМ, приблизно 0,001 нМ або перебуває в діапазоні, визначеному будь-якими двома з вищевказаних значень).

Антигензв'язувальна частина або фрагмент моноклонального антитіла можуть мати будь-який розмір за умови, що ця частина зв'язується з ВСМА. Із цього погляду антигензв'язувальна частина або фрагмент моноклонального антитіла, спрямованого проти ВСМА (що також називається в даному документі "моноклональним антитілом до ВСМА"), у бажаному випадку містить приблизно 5-18 амінокислот (наприклад, приблизно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 або діапазон, визначений будь-якими двома з вищевказаних значень).

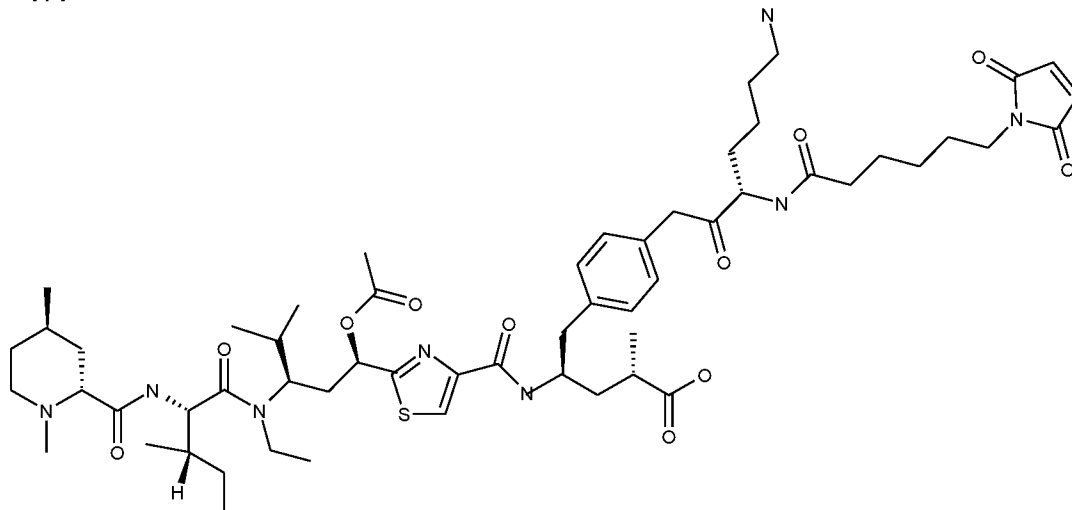
В одному варіанті здійснення кон'югат антитіла та лікарського засобу містить варіабельну ділянку моноклонального антитіла до ВСМА. Із цього погляду ADC може містити варіабельну ділянку легкого ланцюга, варіабельну ділянку важкого ланцюга або як варіабельну ділянку легкого ланцюга, так і варіабельну ділянку важкого ланцюга моноклонального антитіла до ВСМА. ADC переважно містить варіабельну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга моноклонального антитіла до ВСМА. Моноклональні антитіла, які зв'язуються з ВСМА, розкриті, наприклад, у публікації міжнародної заявки на патент WO 2010/104949. В одному варіанті здійснення моноклональне антитіло ADC, описане в даному документі, містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), SYSMN (SEQ ID NO: 1), амінокислотну послідовність HCDR2 SISGSSNYIYADSVKG (SEQ ID NO: 2) та амінокислотну послідовність HCDR3 GGNYYVEYFQY (SEQ ID NO: 3), та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), RASQYISSNYLA (SEQ ID NO: 4), амінокислотну послідовність LCDR2 GASNRAT (SEQ ID NO: 5) та амінокислотну послідовність LCDR3 QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 6). В іншому варіанті здійснення моноклональне антитіло ADC, описане в даному документі, може містити варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7, та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

Терміни "цитотоксин" та "цитотоксичний засіб" стосуються будь-якої молекули, яка інгібує виконання функції клітин або запобігає йому, та/або спричиняє руйнування клітин (загибель клітин), та/або чинить антипроліферативні ефекти. Буде зрозуміло, що цитотоксин або цитотоксичний засіб ADC також називається в даній галузі техніки "корисним навантаженням" ADC. З рівня техніки відомо, що низка класів цитотоксичних засобів є потенційно застосовними в молекулах ADC та можуть застосовуватися в ADC, описаному в даному документі. Такі класи цитотоксичних засобів включають, наприклад, засоби, що діють на мікротрубочки (наприклад, ауристатини та майтанзиноїди), піролобензодіазепіни (PBD), інгібітори РНК-полімерази II (наприклад, аматоксини) та засоби, що алкілюють ДНК (наприклад, псевдодимери індолінобензодіазепіну). Приклади конкретних цитотоксичних засобів, які можуть

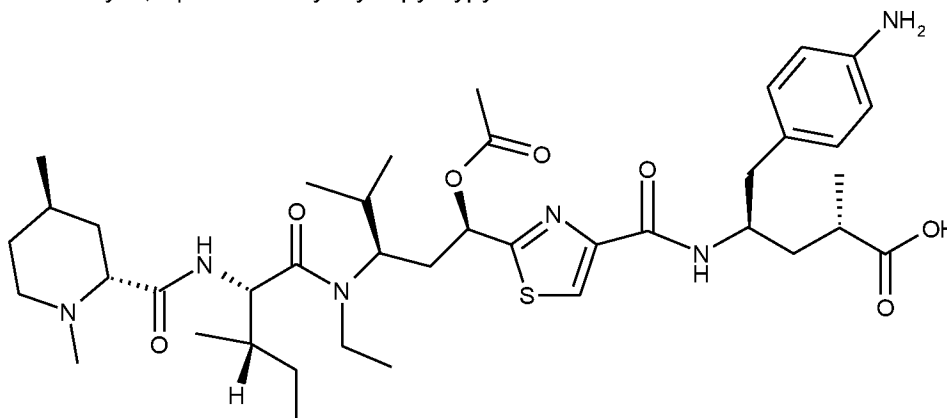
застосовуватися в ADC, описаному в даному документі, включають без обмеження аманітини, ауристатини, каліхеаміцин, дауноміцини, доксорубіцини, дуокарміцини, доластатини, енедіїни, лекситропсини, таксани, пуроміцини, майтанзиноїди, алкалоїди барвінка, тубулізини та піролобензодіазепіни (PBD). Більш конкретно, цитотоксичний засіб може являти собою, наприклад, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, ауристатин Е, паклітаксел, доцетаксел, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолінодоксорубіцин, ризоксин, ціаноморфолінодоксорубіцин, доластатин-10, ехіноміцин, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, DM1, DM4, вінбластин, метотрексат, нетропсин або їхні похідні або аналоги. Цитотоксини, придатні для застосування в ADC, також описані, наприклад, у публікаціях міжнародних заявок на патент №№ WO 2015/155345 та WO 2015/157592.

В одному варіанті здійснення цитотоксичний засіб може являти собою засіб, що діє на мікротрубочки, такий як тубулізин, майтанзиноїд, ауристатин або їхні похідні. Терміни "засіб, що діє на мікротрубочки" та "засіб, що націлюється на мікротрубочки" є синонімічними та стосуються засобу, що інгібує поділ клітини шляхом перешкоджання функції мікротрубочок. Тубулізини є представниками класу природних продуктів, виділених із видів мікобактерій (Sasse et al., J. Antibiot., 53: 879-885 (2000)), які діють як мітотичні отрути, що інгібують полімеризацію тубуліну та зумовлюють блокування клітинного циклу та апоптоз (Steinmetz et al., Chem. Int. Ed., 43: 4888-4892 (2004); Khalil et al., Chem. Biochem., 7: 678-683 (2006); Kaur et al., Biochem. J., 396: 235-242 (2006)). Приклади тубулізинів розкриті, наприклад, у публікаціях міжнародних заявок на патент №№ WO 2015/157594, WO 2004/005326, WO 2012/019123, WO 2009/134279, WO 2009/055562, WO 2004/005327; у патентах США 7776841, 7754885 та 7816377 та в публікаціях заявок на патент США 2010/0240701, 2011/0021568 та 2011/0263650.

У певних аспектах тубулізин являє собою сполуку, описану у WO 2015/157594, яка включена у даний документ за допомогою посилання, таку як, наприклад, сполука, що має наступну структуру:



або сполука, що має наступну структуру:

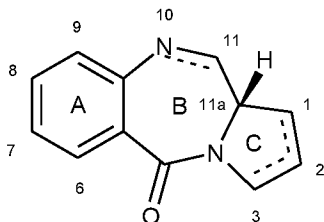


Майтанзиноїди інгібують полімеризацію білка мікротрубочок тубуліну, у такий спосіб запобігаючи утворенню мікротрубочок (див., наприклад, патент США № 6441163 та Remillard et al., Science, 189: 1002-1005 (1975)). Було показано, що майтанзиноїди інгібують ріст пухлинних

клітин *in vitro* із застосуванням моделей культур клітинних та *in vivo* із застосуванням систем з лабораторними тваринами. Крім того, цитотоксичність майтанзиноїдів є у 1000 разів вищою, ніж у традиційних хіміотерапевтичних засобів, таких як, наприклад, метотрексат, даунорубіцин і вінкристин (див., наприклад, патент США 5208020). Майтанзиноїди включають майтанзин, майтанзинол, С3-естери майтанзинолу та інші аналоги та похідні майтанзинолу (див., наприклад, патенти США 5208020 та 6441163). С3-естери майтанзинолу можуть бути такими, що зустрічаються в природі, або одержані синтетичним шляхом. Крім того, як ті, що зустрічаються в природі, так і синтетичні С3-естери майтанзинолу можна класифікувати як С3-естери простих карбонових кислот або С3-естери похідних N-метил-L-аланіну, при цьому останні є більш цитотоксичними, ніж перші. Синтетичні аналоги майтанзиноїдів також відомі з рівня техніки та описані, наприклад, у Kurchan et al., J. Med. Chem., 21: 31-37 (1978). Способи одержання майтанзинолу та його аналогів і похідних описані, наприклад, у патенті США 4151042. Приклади майтанзиноїдів, які можуть застосовуватися у складі ADC, описаних у даному документі, включають без обмеження N2'-дезацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропіл)майтанзин (DM1) та N2'-дезацетил-N2'-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанзин (DM4).

Ауристатини являють собою клас високоефективних антимітотичних засобів, які продемонстрували значну доклінічну активність у добре стерпних дозах (Law et al., Cancer Res., 66: 2328-2337 (2006); Ma et al., Clin. Cancer Res., 12: 2591-2596 (2006); Tse et al., Cancer Res., 12: 1373-1382 (2006); а також Oflazoglu et al., Br. J. Haematol., 142: 69-73 (2008), та Oflazoglu et al., Clin. Cancer Res., 14: 6171-6180 (2008)). ADC, які містять ауристатини, на даний час оцінюються у доклінічних і клінічних випробуваннях. Приклади ауристатинів, які можуть застосовуватися у складі ADC, описаних у даному документі, включають без обмеження монометилауристатин Е (MMAE) і споріднену молекулу монометилауристатин F (MMAF) (див., наприклад, Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003) та Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17: 114-124 (2006)).

В одному варіанті здійснення цитотоксичний засіб може являти собою піролобензодіазепін (PBD) або похідну PBD. PBD переміщується в ядро, де він зшиває ДНК, запобігаючи реплікації під час мітозу, пошкоджуючи ДНК шляхом індукування одониткових розривів і згодом зумовлюючи апоптоз. Деякі PBD також мають здатність розпізнавати специфічні послідовності ДНК та зв'язуватися з ними. PBD мають наступну загальну структуру:

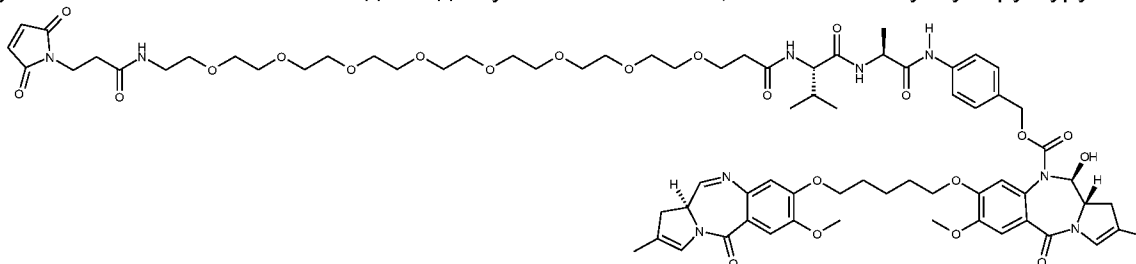


PBD відрізняються числом, типом і положенням замісників як в їхніх ароматичних А-кільцях, так і в пірольних С-кільцях, а також ступенем насиченості С-кілець. У В-кільці міститься імін (N=C), карбіоламін (NH-CH(OH)), або метиловий етер карбіоламіну (NH-CH(OMe)) у положенні N10-C11, яке є електрофільним центром, що відповідає за алкілювання ДНК. Усі відомі природні продукти мають (S)-конфігурацію в положенні хірального атома C11a, яка забезпечує їм праву закрученість, якщо дивитися від С-кільця в напрямку А-кільця. Ця ознака також надає PBD відповідну тривимірну форму для ізоспіральності з малою борозенкою ДНК В-форми, зумовлюючи щільне прилягання в сайті зв'язування (Kohn, у: Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975) та Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19: 230-237 (1986)). PBD можуть утворювати аддукти в малій борозенці, що зумовлює перешкоджання процесингу ДНК.

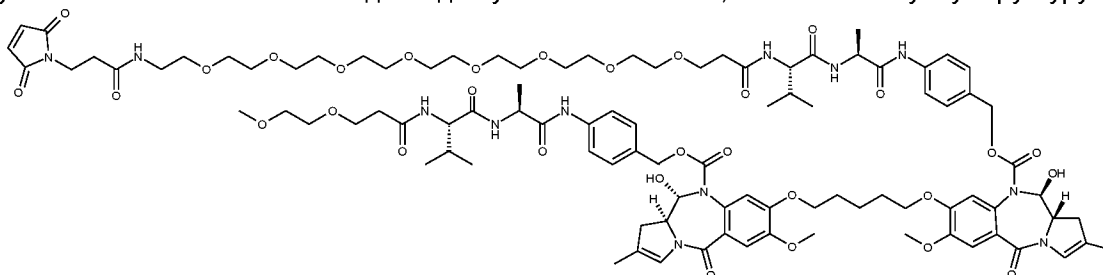
Перший протипухлинний антибіотик на основі PBD, антраміцин, був виявлений у 1965 р. (Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc., 87: 5793-5795 (1965); Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc., 87: 5791-5793 (1965)). Відтоді було повідомлено про низку PBD, що зустрічаються в природі, і було розроблено більше десяти шляхів синтезу для одержання різних аналогів (Thurston et al., Chem. Rev., 433-465 (1994) та Antonow, D. and Thurston, D.E., Chem. Rev., 111: 2815-2864 (2011)). Представники цієї родини включають абейміцин (Hochlowski et al., J. Antibiotics, 40: 145-148 (1987)), чикаміцин (Konishi et al., J. Antibiotics, 37: 200-206 (1984)), DC-81 (патент Японії 58180487; Thurston et al., Chem. Brit., 26: 767-772 (1990) і Bose et al., Tetrahedron, 48: 751-758 (1992)), мазетрамицин (Kuminoto et al., J. Antibiotics, 33: 665-667 (1980)), неотрамицини А та В (Takeuchi et al., J. Antibiotics, 29: 93-96 (1976)), попотрамицин (Tsunakawa et al., J. Antibiotics, 41: 1366-1373 (1988)), протракарцин (Shimizu et al., J. Antibiotics, 29: 2492-2503 (1982) та Langley

and Thurston, J. Org. Chem., 52: 91-97 (1987)), сибаноміцин (DC-102) (Hara et al., J. Antibiotics, 41: 702-704 (1988) та Itoh et al., J. Antibiotics, 41: 1281-1284 (1988)), сибіроміцин (Leber et al., J. Am. Chem. Soc., 110: 2992-2993 (1988)) та томаміцин (Arima et al., J. Antibiotics, 25: 437-444 (1972)). PBD, а також ADC, які містять PBD, також описані в публікаціях міжнародних заявок на патент №№ WO 2015/155345 та WO 2015/157592.

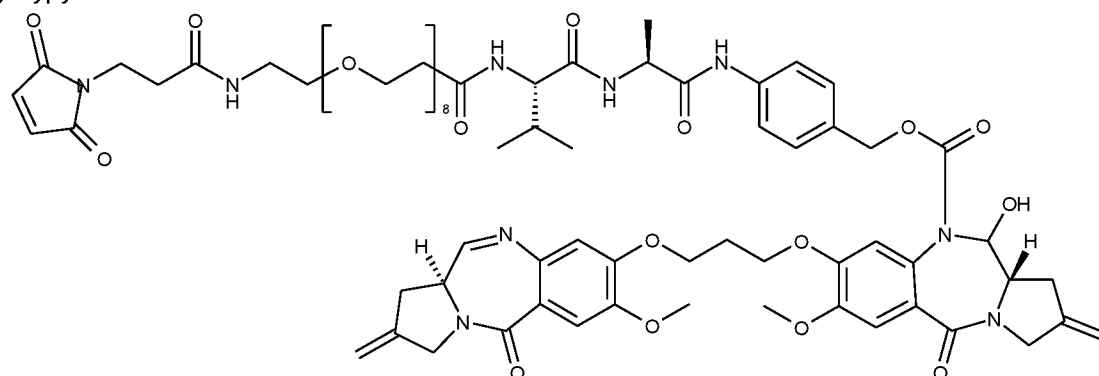
В одному варіанті здійснення PBD являє собою PBD 3249, що також називається в даному документі "SG3249" та описаний докладно у WO 2014/057074, який має наступну структуру:



В іншому варіанті здійснення PBD являє собою PBD 3315, що також називається в даному документі "SG3315" та описаний докладно у WO 2015/052322, який має наступну структуру:



В іншому варіанті здійснення PBD являє собою SG3400, що також називається сполукою 23, який докладно описаний у РСТ/EP2017/052988, поданий 10 лютого 2017 р., і має наступну структуру:



Моноклональне антитіло до ВСМА або його антигензв'язувальний фрагмент можуть бути кон'юговані з цитотоксином за допомогою будь-якого придатного способу, відомого з рівня техніки, включаючи способи сайт-специфічного або сайт-неспецифічного кон'югування. Традиційні стратегії кон'югування антитіл зазвичай базуються на випадковому (тобто неспецифічному) кон'югуванні корисного навантаження з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом за залишками лізину або цистеїну. Відповідно, у деяких аспектах антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент є випадково кон'югованими з цитотоксичним засобом, наприклад, шляхом часткового відновлення антитіла або фрагмента антитіла з наступною реакцією з бажаним засобом із приєднаним лінкерним фрагментом або без нього. Наприклад, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можуть бути відновлені із застосуванням дитіотреїтолу (DTT) або аналогічного відновника. Цитотоксичний засіб із приєднаним до нього лінкерним фрагментом або без нього потім можна додавати у молярному надлишку до відновленого антитіла або фрагмента антитіла у присутності диметилсульфоксиду (DMSO). Після кон'югування можна додавати надлишок вільного цистеїну для гасіння засобу, який не прореагував. Реакційну суміш можна потім очищати та піддавати заміні буфера на фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS).

В інших варіантах здійснення цитотоксичний засіб може бути кон'югований із моноклональним антитілом до ВСМА за допомогою способів сайт-специфічного кон'югування за

конкретними реакційноздатними амінокислотними залишками з одержанням гомогенних препаратів ADC з однаковим стехіометричним складом. Сайт-специфічне кон'югування може відбуватися за залишком цистеїну або за неприродною амінокислотою. В одному варіанті здійснення цитотоксичний засіб може бути кон'югований з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом за щонайменше одним залишком цистеїну. Зокрема, наприклад, цитотоксичний засіб може бути кон'югований хімічним способом із бічним ланцюгом амінокислоти за конкретним положенням згідно з Kabat у Fc-ділянці моноклонального антитіла до ВСМА. У зв'язку з цим цитотоксичний засіб може бути кон'югований із моноклональним антитілом до ВСМА за залишком цистеїну в будь-якому придатному положенні у Fc-ділянці антитіла, включаючи без обмеження цистеїн у щонайменше одному з положень 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 та 446, де нумерація відповідає EU-індексу за Kabat. В одному варіанті здійснення цитотоксичний засіб може бути кон'югований із моноклональним антитілом до ВСМА за залишком цистеїну в конкретних положеннях 239 та/або 442 за Kabat моноклонального антитіла до ВСМА та/або за амінокислотним залишком, вставленим між положеннями 239 та 240 за Kabat антитіла до ВСМА (Dimasi et al., *Mol Pharm*, 14(5):1501-1516 (2017)). Альтернативно, цитотоксичний засіб може бути кон'югований із моноклональним антитілом до ВСМА або його антигензв'язувальним фрагментом за допомогою тіолмалеїмідного зв'язку, як, наприклад, за сульфгідрильною реакційноздатною групою в шарнірній ділянці та в парах важкого та легкого ланцюгів.

Моноклональне антитіло до ВСМА, описане в даному документі, містить щонайменше одну молекулу цитотоксину, кон'юговану з ним; однак, моноклональне антитіло до ВСМА може містити будь-яку придатну кількість молекул цитотоксину, кон'югованих із ним (наприклад, 1, 2, 3, 4 або більше молекул цитотоксину), для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Бажано, щоб ADC, описаний у даному документі, містив дві молекули цитотоксину, кон'юговані з моноклональним антитілом до ВСМА.

Антитіло до ВСМА, описане в даному документі, є застосовним для будь-якого терапевтичного засобу, в якому є бажаним його націлювання на ВСМА, як, наприклад, в адоптивному перенесенні клітин (ACT), біспецифічних активаторах, що привертають Т-клітини (BiTE), і наночастинках. В одному варіанті здійснення у даному винаході передбачений химерний антигенний рецептор (CAR), який містить антигензв'язувальний домен моноклонального антитіла до ВСМА, описаного в даному документі, зв'язаний із фрагментом, що активує Т-клітини. "Химерний антигенний рецептор (CAR)" являє собою штучно сконструйований гібридний білок або поліпептид, який містить антигензв'язувальний домен антитіла (наприклад, одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv)), зв'язаний із фрагментами, що передають сигнал в Т-клітини або активують Т-клітини. Структури CAR створювалися протягом останніх двадцяти років і найчастіше містять у своєму складі одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv), одержаний із моноклонального антитіла (mAb), і сигнальний мотив із  $\zeta$ -ланцюга TCR (і вони називаються "CAR першого покоління" (див., наприклад, Okur, F.V., Brenner, M.K., *Methods Mol. Biol.*, 651: 319-45 (2010); та Lee et al., *Clin. Cancer. Res.*, 18(10): 2780-2790 (2012)). Порівняно нещодавно були розроблені CAR другого та третього покоління, які містять у своєму складі один ("друге покоління") або два ("третє покоління") коstimулювальні активувальні мотиви, наприклад, із CD28, 4-1BB (CD137) та/або CD134 (OX-40), які посилюють проліферацію, цитотоксичність і персистенцію *in vivo* (див., наприклад, Finney et al., *J. Immunol.*, 172: 104-13 (2004); Imai et al., *Leukemia*, 18: 676-84 (2004); Maher et al., *Nat Biotechnol.*, 20:70-5 (2002); Milone et al., *Mol Ther.*, 17: 1453-64 (2009) та Lee et al., вище).

Антигензв'язувальний домен CAR може містити ціле моноклональне антитіло або фрагмент моноклонального антитіла, описані в даному документі. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальний домен CAR може містити одноланцюговий Fv-фрагмент (scFv) моноклонального антитіла до ВСМА. Химерні антигенні рецептори та способи одержання CAR додатково описані, наприклад, у Riviere, I. and M. Sadelain, *Mol. Ther.*, 25(5): 1117-1124 (2017); Davila, M.L. and M. Sadelain, *Int. J. Hematol.*, 104(1): 6-17 (2016) та в публікації заявки на патент США 2015/0051266 A1.

У даному винаході також передбачена композиція, яка містить вищеописані антитіло або кон'югат антитіла та лікарського засобу та фармацевтично прийнятний (наприклад, фізіологічно прийнятний) носій. Будь-який придатний носій, відомий з рівня техніки, може застосовуватися в контексті даного винаходу. Вибір носія буде частково визначатися конкретним місцем, куди можна вводити композицію, і конкретним способом, застосовуваним для введення композиції. Композиція необов'язково може бути стерильною. Композиції можуть бути одержані згідно з

традиційними методиками, описаними, наприклад, у Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

Бажано, щоб композиція містила антитіло або кон'югат антитіла та лікарського засобу у кількості, яка є ефективною для лікування або попередження множинної мієломи. Таким чином, у даному винаході передбачений спосіб знищення клітин множинної мієломи, який включає приведення клітин множинної мієломи, що експресують ВСМА, в контакт з антитілом або кон'югатом антитіла та лікарського засобу, описаними в даному документі, або композицією, яка містить антитіло або ADC, описаною в даному документі, завдяки чому антитіло або кон'югат антитіла та лікарського засобу зв'язуються з ВСМА на клітинах множинної мієломи та знищують клітини множинної мієломи. У даному винаході також передбачене застосування антитіла або ADC, описаних у даному документі, або композиції, яка містить антитіло або ADC, у виготовленні лікарського препарату для лікування множинної мієломи. Як обговорюється в даному документі, множинна мієлома, також відома як плазмоклітинна мієлома або хвороба Калера, являє собою рак з плазматичних клітин, які є типом лейкоцитів, що зазвичай відповідають за вироблення антитіл (Raab et al., Lancet, 374: 324-329 (2009)). Множинна мієлома щороку вражає 1-4 людини на 100000 людей. Захворювання є більш поширеним у чоловіків та через досі невідомі причини вдвічі частіше трапляється в афроамериканців, ніж у європеїдних американців. Множинна мієлома є найменш поширеною гематологічною злоякісною пухлиною (14 %) і становить 1 % від всіх видів раку (Raab et al., вище). Лікування множинної мієломи зазвичай передбачає високодозову хіміотерапію із наступною трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин (алогенною або аутологічною); однак, у пацієнтів із множинною мієломою, які пройшли таке лікування, поширеною є висока частота рецидивів. Як обговорюється вище, ВСМА експресується на високому рівні в клітинах множинної мієломи (див., наприклад, Novak et al., вище; Neri et al., вище; Bellucci et al., вище; та Moreaux et al., вище).

Як продемонстровано в даному документі, ВСМА також експресується на стовбурових клітинах множинної мієломи. У зв'язку з цим у даному винаході передбачений спосіб знищення стовбурових клітин множинної мієломи, який включає приведення стовбурових клітин множинної мієломи, що експресують ВСМА, в контакт із кон'югатом антитіла та лікарського засобу, описаним у даному документі, або композицією, яка містить ADC, описаною в даному документі, внаслідок чого кон'югат антитіла та лікарського засобу зв'язується з ВСМА на стовбурових клітинах множинної мієломи та знищує стовбурові клітини множинної мієломи. Стовбурові клітини множинної мієломи можна ідентифікувати в кістковому мозку пацієнтів із множинною мієломою за їхньою поверхневою експресією CD19 та відсутністю поверхневої експресії CD138 (див., наприклад, Matsui et al., Blood, 103: 2332-6 (2004)). Ці клітини мають унікальну клоногенність та здатність до приживлення в мишей з імунodefіцитом, у той час як плазматичні клітини мієломи, визначені як CD138+CD19-, не є такими. Стовбурові клітини множинної мієломи також є стійкими до наявних засобів терапії (Matsui et al., Cancer Res., 68: 190-7 (2008)).

Кон'югат антитіла та лікарського засобу, описаний у даному документі, або композиція, яка містить кон'югат антитіла та лікарського засобу, можуть бути приведені в контакт із популяцією клітин множинної мієломи, що експресують ВСМА, *ex vivo*, *in vivo* або *in vitro*. "Ex vivo" стосується способів, що здійснюються всередині клітин або тканини або на них у штучному середовищі поза організмом із мінімальною зміною природних умов. На відміну від цього, термін "in vivo" стосується способу, що здійснюється усередині живих організмів у їхньому нормальному, інтактному стані, у той час як спосіб "in vitro" здійснюється із застосуванням компонентів організму, які були виділені з їхнього звичайного біологічного оточення. В одному варіанті здійснення клітини множинної мієломи є клітинами множинної мієломи людини, які приводять у контакт з ADC, описаним у даному документі, або композицією, яка містить ADC, *in vivo*.

Використовувані в даному документі терміни "лікування", "здійснення лікування" тощо стосуються одержання бажаного фармакологічного та/або фізіологічного ефекту. Ефект переважно є терапевтичним, тобто ефект забезпечує часткове або повне виліковування захворювання та/або несприятливого симптому, пов'язаного із захворюванням. З цією метою спосіб згідно з даним винаходом включає введення "терапевтично ефективної кількості" антитіла, або ADC, або композиції, яка містить антитіло або ADC та фармацевтично прийнятний носій. "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективної в дозах та протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість може варіюватися залежно від таких факторів, як хворобливий стан, вік, стать і маса тіла індивідуума та здатність антитіла або ADC викликати бажану відповідь в

індивідуума. Наприклад, терапевтично ефективна кількість ADC за даним винаходом являє собою кількість, яка зв'язується з ВСМА на клітинах множинної мієломи та руйнує їх.

Альтернативно, фармакологічний та/або фізіологічний ефект може бути профілактичним, тобто ефект забезпечує повне або часткове попередження захворювання або його симптому. Із цього погляду спосіб згідно з даним винаходом включає введення "профілактично ефективної кількості" ADC або композиції, яка містить ADC, ссавцю, який має схильність до множинної мієломи. "Профілактично ефективна кількість" стосується кількості, ефективної в дозах та протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного профілактичного результату (наприклад, попередження початку прояву захворювання).

Терапевтичну або профілактичну ефективність можна контролювати за допомогою періодичної оцінки пацієнтів, які одержують лікування. В одному варіанті здійснення ADC, описаний у даному документі, інгібує або пригнічує проліферацію клітин мієломи, що експресують ВСМА, на щонайменше приблизно 10 % (наприклад, на щонайменше приблизно 20 %, на щонайменше приблизно 30 %, на щонайменше приблизно 40 %, на щонайменше приблизно 50 %, на щонайменше приблизно 60 %, на щонайменше приблизно 70 %, на щонайменше приблизно 80 %, на щонайменше приблизно 90 % або на щонайменше приблизно 100 %). Проліферацію клітин можна вимірювати за допомогою будь-якого придатного способу, відомого з рівня техніки, такого як вимірювання включення мічених нуклеозидів (наприклад, 3H-тимідину або бромдезоксидуридину Brd(U)) до складу геномної ДНК (див., наприклад, Madhavan, H.N., J. Stem Cells Regen. Med., 3(1): 12-14 (2007)).

Антитіло або ADC, описані в даному документі, або композицію, яка містить ADC на основі антитіла, можна вводити ссавцю (наприклад, людині) за допомогою стандартних методик введення, в тому числі, наприклад, внутрішньовенного, внутрішньочеревинного, підшкірного. Більш переважно, антитіло або ADC або композицію, яка їх містить, вводять ссавцю шляхом внутрішньовенної ін'єкції.

Антитіло або ADC, описані в даному документі, або композицію, яка містить антитіло або ADC, можна вводити з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, які можна вводити ссавцю спільно. Термін "спільне введення", використовуваний у даному документі, стосується введення одного або декількох додаткових терапевтичних засобів та антитіла або ADC, описаних у даному документі, або композиції, яка містить антитіло або ADC, достатньо близько за часом одне від одного так, щоб антитіло або ADC могли посилювати ефект одного або декількох додаткових терапевтичних засобів або навпаки. У зв'язку з цим антитіло або ADC або композицію, яка їх містить, можна вводити в першу чергу, а один або декілька додаткових терапевтичних засобів можна вводити в другу чергу, або навпаки. Наприклад, антитіло або ADC або композицію, яка їх містить, можна вводити в комбінації з іншими засобами (наприклад, як ад'ювантами) для лікування або попередження множинної мієломи. Із цього погляду антитіло або ADC або композицію, яка містить антитіло або ADC, можна застосовувати в комбінації з щонайменше одним іншим протираковим засобом, в тому числі, наприклад, будь-яким придатним хімотерапевтичним засобом, відомим з рівня техніки, іонізуювальним випромінюванням, низькомолекулярними протираковими засобами, протираковими вакцинами, біологічними засобами терапії (наприклад, іншими моноклональними антитілами, вірусами, що знищують ракові клітини, генною терапією та адоптивним перенесенням Т-клітин) та/або хірургічним втручанням.

Наступні приклади додатково ілюструють даний винахід, але, звичайно, їх не слід тлумачити як такі, що будь-яким чином обмежують його обсяг.

#### ПРИКЛАД 1

У даному прикладі описане одержання моноклонального антитіла, спрямованого проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA).

Згідно із режимом імунізації RIMMS, описаним в Kilpatrick et al., Hybridoma, 16(4): 381-389 (1997), самиці трансгенних мишей Ablexis (Ablexis, LLC, Сан-Франциско, Каліфорнія) віком шість тижнів одержували шість циклів підшкірних ін'єкцій очищеного рекомбінантного BCMA-Fc людини (rHu) окремо (кампанія 1) або поперемінну імунізацію за допомогою як rHu BCMA-Fc, так і BCMA-Fc макаки-крабїда (Cupo BCMA-Fc) або адгезивних клітин 293 (Ad293), що експресують Hu BCMA або Cupo BCMA (кампанія 2), в декілька ділянок. Мишей імунізували протягом курсу 13 днів з інтервалами у 2-3 дні. У кожному циклі імунізації мишей спочатку анестезували ізофлураном. Імуноген емульгували в повному або неповному ад'юванті Фрейнда та ад'юванті TITERMAX® Gold (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі) та ін'єктували білатерально в декілька ділянок. Тестовані зразки крові збирали в день 13 та аналізували щодо зв'язування антигену за допомогою ELISA та FACS на адгезивних клітинах 293, що експресують BCMA людини та макаки-крабїда. Мишам із добрими титрами у сироватці крові внутрішньочеревинно

вводили бустерну ін'єкцію до злиття, і їх умертвляли в день 17. Клітини лімфатичних вузлів збирали та зливали з лінією клітин мієломи P3-X63-Ag8.653 згідно зі способом злиття, опосередкованого поліетилєнглїколем (Roche Diagnostics, Індіанapolis, Індіана), для одержання стабільних гібридом.

Гібридами, що виробляють антитїла, специфічні до BCMA, ідентифїкували шляхом скринінгу зразків надосадової рїдини культур гібридом в аналізі ELISA з прямим зв'язуванням з наступним FACS стосовно клітин Ad293, що експресують BCMA. Позитивні гібридами додатково тестували щодо їхньої здатності зв'язувати, інтерналізувати та знищувати клітини множинної мієломи NCI-H929 *in vitro* із застосуванням кон'югату на основі вторинного антитїла та сапорину Fab-ZAP (Advanced Targeting Systems, Сан-Дїєго, Калїфорнія, IT-48) та за допомогою аналізу зв'язування з ендogenous BCMA, що експресується в лініях клітин, за методом FACS. З урахуванням ефективності інтерналізації та знищення клітин гібридами потїм клонували методом граничних розведень і розмножували для очищення антитїл та збереження гена варїабельної ділянки.

В ходї першої кампанїї було одержано панель із 44 зв'язувальних засобів, які зв'язуються лише з антигенами людини, та 4 зв'язувальних засобів із перехресною реактивністю щодо антигенів людини та макаки-крабоїда. Цї 48 антитїл потїм додатково тестували за допомогою FACS стосовно адгезивних клітин 293, що експресують BCMA, та ліній клітин NCI-H929, що експресують ендogenous huBCMA. Лїдерну панель із 25 гібридомних ліній ідентифїкували шляхом ранжування антитїл за найлїпшим зв'язуванням з ендogenous BCMA людини. Загалом з 11 гібридами переходили до субклонування, збільшення масштабу, секвенування та очищення. Клони також оцінювали щодо знищення, опосередкованого Fab-ZAP. Одне антитїло (клон 4679) рекомбїнантно клонували як IgG1 людини для додаткового оцінювання.

В ходї другої кампанїї було одержано панель із 98 зв'язувальних засобів для імунїзації за допомогою BCMA-Fc gHu/Суно, дев'ять зв'язувальних антитїл для імунїзації за допомогою gHu/Суно BCMA-Fc та клітин Ad293, що експресують Суно BCMA, і жодного зв'язувального засобу для імунїзації за допомогою клітин Ad293, що експресують як Hu, так і Суно BCMA. Цї гібридами додатково тестували щодо зв'язування з TACI та BAFF-R за допомогою FACS, при цьому антитїла, що демонструють будь-яке виявлюване зв'язування з TACI та BAFF-R, вилучали. Цї процедури вторинного скринінгу разом з аналізом з Fab-ZAP зумовлювали ідентифїкацію восьми гібридом, які передавали на клонування методом граничних розведень (LDC). З урахуванням їхньої активності два клони (клони 756 та 15B2) потїм перетворювали на IgG1 людини для додаткового оцінювання.

Антитїла 4679, 756 та 15B2GL (описанї нижче) аналізували за допомогою FACS для оцінювання зв'язування антитїл із BCMA людини, BCMA макаки-крабоїда, TACI та BAFF-R із застосуванням рекомбїнантних форм рецепторів, що стабільно експресуються на клітинах Ad293. Аналізи зв'язування проводили шляхом інкубування антитїл 4679, 756 та 15B2GL із 200000 клітин при 4 °C протягом 45 хвилин із наступними двома промиваннями за допомогою PBS+2 % FBS. Потїм клітини інкубували з мїченими Alexa-Fluor 647 вторинними антитїлами при 4 °C із наступними двома промиваннями в PBS+2 % FBS. Мїчені APC антитїла до BAFF-R, TACI та BCMA людини додавали згідно з рекомендованим виробником розведенням у контрольні лунки. Клітини ресуспендували в 200 мкл PBS+2 % FBS+DAPI, і аналізували зв'язування антитїл з живими клітинами із застосуванням цитометра Becton Dickinson Biosciences LSRII. Антитїло 15B2GL було єдиним протестованим антитїлом з перехресною реактивністю щодо антигенів макаки-крабоїда, яке не зв'язувалося з BAFF-R та/або TACI, як показано на Фїг. 1.

Моноклональне антитїло 15B2 піддавали мутації з перетворенням на форму зародкового типу (15B2GL) із використанням праймерів, розроблених для здійснення мутації чотирьох залишків у 15B2, які не відповідають зародковому типу. ДНК 15B2 дикого типу використовували як матричну ДНК для мутагенезу QuikChange Lightning (Agilent Genomics, Санта-Клара, Калїфорнія). Клітини STBIII (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Волтем, Массачусетс) використовували для трансформації. Після перевірки послїдовності проводили аналізи зв'язування BCMA та кїнетичні аналізи для порівняння зв'язування 15B2GL та 15B2WT й одержували сукупність лїдерних оптимізованих (LO) клонів 15B2GL. Коротко кажучи, 15B2 клонували у вектор експресії FAb, розроблений для бактерїальної експресії. Кожен із двадцяти семи залишків важкого ланцюга та дев'ятнадцяти залишків легкого ланцюга піддавали економному мутагенезу із застосуванням праймерів, розроблених із забезпеченням можливості використання дев'ятнадцяти рїзних амінокислот, за винятком цистеїну. Мутагенез проводили із застосуванням набору для мутагенезу QuikChange Lightning (Agilent Genomics, Санта-Клара, Калїфорнія).

Прийблизно сто колонїї на положення піддавали скринінгу за допомогою ELISA щодо зв'язування у загальній кількостї 6000 клонів. Зв'язування під час ELISA вимїрювали шляхом

захоплення BCMA людини із низькою щільністю та з використанням надосадової рідини культури бактерій після 48 годин бактеріальної експресії. Хіти визначали як такі, що більш ніж удвічі перевищують показник для контролю 15B2GL. Окремі амінокислотні хіти підтверджували за допомогою ELISA для BCMA макаки-крабоїда без зв'язування з неспецифічним білком.

5 Ідентифіковані хіти після економного скринінгу потім об'єднували для розробки праймерів для одержання комбінаторної бібліотеки. Згаданий вище скринінговий підхід з Fab за допомогою аналізу зв'язування ELISA повторювали для комбінаторної бібліотеки з використанням 15B2GL як вихідної матриці та контролю для ELISA. Хіти, ідентифіковані після комбінаторного скринінгу, потім клонували у вектор експресії IgG у клітинах ссавців ("Maia"), розроблений для кон'югування з одержанням ADC. Забезпечували експресію білків у клітинах 293HEK, і їх очищали за допомогою афінної хроматографії з білком А для додаткового тестування.

10 Здатність антитіла 15B2GL та LO-клонів 15B2GL до зв'язування, інтерналізації та знищення клітин H929 множинної мієломи *in vitro* оцінювали з використанням Fab-ZAP та за допомогою аналізу зв'язування з ендегенним BCMA, що експресується в лініях клітин, описаних вище, за методом FACS. Коротко кажучи, антитіла інкубували з 200000 клітин протягом 30 хвилин при 4 °C із наступними двома промиваннями за допомогою PBS+2 % FBS. Клітини ресуспендували в 100 мкл холодного PBS+2 % FBS та витримували при 4 °C. У певні моменти часу клітини промивали та ресуспендували в теплому RPMI+10 % FBS та поміщали в інкубатор при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. У кінці експерименту клітини промивали, а потім інкубували з міченими Alexa-Fluor 647 вторинними антитілами при 4 °C із наступними двома промиваннями в PBS+2 % FBS. Клітини ресуспендували в 200 мкл PBS+2 % FBS+DAPI, і аналізували зв'язування антитіл з живими клітинами із застосуванням цитометра Becton Dickinson Biosciences LSR II. Антитіло 15B2GL демонструвало унікальну та швидку інтерналізацію згідно з цим способом порівняно з антитілом до BCMA J6M0 (описаним у патенті США 9273141) та LO-антитілами.

25 З урахуванням зв'язування BCMA, процедур кінетичного скринінгу (обговорюваних вище) та інтерналізації було відібране моноклональне антитіло 15B2GL, і п'ять LO-клонів (тобто I09, L15, P10, N22 та M02) були вибрані для очищення та кон'югування разом із 15B2GL.

30 Амінокислотні послідовності варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів моноклональних антитіл 15B2 (дикого типу та зародкового типу) та LO-клонів I09, L15, P10, N22 та M02 показані в таблиці 1.

| Антитіло                                        | Амінокислотна послідовність                                         |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| VH 15B2GL                                       | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL 15B2GL                                       | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH) 15B2WT | EIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| Варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL) 15B2WT | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| VH I09                                          | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL I09                                          | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| VH L15                                          | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL L15                                          | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| VH M02                                          | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL M02                                          | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| VH N22                                          | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL N22                                          | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |
| VH P10                                          | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVK   |
| VL P10                                          | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSG |

Результати цього прикладу демонструють одержання моноклональних антитіл, спрямованих проти ВСМА.

#### ПРИКЛАД 2

У даному прикладі продемонстрований спосіб одержання кон'югату антитіла та лікарського засобу (ADC), який містить моноклональне антитіло до ВСМА, кон'юговане з цитотоксином, згідно з даним винаходом.

Моноклональне антитіло 15B2GL та оптимізовані клони, описані в прикладі 1, кон'югували з корисним навантаженням PBD SG3249 за допомогою сайт-специфічного кон'югування (Thompson et al., J. Control Release, 236: 100-116 (2016); Dimasi et al. Mol Pharm. 2017 May 1;14(5):1501-1516). Зокрема, очищене антитіло інкубували із 40-кратним молярним надлишком відновника TCEP (трис(2-карбоксіетил)фосфіну) у PBS, pH 7,2, з 1 mM EDTA (етилендіамінтетраоцтової кислоти) протягом 3 годин при 37 °C. Після інкубування відновник видаляли шляхом 2X діалізу в PBS, pH 7,2, з 1 mM EDTA при 4 °C із застосуванням касет для діалізу з MWCO 10000 із наступним інкубуванням з 20 молярними еквівалентами дегідроаскорбінової кислоти протягом чотирьох годин при 25 °C. Потім послідовно додавали вісім еквівалентів корисного навантаження PBD SG3249 із вихідного розчину в 10 % (об./об.) DMSO з наступним інкубуванням за кімнатної температури протягом однієї години з плавним обертанням. Реакцію кон'югування гасили шляхом додавання чотирьох молярних еквівалентів (щодо SG3249) N-ацетилцистеїну.

Процес кон'югування зумовлював 8-10 % ступінь утворення агрегатів. Макромолекулярні агрегати, реагенти для кон'югування, включаючи гашений цистеїном SG3249, видаляли за допомогою хроматографії на керамічному гідроксиапатиті II типу (CHT), як описано раніше (Thompson et al., J. Control Release, 236: 100-116 (2016)). Сайт-специфічні ADC складали в 25 mM гістидині-HCl, 7 % сахарозі, 0,02 % полісорбаті-80, pH 6.

Для визначення вмісту мономерів, кількості агрегатів та фрагментів проводили аналітичну ексклюзійну хроматографію (SEC-HPLC) із застосуванням 100 мкг (в об'ємі 100 мкл) антитіл або ADC, які завантажували в колонку TSKgel G3000WXL (Tosoh Bioscience, Токіо, Японія). Рухома фаза складалася з 0,1 M сульфату натрію, 0,1 M фосфату натрію та 10 % ізопропанолу, pH 6,8. Швидкість потоку становила 1 мл/хв., а кожний аналіз проводили протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Хроматографію гідрофобних взаємодій (HIC-HPLC) застосовували для оцінки кон'югування та розподілу навантаження лікарського засобу та проводили з використанням колонки з непоруватою смолою з бутильними групами (NPR) (ID 4,6 мкм × 3,5 см, 2,5 мкм, Tosoh Bioscience). Рухома фаза А складалася з 25 mM трис-HCl, 1,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,0; а рухома фаза В складалася з 25 mM трис-HCl та 5 % ізопропанолу, pH 8,0. 100 мкл антитіл або ADC у концентрації 1 мг/мл завантажували та елюювали зі швидкістю потоку 1 мл/хв. із градієнтом від 5 % В до 100 % В протягом 13 хв. Відновлювальну обернено-фазову хроматографію (rRP-HPLC) застосовували для підтвердження кон'югування, специфічного щодо ланцюга. Антитіла та ADC піддавали відновленню при 37 °C протягом 20 хвилин із використанням 42 mM дитіотреїтолу (DTT) у PBS (pH 7,2). 10 мкг відновлених антитіл або ADC завантажували в колонку з полімерним обернено-фазовим середовищем (PLRP-S) на 1000 Å (2,1 × 50 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія) та елюювали за 80 °C зі швидкістю потоку 1 мл/хв. із градієнтом від 5 % В до 100 % В протягом 25 хвилин (рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтова кислота у воді, рухома фаза В: 0,1 % трифтороцтова кислота в ацетонітрилі).

Кон'югування за важкими та легкими ланцюгами та співвідношення лікарський засіб:антитіло (DAR) визначали за допомогою аналізу за методом відновлювальної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (rLCMS), який проводили на пристрої для uHPLC серії Agilent 1290, з'єднаному з TOF Agilent 6230 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія). 2 мкг відновлених антитіл або ADC завантажували в колонку ZORBAX для швидкого розділення з високою роздільною здатністю (RRHD) з 300-дифенілом (2,1 × 50 мм, 1,8 мкм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія) та елюювали зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв. із застосуванням ступеневого градієнта 80 % В після 2,1 хв. (рухома фаза А: 0,1 % мурашина кислота у воді та рухома фаза В: 0,1 % мурашина кислота в ацетонітрилі). Одержували сканограму часопротіної MS у режимі позитивної іонізації, а збір та обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення MassHunter (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія). DAR розраховували з використанням даних rLCMS, як описано в Thompson et al., вище.

Ефективність кон'югування визначали за допомогою наступного рівняння, де використовували теоретичне DAR, що дорівнює 2:

$$\text{Ефективність кон'югування} = (\text{визначене DAR} \times \text{теоретичне DAR}) \times \frac{1}{100}$$

Значення ефективності кон'югування та DAR тестованих антитіл представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

| Назва конструкції | Корисне навантаження | Ефективність кон'югування | Співвідношення лікарський засіб:антитіло (DAR) |
|-------------------|----------------------|---------------------------|------------------------------------------------|
| 15B2GL            | SG3249               | 91                        | 1,82                                           |
| I09               | SG3249               | 91                        | 1,82                                           |
| L15               | SG3249               | 90                        | 1,80                                           |
| M02               | SG3249               | 92                        | 1,84                                           |
| N22               | SG3249               | 91                        | 1,82                                           |
| P10               | SG3249               | 93                        | 1,86                                           |

- 5 Результати цього прикладу демонструють одержання ADC, які містять моноклональне антитіло до BCMA, кон'юговане з піролобензодіазепіном, згідно з даним винаходом.

### ПРИКЛАД 3

У даному прикладі продемонстрована афінність зв'язування моноклональних антитіл до BCMA, описаних у даному документі, із мономерним (розчинним) та мембранозв'язаним BCMA.

- 10 Зв'язування моноклонального антитіла 15B2GL та оптимізованих клонів I09, L15, P10, N22 та M02 (описаних у прикладі 1) оцінювали з використанням мономерного sBCMA людини (GenScript, Піскатавей, Нью-Джерсі) за допомогою пристрою ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Геркулес, Каліфорнія). Зв'язування J6M0 також оцінювали для порівняння. Застосовували стандартне зв'язування за аміногрупою для іммобілізації 25 мкг/мл поліклонального антитіла до Fc (Jackson ImmunoResearch, Вест-Гроув, Пенсільванія), одержаного в 10 мМ натрій-ацетатного буфера (pH 4,5), на поверхні біосенсорного чипа ProteOn GLC (Bio-Rad, Геркулес, Каліфорнія), попередньо активованого за допомогою 20 мМ EDAC (гідрохлориду 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду) та 5 мМ сульфо-NHS (N-гідрокисульфосукциніміду), із щільністю ~ 200–600 резонансних одиниць (RU). 15B2GL, I09, L15, P10, N22, M02 та J6M0
- 15 послідовно вводили в концентрації 1 мкг/мл для захоплення іммобілізованим поліклональним антитілом до Fc. Сенсограму реєстрували за допомогою пропускання двократних серійних розведень sBCMA, одержаного в PBS (pH 7,4) із 0,005 % (об./об.) Tween-20, у діапазоні 100–6,25 нМ над поверхнею із захопленими антитілами протягом 150 секунд при 75 мкл/хвилина з часом дисоціації 600 секунд. Для аналізу даних застосовували програмне забезпечення для
- 20 аналізу даних ProteOn.

Результати даного експерименту показані на Фіг. 13 та Фіг.14 і в таблиці 3.

Таблиця 3

### Вимірювання показників кінетики із застосуванням ProteOn від BioRad

| Антитіло | Kon      | Koff     | Kd       | нМ   |
|----------|----------|----------|----------|------|
| 15B2GL   | 3,73E+05 | 2,27E-02 | 6,07E-08 | 60,7 |
| N22      | 5,36E+05 | 8,73E-03 | 1,63E-08 | 16   |
| I09      | 6,09E+05 | 5,99E-03 | 9,82E-09 | 9,8  |
| M02      | 4,99E+05 | 4,97E-03 | 9,95E-09 | 9,9  |
| L15      | 8,54E+05 | 3,86E-03 | 4,51E-09 | 4,5  |
| P10      | 7,01E+05 | 3,73E-03 | 5,32E-09 | 5,3  |
| J6M0     | 4,21E+05 | 4,69E-04 | 1,11E-09 | 1    |

- 30 Зв'язування 15B2GL, I09, L15 та J6M0 із мембранозв'язаним BCMA людини оцінювали за допомогою проточної цитометрії в лініях клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу, які ендogenно експресують BCMA (NCI-H929 та MM.1S відповідно). Зв'язування 15B2GL, I09, L15 із мембранозв'язаним BCMA людини також оцінювали на клітинах Ad293, що експресують BCMA людини. Аналізи зв'язування проводили шляхом інкубування антитіл до BCMA з 200000 клітин протягом 30 хвилин при 4 °C із наступними двома промиваннями за
- 35 допомогою PBS+2 % FBS (буфера для FACS). Діапазон концентрацій антитіла оцінювали із

застосуванням серії 3-кратних розведень за 12 точками. Потім клітини інкубували з 5 мкг/мл вторинних антитіл кози до IgG людини, мічених AF647 (Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс) при 4 °C із наступними двома промиваннями в PBS+2 % FBS. Клітини ресуспендували в 200 мкл PBS+2 % FBS+DAPI.

- 5 Флуоресценцію живих окремих клітин вимірювали із застосуванням цитометра BD Biosciences LSRII та програмного забезпечення BD FACSDiva (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення FlowJo (FlowJo, LLC, Ешленд, Орегон). Середні значення інтенсивності флуоресценції використовували для визначення відсоткової величини зв'язування, а EC50 визначали із застосуванням програмного
- 10 забезпечення Prism (GraphPad Software Inc, Ла-Хойя, Каліфорнія). Результати даного експерименту показані на Фіг. 15. Узагальнені дані про "позірну афінність", виміряну за допомогою SPR та проточної цитометрії, показані в таблиці 4.

Таблиця 4

| Антитіло | Афінність зв'язування (нМ), мономерний BCMA | Позірна афінність (нМ), BCMA, зв'язаний із клітинами |       |              |
|----------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------|--------------|
|          |                                             | NCI-H929                                             | MM.1S | Ad293+huBCMA |
| 15B2GL   | 60,7                                        | 3,14                                                 | 2,56  | 3,87         |
| N22      | 16                                          | ND                                                   | ND    | ND           |
| I09      | 9,8                                         | 5,4                                                  | 4,8   | 5,3          |
| M02      | 9,9                                         | ND                                                   | ND    | ND           |
| L15      | 4,5                                         | 4,2                                                  | 4,2   | 4,48         |
| P10      | 5,3                                         | ND                                                   | ND    | ND           |
| J6M0     | 1                                           | 6,02                                                 | 6,65  | ND           |

- 15 ND = не визначено

Результати даного прикладу демонструють, що моноклональне антитіло до BCMA 15B2GL характеризується сильним зв'язуванням із мембранозв'язаним BCMA і слабким зв'язуванням із мономерним (розчинним) BCMA, і воно з цього погляду є унікальним серед інших моноклональних антитіл, які аналізували в цих аналізах.

- 20 ПРИКЛАД 4

У даному прикладі продемонстровані способи знищення клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу *in vitro* із застосуванням кон'югатів антитіла та лікарського засобу, описаних у даному документі.

- 25 Знищення ліній клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу за допомогою кон'югатів антитіла та лікарського засобу, які містять 15B2GL або його клони з оптимізованою афінністю, кон'юговані з SG3249, оцінювали *in vitro* із застосуванням протоколу, рекомендованого в наборі CELLTITER-GLO® (Promega, Медісон, Вісконсин). Знищення ліній клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу за допомогою вільного вражального елемента SG3199 також оцінювали із застосуванням протоколу, рекомендованого в наборі
- 30 CELLTITER-GLO® (Promega, Медісон, Вісконсин). Коротко кажучи,  $5 \times 10^3$  клітин у 80 мкл RPMI+10 % FBS додавали у внутрішні лунки 96-лункових планшетів з білими стінками (Corning® Costar®, Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс). Тестували наступні лінії клітин, що експресують BCMA: NCI-H929, EJM, MM.1R, JJN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1 та L363. BCMA-негативні лінії клітин Raji та Jurkat також тестували. Кон'югати антитіла та лікарського засобу розводили до одержання 5х вихідного розчину (2,5 мкг/мл) у RPMI+10 % FBS. Засоби обробки потім серійно розводили 1:3 в RPMI+10 % FBS. 20 мкл цих серійних розведень додавали до клітин у двох повторностях з одержанням у результаті кривої залежності від дози кон'югату антитіла та
- 35 лікарського засобу за 12 точками в діапазоні від найвищої концентрації 0,5 мкг/мл до найнижчої концентрації  $3 \times 10^{-6}$  мкг/мл. Контролі, що являють собою кон'югат ізотипового антитіла та лікарського засобу (IgG1-SG3249 та IgG1-mc-MMAF) та тільки середовище, також включали. Планшети інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 96 годин. Наприкінці періоду інкубування в кожну лунку додавали 100 мкл розчину субстрату (Promega, Медісон, Вісконсин). Люмінесценцію вимірювали за допомогою багатоканального планшет-рідера EnVision (Perkin Elmer, Волтем, Массачусетс). Дані аналізували та представляли графічно за допомогою
- 40 програмного забезпечення GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія), і визначали концентрацію напівмаксимального інгібування (IC50).

Інформацію щодо хромосомних транслокацій для кожної лінії клітин брали з Moreaux et al,

2011 та Boersma-Vreugdenhil et al, 2004. Кількість рецепторів BCMA визначали з використанням 15B2, міченого AF647 (набір для мічення білків Alexa Fluor 647, Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс), та набору Quantum™ MESF для Alexa Fluor 647 (Bangs Laboratories, Фішерс, Індіана).

5 Результати даного експерименту показані в таблиці 5 та на Фіг. 2A-2J.

Таблиця 5

Цитотоксичність in vitro у лініях клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу

| Лінія клітин | Походження захворювання | Хромосомна транслокація | Кількість рецепторів BCMA | 15B2GL-SG3249, IC50 (нг/мл) | SG3199, IC50 (нМ) |
|--------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------|
| NCI-H929     | MM                      | t(4;14)                 | 18931                     | 5,99                        | 5                 |
| EJM          | MM                      | t(14;20)                | 14325                     | 153                         | 22                |
| MM.1R        | PCL                     | t(14;16)                | 9449                      | 8,64                        | 3                 |
| JJN-3        | MM                      | t(14;16)                | 3221                      | 36,28                       | 13                |
| OPM-2        | MM                      | t(4;14)                 | 2873                      | 201                         | 19                |
| MM.1S        | PCL                     | t(14;16)                | 2698                      | 26,8                        | 3                 |
| U266B1       | MM                      | t(11;14)                | 2340                      | 39,7                        | 155               |
| L-363        | PCL                     | t(20;22)                | 930                       | 31,4                        | NT                |
| Raji         | Лімфома Беркитта        | NA                      | 0                         | > 500                       | NT                |
| Jurkat       | T-лімфоцити             | NA                      | 0                         | > 500                       | 3                 |

BCMA = антиген дозрівання В-клітин; NA = дані відсутні; NT = не тестували

10 Здатність ADC 15B2GL-SG3249 знищувати клітини множинної мієломи in vitro у присутності розчинного BCMA (sBCMA) порівняно з ADC I09-SG3249 оцінювали в клітинах MM.1S за допомогою описаного вище протоколу за винятком того, що тестовані лінії клітин також оброблювали кондиціонованим середовищем, що містить BCMA, зібраним від клітин Ad293, що експресують BCMA людини (Фіг. 3A і 3B). Знищення клітин за допомогою ADC 15B2GL-SG3249 у присутності sBCMA також порівнювали з ADC, які містять антитіло до BCMA J6M0, яке описано в патенті США 9273141. Результати даного експерименту показані на Фіг. 3, на якій продемонстровано, що активність ADC 15B2GL-SG3249 підтримується у присутності клінічно значущих рівнів sBCMA більшою мірою, ніж ADC I09-SG3249 (Фіг. 3A), J6M0-mc-MMAF та J6M0-SG3249 (Фіг. 3B та таблиця 6).

Таблиця 6

| sBCMA (нг/мл) | Тестований препарат | IC50 (нг/мл) | Кратність втрати ефективності |
|---------------|---------------------|--------------|-------------------------------|
| 720           | 15B2GL-SG3249       | 29,12        | 2,01                          |
| 270           | 15B2GL-SG3249       | 22,86        | 1,58                          |
| 75            | 15B2GL-SG3249       | 16,09        | 1,11                          |
| 0             | 15B2GL-SG3249       | 14,47        | 1,00                          |
| 720           | J6M0-SG3249         | 92,92        | 19,29                         |
| 270           | J6M0-SG3249         | 32,26        | 6,70                          |
| 75            | J6M0-SG3249         | 12,83        | 2,66                          |
| 0             | J6M0-SG3249         | 4,816        | 1,00                          |
| 720           | I09-SG3249          | 16,16        | 5,75                          |
| 270           | I09-SG3249          | 5,548        | 1,98                          |
| 75            | I09-SG3249          | 3,791        | 1,35                          |
| 0             | I09-SG3249          | 2,809        | 1,00                          |
| 720           | J6M0-mc-MMAF        | 1458         | 49,80                         |
| 270           | J6M0-mc-MMAF        | 159,7        | 5,45                          |
| 75            | J6M0-mc-MMAF        | 55,55        | 1,90                          |
| 0             | J6M0-mc-MMAF        | 29,28        | 1,00                          |

20

Результати даного прикладу демонструють, що ADC 15B2GL-SG3249 знищує клітини множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу in vitro та що активність знищення клітин

підтримується навіть у присутності розчинного BCMA. Зокрема, ADC 15B2GL-SG3249 був цитотоксичним як для MM.1S, так і для NCI-H929 *in vitro*, знищуючи в середньому 95 % пухлинних клітин у присутності sBCMA на рівнях, що становлять не більше ніж 720 нг/мл, із невеликим впливом на IC50. ADC, розроблені на основі антитіл, які мають подібну афінність до мономерного BCMA та мембранозв'язаного BCMA, демонстрували зниження ефективності, залежне від дози sBCMA, із 20-кратним зсувом IC50 у присутності 720 нг/мл sBCMA.

#### ПРИКЛАД 5

У даному прикладі продемонстровані способи знищення клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу *in vivo* із застосуванням кон'югатів антитіла та лікарського засобу, описаних у даному документі.

Підшкірні ксенотрансплантатні мишачі моделі множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу створювали шляхом імплантації ліній клітин множинної мієломи або плазмоклітинного лейкозу, що експресують BCMA (тобто NCI-H929, JJN-3, MM.1S та MM.1R), самицям мишей CB-17 зі SCID (C.B-17/lcrHsd-Prkdc-scid) або безтимусних "голих" (Foxn1<sup>nu</sup>) мишей із застосуванням MATRIGEL™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія). Коли пухлини досягали приблизно 180 мм<sup>3</sup> (клітини NCI-H929), 190 мм<sup>3</sup> (клітини JJN3), 160 мм<sup>3</sup> (клітини MM.1S) або 175 мм<sup>3</sup> (клітини MM.1R), мишей рандомізували згідно з розміром пухлини та поміщали в групи введення доз та обробляли за допомогою ADC, що націлюються на BCMA, як описано нижче.

#### Ксенотрансплантатна модель NCI-H929

Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 0,3 мг/кг ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, або їм внутрішньовенно вводили дози J6M0-мс-MMAF один раз на тиждень в дозі 0,3 мг/кг протягом 2 тижнів. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 та L15-SG3249, спостерігали протягом 99 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 4. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

#### Ксенотрансплантатна модель JJN3

Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 1 мг/кг ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 та L15-SG3249, або їм внутрішньовенно вводили дози ADC J6M0-мс-MMAF один раз на тиждень в дозі 1 мг/кг протягом 3 тижнів. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 та L15-SG3249, спостерігали протягом 104 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 5. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

#### Ксенотрансплантатна модель MM.1S

Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 1 мг/кг ADC 15B2GL-SG3249, I09-SG3249, L15-SG3249, або їм внутрішньовенно вводили дози J6M0-мс-MMAF два рази на тиждень в дозі 1 мг/кг протягом 4 тижнів. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 15B2GL-SG3249, I09-SG3249 та L15-SG3249, спостерігали протягом 99 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 6. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

#### Ксенотрансплантатна модель MM.1R

Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 1 мг/кг 15B2GL-SG3249, або їм внутрішньовенно вводили дози J6M0-мс-MMAF один раз на тиждень в дозі 3 мг/кг протягом 4 тижнів. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 15B2GL-SG3249, спостерігали протягом 109 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 7. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

Результати даного прикладу демонструють, що ADC 15B2GL-SG3249 проявляє підвищену протипухлинну ефективність *in vivo* порівняно з іншими ADC, які націлюються на клітини, що експресують BCMA.

#### ПРИКЛАД 6

У даному прикладі продемонстровано, що стовбурові клітини множинної мієломи експресують BCMA.

У кістковому мозку пацієнтів із множинною мієломою (MM) міститься невелика популяція ракових стовбурових клітин (CSC), які можна ідентифікувати в кістковому мозку пацієнтів за їхньою поверхневою експресією CD19 та відсутністю поверхневої експресії CD138 (Matsui et al., Blood, 103: 2332-6 (2004)).

Експресію BCMA оцінювали у популяції стовбурових клітин у зразках від чотирьох пацієнтів із множинною мієломою за допомогою проточної цитометрії. Зразки одержували від Proteogenex, Inc. (Калвер-Сіті, Каліфорнія) (див. таблицю 7), і окремі зразки множинної мієломи (MM) розморожували на водяній бані при 37°C.

Таблиця 7

## Інформація про пацієнтів з MM

| ID зразка | Стать | Вік | Етнічна приналежність | Клінічний діагноз | Статус захворювання    |
|-----------|-------|-----|-----------------------|-------------------|------------------------|
| MM263BM   | M     | 63  | Європеоїдна раса      | MM                | Установлений діагноз   |
| MM277BM   | F     | 66  | Європеоїдна раса      | MM                | Установлений діагноз   |
| MM276BM   | F     | 81  | Європеоїдна раса      | MM                | Установлений діагноз   |
| MM284BM   | M     | 84  | Європеоїдна раса      | MM                | Резистентне до терапії |

Розморожені клітини додавали до 10 мл PBS та підраховували із застосуванням лічильника ViCELL™ (Beckman-Coulter Life Sciences, Індіанаполіс, Індіана). Аліквоту суспензії клітин одержували для аналізу утворення колоній, у той час як решту суспензії клітин центрифугували за низької швидкості для осадження клітин. Клітини піддавали блокуванню Fc-рецепторів згідно з інструкціями виробника, потім висівали у кількості 200000 клітин на лунку в 96-лунковий планшет. Планшет центрифугували для осадження клітин, розчин для блокування Fc-рецепторів зливали, і зразки клітин ресуспендували в буфері для забарвлювання BV із наступним забарвлюванням за допомогою відповідної панелі антитіл, що складається з безпосередньо кон'югованих антитіл з комерційних джерел, які показані в таблицях 8 і 9.

Таблиця 8

## Панель антитіл для забарвлювання

| Зразок | Опис                         | Панель антитіл                                                                        |
|--------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Окремий барвник BV510        | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510                                        |
| 2      | Окремий барвник PE           | CD138-PE                                                                              |
| 3      | Окремий барвник APC          | CD19-APC                                                                              |
| 4      | Окремий барвник PE/Cy7       | BCMA-PE/Cy7                                                                           |
| 5      | Без забарвлювання            |                                                                                       |
| 6      | Окремий барвник DAPI         | DAPI                                                                                  |
| 7      | FMO (BV510)                  | CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI                                                 |
| 8      | FMO (PE)                     | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI           |
| 9      | FMO (APC)                    | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, BCMA-PE/Cy7, DAPI           |
| 10     | FMO (PE/Cy7)                 | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, DAPI              |
| 11     | Всі барвники                 | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7, DAPI |
| 12     | FMO (DAPI)                   | CD3-BV510, CD34-BV510, CD14-BV510, CD193-BV510, CD138-PE, CD19-APC, BCMA-PE/Cy7       |
| 13     | Компенсаційні гранули BV510  | CD193-BV510                                                                           |
| 14     | Компенсаційні гранули з PE   | CD138-PE                                                                              |
| 15     | Компенсаційні гранули з APC  | CD19-APC                                                                              |
| 16     | Компенсаційні гранули PE/Cy7 | BCMA-PE/Cy7                                                                           |

Таблиця 9

Антитіла, застосовувані для аналізу за методом проточної цитометрії

| Антитіло/реагент                          | Клон   | Постачальник            | № за кат.  |
|-------------------------------------------|--------|-------------------------|------------|
| CD3-BV510                                 | OKT3   | Biolegend               | 317332     |
| CD34-BV510                                | 581    | Biolegend               | 343528     |
| CD14-BV510                                | M5E2   | Biolegend               | 301842     |
| CD193-BV510                               | 5E8    | Biolegend               | 310722     |
| CD19-APC                                  | SJ25C1 | BD Biosciences          | 340437     |
| CD138-PE                                  | B-A38  | Beckman Coulter         | A40316     |
| BCMA-PE/Cy7                               | 19F2   | Biolegend               | 357508     |
| DAPI                                      |        | ThermoFisher Scientific | 62248      |
| Fc Block                                  |        | BD Pharmingen           | 564220     |
| Буфер для забарвлювання Horizon Brilliant |        | BD Biosciences          | 563794     |
| Гранули UltraComp                         |        | eBiosciences            | 01-2222-42 |

Крім того, компенсаційні гранули забарвлювали окремо тестованими антитілами. Планшет інкубували при 4°C у темряві протягом 30 хвилин. Планшет центрифугували, і клітини промивали в DPBS+2 % FBS із наступним ресуспендуванням у 200 мкл DPBS+2 % FBS+DAPI. Клітини з кожної лунки оцінювали на проточному цитометрі BD LSR II (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія), і створювали FCS-файли. Ідентифікацію клітин проводили із застосуванням наступної стратегії гейтування: компенсацію проводили за допомогою автоматичної комп'ютерної матриці у FlowJo®10 (FlowJo LLC, Ешленд, Орегон) із використанням даних про компенсаційні гранули та окремі барвники. Плазматичні клітини гейтували за графіком FSC-A проти SSC-A, потім відбирали окремі живі клітини за графіком флуоресценції DAPI проти SSC-W. Потім застосовували виключне гейтування для вилучення клітин, які характеризувалися позитивним забарвленням щодо CD3, CD14, CD34 та CD193, за графіком флуоресценції BV-510 проти SSC-A. Цю популяцію потім аналізували на графіку флуоресценції CD138-PE проти CD19-APC. Гістограми експресії BCMA створювали для популяції CSC MM, визначеної як CD19+/CD138-, і популяції плазматичних клітин MM, визначеної як CD19-/CD138+. Аналітичні гейти встановлювали з урахуванням відповідних контролів флуоресценції із комбінацією детектовних міток без однієї (FMO). Усі зразки демонстрували невелику відсоткову частку клітин CD138+CD19-, які були позитивними щодо експресії BCMA, як показано на Фіг. 7. Рівень експресії BCMA в популяції стовбурових клітин зазвичай дорівнював рівню, спостережуваному в плазматичних клітинах, за винятком MM277, де рівень був нижчим, але все ще позитивним щодо експресії BCMA.

Результати даного прикладу демонструють, що BCMA експресується на ракових стовбурових клітинах множинної мієломи.

#### ПРИКЛАД 7

У даному прикладі продемонстровано, що кон'югат антитіла та лікарського засобу 15B2GL-SG3249 знищує стовбурові клітини множинної мієломи.

Оскільки стовбурові клітини MM здатні утворювати колонії in vitro (Matsui et al., Blood, 103: 2332-6 (2004)), тестували здатність ADC 15B2GL-SG3249, охарактеризованого в прикладі 2, знищувати клоногенні клітини в біоптатах кісткового мозку пацієнтів із MM. Зокрема, клітини підраховували із застосуванням лічильника ViCELL™ (Beckman-Coulter Life Sciences, Індіанapolis, Індіана) та ресуспендували в IMDM+2 % FBS за щільності, у 10 разів вищої, ніж потрібно для висівання. METHOCULT™ H4434 Classic (StemCell Technologies, Inc., Ванкувер, Британська Колумбія, Канада) змішували з 2000 клітин на мл у випадку з MM263, MM284 та MM276 та 4000 клітин на мл у випадку з MM277 згідно з інструкціями виробника. Потім у відповідні пробірки додавали 25-400 нг на мл тестованих ADC 15B2GL-SG3249 та J6M0-mc-MMAF. Контрольне антитіло IgG1-SG3249 додавали тільки у високій дозі 400 нг на мл. Усі пробірки ретельно струшували для перемішування, а потім залишали в стані спокою, що давало змогу бульбашкам повітря підніматися вгору. Після того, як бульбашки піднімалися, 400 мкл видаляли за допомогою голки з тупим кінцем 16 калібру та обережно висівали в одну лунку 24-лункового планшета з наднизькою адгезією (VWR, Раднор, Пенсільванія). Кожен засіб обробки висівали у двох повторностях у внутрішні лунки планшета. У зовнішні лунки додавали PBS, і планшет інкубували при 37°C протягом 7-10 днів. Колонії підраховували на око з

документуванням утворення колонії шляхом сканування планшетів на відображувальному цитометрі Celigo® (Nexcelom Biosciences, Лоренс, Массачусетс). Як показано на Фіг. 8, у всіх 4 випадках 15B2GL-SG3249 був здатний знищувати клоногенні клітини, у той час як J6M0-мс-MMAF - ні. У найвищій протестованій дозі (400 нг/мл) 15B2GL-SG3249 був здатний знищувати 100 % колоній у випадку з MM263 та MM284 та 87,5 % і 91 % колоній у випадку з MM276 та MM277 відповідно. На відміну від цього, 400 нг/мл J6M0-мс-MMAF не зменшували кількість утворюваних колоній у випадку з MM263 і зумовлювали зменшення утворення колоній лише на 12,5 %, 40 % та 50 % у випадку з MM276, MM277 та MM284 відповідно.

Результати цього прикладу демонструють, що кон'югат антитіла та лікарського засобу 15B2GL-SG3249 націлюється на ракові стовбурові клітини множинної мієломи, що експресують BCMA, і знищує їх.

#### ПРИКЛАД 8

У даному прикладі продемонстровані способи знищення клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу *in vitro* із застосуванням кон'югатів антитіла та лікарського засобу, описаних у даному документі.

Знищення ліній клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу за допомогою кон'югатів антитіла та лікарського засобу, які містять 15B2GL, кон'югований з SG3400, оцінювали *in vitro* із застосуванням набору CELLTITER-GLO® (Promega, Медісон, Вісконсин) відповідно до описаного в прикладі 4. Тестували наступні лінії клітин, що експресують BCMA: NCI-H929, EJM, MM.1R, JLN3, OPM-2, MM.1S, U266.B1 та L363. BCMA-негативні лінії клітин Raji та Jurkat також тестували. Кон'югати антитіла та лікарського засобу розводили до одержання 5х вихідного розчину (25 мкг/мл) у RPMI+10 % FBS. Засоби обробки потім серійно розводили 1:3 в RPMI+10 % FBS. 20 мкл цих серійних розведень додавали до клітин у двох повторностях з одержанням у результаті кривої залежності від дози кон'югату антитіла та лікарського засобу за 12 точками в діапазоні від найвищої концентрації 5 мкг/мл до найнижчої концентрації  $2,8 \times 10^{-5}$  мкг/мл. Контролі, що являють собою кон'югат ізотипового антитіла та лікарського засобу (IgG1-SG3400) та тільки середовище, також включали. Планшети інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 96 годин. Наприкінці періоду інкубування в кожну лунку додавали 100 мкл розчину субстрату (Promega, Медісон, Вісконсин). Люмінесценцію вимірювали за допомогою багатоканального планшет-рідера EnVision (Perkin Elmer, Волтем, Массачусетс). Дані аналізували та представляли графічно за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія). Результати даного експерименту показані на Фіг. 10A-10J.

Результати цього прикладу демонструють, що ADC 15B2GL-SG3400 знищує клітини множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу *in vitro*.

#### ПРИКЛАД 9

У даному прикладі продемонстровані способи знищення клітин множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу *in vivo* із застосуванням кон'югатів антитіла та лікарського засобу, описаних у даному документі.

Підшкірні ксенотрансплантатні мишачі моделі множинної мієломи та плазмоклітинного лейкозу створювали шляхом імплантації ліній клітин множинної мієломи або плазмоклітинного лейкозу, що експресують BCMA (тобто NCI-H929 та MM.1S), самицям мишей CB-17 зі SCID (C.B-17/lcrHsd-Prkdc-scid) із застосуванням MATRIGEL™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія). Коли пухлини досягали приблизно 200 мм<sup>3</sup> (клітини NCI-H929) або 180 мм<sup>3</sup> (клітини MM.1S), мишей рандомізували згідно з розміром пухлини та поміщали в групи введення доз та обробляли за допомогою ADC, що націлюється на BCMA, як описано нижче.

##### Ксенотрансплантатна модель NCI-H929

[0112] Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 1 мг/кг ADC IgG1-SG3400 або 0,3 мг/кг або 1 мг/кг 15B2GL-SG3400, або їм внутрішньовенно вводили дози J6M0-SG3400 в одноразовій дозі 0,3 мг/кг або 1 мг/кг. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 15B2GL-SG3400, спостерігали протягом 74 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 11. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

##### Ксенотрансплантатна модель MM.1S

Мишей обробляли одноразовою внутрішньовенною дозою 1 мг/кг або 3 мг/кг ADC IgG1-SG3400 або 15B2GL-SG3400, або їм внутрішньовенно вводили дози J6M0-SG3400 в дозі 1 мг/кг або 3 мг/кг. Контрольних мишей залишали необробленими. Мишей, оброблених за допомогою 3 мг/кг J6M0-SG3400, спостерігали протягом 85 днів після імплантації пухлини, при цьому ознаки відновлення росту пухлини були відсутні, як показано на Фіг. 12. У жодній із груп введення доз не спостерігалася втрата маси тіла.

Результати цього прикладу демонструють, що ADC 15B2GL-SG3400 проявляє протипухлинну ефективність *in vivo*.

Дані, описані у прикладах, демонструють, що ADC, який містить моноклональне антитіло 15B2GL, проявляє сильну протипухлинну активність у доклінічних моделях ММ. Важливо відзначити, що експерименти *in vitro* дозволяють припустити, що ця активність підтримується у присутності sBCMA. Ці дані додатково демонструють, що ADC 15B2GL-SG3249, який несе сильнодійне корисне навантаження PBD, ефективно націлюється як на масу плазматичних клітин мієломи, так і на менш активні клоногенні клітини CD19+/CD138-, що може дати можливість забезпечення більш тривалої клінічної відповіді за наявності цього генетично неоднорідного захворювання.

Усі літературні джерела, в тому числі публікації, заявки на патенти та патенти, що цитуються в даному документі, включені в даний документ за допомогою посилання тією ж мірою, як якщо б кожне літературне джерело було окремо та конкретно вказане як включене за допомогою посилання та було представлено у всій своїй повноті в даному документі.

Використання форм однини та терміна "щонайменше один" і подібних визначень у контексті опису даного винаходу (особливо в контексті нижченаведеної формули винаходу) слід тлумачити як таке, що охоплює як однину, так і множину, якщо в даному документі не вказане інше або якщо це явно не суперечить контексту. Використання терміна "щонайменше один", за яким йде список з одного або декількох елементів (наприклад, "щонайменше один з А та В"), слід тлумачити як таке, що передбачає один елемент, вибраний зі списку елементів (А або В), або будь-яку комбінацію з двох або більше з перерахованих елементів (А та В), якщо в даному документі не вказане інше або якщо це явно не суперечить контексту. Терміни "що складається", "що має", "що включає" та "що містить" слід тлумачити як відкриті терміни (тобто які означають "такий, що включає без обмеження"), якщо не вказане інше. Передбачається, що наведення діапазонів значень у даному документі слугує лише як спосіб скороченого окремого вказання кожного окремого значення, що входить у даний діапазон, якщо в даному документі не вказано інше, і кожне окреме значення включене в даний опис, як якщо б воно було окремо згадане в даному документі. Усі способи, описані в даному документі, можуть проводитися в будь-якому придатному порядку, якщо в даному документі не вказане інше або якщо це іншим чином явно не суперечить контексту. Застосування всіх без винятку прикладів або ілюстративних фраз (наприклад, "такий як"), представлених у даному документі, передбачається лише для ліпшого висвітлення даного винаходу і не накладає обмеження на обсяг даного винаходу, якщо не заявлене інше. Жодна фраза в даному описі не має тлумачитися як вказівка на те, що будь-який незаявлений елемент є істотним для здійснення даного винаходу на практиці.

Переважні варіанти здійснення даного винаходу описані в даному документі, в тому числі найліпший спосіб здійснення даного винаходу, відомий авторам даного винаходу. Видозміни цих переважних варіантів здійснення можуть стати очевидними для середніх фахівців у даній галузі після прочитання вищевказаного опису. Автори даного винаходу очікують, що фахівці в даній галузі будуть використовувати такі видозміни як придатні, й автори даного винаходу передбачають, що даний винахід буде реалізований на практиці інакше, ніж конкретно описано в даному документі. Відповідно, даний винахід включає всі модифікації й еквіваленти об'єкта винаходу, згаданого в формулі винаходу, що додається, у межах, дозволених застосуванням законодавством. Крім того, будь-яка комбінація вищеописаних елементів у всіх можливих їхніх видозмінах охоплюється даним винаходом, якщо в даному документі не вказане інше або якщо це іншим чином явно не суперечить контексту.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), який містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA), кон'юговані з цитотоксином, де моноклональне антитіло містить: (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), під SEQ ID NO: 1, амінокислотну послідовність HCDR2 під SEQ ID NO: 2 та амінокислотну послідовність HCDR3 під SEQ ID NO: 3, та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), під SEQ ID NO: 4, амінокислотну послідовність LCDR2 під SEQ ID NO: 5 та амінокислотну послідовність LCDR3 під SEQ ID NO: 6.

2. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7.

3. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1 або 2, де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

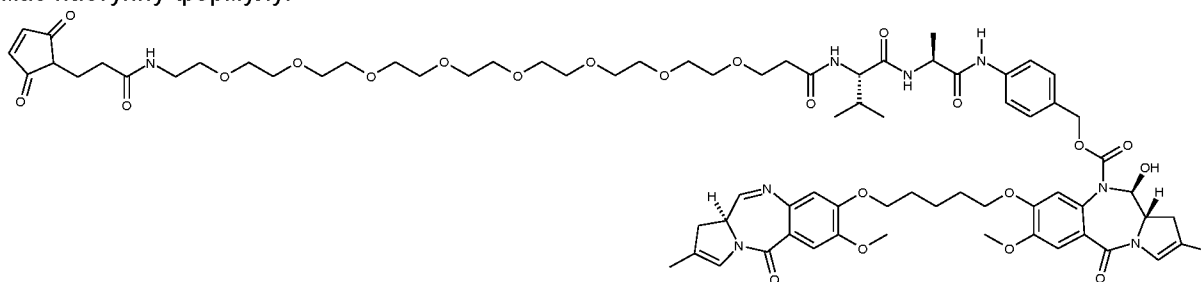
4. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-3, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

5. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-4, де цитотоксин являє собою засіб, що діє на мікротрубочки, піролобензодіазепін (PBD), інгібітор РНК-полімерази II або засіб, що алкілує ДНК.

6. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 5, де цитотоксин являє собою засіб, що діє на мікротрубочки, вибраний із групи, що складається з майтанзиноїду, ауристатину та тубулізину.

7. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 5, де цитотоксин являє собою піролобензодіазепін (PBD).

8. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 7, де піролобензодіазепін являє собою SG3249, який має наступну формулу:



9. Композиція, яка містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-8 та фармацевтично прийнятний носій.

10. Спосіб знищення клітин множинної мієломи, який включає приведення клітин множинної мієломи, що експресують BCMA, у контакт із кон'югатом антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-8, внаслідок чого кон'югат антитіло-лікарський засіб зв'язується з BCMA на клітинах множинної мієломи та знищує клітини множинної мієломи.

11. Спосіб знищення клітин множинної мієломи, який включає приведення клітин множинної мієломи, що експресують BCMA, в контакт із композицією за п. 9, внаслідок чого кон'югат антитіло-лікарський засіб зв'язується з BCMA на клітинах множинної мієломи та знищує клітини множинної мієломи.

12. Спосіб за п. 10 або 11, де клітини множинної мієломи знаходяться в організмі людини.

13. Спосіб за п. 10 або 11, де клітини множинної мієломи знаходяться в умовах *in vitro*.

14. Спосіб знищення стовбурових клітин множинної мієломи, який включає приведення стовбурових клітин множинної мієломи, що експресують BCMA, в контакт із кон'югатом антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-8, внаслідок чого кон'югат антитіло-лікарський засіб зв'язується з BCMA на стовбурових клітинах множинної мієломи та знищує стовбурові клітини множинної мієломи.

15. Застосування композиції за п. 9 у виготовленні лікарського препарату для лікування множинної мієломи.

16. Моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, спрямовані проти антигену дозрівання В-клітин (BCMA), які містять (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (HCDR1), під SEQ ID NO: 1, амінокислотну послідовність HCDR2 під SEQ ID NO: 2 та амінокислотну послідовність HCDR3 під SEQ ID NO: 3, та (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність ділянки 1, що визначає комплементарність (LCDR1), під SEQ ID NO: 4, амінокислотну послідовність LCDR2 під SEQ ID NO: 5 та амінокислотну послідовність LCDR3 під SEQ ID NO: 6.

17. Моноклональне антитіло за п. 16, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7.

18. Моноклональне антитіло за п. 16 або 17, де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

19. Моноклональне антитіло за будь-яким із пп. 16-18, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 8.

20. Композиція, яка містить моноклональне антитіло за будь-яким із пп. 16-19 та фармацевтично прийнятний носій.

21. Химерний антигенний рецептор (CAR), який містить антигензв'язувальний домен моноклонального антитіла за будь-яким із пп. 16-19, зв'язаний із фрагментом, що активує Т-клітини.
22. Химерний антигенний рецептор за п. 21, де антигензв'язувальний домен містить одностанцювий Fv-фрагмент (scFv) моноклонального антитіла.

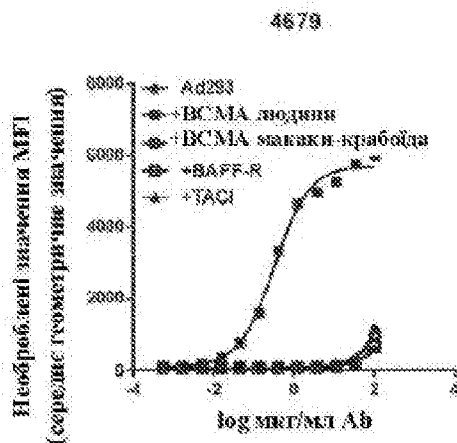


Fig. 1A

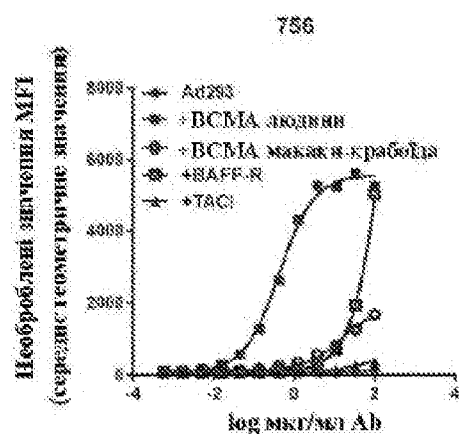


Fig. 1B

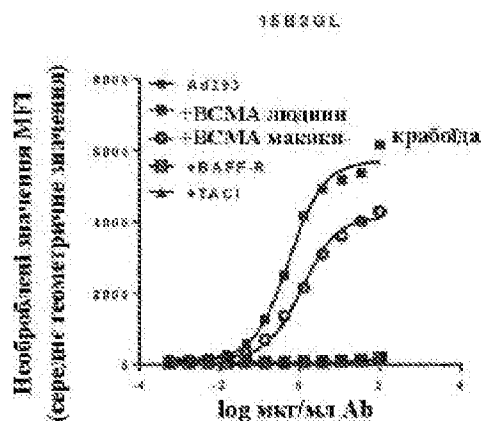


Fig. 1C

Fig. 1

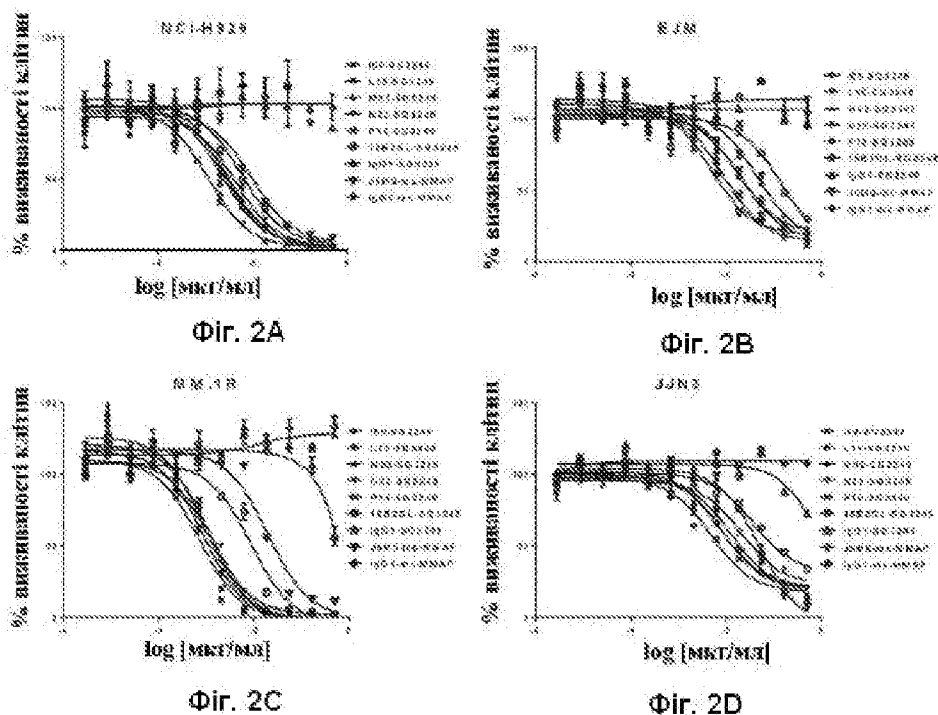


Fig. 2

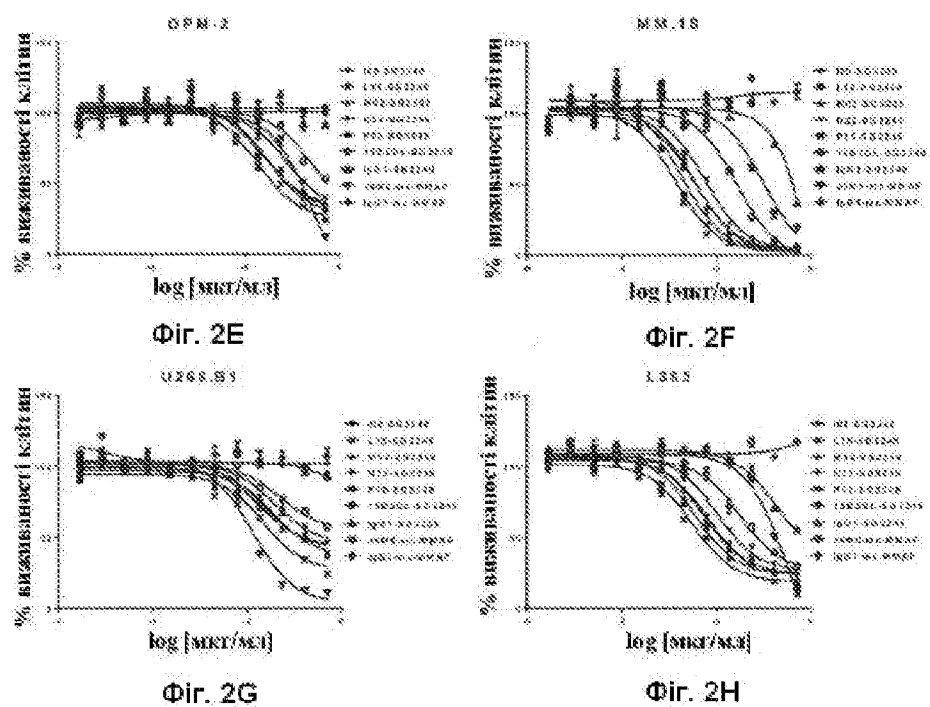
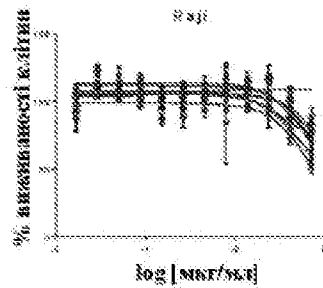
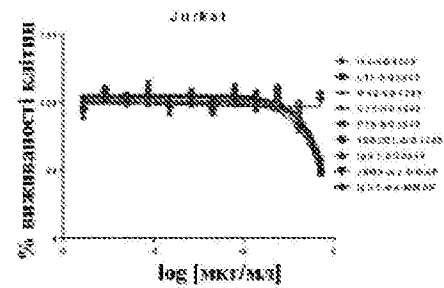


Fig. 2 (продовження)

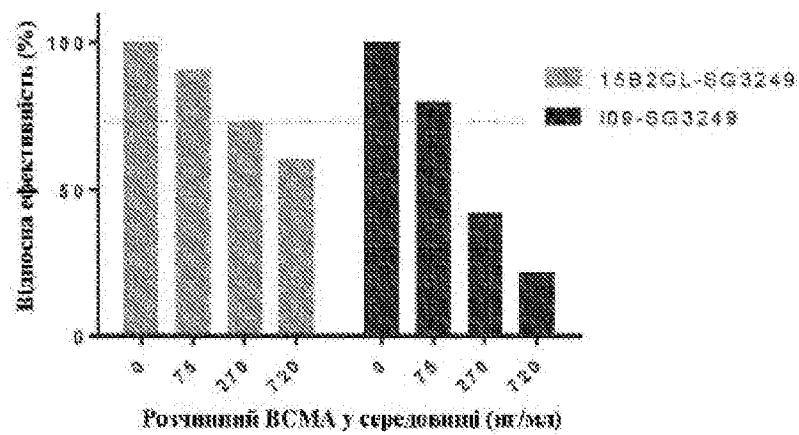


Фіг. 2I

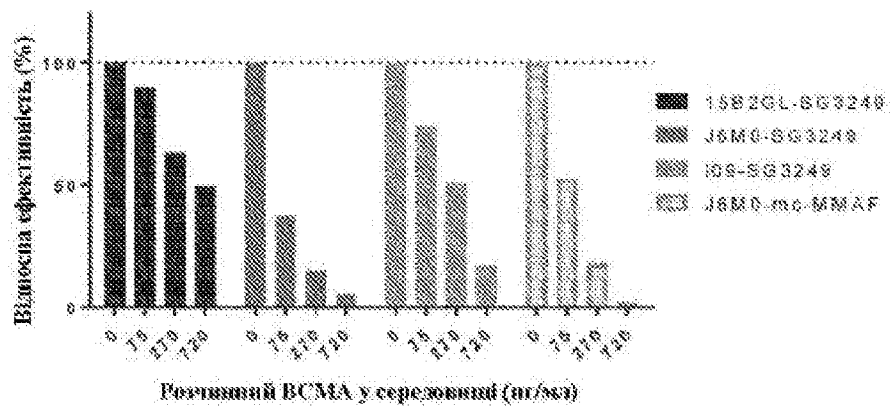


Фіг. 2J

Фіг. 2 (продовження)

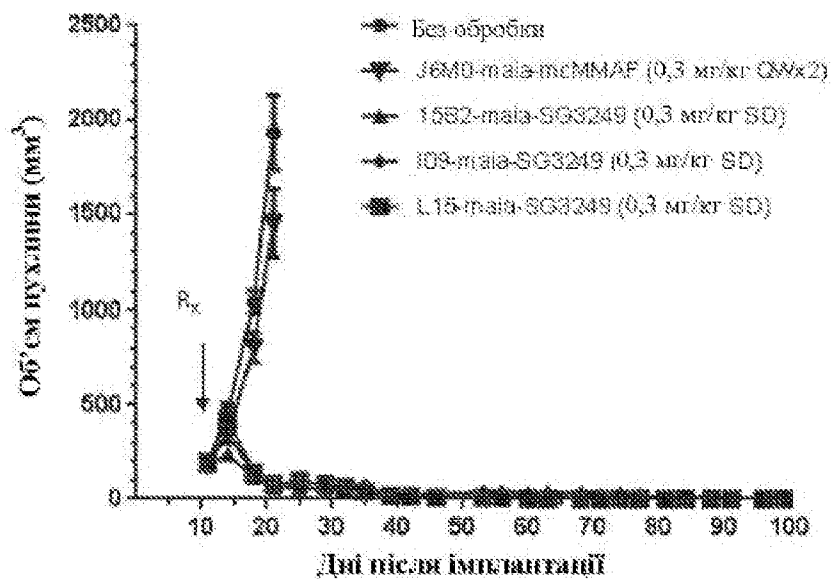


Фіг. 3А

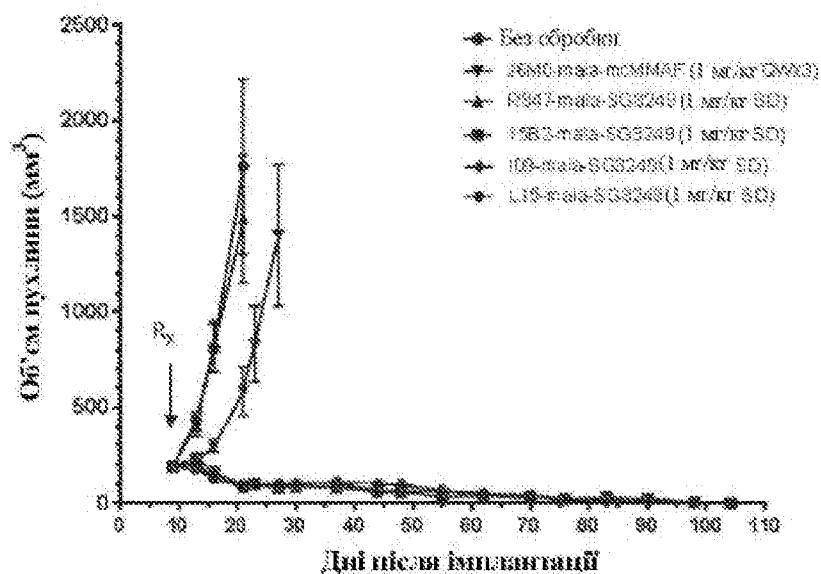


Фіг. 3В

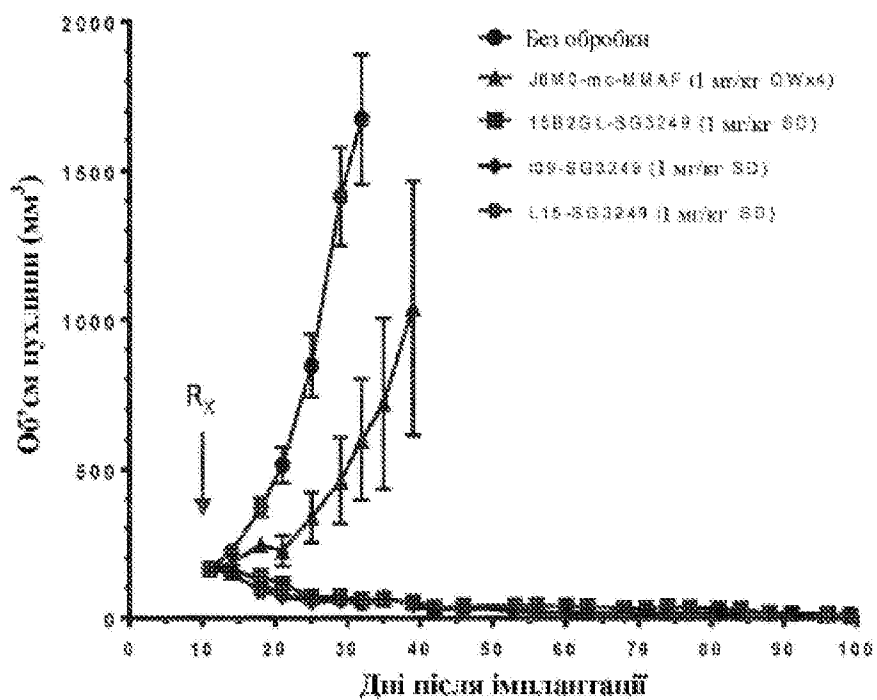
Фіг. 3



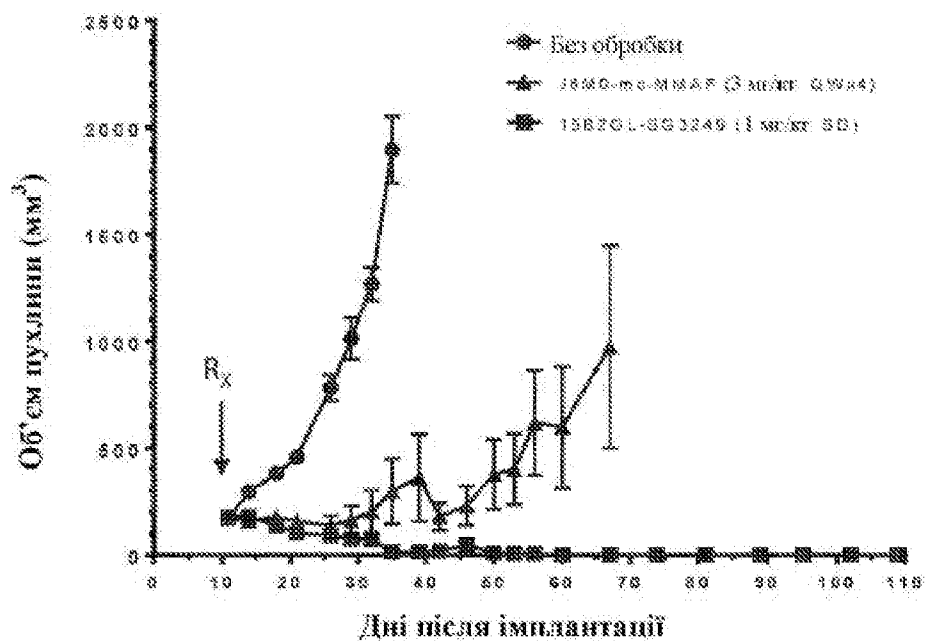
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

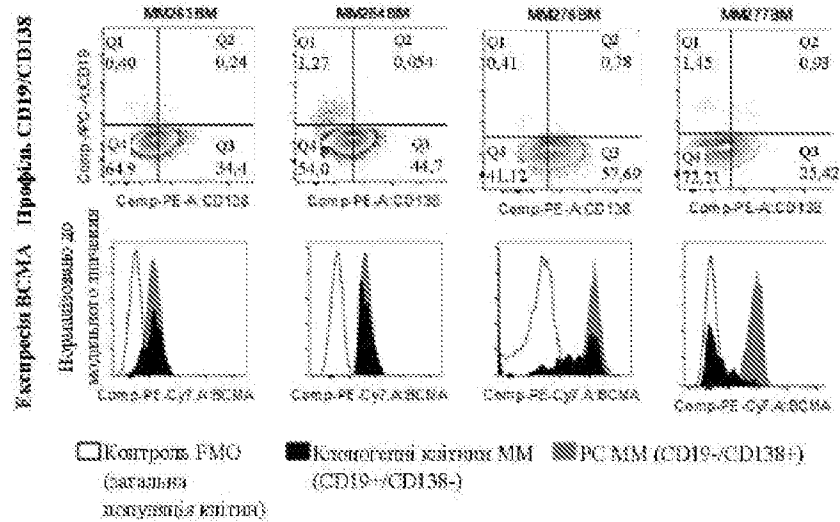


Fig. 8

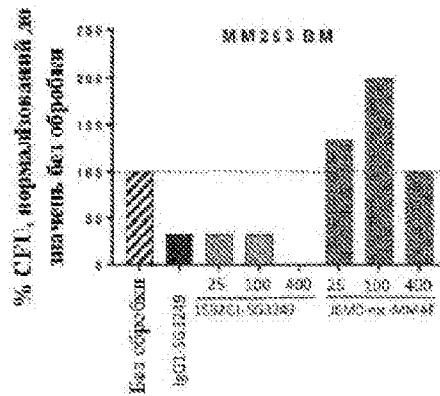


Fig. 9A

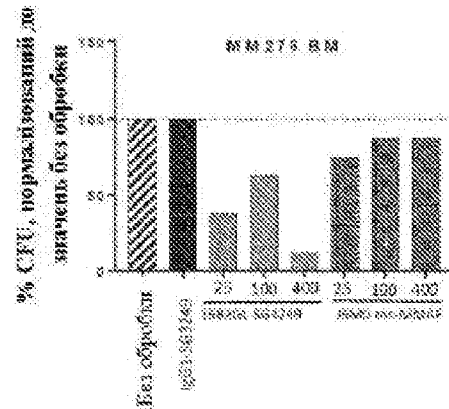


Fig. 9B

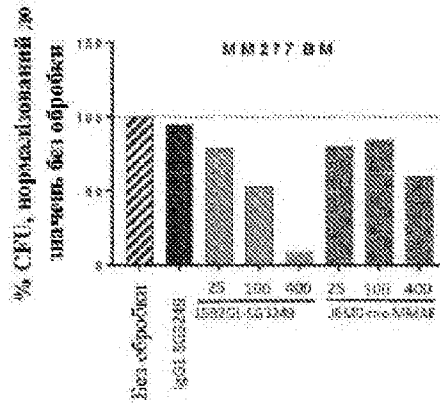


Fig. 9C

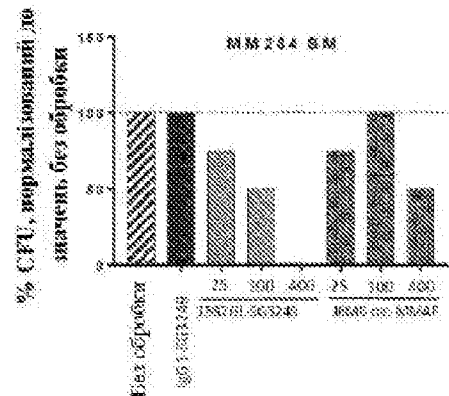


Fig. 9D

Fig. 9

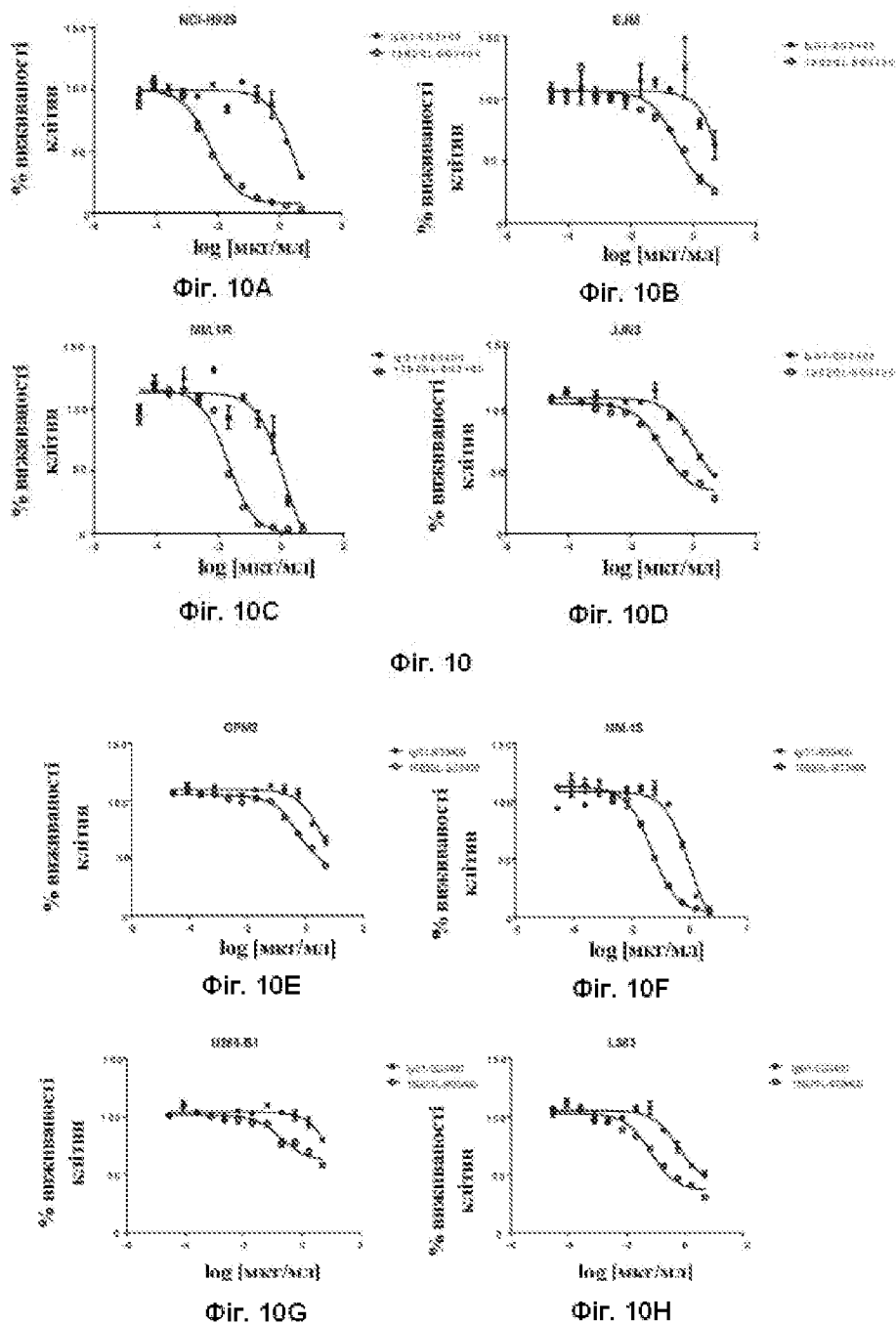


Fig. 10 (продовження)

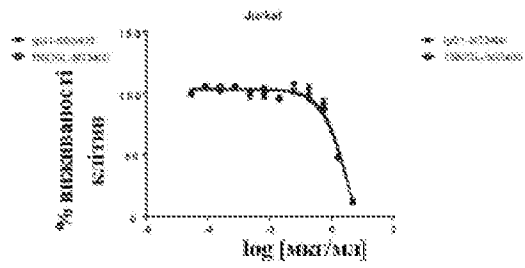
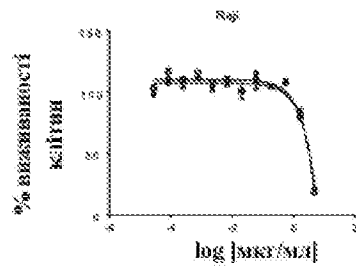


Fig. 101

Fig. 10J

Фіг. 10 (продовження)

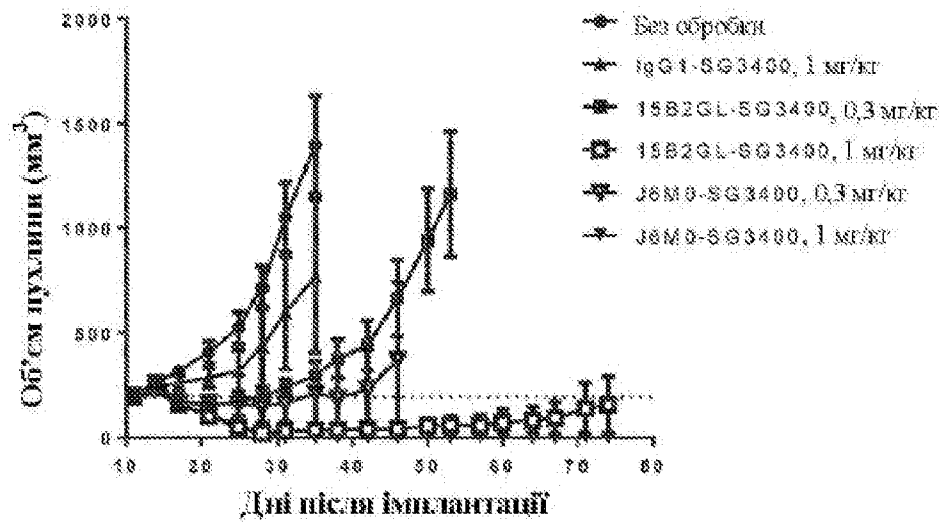


Fig. 11

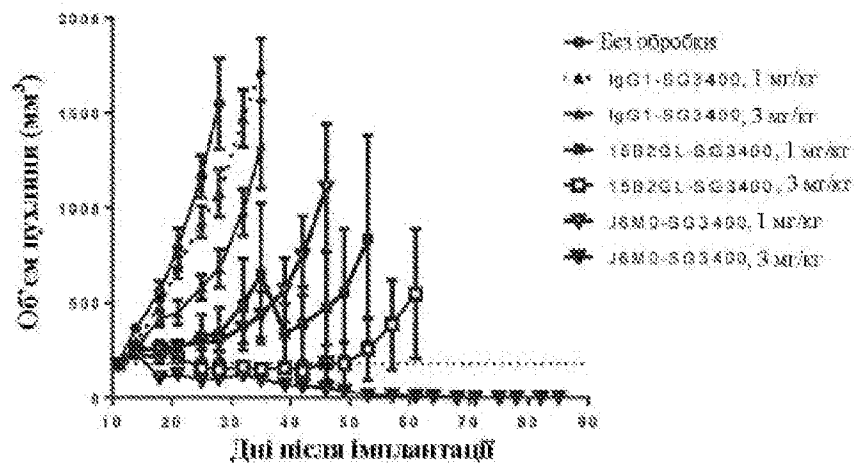
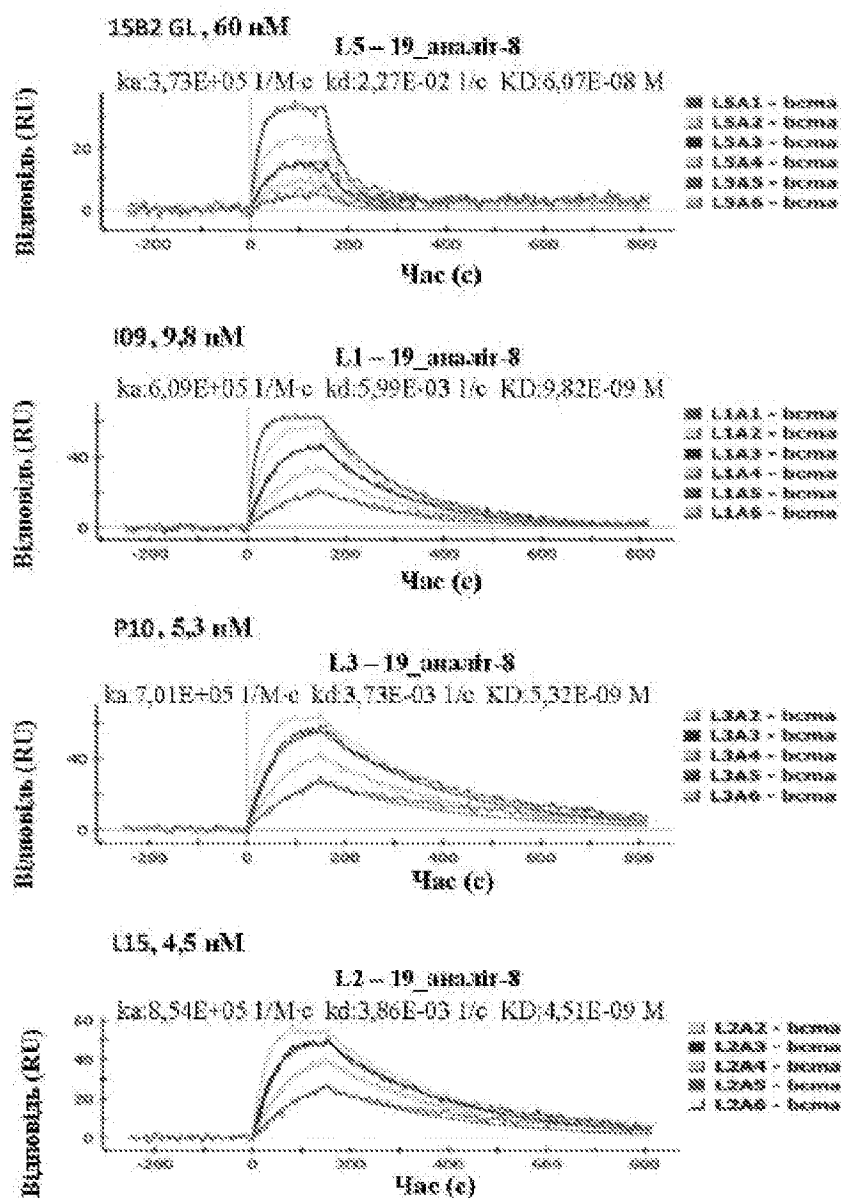


Fig. 12



Фиг. 13

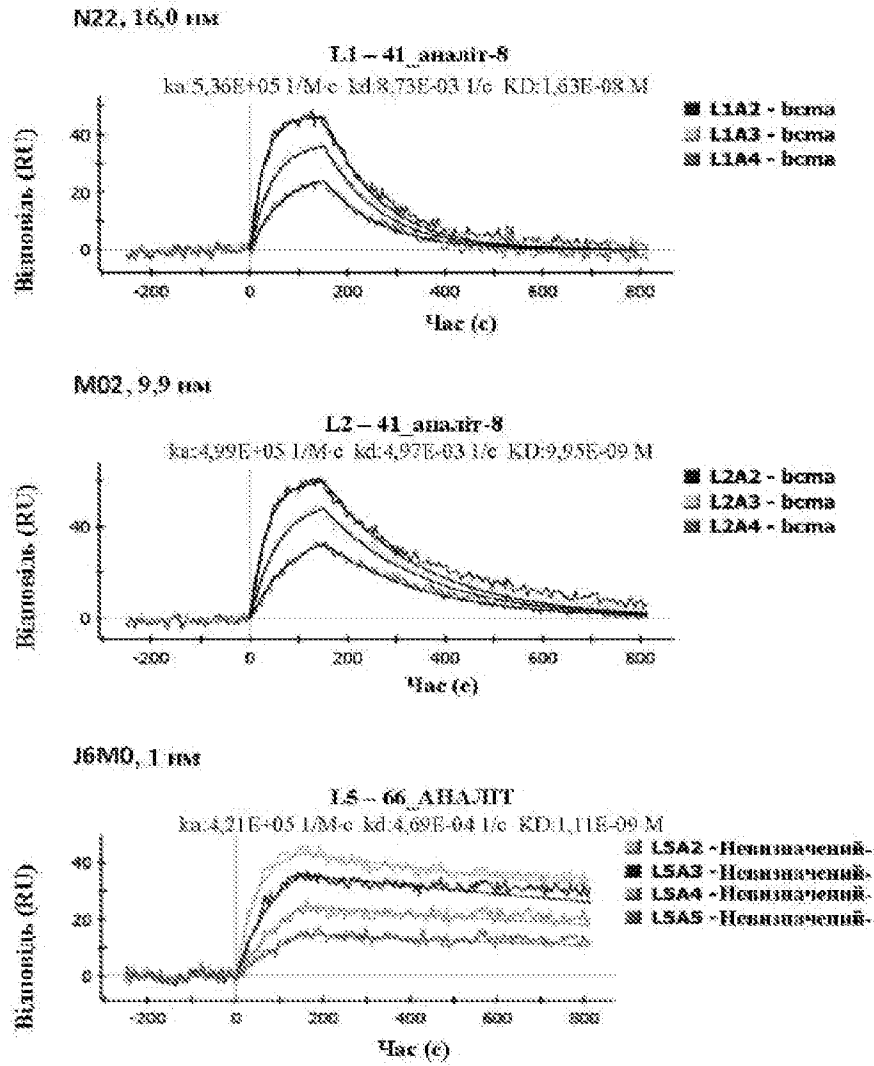
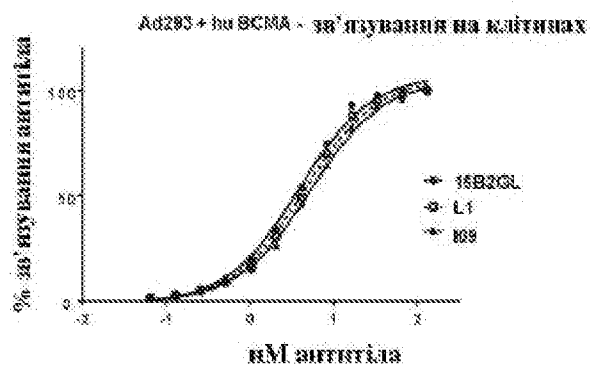
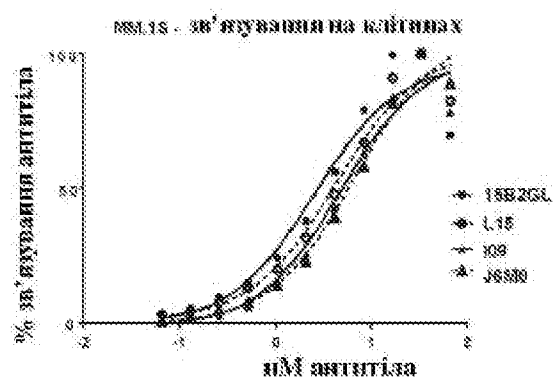
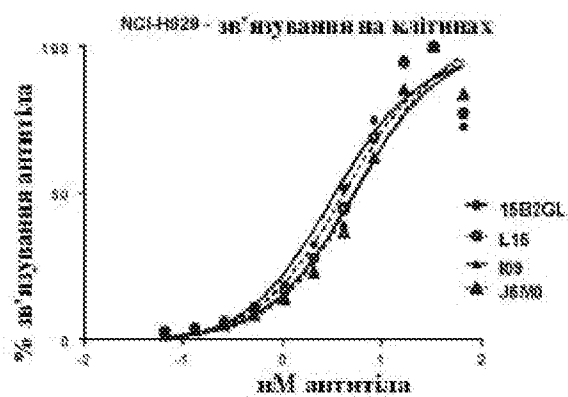


Fig. 14



Фіг. 15

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> МЕДІММЮН, ЛЛК

<120> КОНЮГАТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА ДО ВСМА ТАЛКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

<130> ВСМА-100-US-NP

<150> 62/596194

<151> 2017-12-08

<150> 62/539825

<151> 2017-08-01

<160> 20

<170> Patentin версія 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 2

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 3

Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

<211> 108

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 9

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 9

Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10

<211> 108

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 120

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Gln Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12

<211> 108

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asp Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 13

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> СИНТЕТИЧНИЙ

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

<211> 108

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16

<211> 108

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

# UA 126813 C2

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asp Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 17

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетический

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 18

<211> 108

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 20

<211> 108

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1            5            10            15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn

20            25            30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35            40            45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50            55            60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65            70            75            80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asp Ser Pro

85            90            95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100            105