(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201991408 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.23

(22) Дата подачи заявки
2018.01.19

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ CD137+ КЛЕТОК

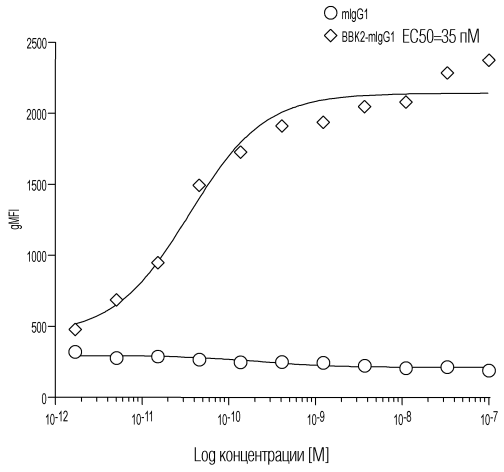
(31) **62/448,741; 62/595,977**
(32) **2017.01.20; 2017.12.07**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2018/050365**
(87) **WO 2018/134787 2018.07.26**
(88) **2018.10.04**

(71) Заявитель:
МАДЖЕНТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хартиган Эдам, Бойтено Энтони, Кук Майкл, Хоубен Меган Д., Палчаудхури Рауль (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены способы предотвращения и лечения реакции "трансплантат против хозяина", а также аутоиммунных заболеваний, таких как заболевания, которые являются результатом трансплантационной терапии, путем селективной элиминации гемопоэтических клеток с применением конъюгатов антитела-лекарственного средства и конъюгатов лиганда-лекарственного средства, которые специфично связывают CD137. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения различных патологий, включающих нарушения функции стволовых клеток, а также других гематологических заболеваний.



201991408 A1

201991408 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-557896EA/042

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ CD137+ КЛЕТОК

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/448,741, поданной 20 января 2017 года, и предварительной заявки на патент США 62/595,977, поданной 7 декабря 2017 года. Содержание вышеуказанных заявок полностью включено в настоящий документ посредством отсылок.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области трансплантационной терапии и предоставляет способы лечения аутоиммунных заболеваний и реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) путем введения антител, конъюгатов антител-лекарственных средств и конъюгатов лигандов-лекарственных средств, способных связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими клетками.

Уровень техники

Хотя гемопоэтические стволовые клетки обладают значительным терапевтическим потенциалом, ограничением, препятствующим их применению в клинике, было развитие реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) через несколько дней или недель после трансплантации клеток. Хотя были достигнуты значительные успехи в лечении РТПХ после трансплантации, в данной области все еще существует потребность в улучшенных способах, особенно в отношении снижения показателей смертности вследствие РТПХ. Традиционное лечение РТПХ требует системной иммунодепрессантной терапии сильнодействующими лекарственными средствами, такими как кортикостероиды и циклоспорин. Такие средства, как микофенолят мофетил, рапамицин (сиролимус), иматиниб и ритуксимаб, применяются у пациентов со стероид-рефрактерной РТПХ. Однако эти методы лечения показывают ограниченную эффективность и часто вызывают серьезные нежелательные эффекты. Только 50% пациентов с РТПХ могут прекратить лечение иммунодепрессантами в течение 5 лет после постановки диагноза, а 10% требуют продолжения лечения после 5 лет. Оставшиеся 40% умирают или у них развивается рецидивирующее злокачественное новообразование до разрешения

РТПХ. Пятилетняя выживаемость пациентов с высоким риском РТПХ (количество тромбоцитов <100000/микролитр или прогрессирующее начало РТПХ) составляет всего 40-50%. Таким образом, разработка инновационных стратегий предотвращения и лечения РТПХ представляет собой важную неудовлетворенную клиническую потребность.

Как и РТПХ, такие аутоиммунные заболевания, как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, заболевания кишечного тракта, псориаз, волчанка и диабет 1-го типа, характеризуются патологическим иммунным ответом, направленным против нормальных собственных тканей. Аутоиммунные заболевания характеризуются образованием аутореактивных Т-клеток и антител, реактивных в отношении хозяйских тканей (аутоантител). Традиционные методы лечения аутоиммунных заболеваний включают применение иммунодепрессантов, которые масштабно ослабляют иммунные ответы. Преимущества таких средств часто ограничены восприимчивостью к оппортунистическим инфекциям, долгосрочному риску развития злокачественных новообразований, токсическим действием и другими нежелательными побочными эффектами. Таким образом, существует необходимость в разработке стратегии более специфичного воздействия на клеточные медиаторы как РТПХ, так и аутоиммунных заболеваний.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены способы предотвращения и лечения острых и хронических форм реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) и аутоиммунных заболеваний у пациента, такого как человек, получающий трансплантационную терапию гемопоэтическими стволовыми клетками, с целью снижения тяжести патологии и смертности, связанной с РТПХ и аутоиммунными заболеваниями. В изобретении дополнительно предложены способы лечения различных гемопоэтических состояний, таких как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, дефицит аденозиндеаминазы-тяжелый комбинированный иммунодефицит, метахроматическая лейкодистрофия, анемия Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-Даймонда, инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, и синдром

приобретенного иммунодефицита, помимо прочих. Изобретение относится к способам лечения пациента антителами, конъюгатами антитела-лекарственного средства, лигандами и конъюгатами лиганда-лекарственного средства, способными связывать белки, экспрессируемые гемопоэтическими клетками, такими как CD137, чтобы таким образом элиминировать популяцию гемопоэтических клеток, таких как Т-клетки, в организме пациента. Такая селективная элиминация Т-клеток, в свою очередь, улучшает общую и безрецидивную выживаемость пациентов, в то же время значительно снижая РТПХ и аутоиммунные заболевания.

В первом аспекте изобретения предложен способ лечения РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC), способного связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

Во втором аспекте изобретения предложен способ элиминации популяции CD137+ клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития РТПХ, путем введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC), способного связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

В третьем аспекте изобретения предложен способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента-человека, нуждающемся в этом, путем введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC), способного связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

В четвертом аспекте изобретения предложен способ элиминации популяции CD137+ клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития аутоиммунного заболевания, путем введения пациенту эффективного количества антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC), способного связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифичного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, двойного вариабельного домена иммуноглобулина, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы $F(ab')_2$ и тандемного ди-scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают внеклеточный домен CD137 человека в эпитопе, расположенном в пределах аминокислотных остатков 115-156 в SEQ ID NO: 20. SEQ ID NO: 20 соответствует внеклеточному домену CD137 и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQ RTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFG TFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQI ISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL (SEQ ID NO: 20)

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен является Fc-доменом изотипа IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен является Fc-доменом изотипа IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен является Fc-доменом изотипа IgG3 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен является Fc-доменом изотипа IgG4 человека.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение

пациенту эффективного количества растворимого лиганда CD137.

В другом аспекте изобретения предложен способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития РТПХ, включающий введение пациенту эффективного количества растворимого лиганда CD137.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента-человека, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества растворимого лиганда CD137.

В другом аспекте изобретения предложен способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития аутоиммунного заболевания, путем введения пациенту эффективного количества растворимого лиганда CD137.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или растворимый лиганд CD137 конъюгированы со связывающим микротрубочки средством через линкер. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, где цитотоксин является связывающим микротрубочки средством.

В некоторых вариантах осуществления связывающим микротрубочки средством является майтанзин.

В некоторых вариантах осуществления связывающим микротрубочки средством является майтанзиноид.

В некоторых вариантах осуществления связывающим микротрубочки средством является майтанзин или майтанзиноид.

В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид выбран из группы, состоящей из DM1, DM3 и DM4 и майтанзинол.

В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид является аналогом майтанзинола.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137

доставляют в организм пациента до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137, конъюгированный с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство, доставляют в организм пациента приблизительно за 3 дня (например, от 1 часа до 7 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней) до введения гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 доставляют в организм пациента одновременно с получением пациентом трансплантата, который включает гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 доставляют в организм пациента после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 (например, конъюгированный с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство) доставляют в организм пациента, например, через приблизительно от 1 часа до 10 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней) или больше после введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства может быть введен через приблизительно

3-4 дня после трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления трансплант является аллогенным. В некоторых вариантах осуществления трансплант является аутологичным.

В некоторых вариантах осуществления трансплант является трансплантом костного мозга, трансплантом периферической крови или трансплантом пуповинной крови.

В некоторых вариантах осуществления трансплант включает гемопоэтические клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки).

В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки после двух или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки после двух или более дней (например, от приблизительно 2 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 20 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 30 дней, например, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или больше) после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны к локализации в гемопоэтической ткани, такой как костный мозг, и/или к восстановлению гемопоэза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления после трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки инициируют восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, тучных клеток,

миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток, Т-клеток и В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат включает лейкоциты.

В некоторых вариантах осуществления после трансплантации пациенту гемопоэтические клетки выбирают из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток, естественных киллерных клеток (NK), макрофагов, раковых клеток, нейтрофилов, базофилов, и эозинофилов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ элиминации популяции CD137+ клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития РТПХ путем введения пациенту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда CD137, способного связывать CD137 и конъюгированного с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство, где гемопоэтические клетки, включающие CD137+ клетки, выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток, естественных киллерных клеток (NK), макрофагов, раковых клеток, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов.

В некоторых вариантах осуществления CD137+ клетки, выбранные из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток, естественных киллерных клеток (NK), макрофагов, раковых клеток, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов, демонстрируют реактивность против антигена пациента.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 интернализируются CD137+ клеткой после введения пациенту. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 могут быть интернализованы CD137+ Т-клеткой путем рецептор-опосредованного эндоцитоза (например, при связывании с поверхностью CD137 клеток). В некоторых вариантах осуществления цитотоксин, ковалентно связанный с антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или ADC, может высвобождаться

внутриклеточно при химическим расщеплении (например, в результате ферментативного или неспецифического расщепления линкера, описанного в настоящем документе). Цитотоксин может при этом получать доступ к своей внутриклеточной мишени (такой как аппарат митотического веретена, ядерная ДНК, рибосомная РНК или топоизомеразы, помимо прочего), вызывая гибель CD137+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 способны блокировать митоз и подавлять пролиферацию (например, путем супрессии динамической нестабильности микротрубочек) CD137+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 могут вызывать гибель клетки путем рекрутинга одного или более дополнительных белков, естественных киллерных клеток (NK), макрофагов, нейтрофилов и/или эозинофилов при введении пациенту.

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд CD137 могут вызывать гибель CD137+ Т-клетки путем рекрутинга одного или более дополнительных белков, естественных киллерных клеток (NK), макрофагов, нейтрофилов и/или эозинофилов при введении пациенту.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или растворимый лиганд CD137 применяются для лечения аутоиммунного заболевания, обусловленного активностью Т- или В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием является рассеянный склероз, ревматоидный артрит, заболевание кишечного тракта, псориаз, волчанка или диабет 1-го типа.

В некоторых вариантах осуществления способ применяется для лечения одного или более нарушений или раковых опухолей у пациента, такого как пациент, который получил трансплантат, включающий гемопоэтические стволовые клетки. Например, пациент может быть пациентом, который страдает нарушением стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает

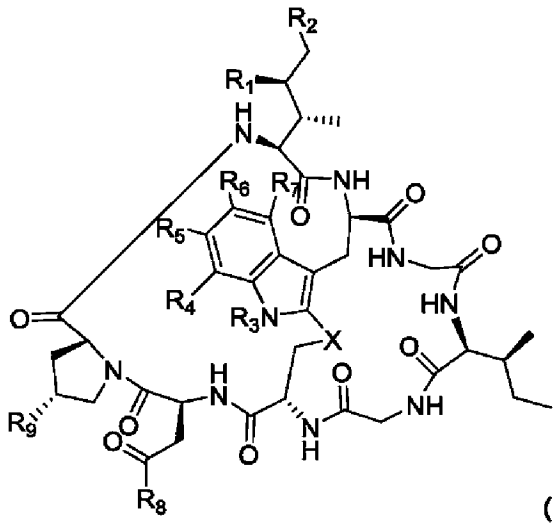
нарушением гемоглобинопатией, таким как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия и синдром Вискотта-Олдрича. Пациент может страдать иммунодефицитом, таким как врожденный иммунодефицит или приобретенный иммунодефицит (например, вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунодефицита). В некоторых вариантах осуществления пациент страдает нарушением обмена веществ, таким как гликогеноз, мукополисахаридозы, болезнь Гоше, болезнь Гурлер, сфинголипидозы и метахроматическая лейкодистрофия. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает раком, таким как лейкоз, лимфома, множественная миелома и миелодиспластический синдром и нейробластома. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает нарушением, выбранным из группы, состоящей из дефицита аденозиндеаминазы и тяжелого комбинированного иммуннодефицита, синдрома гипериммуноглобулинемии М, болезни Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза и ювенильного ревматоидного артрита.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) у пациента-человека, нуждающегося в этом, путем введения конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC) против CD137 пациенту-человеку, таким образом, что осуществляется лечение РТПХ, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином, который является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы. В одном варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту приблизительно за три дня до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту одновременно с получением пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте

осуществления способ включает введение ADC пациенту после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В еще одном варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту приблизительно через 1 час - 10 дней после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту через приблизительно 3-4 дня после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В других вариантах осуществления трансплантат является аллогенным.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у субъекта-человека, имеющего РТПХ или подвергающегося риску развития РТПХ, путем введения ADC против CD137 пациенту-человеку, в результате чего РТПХ популяция клеток CD137 истощается, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином, который является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы. В одном варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту приблизительно за три дня до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту одновременно с получением пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В еще одном варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту приблизительно через 1 час - 10 дней после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления способ включает введение ADC пациенту через приблизительно 3-4 дня после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. В других вариантах осуществления трансплантат является аллогенным. В других

вариантах осуществления связывающим микротрубочки средством является майтанзиноид. В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин. В некоторых вариантах осуществления аматоксин представлен формулой (**IA**):



(IA)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

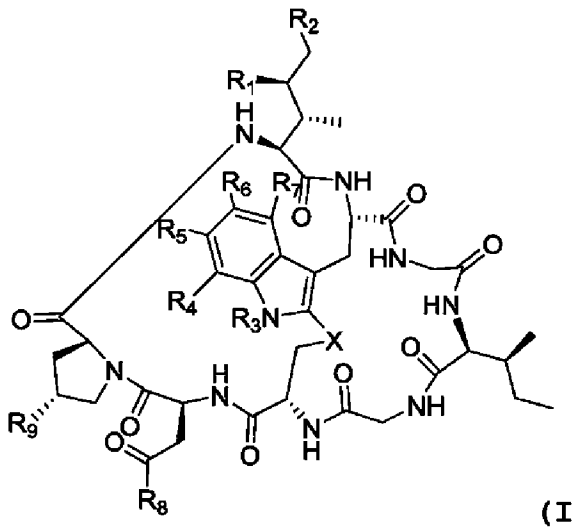
R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен,

необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C. В других вариантах осуществления аматоксин представлен формулой (**IB**):



(IB)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO_2-;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C.

В других вариантах осуществления ADC включает антитело против CD137, конъюгированное с цитотоксином, который является ингибитором РНК-полимеразы, например, аманитином. В одном варианте осуществления аманитин является α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманином, аманинамидом, аманулллином, аманулллиновой кислотой или проаманулллином.

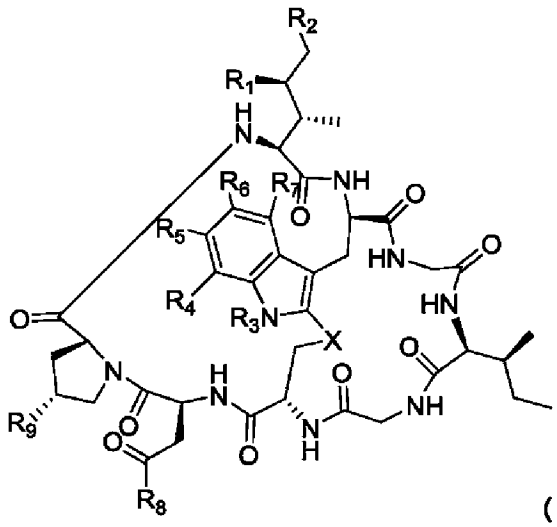
В другом аспекте изобретения предложен способ элиминации аллореактивных Т-клеток у пациента-человека, который получил аллогенный трансплантат, путем введения ADC против CD137 пациенту-человеку, в результате чего такие аллореактивные Т-клетки элиминируются, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином. В некоторых вариантах осуществления трансплантат является трансплантатом костного мозга. В других вариантах осуществления трансплантат является трансплантатом

периферической крови. В других вариантах осуществления трансплантат является трансплантатом пуповинной крови. В других вариантах осуществления трансплантат включает гемопоэтические клетки. В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки после двух или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту. В других вариантах осуществления цитотоксин является ингибитором РНК-полимеразы. В другом варианте осуществления ингибитор РНК-полимеразы является аматоксином. В других вариантах осуществления антитело против CD137 включает CDR-области антитела BBK2, определенные согласно нумерации Кэбата. В другом варианте осуществления антитело против CD137 включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела BBK2 (как описано в публикации Lee, et al. Eur J Immunogenet. 2002 Oct; 29(5):449-52, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки). В других вариантах осуществления антитело против CD137 является химерным BBK2. В других вариантах осуществления антитело против CD137 включает последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 23, и последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 24. В других вариантах осуществления антитело против CD137 является антагонистическим антителом.

В других вариантах осуществления антитело против CD137 является IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD137 является интактным антителом.

В одном варианте осуществления связывающим микротрубочки средством, применяемым в способах и композициях, описанных в настоящем документе, является майтанзиноид.

В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы, применяемым в способах и композициях, описанных в настоящем документе, является аматоксин. В некоторых вариантах осуществления аматоксин представлен формулой (**IA**):



(IA)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

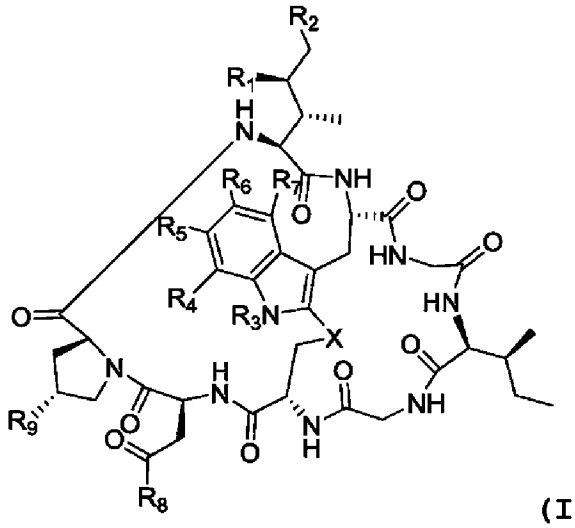
R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно

замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C. В других вариантах осуществления аматоксин представлен формулой (**IB**):



(IB)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил,

необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C. В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аманитин. В других вариантах осуществления аманитин является α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманин, аманинамидом, аманулллином, аманулллиновой кислотой или проаманулллином.

В одном варианте осуществления предложен конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), включающий антитело против CD137, конъюгированное с цитотоксином через линкер. Цитотоксин может быть, например, аманитином, например, α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманином, аманинамидом, аманулллином, аманулллиновой кислотой и проаманулллином. В одном варианте осуществления цитотоксином является α-аманитин. В одном варианте осуществления цитотоксином является β-аманитин. В одном варианте осуществления цитотоксином является γ-аманитин. В одном варианте осуществления цитотоксином является ε-аманитин. В одном варианте осуществления цитотоксином является аманин. В одном варианте осуществления цитотоксином является аманинамид. В одном варианте осуществления цитотоксином является аманулллин. В одном

варианте осуществления цитотоксином является аманулиновая кислота. В одном варианте осуществления цитотоксином является проаманулин. В одном варианте осуществления антитело против CD137 связывается с эктодоменом человеческого CD137. В одном варианте осуществления антитело против CD137 конкурирует с антителом BBK2.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD137 включает CDR-области антитела BBK2. В других вариантах осуществления антитело против CD137 включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела BBK2. В других вариантах осуществления антитело против CD137 является химерным BBK2. В других вариантах осуществления антитело против CD137 включает последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 23, и последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD137 является IgG1 или IgG4.

В другом аспекте изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает человеческий CD137, где указанное антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является интактным антителом.

В другом аспекте изобретения предложен конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), включающий антитело против CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы. В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин. В других вариантах осуществления аматоксином является аманитин. В других вариантах осуществления аманитин является α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманином, аманинамидом,

аманулином, аманулиновой кислотой или проаманулином. Линкер может быть, например, дипептидом, который представляет собой Val-Ala или Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая ADC согласно изобретению и фармацевтически активный носитель.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения отторжения трансплантата или РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение эффективного количества ADC согласно изобретению пациенту-человеку, где пациент-человек ранее получал трансплантат. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек получал трансплантат не больше чем за 4 дня до введения ADC.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения пациента-человека, подвергающегося риску отторжения трансплантата или РТПХ, в котором эффективное количество ADC, описанного в настоящем документе, вводят пациенту-человеку, подвергающемуся риску отторжения трансплантата или РТПХ, с последующим введением трансплантата пациенту-человеку. В некоторых вариантах осуществления ADC вводят пациенту-человеку в однократной дозе.

В другом аспекте изобретения предложен ADC, включающий антитело против CD137, конъюгированное с цитотоксином через линкер, где антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и включает вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным или гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32. В других вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1 или IgG4. В других вариантах осуществления цитотоксин является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы. В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин. В других вариантах осуществления аматоксином является аманитин. В других вариантах осуществления аманитин выбран из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина.

В другом аспекте изобретения предложен конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), включающий антитело против CD137, конъюгированное с цитотоксином через линкер, где антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 и 35, соответственно, и включает вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, 37, 28, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным или гуманизированным антителом. В других вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1 или IgG4. В других вариантах осуществления цитотоксин является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы. В других вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин. В других вариантах осуществления аматоксином является аманитин. В других вариантах осуществления аманитин является α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманином, аманинамидом, амануллином, амануллиновой кислотой или проамануллином.

В другом аспекте изобретения предложена композиция, включающая любой из ADC конъюгатов, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения отторжения трансплантата или РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, путем введения эффективного количества ADC, описанного в настоящем документе, пациенту-человеку, где пациент-человек ранее получал трансплантат. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек получал трансплантат не более чем за 4 дня до введения ADC. В некоторых вариантах осуществления ADC вводят пациенту-человеку в однократной дозе.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения пациента-человека, подвергающегося риску отторжения трансплантата или РТПХ, путем введения эффективного количества ADC против CD137, описанного в настоящем документе, пациенту-человеку, подвергающемуся риску отторжения трансплантата или РТПХ, и последующего введения трансплантата субъекту-человеку. В некоторых вариантах осуществления ADC вводят пациенту-человеку в однократной дозе.

Краткое описание чертежей

На **Фиг. 1A и 1B** графически представлены результаты анализа связывания клеток *in vitro*, включающего мышиное BBK2 (т.е. "BBK-mIgG1") и отрицательный контроль (т.е. "mIgG1"), с клетками Jurkat (т.е. клеточной линией человеческих Т-лимфоцитов) с повышенной экспрессией CD137.

На **Фиг. 2A и 2B** графически представлены результаты анализа киллинга Т-клеток *in vitro*, включающего ADC против CD137-аманитин (т.е. "CD137-Аманитин") и специфичный против Т-клеток ADC-аманитин (т.е. "против Т-клеток-Аманитин") по сравнению с отрицательным контролем (т.е. "hIgG-Аманитин"). Результаты указывают количество жизнеспособных активированных клеток (Фиг.2A) или жизнеспособных неактивированных клеток (Фиг. 2B) каждого ADC (ось Y) в зависимости от концентрации ADC (ось X).

На **Фиг. 3** графически представлены результаты анализа *in vivo*, сравнивающего процентную выживаемость мышей (ось Y) в зависимости от количества дней после трансплантации (ось X) для

ADC против CD137-аманитина по сравнению с контролем PBS, антителом против CD137 (голым) и изотип-аманитином в модели ксено-РТПХ на мышах NSG.

На **Фиг. 4** графически представлены результаты анализа *in vivo*, сравнивающего количество человеческих Т-клеток, обнаруженных в периферической крови (ось Y), в зависимости от количества дней после трансплантации (ось X) для ADC против CD137-аманитина по сравнению с контролем PBS, антителом против CD137 (голым) и изотип-аманитином в модели ксено-РТПХ на мышах NSG.

На **Фиг. 5A и 5B** графически представлены результаты анализа *in vivo* для определения скорости приживления (Фиг. 5A) и частоты Т-клеток (Фиг. 5B) в модели на гуманизированных мышах NSG-SGM3, где приживление и частоту Т-клеток измеряли в день 5, день 9, день 14, день 22 и в день 27 после трансплантации для ADC против CD137-аманитина в сравнении с контролем PBS, антителом против CD137-ВВК (голым), изотипом-аманитином и ADC против Т-клеток-аманитином в модели ксено-РТПХ на мышах NSG.

Определения

При использовании в настоящем документе термин "приблизительно" относится к значению, которое на 10% выше или ниже описываемого значения. Например, термин "приблизительно 5 нМ" указывает диапазон от 4,5 нМ до 5,5 нМ.

При использовании в настоящем документе термин "аллогенный" относится к клеткам или тканям индивидов, которые относятся к одному виду, но являются генетически отличными, и поэтому иммунологическим несовместимыми. Таким образом, термин "аллогенные клетки" относится к типам клеток, которые являются генетически отличными, но все же относятся к одному виду. Как правило, термин "аллогенный" используется для определения клеток, таких как стволовые клетки, которые пересажены от донора реципиенту того же вида.

При использовании в настоящем документе термин "аматоксин" относится к представителю семейства аматоксинов, пептидов, продуцируемых грибами *Amanita phalloides*, или их варианту или производному, такому как вариант или производное, способные

ингибировать активность РНК-полимеразы II. Аматоксины, которые могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту и проамануллин, а также их производные, такие как производное, описанное любой из формул (**I**), (**IA**) и (**II**), описанных в настоящем документе.

Термин "антагонист" при использовании в настоящем документе описывает любую молекулу, которая ингибирует или уменьшает биологическую активность молекулы-мишени, например, CD137.

При использовании в настоящем документе термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфично связывается или является иммунологически реактивной с конкретным антигеном, и включает поликлональные, моноклональные, генно-инженерно и иным образом модифицированные формы антител, в том числе, без ограничения перечисленными, химерные антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгаты антител (например, би-, три- и тетра-специфичные антитела, диатела, триатела и тетратела) и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, rlgG и scFv фрагменты. Если не указано иное, термин "моноклональное антитело" (мАт) предусматривает включение как интактных молекул, так и фрагментов антител (в том числе, например, Fab и $F(ab')_2$ фрагментов), которые способны специфично связываться с белком-мишенью. При использовании в настоящем документе Fab и $F(ab')_2$ фрагменты относятся к фрагментам антител, которые не содержат Fc-фрагмент интактного антитела. Примеры этих фрагментов антител описаны в настоящем документе.

В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов тяжелых цепей антител антитела можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, причем некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на субклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным

классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и описаны в общем, например, в публикации Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000). Антитело может быть частью более крупной слитой молекулы, образованной при ковалентной или нековалентной ассоциации антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" при использовании в настоящем документе относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном-мишенью. Антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Фрагментами антитела могут быть, например, Fab, F(ab')2, scFv, диатело, триатело, аффитело, нанотело, аптамер или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают, без ограничения перечисленным: (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из V_L, V_H, C_L и C_H1 доменов; (ii) $F(ab')_2$ фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и C_H1 доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела, (v) dAb, включающий V_H и V_L домены; (vi) dAb-фрагмент, который состоит из V_H домена (см., например, Ward et al., Nature 341:544-546, 1989); (vii) dAb, который состоит из V_H или V_L домена; (viii) выделенная определяющая комплементарность область (CDR); и (ix) комбинацию двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR-областей, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены при использовании рекомбинантных методов с помощью линкера, который позволяет им находиться в виде одной белковой цепи, в которой V_L и V_H области спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv). Эти фрагменты антител могут быть получены с помощью

стандартных методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на пригодность таким же способом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, при ферментативном или химическом расщеплении интактных иммуноглобулинов или, в некоторых случаях, при использовании методик химического синтеза пептидов, известных в данной области.

Используемый в настоящем документе термин "антитело против CD137" относится к белку или пептидсодержащей молекуле, которая включает, по меньшей мере, часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения перечисленным, по меньшей мере одна CDR тяжелой или легкой цепи или ее лигандсвязывающая часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную область или их любую часть, которая способна специфично связываться с CD137. Антитела против CD137 также включают каркасы антителоподобных белков, такие как десятый домен фибронектина III типа (^{10}Fn3), который содержит структурные петли BC, DE и FG, сходные по структуре и доступности растворителя с CDR-областями антител. Третичная структура домена ^{10}Fn3 напоминает структуру вариабельной области тяжелой цепи IgG, и специалист в данной области может перевивать, например, CDR-области моноклонального антитела против CD137 на каркас фибронектина путем замены остатков петель BC, DE и FG ^{10}Fn3 остатками из областей CDRH-1, CDRH-2 или CDRH-3 моноклонального антитела против CD137. В одном варианте осуществления антитело против CD137 специфично связывается с человеческим CD137.

При использовании в настоящем документе термин "биспецифичный антитело" относится, например, к моноклональному, часто человеческому или гуманизированному антителу, которое способно связывать по меньшей мере два разных антигена. Например, одна из специфичностей связывания может быть направлена в отношении Т-клеточного поверхностного антигена, такого как CD137, а другая может быть направлена в отношении другого Т-клеточного поверхностного антигена или другого белка

клеточной поверхности, такого как рецептор или субъединица рецептора, участвующие в пути передачи сигнала, который, помимо прочего, блокирует или ограничивает рост клеток.

При использовании в настоящем документе термин "химерное" антитело относится к антителам, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или субклассу антител, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или субклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (см., например, патент США 4,816,567 и Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855). В одном варианте осуществления химерное антитело включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши и константные области легкой и тяжелой цепи человека.

При использовании в настоящем документе термины "определяющая комплементарность область" и "CDR" относятся к гипервариабельной области, присутствующей как в вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой цепи антитела. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Положения аминокислот, которые ограничивают гипервариабельную область антитела, могут варьировать в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области. Некоторые положения в вариабельной области могут рассматриваться как гибридные гипервариабельные положения в том смысле, что эти положения можно считать находящимися внутри гипервариабельной области согласно одному набору критериев, тогда как согласно другому набору критериев можно считать, что они находятся вне гипервариабельной области. Одно или более таких положений также можно найти в расширенных гипервариабельных областях. Описанные в настоящем документе антитела могут содержать модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. Каждый из вариабельных доменов

нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре каркасных области, которые в основном принимают конфигурацию β-листа, соединенных тремя CDR-областями, которые образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры β-листа. CDR-области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости каркасными областями в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и, вместе с CDR-областями из других цепей антител, способствуют образованию мишень-связывающего сайта антител (например, см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD., 1987 or http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi). Нумерация аминокислотных остатков иммуноглобулинов, включая CDR-области, может быть выполнена в соответствии с системой нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулинов Kabat et al.

При использовании в настоящем документе термин "конъюгат" относится к соединению, образованному при химическом связывании реакционноспособной функциональной группы одной молекулы, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с подходящей реакционноспособной функциональной группой другой молекулы, такой как цитотоксин, описанный в настоящем документе. Конъюгаты могут включать линкер между двумя молекулами, связанными друг с другом. Примеры линкеров, которые можно использовать для получения конъюгата, включают пептидсодержащие линкеры, такие как линкеры, которые содержат природные или не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры могут быть получены при использовании различных стратегий, описанных в настоящем документе и известных в данной области. В зависимости от реакционноспособных компонентов в линкере он может расщепляться, например, при ферментативном гидролизе, фотолизе, гидролизе в кислых условиях, гидролизе в основных условиях, окислении, восстановлении дисульфидных связей, нуклеофильном расщеплении или металлоорганическом расщеплении (см., например, Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012). В частности, термин "конъюгат" (в отношении соединения) также

попеременно именуется в настоящем документе как "конъюгат лекарственного средства-антитела" или "конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC)".

При использовании в настоящем документе термин "реакция сочетания" относится к химической реакции, в которой два или более заместителя, подходящих для взаимодействия друг с другом, реагируют с образованием химического фрагмента, который соединяет (например, ковалентно) молекулярные фрагменты, связанные с каждым заместителем. Реакции сочетания включают такие реакции, в которых реакционноспособный заместитель, связанный с фрагментом, который является цитотоксином, таким как цитотоксин, известный в данной области или описанный в настоящем документе, реагирует с подходящим реакционноспособным заместителем, связанным с фрагментом, которым является антитело к CD137, известное в уровне техники или описанное в настоящем документе. Примеры подходящих реакционноспособных заместителей включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галогеналкил, пару амин/карбонил или пару тиол/α,β-ненасыщенный карбонил, помимо прочего), пару диен/диенофил (например, пару азид/алкин, помимо прочего) и т.п. Реакции сочетания включают, без ограничения, алкилирование тиола, алкилирование гидроксила, алкилирование амина, конденсацию амина, амидирование, этерификацию, образование дисульфидной связи, циклоприсоединение (например, циклоприсоединение [4+2] Дильса-Альдера, циклоприсоединение [3+2] Хьюсгена, помимо прочего), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие методики реакций, известные в уровне техники или описанные в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе термин "донор" относится к человеку или животному, у которого выделяют одну или более клеток перед введением клеток или их потомства реципиенту. Одна или более клеток могут быть, например, популяцией гемопоэтических стволовых клеток.

При использовании в настоящем документе термин "диатело" относится к двухвалентному антителу, содержащему две

полипептидные цепи, в котором каждая полипептидная цепь включает V_H и V_L домены, соединенные слишком коротким линкером (например, линкером, состоящим из пяти аминокислот), чтобы позволять внутримолекулярную ассоциацию V_H и V_L доменов на одной пептидной цепи. Эта конфигурация заставляет каждый домен спариваться с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи с образованием гомодимерной структуры. Соответственно, термин "триателло" относится к трехвалентным антителам, содержащим три пептидные цепи, каждая из которых содержит один V_H домен и один V_L домен, соединенные линкером, который является чрезвычайно коротким (например, линкером, состоящим из 1-2 аминокислот), чтобы позволять внутримолекулярную ассоциацию V_H и V_L доменов в пределах одной пептидной цепи. Для укладки в свои нативные структуры, пептиды такой конфигурации обычно тримеризуются, в результате чего V_H и V_L домены на соседних пептидных цепях располагаются в пространстве проксимально по отношению друг к другу (см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993).

При использовании в настоящем документе "иммуноглобулин с двойным вариабельным доменом" ("DVD-Ig") относится к антителу, в котором мишень-связывающие вариабельные домены двух моноклональных антител объединены через линкеры, что приводит к созданию тетравалентного агента с двойной специфичностью (см. например, Gu et al., Meth. Enzymol., 502:25-41, 2012).

При использовании в настоящем документе термин "эндогенный" описывает вещество, такое как молекулу, клетку, ткань или орган (например, гемопоэтическую стволовую клетку или клетку гемопоэтической линии, такую как мегакариоцит, тромбоцит, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, естественная киллерная клетка, Т-клетка или В-клетка), которые в естественных условиях присутствуют в определенном организме, таком как пациент-человек.

При использовании в настоящем документе термин "экзогенный" описывает вещество, такое как молекулу, клетку, ткань или орган

(например, гемопоэтическую стволовую клетку или клетку гемопоэтической линии, такую как мегакариоцит, тромбоцит, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, естественная киллерная клетка, Т-клетка или В-клетка), которые в естественных условиях не присутствуют в конкретном организме, таком как пациент-человек. Экзогенные вещества включают вещества, которые поступают из внешнего источника в организм или культивируемую материю, выделенную из него.

При использовании в настоящем документе термин "каркасная область", "FR" или "FW-область" включает аминокислотные остатки, которые граничат с CDR-областями в вариабельной области антитела или его антигенсвязывающем фрагменте. Остатки FW-области могут присутствовать, например, помимо прочего, в человеческих антителах, гуманизированных антителах, моноклональных антителах, фрагментах антител, Fab-фрагментах, одноцепочечных фрагментах антител, scFv-фрагментах, доменах антител и биспецифичных антителах.

При использовании в настоящем документе, термин "период полувыведения" относится ко времени, которое требуется для двухкратного или 50% снижения концентрации лекарственного средства на основе антитела в плазме. Такое 50% снижение концентрации в сыворотке отражает количество лекарственного средства, циркулирующего и не удаляемого естественными методами клиренса антител.

При использовании в настоящем документе термин "гемопоэтические стволовые клетки" ("ГСК") относится к незрелым клеткам крови, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки крови, в том числе различные линии дифференцировки, включающие, без ограничения перечисленными, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, из которых образуются тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки,

микроглию, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, B-клетки и T-клетки). Такие клетки могут включать $CD34^+$ клетки. $CD34^+$ клетки являются незрелыми клетками, которые экспрессируют маркер клеточной поверхности CD34. Считается, что у людей CD34+ клетки включают субпопуляцию клеток со свойствами стволовых клеток, определенными выше, тогда как у мышей ГСК являются CD34-. Кроме того, ГСК также относятся к ГСК с долгосрочной репопуляционной активностью (ДР-ГСК) и ГСК с краткосрочной репопуляционной активностью (КР-ГСК). ДР-ГСК и КР-ГСК дифференцируются в зависимости от функционального потенциала и экспрессии маркеров клеточной поверхности. Например, человеческие ГСК являются CD34+, CD38-, CD45RA-, CD90+, CD49F+ и lin- (отрицательными по маркерам зрелой линии дифференцировки, включающим CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11B, CD19, CD20, CD56, CD235A). У мышей ДР-ГСК костного мозга являются CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+, CD48- и lin- (отрицательными по маркерам зрелой линии дифференцировки, включающим Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra), тогда как КР-ГСК являются CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+ и lin- (отрицательными по маркерам зрелой линии дифференцировки, включающим Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra). Кроме того, КР-ГСК реже находятся в фазе покоя и более активно пролиферируют, чем ДР-ГСК в гомеостатических условиях. Однако ДР-ГСК имеют больший потенциал к самообновлению (то есть они выживают в течение всей зрелой жизни и могут быть последовательно трансплантированы ряду реципиентов), тогда как КР-ГСК обладают ограниченной способностью к самообновлению (т.е. они выживают только в течение ограниченного периода времени и не обладают потенциалом к последовательной трансплантации). Любые из этих ГСК могут применяться в способах, описанных в настоящем документе. КР-ГСК особенно полезны, поскольку они обладают высокой способностью к пролиферации и, следовательно, могут быстрее давать дифференцированное потомство.

При использовании в настоящем документе термин "функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки" относится к функциональным свойствам гемопоэтических стволовых

клеток, которые включают: 1) плюрипотентность (которая относится к способности дифференцироваться во множество различных линий клеток крови, включающих, без ограничения перечисленными, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, из которых образуются тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглию, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, B-клетки и T-клетки), 2) самообновление (которое относится к способности гемопоэтических стволовых клеток давать дочерние клетки, которые обладают эквивалентным потенциалом, как у материнской клетки, и, кроме того, эта способность может повторно проявляться на протяжении всей жизни человека без снижения), и 3) способность гемопоэтических стволовых клеток или их потомства к повторному введению реципиенту трансплантата, после чего они возвращаются в нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

При использовании в настоящем документе термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, все CDR-области, каркасные области, C_L, C_H домены (например, C_H1, C_H2, C_H3), шарнир и V_L и V_H домены) являются по существу неиммуногенными у людей, с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Человеческое антитело можно продуцировать в клетке человека (например, при рекомбинантной экспрессии) или животного, не относящегося к человеку, или в прокариотической или эукариотической клетке, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческого иммуноглобулина (такие как гены тяжелой цепи и/или легкой цепи). Когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может включать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, как например, от двух до восьми остатков глицина или других аминокислотных остатков, которые соединяют вариабельную область тяжелой цепи и

вариабельную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области, включая способы фагового дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека.

"Гуманизированное" антитело относится к нечеловеческому антителу, которое содержит минимальные последовательности, полученные из нечеловеческого иммуноглобулина. Таким образом, "гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого антитела. В целом гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, два, вариабельных домена, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют CDR-областям из нечеловеческого иммуноглобулина. Все или по существу все FW-области также могут быть FW-областями из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Способы гуманизации антител известны в уровне техники.

В одном варианте осуществления гуманизированное антитело является человеческим антителом (реципиентным антителом), в котором остатки из CDR-областей реципиента заменены остатками из CDR-областей не относящегося к человеку вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, обладающих требуемой специфичностью, аффинностью и/или способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого антитела заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не

присутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дополнительного улучшения эффективности антитела. В целом гуманизированное антитело будет включать по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям из нечеловеческого антитела, и все или по существу все FR-области происходят из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно будет также включать, по меньшей мере, часть константной области антитела (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Для получения дополнительных сведений см. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и источники, цитируемые в них: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

Термины "полноразмерное антитело" и "интактное антитело" используются в настоящем документе попеременно для обозначения антитела в его по существу интактной форме, а не фрагмента антитела, как определено в настоящем документе. Таким образом, в случае IgG антитела, интактное антитело включает две тяжелых цепи, каждая из которых включает вариабельную область, константную область и Fc-область, и две легких цепи, каждая из которых включает вариабельную область и константную область. В частности, интактный IgG включает две легких цепи, каждая из которых включает вариабельную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL), и включает две тяжелых цепи, каждая из которых включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и три константных области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). CH2 и CH3 представляют собой Fc-область тяжелой цепи.

При использовании в настоящем документе термин "связывающее микротрубочки средство" относится к соединению, которое разрушает сеть микротрубочек, которая важна для митотической и межфазной клеточной функции. Примеры связывающего микротрубочки

средства включают, без ограничения перечисленными, майтанзин, майтанзиноиды и их производные, такие как описанные в настоящем документе или известные в уровне техники, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винбластина сульфат, винкристин, винкристина сульфат, виндезин и винорелбин, таксаны, такие как доцетаксел и паклитаксел, макролиды, такие как дискодермолиды, колхицин и эпотилоны, а также их производные, такие как эпотилон B или его производное. Паклитаксел доступен на рынке под наименованием Таксол®; доцетаксел как Таксотер®; винбластина сульфат как VINBLASTIN R.P®; и винкристина сульфат как FARMISTIN®. Также включены универсальные формы паклитаксела, а также различные лекарственные формы паклитаксела. Универсальные формы паклитаксела включают, без ограничения перечисленными, бетаксолола гидрохлорид. Различные лекарственные формы паклитаксела включают, без ограничения перечисленными альбуминовые наночастицы паклитаксела, доступные на рынке под наименованием Абраксан®; ONXOL®, CYTOTAX®. Дискодермолид может быть получен, например, как раскрыто в патенте США 5,010,099. Также включены производные эпотилона, которые раскрыты в патенте США 6,194,181, WO9810121, WO9825929, WO9808849, WO9943653, WO9822461 и WO0031247, описания каждого из которых включены в настоящий документ посредством отсылки.

При использовании в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу, которым оно получено.

При использовании в настоящем документе термин "пациент, подвергающийся риску РТПХ" относится к пациенту с одним или более факторами риска развития РТПХ. Факторы риска включают, без ограничения перечисленными, аллогенный донорский трансплантат (например, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток из трансплантата костного мозга), включая донора, несовпадающего по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA), и донора другого пола, трансплантат стволовых клеток, насыщенный Т-клетками, возраст донора и реципиента, присутствие цитомегаловируса (ЦМВ)

или антитела к ЦМВ у донора или реципиента трансплантата, повышенную дозу тотального облучения тела (TBI), интенсивность схемы кондиционирования, профилактику острой РТПХ, отсутствие защитных сред, спленэктомию, применение иммуноглобулина, первопричинное заболевание, совместимость по группе крови, предыдущий контак с вирусами герпеса, переливания донорской крови, индекс общего состояния, деконтаминация кишечного тракта антибиотиками и переливания крови после аллогенной трансплантации.

При использовании в настоящем документе термин "пациент, подвергающийся риску аутоиммунного заболевания" относится к пациенту с одним или более факторами риска аутоиммунного заболевания. Факторы риска включают, без ограничения перечисленными, возраст (от подросткового до среднего возраста), пол (женский), этническую принадлежность (афроамериканец, американский индеец или латиноамериканец), случаи аутоиммунных заболеваний у ближайших родственников, возлействие факторов внешней среды, предыдущую инфекцию, хроническое воспаление и донорскую трансплантацию (например, пересадку гемопоэтических стволовых клеток из трансплантата костного мозга). При использовании в настоящем документе термин "реципиент" относится к пациенту, который получает трансплантат, такой как трансплантат, содержащий популяцию гемопоэтических стволовых клеток. Трансплантированные клетки, вводимые реципиенту, могут быть, например, аутологичными, изогенными или аллогенными клетками.

При использовании в настоящем документе термин "образец" относится к образцу (например, крови, компонента крови (например, сыворотки или плазмы), мочи, слюны, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, ткани (например, плацентарной или кожной), панкреатического сока, пробу ворсин хориона и клетки, взятые у субъекта.

При использовании в настоящем документе термин "scFv" относится к одноцепочечному Fv антителу, в котором вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи антитела были соединены с образованием одной цепи. scFv-фрагменты содержат одну

полипептидную цепь, которая включает вариабельную область легкой цепи антитела (V_L) (например, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (V_H) (например, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), разделенные линкером. Линкер, который соединяет V_L и V_H области scFv-фрагмента, может быть пептидным линкером, состоящим из протеиногенных аминокислот. Альтернативные линкеры могут использоваться для увеличения устойчивости scFv-фрагмента к протеолитической деградации (например, линкеры, содержащие D-аминокислоты), для повышения растворимости scFv-фрагмента (например, гидрофильные линкеры, такие как линкеры, содержащие полиэтиленгликоль, или полипептиды, содержащие повторяющиеся остатки глицина и серина), для улучшения биофизической стабильности молекулы (например, линкер, содержащий остатки цистеина, которые образуют внутримолекулярные или межмолекулярные дисульфидные связи), или для уменьшения иммуногенности scFv-фрагмента (например, линкеры, содержащие сайты гликозилирования). Специалисту в данной области также должно быть понятно, что вариабельные области молекул scFv, описанных в настоящем документе, могут быть модифицированы таким образом, что они отличаются по аминокислотной последовательности от молекулы антитела, из которого они были получены. Например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям на уровне аминокислотных остатков (например, в CDR и/или каркасных остатках), чтобы сохранить или усилить способность scFv связываться с антигеном, распознаваемым соответствующим антителом.

Термины "специфичное связывание" или "специфично связывающий" при использовании в настоящем документе относятся к способности антитела (или ADC) распознавать и связываться с определенной белковой структурой (эпитопом), а не с белками в целом. Если антитело или ADC является специфичным к эпитопу "A", присутствие молекулы, содержащей эпитоп (или свободный, немеченый A), в реакции, содержащей меченый "A" и антитело, уменьшит количество меченого "A", связанного с антителом или ADC. В качестве примера, антитело "специфично связывается" с

мишенью, если антитело, когда оно помечено, может подвергаться конкуренции за связывание с его мишенью с соответствующим немеченым антителом. В одном варианте осуществления антитело специфично связывается с мишенью, например CD137, если антитело имеет K_D в отношении мишени, составляющее по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или меньше (меньше означает число, которое меньше 10^{-12}, например 10^{-13}). В одном варианте осуществления термин "специфичное связывание с CD137" или "специфично связывается с CD137" при использовании в настоящем документе относится к антителу или ADC, которые связываются с CD137 и имеют константу диссоциации (K_D) $1,0\times10^{-7}$ М или меньше, при определении методом поверхностного плазмонного резонанса. В одном варианте осуществления K_D определено согласно стандартной интерферометрии биослоя (BLI). Впрочем, следует понимать, что антитело или ADC могут специфично связываться с двумя или больше антигенами, которые имеют родственную последовательность. Например, в одном варианте осуществления антитело может специфично связываться как с человеческим, так и с нечеловеческими ортологами CD137 (например, мыши или не относящегося к человеку примата).

При использовании в настоящем документе термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, такому как человек, который получает лечение конкретного заболевания или состояния, как описано в настоящем документе. Например, пациент, такой как пациент-человек, может получать лечение до трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками, с целью лечения или предотвращения РТПХ путем введения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или лиганда, как описано в настоящем документе, способных связывать CD137.

При использовании в настоящем документе фраза "по существу выведен из крови" относится к моменту времени после введения лекарственного средства (такого как антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, или растворимый лиганд) пациенту, когда концентрация лекарственного средства в образце крови,

выделенном у пациента, является такой, что лекарственное средство невозможно обнаружить с помощью стандартных способов (например, когда лекарственное средство не обнаруживается на уровне выше фонового порога устройства или анализа, используемого для обнаружения лекарственного средства). Для обнаружения антител, фрагментов антител и белковых лигандов могут использоваться различные методы, известные в данной области, такие как анализы обнаружения на основе ИФА, известные в уровне техники или описанные в настоящем документе. Дополнительные анализы, которые могут использоваться для обнаружения антител, фрагментов антител и белковых лигандов, включают, помимо прочего, методы иммунопреципитации и иммуноблот-анализы, известные в уровне техники.

При использовании в настоящем документе фраза "нарушение функции стволовых клеток" в широком смысле относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, которое можно лечить или излечивать с помощью кондиционирования целевых тканей субъекта и/или путем абляции эндогенной популяции стволовых клеток в целевой ткани (например, абляции популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников из ткани костного мозга субъекта) и/или путем приживления или трансплантации стволовых клеток в целевых тканях субъекта. Например, было показано, что диабет I типа излечивается при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, и при этом может быть эффективным кондиционирование в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе. Дополнительные нарушения, которые можно лечить с применением композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, АДА-ТКИД, ВИЧ/СПИД, метахроматическую лейкодистрофию, анемию Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или может быть поражен наследственным гематологическим заболеванием (например, серповидноклеточную анемию) или аутоиммунным заболеванием. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или может быть поражен онкологическим заболеванием, таким

как онкологическое заболевание, выбранное из группы, состоящей из гемабластозов (например, лейкозов, лимфом, множественной миеломы или миелодиспластического синдрома) и нейробластомы. В некоторых вариантах субъект страдает или иным образом поражен нарушением обмена веществ. Например, субъект может страдать или может быть иным образом поражен нарушением обмена веществ, выбранным из группы, состоящей из заболеваний накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлер, сфинголипидозов, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или нарушений, при которых может быть эффективным лечение и способы лечения, описанные в настоящем документе, и включающих, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Уискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулинемии М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и другие заболевания или нарушения, описанные в публикации "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), которая полностью включена в настоящее описание посредством отсылки, поскольку она относится к патологиям, которые можно лечить путем применения трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками.

При использовании в настоящем документе термин "страдающий заболеванием" относится к субъекту (например, человеку), который страдает РТПХ или аутоиммунным заболеванием. Предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается какими-либо конкретными признаками или симптомами, или заболеванием. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение охватывает субъектов, у которых присутствует любой спектр заболеваний, от субклинических проявлений до резко выраженных заболеваний, когда у субъекта наблюдаются, по меньшей мере, некоторые проявления (например, признаки и симптомы), связанные с РТПХ или аутоиммунным заболеванием.

При использовании в настоящем документе термин

"трансфекция" относится к любому из целого ряда методов, стандартно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, таких как электропорация, липофекция, соосаждение с фосфатом кальция, трансфекция с ДЭАЭ-декстраном и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "трансплантат" относится к любому органу, ткани тела или клетке(ам), которые были перемещены из их места происхождения в реципиентный участок, или к действию по выполнению такого перемещения.

При использовании в настоящем документе термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, целью которого является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, или содействие благоприятному фенотипу у пациента, подвергаемого лечению. Полезные или требуемые клинические результаты включают, без ограничения перечисленными, уменьшение количества клеток или относительной концентрации CD137-положительных клеток, уменьшение клеточных и клинических проявлений РТПХ или аутоиммунного заболевания, содействие приживлению экзогенных гемопоэтических клеток у пациента, как описано в настоящем документе, и последующую трансплантационную терапию гемопоэтическими стволовыми клетками. Дополнительные полезные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гемопоэтических стволовых клеток, страдающих или подвергающихся риску РТПХ. Полезные результаты терапии, описанной в настоящем документе, также могут включать увеличение количества клеток или относительной концентрации одной или более клеток гемопоэтической линии, таких как мегакариоцит, тромбоцит, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, NK-клетка, Т-клетка или В-клетка, после трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками.

При использовании в настоящем документе термин "эффективное

количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое является достаточным для достижения требуемого результата или воздействия на РТПХ или аутоиммунное заболевание. Определенный уровень терапевтически эффективной дозы для какого-либо конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включающих подвергаемое лечению нарушение и тяжесть нарушения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения; путь введения; уровень экскреции конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретным используемым соединением, и подобные факторы, известные в уровне техники. Схема применения может изменяться и может включать введение в одно или более введений дозы ежедневно, в течение одного или нескольких дней.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может именоваться "VH". Вариабельный домен легкой цепи может именоваться "VL". Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными фрагментами антитела и содержат антигенсвязывающие участки (CDR-области).

При использовании в настоящем документе термин "вектор" включает полинуклеотидный вектор, такой как плазмиду, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, вирус или другой подходящий репликон. Описанные в настоящем документе экспрессионные векторы могут содержать полинуклеотидную последовательность, а также, например, дополнительные элементы последовательности, используемые для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клетки млекопитающего. Некоторые векторы, которые могут использоваться для экспрессии антител и фрагментов антител согласно изобретению, включают плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как промоторные и энхансерные области, которые направляют транскрипцию гена. Другие подходящие векторы для экспрессии антител и фрагментов антител содержат полинуклеотидные последовательности, которые увеличивают уровень

трансляции этих генов или улучшают стабильность или ядерный экспорт мРНК, образующейся в результате транскрипции гена. Эти элементы последовательности могут включать, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области и сайт сигнала полиаденилирования для направления эффективной транскрипции гена, который несет экспрессирующий вектор. Экспрессионные векторы, описанные в настоящем документе, также могут содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для отбора клеток, которые содержат такой вектор. Примеры подходящего маркера включают гены, которые кодируют устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин и нурсеотрицин.

При использовании в настоящем документе термин "алкил" относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 1 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, трет-пентил, гексил, изогексил и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "алкилен" относится к двухвалентной алкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в алкильной цепи. Примеры алкилена включают метилен, этилен, пропилен, изопропилен и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкил" относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 1 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей в цепи один или более гетероатомов (например, помимо прочего, кислород, азот или серу).

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкилен" относится к двухвалентной гетероалкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкильной цепи.

При использовании в настоящем документе термин "алкенил" относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкенильных групп включают винил, пропенил, изопропенил,

бутенил, трет-бутиленил, гексенил и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "алкенилен" относится к двухвалентной алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в алкенильной цепи. Примеры алкенилена включают этенилен, пропенилен, изопропенилен, бутенилен и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкенил" относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей в цепи один или более гетероатомов (например, помимо прочего, кислород, азот или серу).

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкенилен" относится к двухвалентной гетероалкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкенильной цепи.

При использовании в настоящем документе термин "алкинил" относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкинильных групп включают пропаргил, бутинил, пентинил, гексинил и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "алкинилен" относится к двухвалентной алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в алкинильной цепи.

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкинил" относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей в цепи один или более гетероатомов (например, помимо прочего, кислород, азот или серу).

При использовании в настоящем документе термин "гетероалкинилен" относится к двухвалентной гетероалкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкинильной

цепи.

При использовании в настоящем документе термин "циклоалкил" относится к моноциклической или конденсированной, мостиковой или спиро-полициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и содержит, например, от 3 до 12 атомов углерода в кольце. Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, бицикло[3.1.0]гексан и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "циклоалкилен" относится к двухвалентной циклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в кольцевой структуре. Примеры циклоалкилена включают циклопропилен, циклобутилен, циклопентилен, циклогексилен и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "гетероциклоалкил" относится к моноциклической или конденсированной, мостиковой или спиро-полициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и содержит, например, от 3 до 12 атомов в кольцевой структуре, выбранных из атомов углерода и гетероатомов, выбранных, например, помимо прочего, из азота, кислорода и серы. Кольцевая структура может содержать, например, одну или более оксогрупп на атомах углерода, азота или серы, содержащихся в кольце.

При использовании в настоящем документе термин "гетероциклоалкилен" относится к двухвалентной гетероциклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в кольцевой структуре.

При использовании в настоящем документе термин "арил" относится к моноциклической или полициклической ароматической кольцевой системе, содержащей, например, от 6 до 19 атомов углерода. Арильные группы включают, без ограничения перечисленными, фенил, флуоренил, нафтил и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "арилен" относится к двухвалентной арильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах.

При использовании в настоящем документе термин "гетероарил" относится к моноциклической гетероароматической или

бициклической или трициклической гетероароматической группе с конденсированными кольцами. Гетероарильные группы включают пиридил, пирролил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, пиразолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,3,4-триазинил, 1,2,3-триазинил, бензофурил, [2,3-дигидро]бензофурил, изобензофурил, бензотиенил, бензотриазолил, изобензотиенил, индолил, изоиндолил, 3Н-индолил, бензимидазолил, имидазо[1,2-а]пиридил, бензотиазолил, бензоксазолил, хинолизинил, хиназолинил, фталазинил, хиноксалинил, циннолинил, нафтиридинил, пиридо[3,4-b]пиридил, пиридо[3,2-b]пиридил, пиридо[4,3-b]пиридил, хинолил, изохинолил, тетразолил, 5,6,7,8-тетрагидрохинолил, 5,6,7,8-тетрагидроизохинолил, пуринил, птеридинил, карбазолил, ксантенил, бензохинолил и т.п.

При использовании в настоящем документе термин "гетероарилен" относится к двухвалентной гетероарильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах.

Если иное не ограничено определением отдельного заместителя, предшествующие химические группы, такие как "алкил", "алкилен", "гетероалкил", "гетероалкилен", "алкенил", "алкенилен", "гетероалкенил", "гетероалкенилен", "алкинил", "алкинилен", "гетероалкинил", "гетероалкинилен", "циклоалкил", "циклоалкилен", "гетероциклоалкил", гетероциклоалкилен", "арил", "арилен", "гетероарил" и "гетероарилен" необязательно могут быть замещены, например, 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклоалкила, алкиларила, алкилгетероарила, алкилциклоалкила, алкилгетероциклоалкила, амино, аммония, ацила, ацилокси, ациламино, аминокарбонила, алкоксикарбонила, уреидо, карбамата, арила, гетероарила, сульфинила, сульфонила, алкокси, сульфанила, галогена, карбокси, тригалогенметила, циано, гидрокси, меркапто, нитро и т.п. Замена может включать ситуации, в которых соседние заместители подверглись циклизации, такой как циклизация вицинальных функциональных заместителей, с

образованием, например, лактамов, лактонов, циклических ангидридов, ацеталей, полуацеталей, тиоацеталей, аминалей и полуаминалей, образованных в результате циклизации, например, для получения защитной группы.

Подробное описание

Изобретение предоставляет способы профилактики и лечения реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) и аутоиммунных заболеваний путем введения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда, способных связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими клетками. Такое введение может вызывать селективную элиминацию популяции экзогенных Т-клеток, которые являются аутореактивными у реципиента. Изобретение частично основано на открытии того, что антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд, способные связывать CD137, можно вводить пациенту с целью предотвращения и лечения РТПХ и аутоиммунных заболеваний, возникающих в результате трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками.

Профилактика и лечение РТПХ путем введения антител против CD137, их антигенсвязывающих фрагментов, ADC или растворимых лигандов, могут проявляться в различных клинических симптомах (см., например, McDonald, Blood. 127: 1544-1440, 2016, и Flowers et al., Blood. 125: 606-615, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится, без ограничения, к измеряемым клиническим признакам острой и хронической РТПХ соответственно). Профилактика и лечение РТПХ и аутоиммунных заболеваний путем введения антител против CD137, их антигенсвязывающих фрагментов или ADC, могут проявляться в различных эмпирических измерениях. Например, элиминация CD137+ положительных клеток может быть определена с помощью анализа методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), известного в данной области, для измерения количества CD137+ лейкоцитов в периферической крови в течение периода после трансплантации, и/или путем измерения восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного

мозга. Подсчет Т-клеток, продуцирующих интерферон-γ (IFN-γ) в периферической крови реципиентов, может позволить оценить эффективность антител к CD137 при РТПХ и аутоиммунных заболеваниях. Изменение популяций иммунных клеток при определении с помощью FACS может указывать на РТПХ или аутоиммунное заболевание. Наконец, генетические и протеомные биомаркеры, обнаруженные у пациента, также могут указывать на РТПХ или аутоиммунное заболевание.

В разделах ниже предоставлено описание антител, их антигенсвязывающих фрагментов, ADC или растворимых лигандов, которые могут быть введены пациенту, страдающему или подвергающемуся риску РТПХ или аутоиммунного заболевания, а также способов введения таких терапевтических средств пациенту.

Антитела и лиганды против CD137

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и растворимые лиганды, способные связывать CD137 (также называемый CDw137, TNFRSF9, 4-1BB и ILA), могут применяться в качестве терапевтических средств для предотвращения и лечения РТПХ в результате введения гемопоэтических стволовых клеток у пациента, страдающего или подвергающегося риску развития РТПХ или аутоиммунного заболевания. Кроме того, было обнаружено, что лиганды, которые связывают CD137, такие как CD137L человека, могут применяться в качестве терапевтического средства для предотвращения и лечения пациента, страдающего или подвергающегося риску развития РТПХ. Эти лиганды, такие как растворимый человеческий CD137, могут быть ковалентно связаны с эффекторным доменом, таким как Fc-домен, например, с целью вызвать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC).

Было показано, что Т-клетки экспрессируют CD137, поскольку этот антиген представляет суперсемейство костимулирующих молекул трансмембранного рецептора ФНО и экспрессируется на различных гемопоэтических клетках, способствует активации Т-клеток и регулирует пролиферацию и выживание Т-клеток (см., например,

публикацию Cannons et al., J. Immunol. 167:1313-1324, 2001, которая включена в настоящее описание посредством отсылки, поскольку она относится к экспрессии CD137 Т-клетками). Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и лиганды могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в уровне техники и описанных в настоящем документе, таких как иммунизация, методы компьютерного моделирования и способы отбора *in vitro*, такие как платформы фагового дисплея и клеточного дисплея, описанные ниже.

Антитела против CD137, которые могут применяться для предотвращения и лечения РТПХ или аутоиммунного заболевания способами, раскрытыми в настоящем документе, включают антитела против CD137, которые содержат одну или более, или все, из следующих CDR-областей:

a. CDR-H1, имеющая аминокислотную последовательность STYWIS (SEQ ID NO: 1);

b. CDR-H2, имеющая аминокислотную последовательность KIYPGDSYTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 2);

c. CDR-H3, имеющая аминокислотную последовательность RGYGIFDY (SEQ ID NO: 3);

d. CDR-L1, имеющая аминокислотную последовательность SGDNIGDQYAH (SEQ ID NO: 4)

e. CDR-L2, имеющая аминокислотную последовательность QDKNRPS (SEQ ID NO: 5); и

f. CDR-L3, имеющая аминокислотную последовательность ATYTGFGSLAV (SEQ ID NO: 6)

Дополнительные антитела против CD137, которые могут применяться для предотвращения и лечения РТПХ и аутоиммунных заболеваний способами, раскрытыми в настоящем документе, включают антитела против CD137, которые содержат одну или более, или все, из следующих CDR-областей:

a. CDR-H1, имеющая аминокислотную последовательность STYWIS (SEQ ID NO: 1);

b. CDR-H2, имеющая аминокислотную последовательность KIYPGDSYTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 2);

c. CDR-H3, имеющая аминокислотную последовательность

RGYGIFDY (SEQ ID NO: 3);

d. CDR-L1, имеющая аминокислотную последовательность SGDNIGDQYAH (SEQ ID NO: 4)

e. CDR-L2, имеющая аминокислотную последовательность QDKNRPS (SEQ ID NO: 5); и

f. CDR-L3, имеющая аминокислотную последовательность STYTFVGFTTV (SEQ ID NO: 7)

Дополнительные антитела против CD137 включают антитела против CD137, которые содержат одну или более, или все, из следующих CDR-областей:

a. CDR-H1, имеющая аминокислотную последовательность NSYAIS (SEQ ID NO: 8);

b. CDR-H2, имеющая аминокислотную последовательность GIIPGFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 9);

c. CDR-H3, имеющая аминокислотную последовательность RKNEEDGGFDH (SEQ ID NO: 10);

d. CDR-L1, имеющая аминокислотную последовательность SGDNLGDYYAS (SEQ ID NO: 11)

e. CDR-L2, имеющая аминокислотную последовательность DDSNRPS (SEQ ID NO: 12); и

f. CDR-L3, имеющая аминокислотную последовательность QTWDGTLHFV (SEQ ID NO: 13)

Дополнительные антитела против CD137 или ADC включают антитела против CD137 или ADC, которые содержат одну или более, или все, из следующих CDR-областей:

a. CDR-H1, имеющая аминокислотную последовательность SDYYMH (SEQ ID NO: 14);

b. CDR-H2, имеющая аминокислотную последовательность VISGSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 15);

c. CDR-H3, имеющая аминокислотную последовательность RLYAQFEGDF (SEQ ID NO: 16);

d. CDR-L1, имеющая аминокислотную последовательность SGDNIGSKYVS (SEQ ID NO: 17)

e. CDR-L2, имеющая аминокислотную последовательность SDSERPS (SEQ ID NO: 18); и

f. CDR-L3, имеющая аминокислотную последовательность

QSWDGSISRV (SEQ ID NO: 19)

Предыдущие антитела описаны, например, в патенте США 9,468,678, описание которого включено в настоящий документ посредством отсылки, поскольку оно относится к антителам против CD137 и их антигенсвязывающим фрагментам. Антитела и фрагменты, раскрытые в патенте США 9,468,678, могут применяться совместно со способами, раскрытыми в настоящем документе.

В другом варианте осуществления антитело против CD137, которое может применяться в способах и композициях (включающих ADC), описанных в настоящем документе, является мышиным антителом против CD137, BBK2 (Thermo Fisher; MS621PABX), или антителом против CD137, включающим антигенсвязывающие области, соответствующие антителу BBK2. Антитело BBK2 (которое может также именоваться антителом BBK-2 или антителом против 4-1BB), представляет собой моноклональное мышиное антитело (IgG1, каппа), которое связывается с эктодоменом человеческого рекомбинантного белка 4-1BB (4-1BB также известен как CD137). В некоторых вариантах осуществления способы и композиции настоящего изобретения включают антитело против CD137, включающее связывающие области (например, CDR-области) антитела BBK2. В другом варианте осуществления способы и композиции настоящего изобретения включают антитело, которое селективно ингибирует связывание антитела BBK2 с его эпитопом на CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD137 представляет собой гуманизированное BBK2 или химерное BBK2.

В одном варианте осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, включают химерное антитело против CD137 (ch-BBK2), включающее вариабельные области тяжелой и легкой цепи BBK2. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело BBK2 является IgG1 антителом, включающим человеческие константные области. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи ch-BBK2 описана в SEQ ID NO: 23, и аминокислотная последовательность легкой цепи ch-BBK2 описана в SEQ ID NO: 24. CDR-области (CDR1, CDR2 и CDR3) каждой из последовательностей тяжелой и легкой цепи выделены полужирным шрифтом ниже. Вариабельные области выделены курсивом.

*QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA**SGYTFTSYW**INWVKQRPGQGLEWIG**NIYPSDSYT**N*
*YNQKFKDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYC**TRNGVEGYPHYYAME**YWGQGTSVTVSS*
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)

*DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRA**SQDLSNH**LYWYQQKPDGTVKLLI**YYTS**RLHSGVP*
*SRFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYF**CQQGYTLPY**TFGGGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 24)

Предыдущие CDR-области (и антитело BBK2) описаны в публикации Lee et al. (2002) European J of Immunogenetics 29(5):449-452. Таким образом, в одном варианте осуществления аминокислотные последовательности VH CDR антитела против CD137 BBK2 (включая ch-BBK2) являются следующими: SGYTFTSYW (VH CDR1; SEQ ID NO: 33); NIYPSDSYT (VH CDR2; SEQ ID NO: 34) и TRNGVEGYPHYYAME (VH CDR3; SEQ ID NO: 35). Аминокислотные последовательности VL CDR антитела против CD137, BBK2 (включая ch-BBK2), являются следующими: SQDLSNH (VL CDR1; SEQ ID NO: 36); YYTS (VL CDR2; SEQ ID NO: 37) и CQQGYTLPY (VL CDR3; SEQ ID NO: 38).

В альтернативе CDR-области BBK2 могут быть определены согласно нумерации Кэбата. CDR-области, определенные согласно нумерации Кэбата, описаны ниже для каждой из последовательностей тяжелой и легкой цепи (выделены полужирным шрифтом ниже). Вариабельные области BBK2 выделены курсивом.

*QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT**SYWIN**WVKQRPGQGLEWIG**NIYPSDSYTN***
***YNQKFKD**KATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYCTR**NGVEGYPHYYAMEY**WGQGTSVTVSS*
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (тяжелая цепь ch-BBK2; SEQ ID NO: 23)

*DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGC**RASQDLSNHLY**WYQQKPDGTVKLLIY**YTSRLHS**GVP SRFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYFC**QQGYTLPYT**FGGGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (легкая цепь ch-BBK2; SEQ ID NO: 24)

Таким образом, в одном варианте осуществления, аминокислотные последовательности VH CDR антитела против CD137, BBK2 (включая ch-BBK2), являются следующими: SYWIN (VH CDR1; SEQ ID NO: 25); NIYPSDSYTNYNQKFKD (VH CDR2; SEQ ID NO: 26) и NGVEGYPHYYAMEY (VH CDR3; SEQ ID NO: 27), и аминокислотные последовательности VL CDR антитела против CD137, BBK2 (включая ch-BBK2), являются следующими: RASQDLSNHLY (VL CDR1; SEQ ID NO: 29); YTSRLHS (VL CDR2; SEQ ID NO: 30) и QQGYTLPYT (VL CDR3; SEQ ID NO: 31).

Вариабельная область тяжелой цепи BBK2 представлена в SEQ ID NO: 28 как QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKF KDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYCTRNGVEGYPHYYAMEYWGQGTSVTVSS. Вариабельная область легкой цепи BBK2 представлена в SEQ ID NO: 32 как DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRASQDLSNHLYWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYFCQQGYTLPYTFGGGTKLEIK. Антитела против CD137 (включая ADC против CD137) могут включать аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 32, соответственно.

В одном варианте осуществления антитело против CD137, например химерное (ch-BBK2) антитело или гуманизированное антитело BBK2, включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и включает вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В одном варианте осуществления антитело против CD137, например, химерное (ch-BBK2) антитело или гуманизированное антитело BBK2, включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; и включает вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

Таким образом, антитело BBK2, гуманизированное антитело BBK2 или химерное антитело BBK2 могут применяться в ADC против CD137 и способах, описанных в настоящем документе. Каждое из этих антител может быть конъюгировано с любым цитотоксином, описанным ниже, при использовании способов, известных в уровне техники и описанных в настоящем документе.

Другие антитела против CD137, которые могут применяться в сочетании с цитотоксином, описанным в настоящем документе, могут быть идентифицированы при использовании способов, известных в уровне техники (например, получение гибридом). Гибридомы могут быть получены при использовании мышиной системы. Методики иммунизации и последующего выделения спленоцитов для слияния известны в уровне техники. Партнеры по слиянию и методики создания гибридом также известны. Человеческие антитела против CD137 также могут быть созданы в HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. При получении антител против CD137 антиген CD137 выделяют и/или очищают. Антиген CD137 может быть фрагментом CD137 из внеклеточного домена CD137. Иммунизация животных может быть выполнена любым способом, известным в данной области. См., например, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Способы иммунизации животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области. См.,

например, Harlow and Lane, выше, и патент США 5,994,619. Антиген CD137 можно вводить с адъювантом для стимуляции иммунного ответа. Адъюванты, известные в данной области, включают полный или неполный адъювант Фрейнда, RIBI (мурамилдипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). После иммунизации животного антигеном CD137 из клеток, выделенных у иммунизированного животного, получают антителопродуцирующие иммортализованные клеточные линии. После иммунизации животное умерщвляют и В-клетки лимфатическим узлов и/или селезенки иммортализируют способами, известными в данной области (например, перенос онкогена, трансдукция онкогенным вирусом, воздействие канцерогенных или мутагенных соединений, слияние с иммортализованной клеткой, например миеломной клеткой, и инактивация гена-супрессора опухоли. См., например, Harlow and Lane, выше. Гибридомы можно отбирать, клонировать и затем подвергать скринингу на наличие требуемых характеристик, включая устойчивый рост, высокую продукцию антител и нужные свойства антител.

Антитела против CD137 могут быть получены из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность связывающей CD137 молекулы, предложенной в настоящем изобретении. Аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеотидной последовательностью, может быть любой частью антитела, такой как CDR, последовательность, содержащая одну, две или три CDR-области, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи, или может быть полноразмерной тяжелой цепью или полноразмерной легкой цепью. Нуклеиновая кислота согласно изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. Как правило, нуклеиновая кислота является молекулой кДНК.

В дополнение к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, растворимые лиганды CD137, такие как лиганд CD137 человека, могут быть введены пациенту в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, для кондиционирования пациента

перед трансплантационной терапией гемопоэтическими стволовыми клетками. Например, лиганды CD137, такие как лиганд CD137 человека, могут быть конъюгированы с цитотоксином (например, в соответствии со способами, описанными ниже или известными в уровне техники), или другой эффекторной молекулой, такой как Fc-домен. Майтанзиновые цитотоксины для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают, например, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgG1, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgG2, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgG3, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgG4, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgA, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgE, конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgM и конъюгаты лиганда CD137 человека-Fc IgD.

Антитела и лиганды для применения в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают варианты тех антител, которые описаны выше, такие как фрагменты антител, которые содержат или не имеют Fc-домена, а также гуманизированные варианты нечеловеческих антител, описанных в настоящем документе, и антителоподобные белковые каркасы (например, домены ^{10}Fn3), содержащие одну или более, или все CDR-области, или эквивалентные им области антитела, фрагмента антитела или растворимого лиганда, описанных в настоящем документе.

Способы идентификации антител и лигандов

Способы высокопроизводительного скрининга библиотек антител, фрагментов антител и лигандов с целью выявления молекул, способных связывать CD137, могут применяться для идентификации и созревания аффинности средств, которые, например, могут применяться для предотвращения и лечения РТПХ или аутоиммунных заболеваний. Такие способы, помимо прочего, включают методы дисплея *in vitro*, известные в данной области, такие как, например, фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей на клетках млекопитающих, рибосомный дисплей, мРНК-дисплей и кДНК-дисплей. Применение фагового дисплея для выделения антител, антигенсвязывающих фрагментов или лигандов, которые связывают биологически релевантные молекулы,

было рассмотрено, например, в обзорах Felici et al., Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995; Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997; и Hoogenboom et al., Immunotechnology 4:1-20, 1998, которые включены в настоящее описание посредством отсылки, поскольку они относятся к методам дисплея *in vitro*. Рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки были сконструированы для отбора полипептидов, которые связываются с антигенами клеточной поверхности, как описано в публикациях Kay, Perspect. Drug Discovery Des. 2:251-268, 1995 и Kay et al., Mol. Divers. 1:139-140, 1996, которые включены в настоящее описание посредством отсылки, поскольку они относятся к обнаружению новых антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно экспонированы фагами в качестве функциональных молекул (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-84 1992, содержание которых включено в настоящее описание посредством отсылки, поскольку они относятся к применению методов дисплея *in vitro* для обнаружения новых антигенсвязывающих молекул). Кроме того, функциональные фрагменты антител, такие как Fab и scFv-фрагменты, были экспрессированы в форматах дисплея *in vitro* (см., например, публикации McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990; Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991; и Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, которые включены в настоящее описание посредством отсылки, поскольку они относятся к платформам дисплея in vitro для обнаружения новых антигенсвязывающих молекул). Человеческие антитела против CD137 также могут быть получены, например, в HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. Эти методы, помимо прочих, могут применяться для идентификации и улучшения аффинности антител, фрагментов антител и лигандов, которые связывают CD137, которые в свою очередь могут применяться для элиминации гемопоэтических клеток у пациенте.

В дополнение к методам дисплея *in vitro*, методы компьютерного моделирования могут применяться для конструирования и идентификации антител против CD137, фрагментов

антител и лигандов *in silico*, например, с применением методик, описанных в US 2013/0288373, описание которого включено в настоящий документ, поскольку оно относится к способам молекулярного моделирования для идентификации антител против CD137. Например, с применением методов компьютерного моделирования специалист в данной области сумеет провести скрининг библиотек антител, фрагментов антител и лигандов *in silico* с целью обнаружения молекул, способных связывать специфические эпитопы на CD137, такие как внеклеточные эпитопы CD137.

Дополнительные методы могут применяться для идентификации антител, антигенсвязывающих фрагментов и их лигандов, которые связывают CD137 на поверхности клетки (например, Т-клетки) и которые интернализуются клеткой, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Например, описанные выше методы дисплея *in vitro* можно адаптировать для скрининга антител, их антигенсвязывающих фрагментов и лигандов, которые связывают CD137 на поверхности гемопоэтической стволовой клетки и которые затем интернализуются. Фаговый дисплей представляет собой один из таких методов, который можно использовать в соответствии с этой парадигмой скрининга. Для идентификации антител против CD137, их фрагментов и лигандов, которые связывают CD137 и затем интернализуются гемопоэтическими стволовыми клетками, специалист в данной области может использовать методы фагового дисплея, описанные в публикации Williams et al., Leukemia 19: 1432-1438, 2005, которая полностью включена в настоящее описание посредством отсылки. Например, при использовании методов мутагенеза, известных в данной области, могут быть получены рекомбинантные фаговые библиотеки, которые, помимо прочего, кодируют антитела, фрагменты антител, такие как scFv-фрагменты, Fab-фрагменты, диатела, триатела и ^{10}Fn3 домены, или лиганды, которые содержат рандомизированные аминокислотные кассеты (например, в одной или более, или всех CDR-областях или эквивалентных им областях, или антителе или фрагменте антитела). Каркасные области, шарнирная область, Fc-домен и другие области антител или фрагментов антител могут быть сконструированы таким

образом, что они не являются иммуногенными для человека, например, благодаря присутствию последовательностей антител зародышевой линии человека или последовательностей, которые демонстрируют только незначительные отличия по сравнению с человеческими антителами зародышевой линии.

При использовании методов фагового дисплея, описанных в настоящем документе или известных в данной области, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела, фрагменты антител или лиганды, ковалентно связанные с фаговыми частицами, можно инкубировать с антигеном CD137, например, сначала инкубируют фаговую библиотеку с блокирующими агентами, такими как, например, молочный белок, бычий сывороточный альбумин и/или IgG для удаления фага, кодирующего антитела, их фрагменты или лиганды, которые проявляют неспецифическое связывание с белком, и фагов, которые кодируют антитела или их фрагменты, которые связывают Fc-домены, а затем фаговую библиотеку инкубируют с популяцией гематопоэтических стволовых клеток, которые являются CD137+. Фаговую библиотеку можно инкубировать с гематопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы специфичные к CD137 антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или лиганды связывались с CD137 клеточной поверхности и затем интернализировались гемопоэтическими стволовыми клетками (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C). Фаг, содержащий антитела, их фрагменты или лиганды, которые не проявляют достаточной аффинности в отношении CD137, чтобы обеспечить связывание с, и интернализацию, гематопоэтическими стволовыми клетками, затем можно удалить при промывке клеток, например, холодным (4°C) 0,1 М глициновым буфером при pH 2,8. Фаг, связанный с антителами, их фрагментами или лигандами, который был интернализирован гемопоэтическими стволовыми клетками, можно идентифицировать, например, путем лизиса клеток и выделения интернализованного фага из среды культивирования клеток. Затем фаг можно амплифицировать в бактериальных клетках, например, при инкубировании бактериальных клеток с выделенным фагом в среде

2×YT при использовании способов, известных в данной области. Фаг, выделенный из этой среды, можно затем исследовать, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты гена(ов), кодирующего антитела, их фрагменты или лиганды, встроенного в геном фага. Кодируемые антитела, их фрагменты или лиганды затем могут быть получены *de novo* с помощью химического синтеза (например, фрагментов антител, таких как scFv-фрагменты, или лигандов CD137) или рекомбинантной экспрессии (например, полноразмерных антител).

Способность к интернализации полученных антител, их фрагментов или лигандов может быть оценена, например, с использованием известных в данной области анализов интернализации радионуклидов. Например, антитела, их фрагменты или лиганды, идентифицированные при использовании методов дисплея *in vitro*, описанных в настоящем документе или известных в данной области, могут быть функционализированы путем включения радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{169}Yb, ^{186}Re, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{177}Lu, ^{77}As, ^{72}As, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{89}Zr, ^{212}Bi, ^{213}Bi или ^{225}Ac. Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, могут быть включены в антитела, их фрагменты или лиганды при использовании микросфер, таких как полистирольные микросферы, содержащие электрофильные галоген-содержащие реагенты (например, микросферы для иодирования, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Радиоизотопно меченые антитела, их фрагменты, ADC или лиганды можно инкубировать с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для интернализации (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C. Затем клетки можно промыть для удаления неинтернализованных антител или их фрагментов (например, при использовании холодного (4°C) 0,1 М глицинового буфера при pH 2,8). Интернализованные антитела, их фрагменты или лиганды могут быть идентифицированы при детектировании испускаемого излучения (например, γ-излучения) полученных гемопоэтических стволовых клеток по сравнению с

испускаемым излучением (например, γ-излучением) выделенного промывочного буфера.

Антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных методов и композиций, например, как описано в патенте США 4,816,567. В одном варианте осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против CD137, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом варианте осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В другом варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном таком варианте осуществления клетка-хозяин включает (например, была трансформирована перечисленным): (1) вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и аминокислотную последовательность, включающую VH антитела, или (2) первый вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и второй вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VH антитела. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например клеткой яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела против CLL-1, где способ включает культивирование клетки-хозяина, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, выделение антитела из клетки-хозяина (или среды культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантной продукции антитела против CD137, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для

дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитела векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc эффекторная функция не требуются. Касательно экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, патенты США 5,648,237, 5,789,199, и 5,840,523 (также см. Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), стр. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из массы бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Клетки позвоночных также можно использовать в качестве хозяев. Например, могут использоваться линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьян CV1, трансформированная SV40 (COS-7); эмбриональная линия клеток почки человека (293 или клетки 293, как описано, например, в Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки детеньшей хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, как описано, например, в Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени буйвола (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al. Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие подходящие линии

клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для получения информации о некоторых линиях клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), стр. 255-268 (2003).

Конъюгаты антитела-лекарственного средства

Цитотоксины

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и лиганды, описанные в настоящем документе (например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и растворимые лиганды, которые распознают и связывают CD137), могут быть конъюгированы (или связаны) с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство (например, майтанзин или майтанзиноид), аматоксин, экзотоксин A *Pseudomonas*, дебуганин, дифтерийный токсин, такой как α-аманитин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазепина, или их вариант, или другое цитотоксическое соединение, описанное в настоящем документе или известное в данной области, вызывающее элиминацию гемопоэтических клеток, таких как аутореактивная Т-клетка, при введении пациенту. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с интернализируемым антителом против CD137, его антигенсвязывающим фрагментом или растворимым лигандом, в результате чего, после поглощения клеткой антитела, его фрагмента или растворимого лиганда, цитотоксин может получать доступ к своей внутриклеточной мишени и опосредовать гибель гемопоэтической клетки. Дополнительные цитотоксины, подходящие для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, помимо прочих, ДНК-интекалирующие средства (например, антрациклины), средства, способные разрушать аппарат митотического веретена

(например, алкалоиды барвинка, майтанзин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как α-аманитин, и их производные), средства, способные нарушать биосинтез белка (например, средства, которые демонстрируют N-гликозидазную активность в отношении рРНК, такие как сапорин и А-цепь рицина), известные в уровне техники.

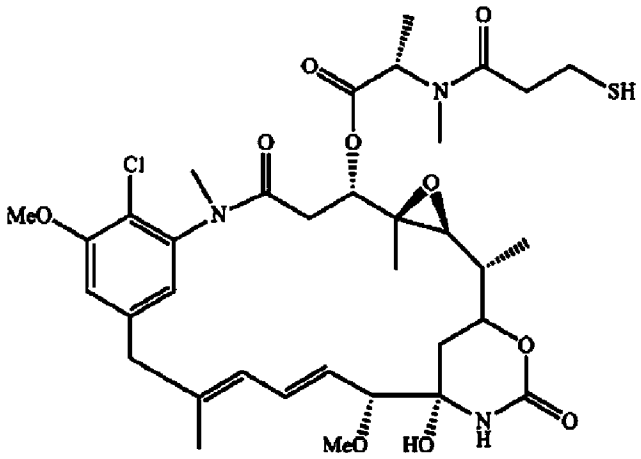
Майтанзиноиды

Антитела против CD137 могут быть конъюгированы с цитотоксином, который является средством, связывающим микротрубочки. В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является мейтанзин, майтанзиноид или аналог майтанзиноида. Майтанзиноиды являются связывающими микротрубочки средствами, которые препятствуют полимеризации тубулина. Примеры подходящих мейтанзиноидов включают сложные эфиры майтанзинола, синтетический майтанзинол, а также аналоги и производные майтанзинола. Включены любые лекарственные средства, которые ингибируют образование микротрубочек и которые являются высокотоксичными для клеток млекопитающих, как и майтанзиноиды, майтанзинол и аналоги майтанзинола, а также их производные.

Примеры подходящих сложных эфиров майтанзинола включают такие, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, и такие, которые имеют модификации в других положениях. Такие подходящие майтанзиноиды раскрыты в патентах США 4,137,230; 4,151,042; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,322,348; 4,362,663; 4,371,533; 5,208,020; 5,416,064; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; 6,333,410; 7,276,497; и 7,473,796, описания каждого из которых включены в настоящий документ посредством отсылки, поскольку они относятся к майтанзиноидам и их производным.

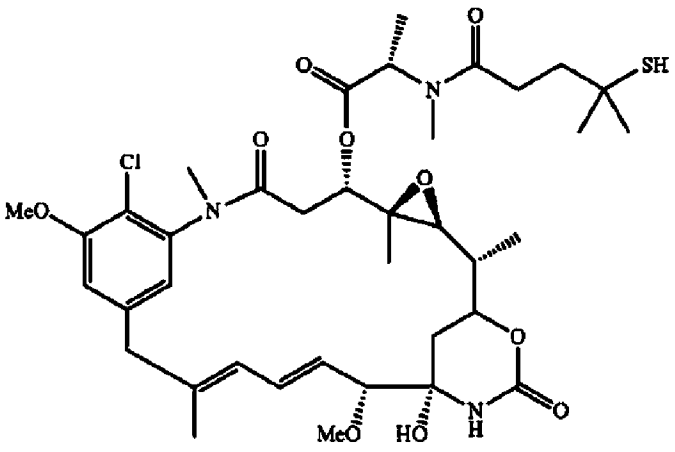
В некоторых вариантах осуществления в иммуноконъюгатах (ADC) согласно изобретению в качестве цитотоксического средства используется тиолсодержащий майтанзиноид (DM1), имеющий

официальное название $N^{2'}$-дезацетил-$N^{2'}$-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин. DM1 представлен следующей структурной формулой:



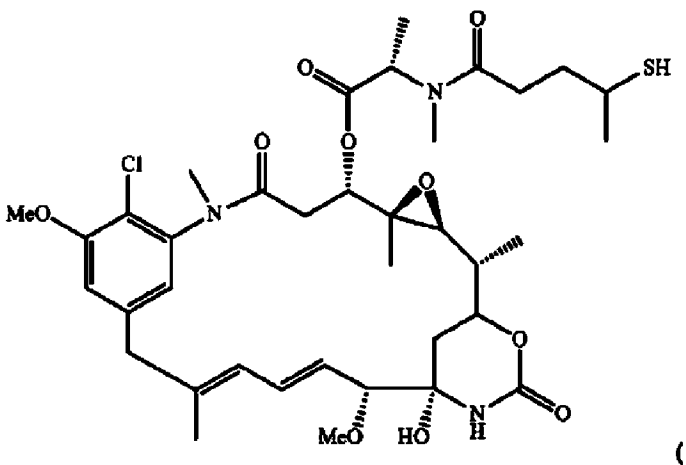
(I)

В другом варианте осуществления в конъюгате согласно настоящему изобретению в качестве цитотоксического средства используется тиолсодержащий майтанзиноид $N^{2'}$-дезацетил-$N^{2'}$-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (например, DM4). DM4 представлен следующей структурной формулой:



(II)

Другим майтанзиноидом, включающим боковую цепь, которая содержит стерически затрудненную тиольную связь, является $N^{2'}$-дезацетил-$N^{2'}$-(4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (называемый DM3), представленный следующей структурной формулой (III):



(III)

Каждый из майтанзиноидов, описанных в патентах США 5,208,020 и 7,276,497, также может использоваться в конъюгате согласно настоящему изобретению. В этом отношении все описание 5,208,020 и 7,276,697 включено в настоящий документ посредством отсылки.

Многие положения на майтанзиноидах могут служить в качестве положения для химического связывания соединительного фрагмента. Например, ожидается, подходящими будут положение C-3, содержащее гидроксильную группу, положение C-14, модифицированное гидроксиметилом, положение C-15, модифицированное гидроксигруппой, и положение C-20, содержащее гидроксигруппу. В некоторых вариантах осуществления положение C-3 служит в качестве положения для химического связывания соединительного фрагмента, и в некоторых конкретных вариантах осуществления положение C-3 мейтанзинола служит в качестве положения для химического связывания соединительного фрагмента.

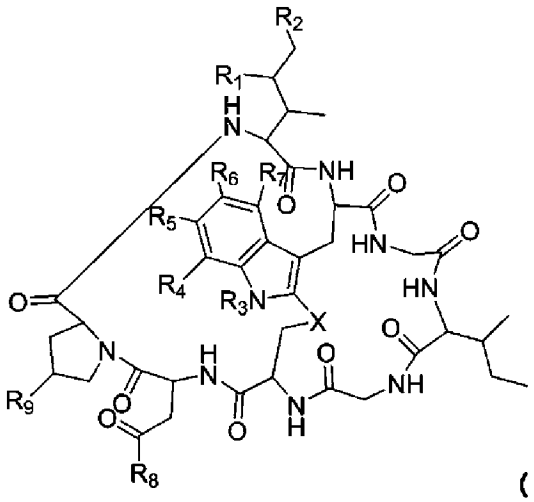
Изобретение также включает различные изомеры и смеси майтанзиноидов и конъюгатов. Некоторые соединения и конъюгаты настоящего изобретения могут существовать в различных стереоизомерных, энантиомерных и диастереомерных формах. Несколько описаний получения таких конъюгатов антител-майтанзиноидов представлены в патентах США 5,208,020, 5,416,064 6,333,410, 6,441,163, 6,716,821 и 7,368,565, каждый из которых полностью включен в настоящий документ.

Терапевтически эффективное количество молекул майтанзиноидов, связанных с одной молекулой антитела, может быть определено с помощью спектрофотометрического измерения отношения

оптического поглощения при 252 нм и 280 нм. В среднем 3-4 молекулы майтанзиноида, конъюгированных с молекулой антитела, могут усиливать цитотоксическое воздействие на клетки-мишени, не оказывая при этом отрицательного влияния на функцию или растворимость антитела, хотя одна молекула токсина/антитела может усиливать цитотоксичность по сравнению с одним антителом. Среднее количество молекул майтанзиноида/антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или растворимый лиганд, может составлять, например, 1-10 или 2-5.

Аматоксины

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является аматоксин или его производное, такое как α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота или проамануллин. Например, подходящие цитотоксины, которые могут быть конъюгированы с антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или растворимым лигандом, описанными в настоящем документе, включают аматоксин или его производное, представленное формулой (**IV**):



(IV)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

R_4 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой L-Z;

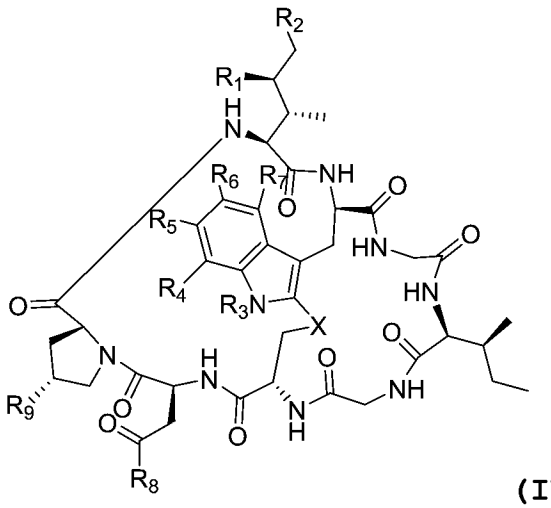
R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химической группой, которая участвует в реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или растворимом лиганде, который связывает CD137.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин содержит один заместитель R_C.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин является аматоксином или его производным, представленным формулой (IVA):



(IVA)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

R_4 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

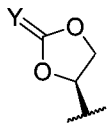
L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен,

необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен;

Z является химической группой, которая участвует в реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или растворимых лигандах, который связывает CD137; и

где цитотоксин содержит один заместитель R_C.

В некоторых вариантах осуществления R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



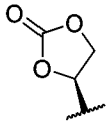
где Y выбран из O, S, NR_E и CR_ER_E', и

каждый R_E и R_E' независимо представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен-R_C, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен-R_C, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен-R_C, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен-R_C, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен-R_C, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен-R_C, необязательно замещенный циклоалкилен-R_C, необязательно замещенный гетероциклоалкилен-R_C, необязательно замещенный арилен-R_C или необязательно замещенный гетероарилен-R_C.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин является аматоксином или его производным, представленным формулой (**IA**), где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



R_3 представляет собой H или R_C;

R_4 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

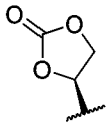
R_9 представляет собой H или OH; и

где каждый R_C и R_D является таким, как определено выше. Токсины, применяемые в сочетании с конъюгатом, описанным в настоящем документе, включают токсины, которые содержат аматоксин или его производное, представленные формулой (**IVA**),

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



R_3 представляет собой H или R_C;

каждый R_4 и R_5 независимо представляет собой H, OH, OR_C, R_C или R_D;

каждый R_6 и R_7 представляет собой H;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

R_9 представляет собой H или OH; и

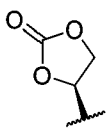
где R_C является таким, как определено выше.

Токсины, применяемые в сочетании с конъюгатами, описанным в настоящем документе, включают токсины, которые содержат аматоксин или его производное, представленные формулой (**IVA**),

где R_1 представляет собой H, OH или OR_A;

R_2 представляет собой H, OH или OR_B;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



каждый R_3, R_4, R_6 и R_7 представляет собой H;

R_5 представляет собой OR_C;

R_8 представляет собой OH или NH_2;

R_9 представляет собой H или OH; и

где R_C является таким, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксинов описаны, например, в публикации заявки на патент США 2016/0002298, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

Токсины, применяемые в сочетании с конъюгатами, описанными в настоящем документе, включают токсины, которые содержат аматоксин или его производное, представленные формулой (**IVA**),

где каждый R_1 и R_2 независимо представляет собой H или OH;

R_3 представляет собой R_C;

каждый R_4, R_6 и R_7 представляет собой H;

R_5 представляет собой H, OH или OC_1-C_6 алкил;

R_8 представляет собой OH или NH_2;

R_9 представляет собой H или OH; и

где R_C является таким, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксинов описаны, например, в публикации заявки на патент США 2014/0294865, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

Токсины, применяемые в сочетании с конъюгатами, описанными в настоящем документе, включают токсины, которые содержат аматоксин или его производное, представленные формулой (**IA**),

где каждый R_1 и R_2 независимо представляет собой H или OH;

каждый R_3, R_6 и R_7 представляет собой H;

каждый R_4 и R_5 независимо представляет собой H, OH, OR_C или R_C;

R_8 представляет собой OH или NH_2;

R_9 представляет собой H или OH; и

где R_C является таким, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксинов описаны, например, в публикации заявки на патент США 2015/0218220, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

Токсины, применяемые в сочетании с конъюгатами, описанным в настоящем документе, включают токсины, которые содержат аматоксин или его производное, представленные формулой (**IVA**),

где каждый R_1 и R_2 независимо представляет собой H или OH;

каждый R_3, R_6 и R_7 представляет собой H;

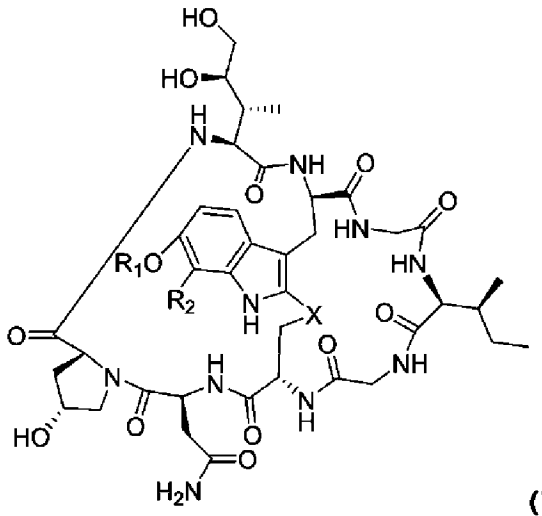
каждый R_4 и R_5 независимо представляет собой H или OH;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

R_9 представляет собой H или OH; и

где R_C является таким, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксинов описаны, например, в патентах США 9,233,173 и 9,399,681, описания каждого из которых полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, конъюгированы с аматоксином, таким как α-аманитин или его вариант. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связывают CD137), конъюгированы с соединением α-аманитина, представленным формулой (**II**):



(V)

где X представляет собой S, SO или SO_2; R_1 представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или лигандом; и R_2 представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или лигандом; где в том случае, когда R_1 представляет собой H, R_2 является линкером, и когда R_2 представляет собой H, R_1 является линкером.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является α-аманитин. В некоторых вариантах осуществления α-аманитин

является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления α-аманитин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть соединен с α-аманитином формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является β-аманитин. В некоторых вариантах осуществления β-аманитин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления β-аманитин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к β-аманитину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер

присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-((C=O)(CH_2)_n-$, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является γ-аманитин. В некоторых вариантах осуществления γ-аманитин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления γ-аманитин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к γ-аманитину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер

присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-((C=O)(CH_2)_n-$, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является ε-аманитин. В некоторых вариантах осуществления ε-аманитин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления ε-аманитин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к ε-аманитину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент

PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является аманин. В некоторых вариантах осуществления аманин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления аманин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является аманинамид. В некоторых вариантах осуществления аманинамид

является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления аманинамид формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманинамиду формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является амануллин. В некоторых вариантах осуществления амануллин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления амануллин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманулину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых

вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является амануллиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота формулы **IV** присоединена к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к амануллиновой кислоте формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер

присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-((C=O)(CH_2)_n-$, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксином является проамануллин. В некоторых вариантах осуществления проамануллин является соединением формулы **IV**. В некоторых вариантах осуществления проамануллин формулы **IV** присоединен к антителу против CD137 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к проамануллину формулы **IV** в любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9). В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых

вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и лиганды для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как α-аманитин или его вариант, при использовании методов конъюгирования, известных в уровне техники или описанных в настоящем документе. Например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и лиганды, которые распознают и связывают CD137, могут быть конъюгированы с α-аманитином или его вариантом, как описано в заявке US 2015/0218220, описание которой включено в настоящий документ посредством отсылки, поскольку она относится, например, к аматоксинам, таким как α-аманитин и его варианты, а также ковалентным линкерам, которые могут применяться для ковалентного конъюгирования.

Примеры конъюгатов антител-лекарственных средств и конъюгатов лигандов-лекарственных средств, которые могут применяться в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, могут быть получены в реакции антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или лиганда с аматоксином, который конъюгирован с линкером, содержащим заместитель, подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или лиганде. Аматоксины, которые конъюгированы с линкером, содержащим заместитель, подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или лиганде, включают, без ограничения перечисленными: 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)-

аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)-пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-карбоксипропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-((4-(малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)-пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(2-(аминоокси)-ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексаноил)-пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(малеимидо)гексанамидо)-пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(малеимидо)-гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; (R)-7'C-((3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; (S)-7'C-((3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)-пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(6-(малеимидо)-гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)-

пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(малеимидо)-гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)-циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)-S-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)-R-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)-S-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((4-((малеимидо)метил)циклогексан-карбоксамидо)-R-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(3-карбоксипропанамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(4-((малеимидо)метил)-циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(4-(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-(малеимидо)ацетамидо)этил)-пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-(малеимидо)-бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)-пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(малеимидо)-гексанамидо)метил)азетидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)азетидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)-азетидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-(2-(4-((малеимидо)-метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)азетидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексан-

карбоксамидо)гексанамидо)этил)азетидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(6-(малеимидо)-N-метилгексанамидо)этил)(метил)амино)-метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(6-(малеимидо)-N-метилгексанамидо)-бутил(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-((2-(2-(6-(малеимидо)-гексанамидо)этил)азиридин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((2-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)-азиридин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(6-(2-(аминоокси)-ацетамидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(1-(аминоокси)-2-оксо-6,9,12,15-тетраокса-3-азагептадекан-17-оил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-(аминоокси)ацетамидо)ацетил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(3-(2-(аминоокси)ацетамидо)пропаноил)-пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(4-(2-(аминоокси)-ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-(2-(аминоокси)ацетамидо)-ацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(20-(аминоокси)-4,19-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,18-диазаикозил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)-N-метилгексанамидо)этил)-(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)-N-метилгексанамидо)бутил)(метил)амино)-метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексан-карбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-S-метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбокс-амидо)гексанамидо)-R-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(3-(пиридине-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'O-(5-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)-аматоксин; 6'O-(2-((6-(малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)-аматоксин; 6'O-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; 6'O-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил)-

аматоксин; 6'O-(6-(2-бромацетамидо)гексил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(азидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(hex-5-ynоиламино)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)-гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'O-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)-аматоксин; 6'O-(6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)-аматоксин; 6'O-((6-аминоокси)гексил)-аматоксин; и 6'O-(6-(2-иодацетамидо)гексил)-аматоксин. Предыдущие линкеры, помимо прочих, подходящие для применения в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в публикации заявки на патент США 2015/0218220, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

Дополнительные цитотоксины, которые могут быть конъюгированы с антителами, их антигенсвязывающими фрагментами и лигандами, которые распознают и связывают CD137, для применения в лечении РТПХ или аутоиммунного заболевания, включает, без ограничения перечисленными, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен, адеципенол, адозелезин, алдеслейкин, алтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминолевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антареликс, анти-дорсализующий морфогенетический белок-1, антиандроген, карцинома предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколина глицинат, модуляторы генов апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновую кислоту, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины, бензоилстауроспорин, производные бета-лактамов, бета-алетин, бетакламицин B, бетулиновую кислоту, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрен, бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен A, бизелезин, брефлат, блеомицин A2, блеомицин B2, бропиримин, будотитан, бутионина сульфоксимин, кальципотриол,

кальфостин С, производные камптотецина (например, 10-гидрокси-камптотецин), капецитабин, карбоксамидаминотриазол, карбоксиамидотриазол, карзелезин, ингибиторы казеинкиназы, кастаноспермин, цекропин В, цетрореликс, хлорины, хлорохиноксалина сульфонамид, цикапрост, цис-порфирин, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллисмицин А, коллисмицин В, комбретастатин А4, аналоги комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, кристнатол, криптофицин 8, производные криптофитоцина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, цитарабина окфосфат, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, 2'-дезоксикоформицин (DCF), деслорелин, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацитидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенилспиромустин, дискодермолид, докозанол, доласетрон, доксифлуридин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эдельфосин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпитилоны, эпристерид, эстрамустин и его аналоги, этопозид, этопозида 4'-фосфат (также называемый этопофосом), эксеместан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, флуастерон, флударабин, фтордаунорубицина гидрохлорид, форфенимекс, форместан, фостриецин, фотемустин, гадолиний тексафирин, галлия нитрат, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомогарринтонин (ННТ), гиперицин, ибандроновую кислоту, идоксифен, идрамантон, ильмофосин, иломастат, имидазоакридоны, имихимод, иммуностимулирующие пептиды, иобенгуан, иоддоксорубицин, ипомеанол, иринотекан, иропласт, ирсогладин, изобенгазол, джасплакинолид, кахалалид F, ламелларина-N триацетат, ланреотид, лейнамицин, леноградстим, лентинана сульфат, лептолстатин, летрозол, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобаплатин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, локсорибин, луртотекан, лютеция тексафирин, лизофиллин, масопрокол, маспин, ингибиторы матриксной металлопротеиназы, меногарил, мербарон, метерелин, метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF,

ифепристон, милтефосин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол, митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, микапероксид B, мириапорон, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновую кислоту, нилутамид, низамицин, нитруллин, октреотид, окиценон, онапристон, ондансетрон, орацин, ормаплатин, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел и его аналоги, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновую кислоту, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пэгаспаргазу, пелдезин, пентосана полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритрексим, подофиллотоксин, порифиромицин, ингибиторы пурин-нуклеозидфосфорилазы, ралтитрексед, ризоксин, роглетимид, рогитукин, рубигинон B1, рубоксил, сафингол, сайнтопин, саркофитол A, сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфосиновую кислоту, спикамицин D, спиромустин, стипиамид, сульфиназин, таллимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин, триметрексат, верамин, винорелбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и зиласкорб и другие.

Линкеры для химического конъюгирования

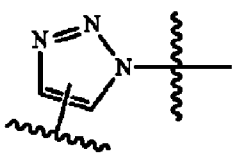
Различные линкеры могут использоваться для конъюгирования антител, антигенсвязывающих фрагментов и лигандов, описанных в настоящем документе (например, антител, их антигенсвязывающих фрагментов и растворимых лигандов, которые распознают и связывают CD137), с цитотоксической молекулой. Подходящие линкеры включают линкеры, которые могут быть расщеплены, например, в результате ферментативного гидролиза, фотолиза, гидролиза в кислотных условиях, гидролиза в основных условиях, окисления, восстановления дисульфидных связей, нуклеофильного расщепления или металлоорганического расщепления (см., например, публикацию Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20: 571-582, 2012, которая включена в настоящий документ посредством отсылки, поскольку она относится к линкерам, подходящим для ковалентного конъюгирования). Примеры линкеров, подходящих для синтеза

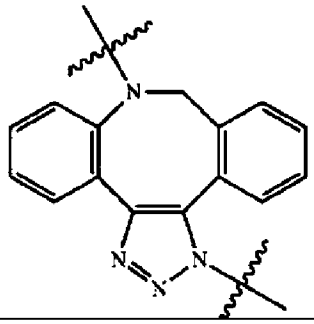
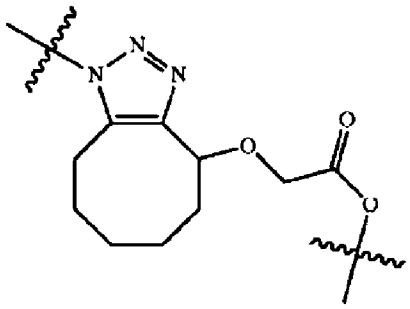
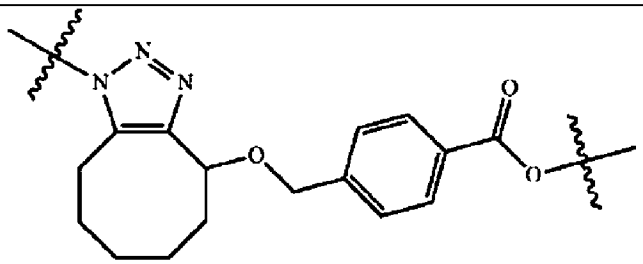
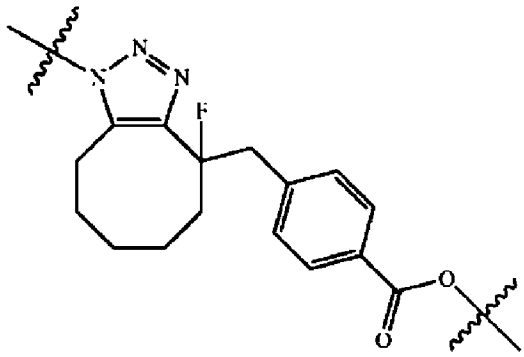
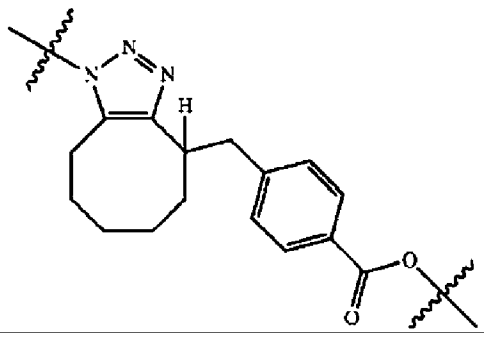
конъюгатов лекарственного средства-антитела и лекарственного средства-лиганда, включают линкеры, которые, помимо прочего, содержат электрофилы, такие как акцепторы Михаэля (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, подходящие для реакции с нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителах, антигенсвязывающих фрагментах и лигандах, таких как амины и тиольные группы. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственного средства-антитела и лекарственного средства-лиганда, включают, без ограничения перечисленными, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидилиодацетат (SIA), сульфо-SMCC, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидилиодацетат, которые, помимо прочего, описаны, например, в публикации Liu et al., 18: 690-697, 1979, которая включена в настоящий документ посредством отсылки, поскольку она относится к линкерам для химического конъюгирования. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно подходят для конъюгирования средств, разрушающих микротрубочки, таких как ауристатины, которые описаны в публикации Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17: 14-24, 2006, которая включена в настоящий документ посредством отсылки, поскольку она относится к линкерам для химического конъюгирования. Дополнительные линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственного средства-антитела и лекарственного средства-лиганда, как описано в настоящем документе, включают линкеры, способные высвобождать цитотоксин в процессе 1,6-элиминирования, такие как п-аминобензиловый спирт (ПАБК), 6-малеимидогексановая кислота, pH-чувствительные карбонаты и другие реагенты, описанные в публикации Jain et al., Pharm. Res. 32: 3526-3540, 2015, которая полностью включена в настоящий документ посредством отсылки.

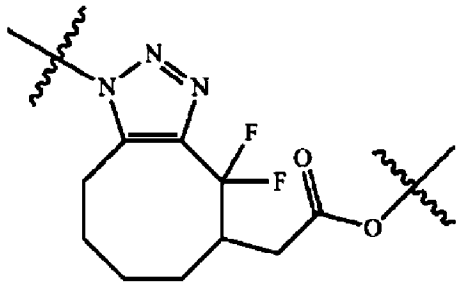
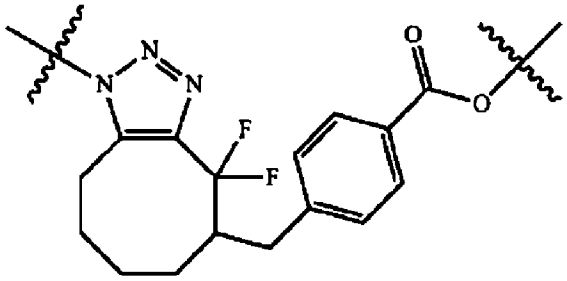
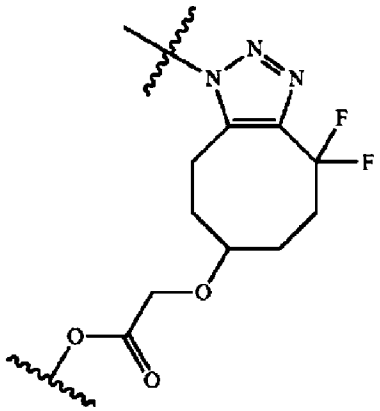
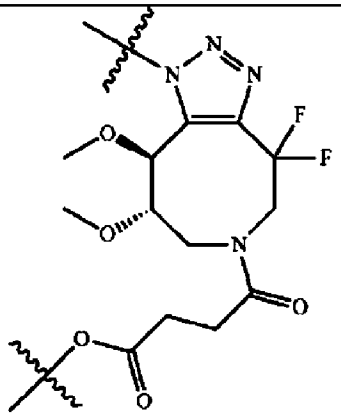
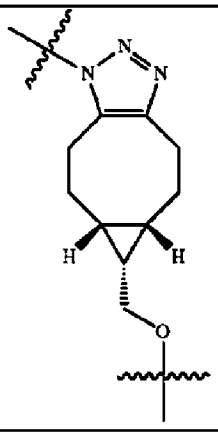
Линкеры, которые могут использоваться для конъюгирования антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или лиганда с цитотоксическим средством, включают линкеры, которые ковалентно связываются с цитотоксическим средством на одном конце линкера,

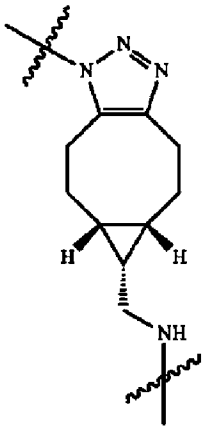
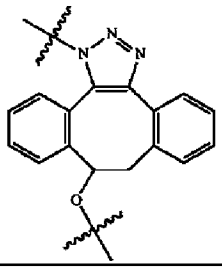
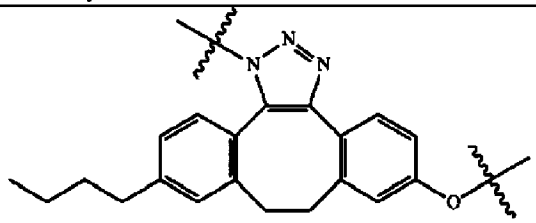
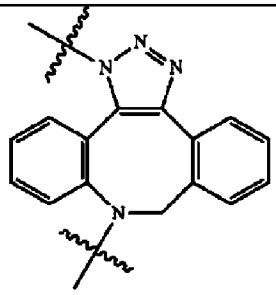
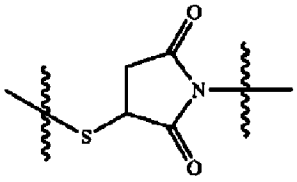
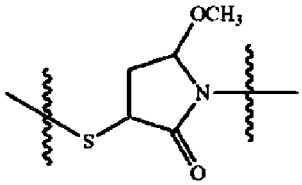
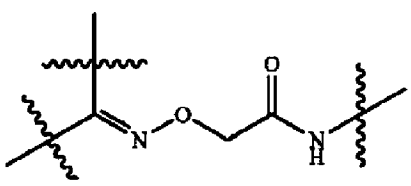
а на другом конце линкеры содержат химическую группу, образованную в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или лиганде, который связывает CD137. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или лиганде, который связывается с CD137, включают, без ограничения перечисленными, гидроксильные группы остатков серина, треонина и тирозина; аминогруппы остатков лизина; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные группы остатков цистеина, а также пропаргильные, азидо, галогенарильные (например, фторарильные), галогенгетероарильные (например, фторгетероарильные), галогеналкильные и галогенгетероалкильные группы неприродных аминокислот. Линкеры, используемые при конъюгировании в конъюгатах антитело-лекарственное средство и лиганд-конъюгатах, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения перечисленными, линкеры, содержащие химические группы, образованные в реакциях сочетания, как показано в Таблице 1 ниже. Кривые линии обозначают положения присоединения к антителу, антигенсвязывающему фрагменту или лиганду и цитотоксической молекуле, соответственно.

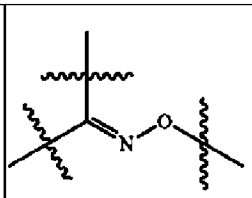
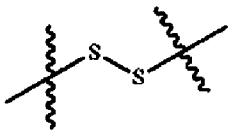
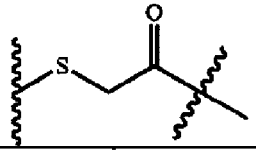
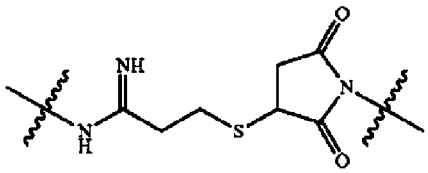
Таблица 1. Примеры химических групп, которые образуются в реакциях сочетания при получении конъюгатов антитела-лекарственного средства

Примеры реакций сочетания	**Химическая группа, которая образуется в реакциях сочетания**
[3+2] циклоприсоединение	

[3+2] циклоприсоединение	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	

[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	

[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение	
Присоединение Михаэля	
Присоединение Михаэля	
Конденсация иминов, амидирование	

Конденсация иминов	
Образование дисульфидной связи	
Алкилирование тиолов	
Конденсация, присоединение Михаэля	

В некоторых вариантах осуществления ADC включает антитело против CD137, конъюгированное с токсином через линкер, где линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено -((C=O)$(CH_2)_n$-, где n является целым числом от 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

Фармакокинетический профиль антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства имеет определенный полупериод существования в сыворотке. Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты, которые могут применяться в способах в настоящем документе, включают те, которые имеют полупериод существования в сыворотке, например, от 1-24 часов. В некоторых вариантах осуществления трансплантат вводят до, одновременно или после

антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства, когда уровень циркулирующего антитела является терапевтически эффективным уровнем. Фармакокинетический анализ с измерением уровней в сыворотке может быть выполнен с использованием анализов, известных в данной области.

Пути введения и способ применения

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, ADC и лиганды, описанные в настоящем документе, могут вводить пациенту (например, пациенту-человеку, страдающему или подвергающемуся риску РТПХ или аутоиммунного заболевания) в различных лекарственных формах. Например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, ADC и лиганды, описанные в настоящем документе, могут вводить пациенту, страдающему или подвергающемуся риску РТПХ, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают модификаторы вязкости. Водный раствор можно стерилизовать при использовании методов, известных в уровне техники.

Фармацевтические композиции, включающие ADC против CD137, как описано в настоящем документе, приготавливают путем смешивания такого ADC с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают, без ограничения перечисленными: буферы, такие как фосфат, цитрат, а также другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; пирокатехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше чем

приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильньные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразователи, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, ADC и лиганды, описанные в настоящем документе, могут вводить различными путями, например, перорально, трансдермально, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, интраокулярно или парентерально. Наиболее подходящий путь для введения в каждом конкретном случае будет зависеть от конкретного вводимого антитела, антигенсвязывающего фрагмента или ADC, пациента, способов изготовления фармацевтической композиции, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста пациента, массы тела, пола, тяжести подвергаемых лечению заболеваний, диеты пациента и показателей скорости экскреции пациента.

Эффективная доза антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или лиганда, описанных в настоящем документе, может изменяться, например от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг/кг массы тела за однократное (например, болюсное) введение, многократные введения или непрерывное введение, или обеспечивать достижение оптимальной концентрации в сыворотке (например, концентрации в сыворотке 0,0001-5000 мкг/мл) антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда. Дозу могут вводить один или более раз (например, 2-10 раз) в день, неделю или месяц субъекту (например, человеку), страдающему или подвергающемуся риску РТПХ или аутоиммунного заболевания. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или лиганд могут вводить в количестве, достаточном

для уменьшения количества аутореактивных Т-клеток, например на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше, до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Способы лечения

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для элиминации активированных Т-клеток, которые ассоциированы с отторжением трансплантата и аутоиммунными заболеваниями, для достижения толерантности трансплантата. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, особенно пододят для профилактики и лечения РТПХ и аутоиммунных заболеваний. Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, также могут применяться для снижения риска отторжения трансплантата у пациента-человека, получающего аллогенный трансплантат. Предпочтительным субъектом является человек. Количество вводимого антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или конъюгата лиганд-лекарственное средство должно быть достаточным для элиминации клеток, например активированных Т-клеток, которые способствуют развитию РТПХ или аутоиммунного заболевания. Определение терапевтически эффективной дозы находится в рамках компетенции специалистов в данной области, однако, в качестве примера, в вариантах осуществления способа, описанного в настоящем документе, в котором используется системное введение антитела для лечения РТПХ или аутоиммунного заболевания, эффективная доза для человека будет находиться в диапазоне 0,1-150 мг/кг (например, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг и т.д.). Путь введения может влиять на рекомендуемую дозу. Предусмотрены повторные системные дозы для поддержания эффективного уровня, например, для ослабления или ингибирования РТПХ или аутоиммунного заболевания в зависимости от применяемого способа введения.

Антитело, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить нуждающемуся пациенту-человеку до, одновременно или после трансплантации клеток или паренхиматозного органа пациенту. В одном варианте осуществления ADC против CD137 вводят

нуждающемуся в этом пациенту-человеку до (например, за 3 дня до, за 2 дня до, за 12 часов до) трансплантации клеток или паренхиматозного органа. В одном варианте осуществления ADC против CD137 вводят нуждающемуся в этом пациенту-человеку после (например, через 1 день, через 2 дня, через 3 дня или через 4 дня после) трансплантации клеток или паренхиматозного органа. Однократная доза ADC против CD137 может быть введена пациенту-человеку до, одновременно или после трансплантации клеток или органа, где такая однократная доза является достаточной для лечения или предотвращения РТПХ или отторжения трансплантата.

ADC против CD137 могут применяться в качестве альтернативы традиционным средствам (например, химиотерапии и/или лучевой терапии), используемым для приживления трансплантата, в том числе аллогенного трансплантата. Традиционные средства обычно снижают иммунный ответ пациента, способствуя приживлению и приживляемости трансплантированных клеток или органов. Способы и композиции, описанные в настоящем документе, обеспечивают более селективную терапию, которая позволяет большей части иммунной системы пациента оставаться интактной, но в то же время направленно воздействует и элиминирует CD137 экспрессирующие активированные Т-клетки. Таким образом, способность ADC против CD137, раскрытых в настоящем документе, селективно элиминировать активированные Т-клетки обеспечивает терапию, обладающую преимуществами по сравнению с традиционной терапией в контексте трансплантации, с учетом того, что, в частности, алло-активированные иммунные клетки могут подвергаться адресному возействию и элиминации для достижения успешной трансплантации клеток или паренхиматозного органа.

Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для предотвращения или лечения отторжения трансплантата. Отторжение трансплантата, включая отторжение после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, может проявляться в целом как отсутствие первоначального приживления донорских клеток или потеря донорских клеток после первоначального приживления (см. обзор Mattsson et al. (2008) Biol Blood Marrow Transplant. 14(Suppl 1): 165-170). Композиции

и способы, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для элиминации CD137-экспрессирующих активированных Т-клеток в схеме пересадки или трансплантации, где вызывает беспокойство отторжение трансплантата, например, когда у пациента-человека существует риск отторжения трансплантата после трансплантации паренхиматозного органа или клеток, в частности, когда трансплантированные клетки или орган являются аллогенными.

В одном варианте осуществления антитело против CD137, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства применяется для элиминации CD137-экспрессирующих донорских клеток, например, активированных Т-клеток, экспрессирующих CD137, при контакте клеток, трансплантата или паренхиматозного органа с антителом против CD137, конъюгатом антитела-лекарственного средства или конъюгатом лиганда-лекарственного средства перед трансплантацией клеток, трансплантата или органа пациенту-человеку. В одном варианте осуществления клетки, трансплантат или орган являются аллогенными.

Риск РТПХ остается высоким после трансплантации с применением современных методов лечения. Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для ингибирования реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) у пациента-человека. ADC против CD137 могут применяться для селективного адресного воздействия на активированные Т-клетки у пациента, который получит трансплантат, такой как трансплантат стволовых клеток. ADC против CD137, как описано в настоящем документе, также могут применяться для снижения риска развития РТПХ путем адресного воздействия и элиминации CD137-положительных клеток у пациента-человека, который должен будет получить или уже получил трансплантат, такой как, без ограничения, трансплантат ГСК. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, предназначены для лечения РТПХ до появления симптомов РТПХ у пациента после трансплантационной терапии, например аллогенными ГСК.

Способы, описанные в настоящем документе, также могут

применяться для предотвращения реакций трансплантат против хозяина (ТпХ). ADC против CD137 также можно применять в качестве иммунодепрессанта для предотвращения реакций трансплантат против хозяина (ТпХ), предотвращая или уменьшая риск отторжения аллогенного трансплантата. Применение ADC против CD137 у пациента с риском реакции ТпХ может обеспечить успешное приживление донорских клеток с более высокой степенью HLA-несоответствия. Дополнительные применения включает индукцию толерантности при трансплантации паренхиматозных органов, где ADC к CD137 предотвращает или ослабляет реакции хозяина против трансплантата. Они могут включать трансплантацию паренхиматозных органов с трансплантацией или без трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включая ксенотрансплантаты, когда орган имеет нечеловеческое происхождение и/или является генетически модифицированным.

В одном варианте осуществления ADC против CD137 применяется для предотвращения реакции трансплантата против трансплантата (ТпТ) в контексте аллогенных трансплантов, когда используются два донора. Примеры включают применение стволовых клеток пуповинной крови от 2 доноров у взрослых пациентов и пациентов детского возраста. Предотвращение ТпТ может обеспечивать более быстрое восстановление гемопоэтических клеток (например, нейтрофилов и тромбоцитов) после трансплантации, поскольку оба источника стволовых клеток будут успешно приживаться.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат является аллогенным. В некоторых вариантах осуществления трансплантат является аутологичным.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат является трансплантатом костного мозга, трансплантатом периферической крови или трансплантатом пуповинной крови.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат включает гемопоэтические клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки).

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, трансплантат может быть любым трансплантатом паренхиматозного органа или кожи. В некоторых вариантах

осуществления трансплантат выбран из группы, состоящей из трансплантата почки, трансплантата сердца, трансплантата печени, трансплантата поджелудочной железы, трансплантата легкого, трансплантата кишечника и трансплантата кожи.

Способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения рассеянного склероза (РС). РС является тяжелым аутоиммунным воспалительным заболеванием центральной нервной системы. Хорошо известно, что повреждение в центральной нервной системе (ЦНС) вызвано аутоиммунной атакой против (ауто)антигенов в миелиновой оболочке. Механизмы, лежащие в основе повреждения ткани при РС, включают активацию аутореактивных Т-клеток, которые атакуют белки в миелиновой оболочке. Первые симптомы обычно проявляются у людей в возрасте 15-50 лет. Больные испытывают приступы воспалительной демиелинизации, которая обуславливает классическое течение заболевания с обострениями - ремиссиями.

Способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для лечения системной волчанки человека (СКВ). СКВ или волчанка является системным хроническим аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется продукцией аутоантител против аутоантигенов. Аутореактивные В-клетки направляются аутоантигеном, включая антитела к двухцепочечной ДНК, к ядерным белковым антигенам и к рибонуклеопротеинам. Факторы, которые вызывают потерю В-клеточной толерантности и вызывают продукцию аутоантител, неизвестны. Системная волчанка может поражать практически любой орган или систему тела. Системная волчанка может включать периоды, в течение которых наблюдается мало симптомов, если таковые вообще присутствуют ("ремиссия"), и другие периоды, когда болезнь становится более активной ("обострение").

Способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для лечения ревматоидного артрита (РА). РА является системным аутоиммунным заболеванием, которое первоначально поражает синовиальную оболочку, оболочку из соединительной ткани, которая выстилает полость между суставами и секретирует смазывающую жидкость. Хотя причина РА неизвестна, развитию РА

могут способствовать инфекционные, генетические и гормональные факторы. РА связан с нарушением иммунитета, поскольку суставы пациентов, страдающих РА, сильно инфильтрированы лейкоцитами, такими как макрофаги и дендритные клетки, а также Т и В-клетками. Болезнь может проявляться в любом возрасте, однако наиболее часто болезнь возникает в возрасте 25-55 лет. Число случаев возрастает с возрастом. Начало болезни обычно постепенное, с усталостью, утренней скованностью, длящейся больше одного часа, разлитыми мышечными болями, потерей аппетита и слабостью. В конечном счете, появляется боль в суставах с жаром, опуханием, болезненностью и ригидностью сустава после отсутствия движения.

Способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для лечения воспалительного заболевания кишечника (ВЗК). Проявления ВЗК включают язвенный колит, болезнь Крона, лимфоцитарный колит и коллагенозный колит. ВЗК предсталяет собой спонтанно рецидивирующее, иммунологически опосредованное заболевание желудочно-кишечного тракта, характеризуемое неконтролируемым воспалением и постоянной активацией иммунной системы слизистой оболочки. Считается, что CD4 Т-клетки играют решающую роль в патогенезе ВЗК у человека из-за их перемещения в воспаленную слизистую оболочку.

Способы, описанные в настоящем документе, особенно подходят для лечения псориаза. Псориаз является хроническим воспалительным кожным заболеванием, которое характеризуется образованием красных, шелушащихся, приподнятых над поверхностью кожи бляшек. Псориаз опосредован активностью Т-клеток и ассоциированным повышением уровней цитокинов, что приводит к усиленному делению клеток и нарушению дифференцировки. Псориаз - хроническое, рецидивирующее кожное заболевание с разными степенями тяжести, которое также связано с тяжелыми сопутствующими патологиями, включающими псориатический артрит, депрессию, злокачественное течение, метаболический синдром, сердечно-сосудистую патологию и смертность, а также такие аутоиммунные заболевания, как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК).

Способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для лечения сахарного диабета 1-го типа (диабета 1-го типа). Диабет 1-го типа - нарушение обмена веществ у людей, которые включают пациентов с ранним началом в детском возрасте, которые не имет избыточного веса относительно своего возраста и роста, с быстрым началом болезни в раннем возрасте, часто до 30 лет, хотя диабет 1-го типа может появиться в любом возрасте. Диабет 1-го типа считается заболеванием с аутоиммунной этиологией. CD4 и CD8 Т-клетки вовлечены как причинный фактор при повреждении бета-клеток (клеток, вырабатывающих инсулин).

Способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для лечения других аутоиммунных заболеваний, включающих, без ограничения перечисленными, острый рассеянный энцефаломиелит (ОРЭМ), болезнь Аддисона, генерализованную алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром (АФС), апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Чагаса, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, целиакию-герпетиформный дерматит, болезнь холодовых агглютининов, синдром CREST, болезнь Дего, дискоидную волчанку, вегетативную дисфункцию, эндометриоз, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию-фибромиозит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическую и/или острую тромбоцитопеническую пурпуру, идиопатический фиброз легких, IgA невропатию, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), тяжелую миастению, невромиотонию, опсо-миоклональный синдром (ОМС), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, выльгарную пузырчатку, пернициозную анемию, полихондрит, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узелковый

полиартериит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как "гигантоклеточный артериит"), язвенный колит, коллагенозный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводинию ("вульварный вестибулит") и гранулематоз Вегенера.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения различных нарушений, включающих, без ограничения, незлокачественную гемоглобинопатию (например, гемоглобинопатию, выбранную из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони и синдром Вискотта-Олдрича). Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения приобретенного иммунодефицита (например, приобретенного иммунодефицита, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ и СПИДа). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения нарушения обмена веществ (например, нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из заболеваний накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлер, сфинголипидозов и метахроматической лейкодистрофии). Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения онкологического заболевания, такого как гемобластоз (например, лейкоз, лимфома, множественная миелома и миелодиспластический синдром), а также других онкологических заболеваний, включая нейробластому.

Дополнительные нарушения, которые можно лечить с применением композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают дефицит аденозиндеаминазы и тяжелый комбинированный иммуннодефицит, синдром гипериммуноглобулинемии М, болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз,

остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз и ювенильый ревматоидный артрит.

Примеры

Следующие примеры представлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области описание того, как композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять, изготавливать и оценивать, и предназначены просто в качестве иллюстрации изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением.

Пример 1. Введение антитела против CD137 или ADC пациенту-человеку при подготовке к трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками

Согласно способам, раскрытым в настоящем документе, квалифицированной врач сумеет ввести пациенту-человеку антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд, способный связывать CD137, такой как антитело против CD137, описанное в настоящем документе. Антитело, его фрагмент, ADC или растворимый лиганд может быть ковалентно конъюгирован с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в уровне техники, или Fc-доменом. Например, антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд может быть ковалентно конъюгирован с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство, майтанзин, майтанзиноид, аматоксин, экзотоксин A *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, такой как α-аманитин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазепина или их вариант.

Такое конъюгирование может быть выполнено при использовании методов образования ковалентной связи, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства могут затем вводить пациенту, например путем

внутривенного введения, перед трансплантацией экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аллогенные гемопоэтические стволовые клетки) пациенту.

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства могут вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества аутореактивных Т-клеток, например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше, до, во время или после трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками. Снижение количества донорских Т-клеток можно контролировать при использовании стандартных методов, известных в данной области, таких как FACS анализ клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены гемопоэтических клеток, в образце крови, забранном у пациента. Например, квалифицированный врач может забрать образец крови у пациента в различные моменты времени и определить степень снижения донорских CD137+ Т-клеток путем проведения FACS анализа с целью определения относительных концентраций Т-клеток в образце с использованием антител, которые связываются с антигенами донорских Т-клеток.

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как модификатор вязкости. Водный раствор может быть стерилизован при использовании методов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в дозе, например, от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг до введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое обеспечивает оптимальное приживление экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от 1 часа до 7 дней (например, 1

час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней) или больше до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить приблизительно за 3 дня до трансплантации. В альтернативе антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое обеспечивает оптимальное приживление экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, одновременно с введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое обеспечивает оптимальное приживление экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от 1 часа до 10 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней) или больше после введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить приблизительно через 3-4 дня после трансплантации. Количество антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства может быть определено количественно с помощью методов, известных в уровне техники, в плазме пациентов, для определения, когда концентрация антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата

лиганда-лекарственного средства достигает своего максимума.

Затем пациент может получать инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, выполняемую тем же врачом, который вводил антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или другим врачом. Врач может вводить пациенту инфузию аутологичных, сингенных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от 1×10^3 до 1×10^9 CD34+ клеток/кг. Врач может контролировать приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем забора образца крови у пациента и определения увеличения концентрации гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии (таких как мегакариоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглия, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, NK-клетки, Т-клетки и В-клетки) после введения трансплантата. Этот анализ может быть проведен, например, от 1 часа до 6 месяцев или больше после трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками (например, через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделя, 22 недели, 23 недели, 24 недели или больше). Обнаружение того, что концентрация гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии увеличилась (например, на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 500% или больше) после трансплантационной терапии по сравнению с концентрацией клеток соответствующего типа до трансплантационной терапии, является одним показанием того, что лечение антителом против CD137, его

антигенсвязывающим фрагментом, конъюгатом антитела-лекарственного средства или конъюгатом лиганда-лекарственного средства успешно вызвало приживление пересаженного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

Пример 2. Создание антител против CD137 методом фагового дисплея

Иллюстративным способом создания антител против CD137 *in vitro* для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, является фаговый дисплей. Библиотеки фагового дисплея могут быть созданы путем получения спроектированной серии мутаций или вариаций в кодирующей последовательности CDR-областей антитела или аналогичных областей антителоподобного каркаса (например, петли BC, CD и DE доменов ^{10}Fn3). Последовательность, кодирующая матричное антитело, в которое вводят эти мутации, может представлять собой, например, наивную последовательность зародышевой линии человека. Эти мутации могут быть введены при использовании стандартных методов мутагенеза, известных в данной области. Таким образом, каждая мутантная последовательность кодирует антитело, соответствующее матрице, за исключением одной или более аминокислотных вариаций. Ретровирусные векторы и векторы фагового дисплея могут быть сконструированы с использованием стандартных методов конструирования векторов, известных в данной области. Векторы фагового дисплея на основе фага P3 вместе с совместимыми векторами для экспрессии белка можно использовать для создания векторов фагового дисплея для диверсификации антител.

Мутантная ДНК обеспечивает разнообразие последовательностей, при этом каждый трансформированный фаг экспонирует один вариант исходной матричной аминокислотной последовательности, кодируемой такой ДНК, что приводит к получению популяции фага (библиотеки), экспонирующей огромное количество разных, но структурно родственных аминокислотных последовательностей. Ожидается, что благодаря точно определенной структуре гипервариабельных областей антител, вариации аминокислот, введенные при скрининге фагового дисплея, изменят

свойства связывания связывающего пептида или домена без значительного изменения его общей молекулярной структуры.

При типичном скрининге фаговая библиотека может быть подвергнута контакту и может получить возможность связывания с CD137 или его эпитопом. Для облегчения разделения связывающихся фагов и несвязывающихся фагов, удобно иммобилизовать мишень на твердой подложке. Фаг, несущий CD137-связывающий фрагмент, может образовывать комплекс с мишенью на твердой подложке, тогда как несвязывающийся фаг остается в растворе и может быть смыт избытком буфера. Связанный фаг затем можно снять с мишени путем изменения pH буфера до экстремального значения (pH 2 или pH 10), изменения ионной силы буфера, добавления денатурирующих агентов или другими известными способами.

Выделенный фаг может быть затем амплифицирован путем заражения бактериальных клеток, после чего процесс скрининга может быть повторен с новым пулом, который теперь будет обеднен несвязывающими антителами и обогащен антителами, которые связывают CD137. Выделение даже нескольких связывающих фагов достаточно для амплификации фага с целью последующей итерации скрининга. После нескольких раундов селекции, последовательности генов, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из отобранных клонов фага в связывающем пуле, определяют с помощью стандартных методов, определяя таким образом пептидную последовательность, которая придает аффинность связывания фагу с мишенью. Во время процесса пэннинга разнообразие последовательностей популяции уменьшается с каждым раундом селекции до тех пор, пока не останутся требуемые пептидсвязывающие антитела. Последовательности могут перекрываться на небольшом количестве родственных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Увеличение количества фага, выделенного в каждом раунде селекции, является признаком того, что при скрининге произошла конвергенция библиотеки.

Пример 3. Получение гуманизированных антител против CD137

Нечеловеческие антитела, которые связывают CD137, могут быть гуманизированы, например, согласно следующей методике. Консенсусные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи

антитела человека известны в уровне техники (см., например, базу данных последовательностей зародышевой линии человека "VBASE"; публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992; и Cox et al. Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994, каждая из которых включена в настоящий документ посредством отсылки, поскольку они относятся к консенсусным последовательностям тяжелой цепи и легкой цепи человеческого антитела. При использовании установленных процедур специалист в данной области сможет определить каркасные остатки вариабельного домена и CDR-области консенсусной последовательности антитела (например, при выравнивании последовательностей). Можно заменить одну или более CDR-областей вариабельных доменов тяжелой цепи и/или легкой цепи консенсусной последовательности антитела человека одной или более соответствующими CDR-областями нечеловеческого антитела, которое связывает CD137, с получением гуманизированного антитела. Этот обмен CDR может быть выполнен при использовании способов редактирования генов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники.

Одним из примеров вариабельного домена консенсусной последовательности человеческого антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYAMS**WVRQAPGKG LEWVA**VISENGSDTYYADSV**KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DRGGAVSYFD VW**GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21) и вариабельный домен легкой цепи DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSYLAW**YQQKPGKAPKLLIY**AASSLES**GVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQYNSLPYT**FGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 22), идентифицированные в патенте США 6,054,297, описание которого включено в настоящий документ посредством отсылки, поскольку он относится к консенсусным последовательностям человеческих антител. CDR-области в представленных выше последовательностях выделены полужирным шрифтом.

Для получения гуманизированных антител можно рекомбинантно экспрессировать полинуклеотид, кодирующий вышеуказанную консенсусную последовательность, в которой одна или более CDR-

областей вариабельной области были заменены последовательностями одной или более CDR-областей вариабельной области нечеловеческого антитела, которое связывает CD137. Поскольку аффинность антитела к CD137 определяется, прежде всего, CDR-последовательностями, ожидается, что полученное гуманизированное антитело будет демонстрировать аффинность к CD137, которая является примерно такой же, как аффинность нечеловеческого антитела, из которого было получено гуманизированное антитело. Способы определения аффинности антитела к антигену-мишени включают, например, помимо прочих, методы на основе ИФА, описанные в настоящем документе и известные в уровне техники, а также поверхностный плазмонный резонанс, флуоресцентную анизотропию и изотермическую титрационную калориметрию.

Пример 4. Введение антитела против CD137 или ADC пациенту-человеку, подвергающемуся риску или страдающему РТПХ

Согласно способам, раскрытым в настоящем документе, квалифицированный врач может ввести пациенту-человеку антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд, способный связывать CD137, такой как антитело против CD137 или ADC, описанные в настоящем документе. Антитело, его фрагмент, ADC или растворимый лиганд могут быть ковалентно конъюгированы с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в уровне техники, или Fc-доменом. Например, антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент или растворимый лиганд могут быть ковалентно конъюгированы с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство, майтанзин, майтанзиноид, аматоксин, экзотоксин A *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, такой как α-аманитин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазепина или их вариант.

Такое конъюгирование может быть выполнено при использовании методов образования ковалентной связи, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его

антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства могут затем вводить путем внутривенного введения, например, пациенту, подвергающемуся риску РТПХ. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно затем вводить путем внутривенного введения, например, пациенту, страдающему РТПХ. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту до, во время или после трансплантации экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аллогенные гемопоэтические стволовые клетки).

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества аутореактивных Т-клеток, например на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше, после трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками. Уменьшение количества донорских Т-клеток можно контролировать при использовании стандартных методов, известных в уровне техники, таких как FACS анализ клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены гемопоэтических клеток в образце крови, забранном у пациента. Например, квалифицированный врач может забирать образец крови у пациента в различные моменты времени и определять степень снижения донорских CD137+ Т-клеток, проводя FACS анализ для опредедения относительных концентраций Т-клеток в образце с использованием антител, которые связываются с антигенами донорских Т-клеток.

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как модификатор вязкости. Водный раствор может быть стерилизован при использовании методов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-

лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в дозе, например от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг, до введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному предотвращению и лечению РТПХ, например, от 1 часа до 7 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней) или больше до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить приблизительно за 3 дня до трансплантата. В альтернативе антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, одновременно с введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от 1 часа до 10 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней) или больше после введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного

средства можно вводить приблизительно через 3-4 дня после трансплантата. Количество антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства может быть определено количественно с помощью способов, известных в уровне техники, в плазме пациентов, с целью определения, когда концентрация антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства достигла своего максимума.

Затем пациент может получать инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, выполняемую тем же врачом, который вводил антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или другим врачом. Врач может вводить пациенту инфузию аутологичных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от 1×10^3 до 1×10^9 CD34+ клеток/кг.

Квалифицированный врач может оценить клинические проявления РТПХ после введения пациенту-человеку антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда, способного связывать CD137, такого как антитела против CD137, описанного в настоящем документе.

Пример 5. Введение антитела против CD137 или ADC пациенту-человеку, у которого развивается аутоиммунное заболевание в результате трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Согласно способам, раскрытым в настоящем документе, квалифицированный врач может вводить пациенту-человеку антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд, способный связывать CD137, такие как антитело против CD137 или ADC, описанные в настоящем документе. Антитело, его фрагмент или растворимый лиганд могут быть ковалентно конъюгированы с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в уровне техники, или Fc-доменом. Например, антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент или растворимый лиганд могут быть ковалентно

конъюгированы с цитотоксином, таким как связывающее микротрубочки средство, майтанзин, майтанзиноид, аматоксин, экзотоксин А *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, такой как α-аманитин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазепина или их вариант.

Такое конъюгирование может быть выполнено при использовании способов образования ковалентной связи, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства могут затем вводить путем внутривенного введения, например, пациенту, подвергающемуся риску развития аутоиммунного заболевания (например, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, заболевания кишечника, псориаза, волчанки и диабета 1-го типа). Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту, страдающему аутоиммунным заболеванием, которое развивается после трансплантации экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аутологичные или аллогенные гемопоэтические стволовые клетки).

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества аутореактивных лимфоцитов, например на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше, до трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками. Уменьшение количества донорских лимфоцитов можно контролировать при использовании стандартных методов, известных в уровне техники, таких как FACS анализ клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены гемопоэтических клеток, в образце крови, забранном у пациента. Например, квалифицированный врач может забирать образец крови у пациента в различные моменты

времени и определять степень снижения CD137+ Т-клеток путем проведения FACS анализа с целью определения относительных концентраций Т-клеток в образце при использовании антител, которые связываются с Т-клеточными антигенами. Эффективность против аутоиммунного заболевания можно оценивать с помощью анализов, известных в уровне техники (например, измерения ответов аутоантител в образцах сыворотки и пролиферации Т-клеток в ответ на аутоантигены).

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как модификатор вязкости. Водный раствор может быть стерилизован при использовании методов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в дозе, например от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг, до введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному предотвращению и лечению аутоиммунного заболевания, например, от 1 часа до 7 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней) или больше до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить приблизительно 3 дня до трансплантата. В альтернативе антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое

способствует оптимальному приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, одновременно с введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от 1 часа до 10 дней (например, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней) или больше после введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить приблизительно через 3-4 дня после трансплантации. Количество антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства может быть определено количественно с помощью способов, известных в уровне техники, в плазме пациентов, с целью определения, когда концентрация антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства достигла своего максимума.

Затем пациент может получать инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, выполняемую тем же врачом, который вводил антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или другим врачом. Врач может вводить пациенту инфузию аутологичных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от 1×10^3 до 1×10^9 CD34+ клеток/кг.

Квалифицированный врач может оценить клинические проявления аутоиммунного заболевания после введения пациенту-человеку

антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда, способных связывать CD137, таких как антитело против CD137 или ADC, описанные в настоящем документе.

Пример 6. Введение антитела против CD137 пациенту-человеку, подвергающемуся риску или страдающему аутоиммунным заболеванием

Согласно способам, раскрытым в настоящем документе, квалифицированный врач может вводить пациенту-человеку антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, ADC или растворимый лиганд, способные связывать CD137, такие как антитело против CD137 или ADC, описанные в настоящем документе. Антитело, его фрагмент или растворимый лиганд могут быть ковалентно конъюгированы с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в уровне техники, или Fc-доменом.

Такое конъюгирование может быть выполнено при использовании методов образования ковалентной связи, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства могут затем вводить путем внутривенного введения, например, пациенту подвергающемуся риску развития аутоиммунного заболевания (например, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, заболевания кишечника, псориаза, волчанки и диабета 1-го типа). Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитела-лекарственного средства, или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно затем вводить путем внутривенного введения, например, пациенту, страдающему аутоиммунным заболеванием (например, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, заболеванием кишечника, псориазом, волчанкой и диабетом 1-го типа).

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества аутореактивных лимфоцитов, например на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше. Снижение количества донорских лимфоцитов можно контролировать

при использовании стандартных методов, известных в уровне техники, таких как FACS анализ клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены гемопоэтических клеток, в образце крови, забранном у пациента. Например, квалифицированный врач может забирать образец крови у пациента в различные моменты времени и определять степень снижения CD137+ Т-клеток путем проведения FACS анализа с целью определения относительных концентраций Т-клеток в образце при использовании антител, которые связываются с Т-клеточными антигенами. Эффективность против аутоиммунного заболевания можно оценить с помощью анализов, известных в уровне техники (например, измерения ответов аутоантител в образцах сыворотки и пролиферации Т-клеток в ответ на аутоантигены).

Антитело против CD137, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как модификатор вязкости. Водный раствор может быть стерилизован при использовании методов, описанных в настоящем документе или известных в уровне техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту в дозе, например от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг, до введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела-лекарственного средства или конъюгат лиганда-лекарственного средства можно вводить пациенту во время, которое способствует оптимальному предотвращению и лечению аутоиммунного заболевания. Количество антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства может быть определено количественно с помощью способов, известных в уровне техники, в плазме пациентов, с целью определения, когда концентрация антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела-лекарственного средства или конъюгата лиганда-лекарственного средства достигла своего максимума.

Квалифицированный врач может оценить клинические проявления аутоиммунного заболевания после введения пациенту-человеку антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого лиганда, способных связывать CD137, таких как антитело против CD137 или ADC, описанные в настоящем документе.

Пример 7. Анализ связывания клеточной линии *in vitro*

Клетки Jurkat (т.е. иммортализованная клеточная линия Т-клеток человека), характеризуемая стабильной оверэкспрессией hCD137, сеяли при плотности 20000 клеток/лунка и окрашивали при титровании первичным мышиным антителом против CD137, BBK2 (BBK2-mIgG1), в течение 4 часов при 4°C. Вторичное окрашивающее антитело AF488 против иммуноглобулинов мыши, в постоянном количестве, добавляли на 30 минут при 4°C. После промывки планшеты анализировали на проточном цитометре и связывание BBK2-mIgG1 (и отрицательного контроля, т.е. mIgG1) определяли на основе среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции в канале AF488. Результаты этих анализов представлены на Фиг. 1A и B.

Как показано на Фиг. 1A и 1B, мышиное антитело BBK2 связывается с человеческими Т-клетками (т.е. CD137-экспрессирующими клетками Jurkat) с EC_{50}=35 пМ.

Пример 8. Анализ *in vitro* аманитин-конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC) против CD137 при использовании анализа киллинга Т-клеток *in vitro*

Криоконсервированные первичные человеческие Т-клетки, подвергнутые негативной селекции, размораживали и стимулировали микросферами против CD3/против CD28 (Invitrogen) при отношении микросфер:клеток 0,5:1. В начале анализа Т-клетки 2e4 сеяли в лунку 384-луночного планшета и добавляли ADC в лунки при различных концентрациях, от 0,003 до 30 нМ, после чего инкубировали при 37°C и 5% CO_2. После 4 дней культивирования клетки исследовали с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали витальным маркером Live/Dead Yellow (Invitrogen) и исследовали на волюметрическом проточном цитометре. Количество живых активированных клеток (Фиг. 2A) и живых неактивированных

клеток (Фиг. 2B) определяли с помощью FSC/SSC светорассеяния. Неспецифический человеческий IgG, конъюгированный с аманитином (hIgG-аманитин), служил в качестве отрицательного контроля. Таким образом, контроль сравнивали с двумя разными ADC: 1) химерным антителом против CD137, BBK2, конъюгированным с аманитином (CD137-аманитин); и 2) ADC, включающим антитело, специфичное к Т-клеточному антигену, конъюгированное с аманитином (анти-Т-клетка-аманитин). ADC против Т-клеток-аманитин служил в качестве положительного контроля, поскольку ожидали, что он связывает и убивает как активированные, так и неактивированные Т-клетки.

Как показано на Фиг. 2A и 2B, ADC против CD137-аманитин (т.е. "CD137-аманитин") специфично убивал активированные Т-клетки и по существу не убивал неактивированные (покоящиеся, в стационарной фазе) Т-клетки. Кроме того, положительный контроль (т.е. ADC "анти-Т-клетка-аманитин"), который представлял собой ADC, который специфично воздействовал как на активированные, так и неактивированные Т-клетки, убивал активированные и неактивированные Т-клетки.

Пример 9. Анализ предотвращения РТПХ при использовании модели на мышах Xeno-РТПХ

Способность ADC против CD137-аманитин предотвращать формирование или возникновение РТПХ, оценивали *in vivo* при использовании модели на мышах xeno-РТПХ. Самок мышей NSG возрастом 6-8 недель облучали (200 сГр) и на следующий день им пересаживали 6×10^6 человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с получением модели РТПХ на мышах. Через один день животным вводили (в дозе 3 мг/кг) ADC против CD137-аманитин (т.е. "CD137-аманитин") или различные контрольные реактивы (т.е. один буфер ("PBS"), антитело против CD137 ("CD137, голое") или ADC на основе аманитина, который не специфичен к CD137 ("изотип-аманитин")). Антителом против CD137, используемым в этом примере в ADC конъюгатах и в качестве голого антитела, являлось химерное BBK2.

Животных наблюдали ежедневно после введения дозы для

обнаружения признаков РТПХ и/или ухудшения показателей физического состояния, включающих, без ограничения перечисленным, сгорбленную позу, взъерошенный мех, потерю веса и/или ограниченную активность. Животных с серьезными нарушениями физического состояния или животных, у которых потеря веса превышала 20%, умерщвляли и исследовали их ткани на клетки человека. Периферическую кровь и селезенку мышей окрашивали смесью антител, включающей антитела к hCD45, mCD45, hCD3 и hCD137, эритроциты лизировали и исследовали с помощью проточной цитометрии. Количество человеческих Т-клеток в крови определяли как hCD45+ CD3+ и нормализовали по вводимому объему крови. Процент выживаемости в зависимости от количества дней после лечения представлен на Фиг. 3. Количество человеческих Т-клеток в периферической крови в зависимости от количества дней после трансплантации представлено на Фиг. 4.

Как показано на Фиг. 3, животные, получавшие однократную дозу ADC против CD137-аманитин ("CD137-аманитин"), показали практически полное предотвращение РТПХ, даже через 80 дней после трансплантации, тогда как все животные, получавшие контроль (т.е. PBS, антитело против CD137 (голое) и изотип-аманитин) погибали в течение 11-13 дней после трансплантации. Эти результаты также указывают на то, что ADC против CD137-аманитин хорошо переносили все животные, и что однократной дозы ADC против CD137-аманитин было достаточно для полной профилактики РТПХ (в отличие от необходимости многократных доз). Как показано на Фиг. 4, человеческие Т-клетки не были обнаружены в периферической крови мышей в течение по меньшей мере 70 дней после трансплантации у мышей, получавших CD137-аманитин, тогда как в периферической крови у животных, обработанных контролем, было обнаружено присутствие Т-клеток человека через несколько дней после трансплантации, что указывает на развитие РТПХ у животных, получавших контроль.

Пример 10. Определение процента приживления и элиминации Т-клеток в стационарной фазе в модели на мышах hNSG-SGM3

У самок гуманизированных мышей NSG-SGM3 оценивали исходный процент приживления человеческих гемопоэтических (всех и Т-

клеток) клеток в периферической крови с помощью проточной цитометрии при использовании антител к hCD45, mCD45, hCD3 и hCD137. Мышей рандомизировали, а затем вводили CD137-аманитин ADC (ADC на основе химерного BBK2-аманитин), изотип-аманитин ADC, или ADC против-Т-клетки-аманитин, все в дозе 3 мг/кг. Приживление и элиминацию Т-клеток в периферической крови мышей оценивали в день 5, день 9, день 14, день 22 и день 27 после введения (Фиг. 5А и 5В). Периферическую кровь окрашивали для оценки изменений химеризма и количества Т-клеток. Эквивалентные количества крови исследовали на цитофлуориметре с волюметрическим подсчетом и определяли абсолютное количество на основе числа событий. Уменьшение приживления и числа Т-клеток нормализовали по исходным значениям.

Результаты на Фиг. 5А и 5В указывают, что ADC против CD137-аманитин хорошо переносился в этой модели на мышах. Кроме того, приживление и частота Т-клеток (после нормализации по исходным показателям) остались близкими к исходным уровням с небольшим или средним уменьшением приживления и частоты Т-клеток у мышей, получавших ADC против CD137-аманитин. Эти данные указывают, что обычно у гуманизированных мышей NSG в стационарной фазе отсутствует элиминация Т-клеток, что указывает на то, что иммунная функция у мышей, получавших ADC против CD137-аманитин, может быть сохранена, поскольку большинство Т-клеток не было элиминировано. С другой стороны, мыши, получавшие ADC, который специфично направлен против альтернативного Т-клеточного маркера ("ADC против Т-клетки-аманитин"), продемонстрировал полную абляцию приживления и количеств Т-клеток.

Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи химерного BBK2, описанного в примерах выше, представлены в SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно.

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и заявки на патенты, указанные в настоящем описании, включены посредством отсылки в той же степени, как если бы было прямо и индивидуально указано, что каждая независимая публикация или заявка на патент включена посредством отсылки.

Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, при этом предусмотрено, что настоящая заявка охватывает любые варианты, применения или адаптации изобретения, которые в целом соответствуют принципам изобретения, и включает такие отклонения от изобретения, которые входят в известную или общепринятую практику в области техники, к которой относится изобретение, и могут применяться к существенным признакам, изложенным выше, оставаясь при этом в объеме формулы изобретения.

Другие варианты осуществления находятся в рамках формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения реакции "трансплантат против хозяина" у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

2. Способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития реакции "трансплантат против хозяина", включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

3. Способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

4. Способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у пациента-человека, страдающего или подвергающегося риску развития аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных связывать CD137, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином через линкер.

5. Способ по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифичного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, двойного вариабельного домена иммуноглобулина, одиноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-

фрагмента, молекулы F(ab')2 и тандемного ди-scFv.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают внеклеточный домен CD137 человека в эпитопе, расположенном в пределах аминокислотных остатков 115-156 SEQ ID NO: 20.

7. Способ по любому из пп.1-6, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

8. Способ по п.7, где антитело содержит Fc-домен изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

9. Способ по пп.1-8, где цитотоксин является связывающим микротрубочки средством.

10. Способ по п.9, где связывающим микротрубочки средством является майтанзин.

11. Способ по п.9, где связывающим микротрубочки средством является майтанзиноид.

12. Способ по п.11, где майтанзиноид выбран из группы, состоящей из DM1, DM3 и DM4 и майтанзинола.

13. Способ по любому из пп.1-12, где способ включает введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого лиганда CD137 пациенту до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

14. Способ по п.13, включающий введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, пациенту приблизительно за три дня до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

15. Способ по любому из пп.1-14, где способ включает введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, пациенту одновременно с получением пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

16. Способ по любому из пп.1-14, где способ включает введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, пациенту после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

17. Способ по п.16, где способ включает введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, пациенту приблизительно через 1 час - 10 дней после получения пациентом трансплантата,

включающего гемопоэтические стволовые клетки.

18. Способ по п.16, включающий введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, пациенту приблизительно через 3-4 дня после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

19. Способ по любому из пп.13-18, где трансплантат является аллогенным.

20. Способ по любому из пп.13-19, где трансплантат является трансплантатом костного мозга.

21. Способ по любому из пп.13-19, где трансплантат является трансплантатом периферической крови.

22. Способ по любому из пп.13-19, где трансплантат является трансплантатом пуповинной крови.

23. Способ по любому из пп.13-22, где трансплантат включает гемопоэтические клетки.

24. Способ по любому из пп.13-23, где гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки после двух или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

25. Способ по любому из пп.13-24, где гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны к локализации в гемопоэтической ткани и/или восстановлению гемопоэза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

26. Способ по п.24 или 25, где после трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, естественных киллерных клеток (NK), Т-клеток и В-клеток.

27. Способ по любому из пп.13-26, где трансплантат включает лейкоциты.

28. Способ по п.27, где лейкоциты включают клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, дендритных

клеток, NK-клеток, макрофагов, раковых клеток, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов.

29. Способ по п.2 или 4, где CD137-положительные клетки включают клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток, NK-клеток, макрофагов, раковых клеток, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов.

30. Способ по п.29, где клетка демонстрирует реактивность против антигена пациента.

31. Способ по любому из пп.1-30, где антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, интернализуются Т-клетой при контакте.

32. Способ по любому из пп.1-31, где антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, вызывают гибель или подавляют пролиферацию Т-клетки.

33. Способ по любому из пп.1-32, где антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, способны рекрутировать один или более белков комплемента к клетке при введении пациенту.

34. Способ по любому из пп.1-33, где антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, способны рекрутировать один или более белков комплемента к Т-клетке при введении пациенту.

35. Способ по п.3 или 4, где аутоиммунное заболевание является аутоиммунным заболеванием, направляемым Т- или В-клетками.

36. Способ по п.34, где аутоиммунным заболеванием является рассеянный склероз, ревматоидный артрит, заболевание кишечника, псориаз, волчанка или диабет 1-го типа

37. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает нарушением функции стволовых клеток.

38. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает гемоглобинопатией.

39. Способ по п.38, где указанная гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони и синдрома Вискотта-Олдрича.

40. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает иммунодефицитом.

41. Способ по п.40, где указанный иммунодефицит является

врожденным иммуннодефицитом.

42. Способ по п.40, где указанный иммунодефицит является приобретенным иммуннодефицитом.

43. Способ по п.42, где указанный приобретенный иммуннодефицит является вирусом иммунодефицита человека или синдромом приобретенного иммунодефицита.

44. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает нарушением обмена веществ.

45. Способ по п.44, где указанное нарушение обмена веществ выбрано из группы, состоящей из гликогенозов, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлер, сфинголипидозов и метахроматической лейкодистрофии.

46. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает раком.

47. Способ по п.45, где указанный рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и миелодиспластического синдрома, и нейробластомы.

48. Способ по любому из пп.1-36, где указанный пациент страдает нарушением, выбранным из группы, состоящей из дефицита аденозиндеаминазы и тяжелого комбинированного иммуннодефицита, синдрома гипериммуноглобулинемии М, болезни Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза и ювенильного ревматоидного артрита.

49. Способ по любому из пп.37-48, где указанный пациент получил трансплантат, включающий популяцию гемопоэтических стволовых клеток.

50. Способ по любому из пп.37-38, где указанный способ позволяет лечить нарушение или рак.

51. Способ лечения реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение коъюгата антитела-лекарственного средства (ADC) против CD137 пациенту-человеку, в результате чего осуществляется лечение РТПХ, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином, который является связывающим микротрубочки

средством или ингибитором РНК-полимеразы.

52. Способ элиминации популяции CD137-положительных клеток у субъекта-человека, имеющего РТПХ или подвергающегося риску развития РТПХ, включающий введение ADC против CD137 пациенту-человеку, в результате чего РТПХ популяция CD137 клеток элиминируется, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином, который является связывающим микротрубочки средством или ингибитором РНК-полимеразы.

53. Способ по п.51 или 52, где способ включает введение ADC пациенту до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

54. Способ по п.53, где способ включает введение ADC пациенту приблизительно за три дня до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

55. Способ по п.51 или 52, где способ включает введение ADC пациенту одновременно с получением пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

56. Способ по п.51 или 52, где способ включает введение ADC пациенту после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

57. Способ по п.56, где способ включает введение ADC пациенту приблизительно через 1 час - 10 дней после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

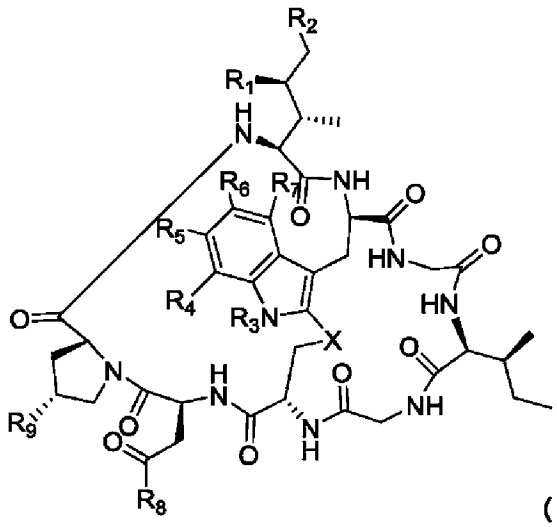
58. Способ по п.56, включающий введение ADC пациенту приблизительно через 3-4 дня после получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

59. Способ по любому из пп.51-58, где трансплантат является аллогенным.

60. Способ по любому из пп.51-59, где связывающим микротрубочки средством является майтанзиноид.

61. Способ по любому из пп.51-59, где ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин.

62. Способ по п.61, где аматоксин представлен формулой (**IA**):



(IA)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

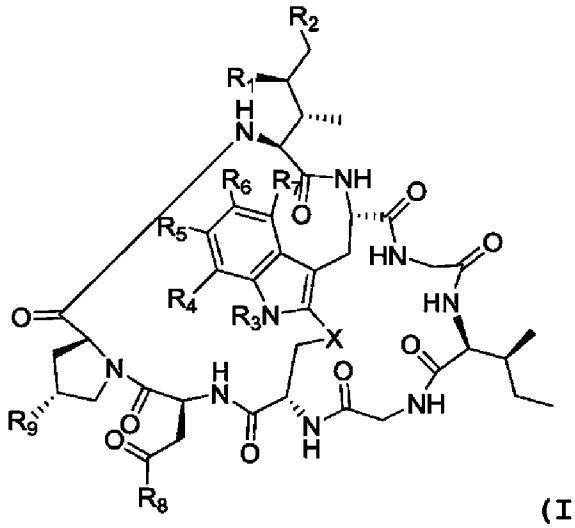
L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно

замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C.

63. Способ по п.61, где аматоксин представлен формулой (IB):



(IB)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6

гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C.

64. Способ по любому из пп.51-59, где ингибитором РНК-полимеразы является аманитин.

65. Способ по п.64, где аманитин выбран из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина.

66. Способ элиминации аллореактивных Т-клеток у пациента-человека, который получил аллогенный трансплантат, где способ включает введение ADC против CD137 пациенту-человеку, в результате чего аллореактивные Т-клетки элиминируются, где ADC включает антитело против CD137, связанное с цитотоксином.

67. Способ по п.66, где трансплантат является трансплантатом костного мозга.

68. Способ по п.66, где трансплантат является трансплантатом периферической крови.

69. Способ по п.66, где трансплантат является трансплантатом пуповинной крови.

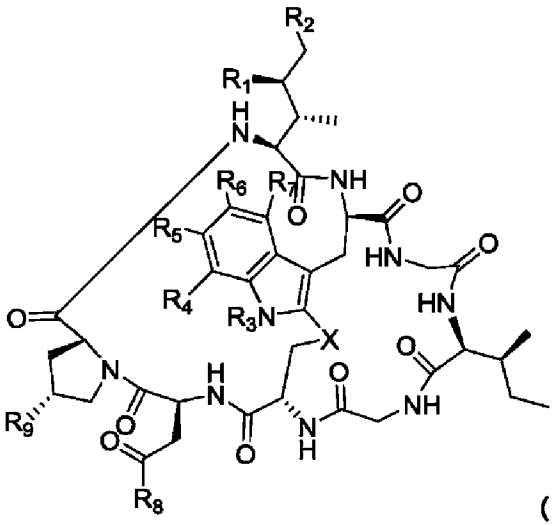
70. Способ по любому из пп.66-69, где трансплантат включает гемопоэтические клетки.

71. Способ по п.70, где гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки после двух или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

72. Способ по любому из пп.66-71, где цитотоксином является ингибитор РНК-полимеразы.

73. Способ по п.72, где ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин.

74. Способ по п.73, где аматоксин представлен формулой (**IA**):



(IA)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил,

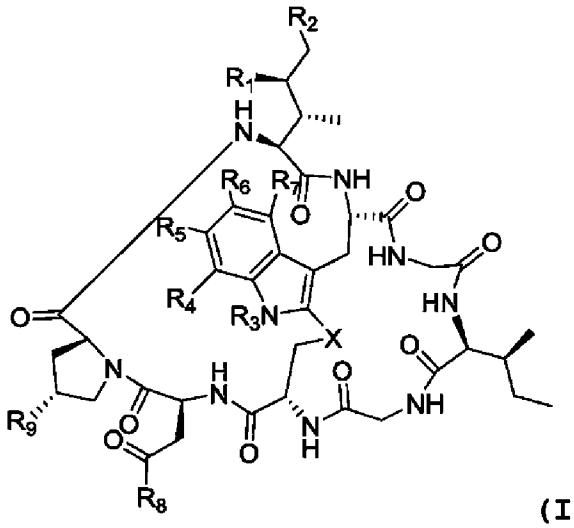
необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C.

75. Способ по п.73, где аматоксин представлен формулой (**IB**):



(IB)

где R_1 представляет собой H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C;

R_A и R_B объединены вместе с атомами кислорода, с которыми

они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R_3 представляет собой H, R_C или R_D;

каждый R_4, R_5, R_6 и R_7 независимо представляет собой H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 представляет собой OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет собой -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C представляет собой -L-Z;

R_D представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z является химическим фрагментом, образованным в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает только один заместитель R_C.

76. Способ по п.72, где ингибитором РНК-полимеразы является аманитин.

77. Способ по п.76, где аманитин выбран из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и

проаманулина.

78. Способ по любому из пп.1-77, где антитело против CD137 включает CDR-области антитела BBK2, определенные согласно нумерации Кэбата.

79. Способ по любому из пп.1-77, где антитело против CD137 включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела BBK2.

80. Способ по любому из пп.1-77, где антителом против CD137 является химерное BBK2.

81. Способ по любому из пп.1-77, где антитело против CD137 включает последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 23, и последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 24.

82. Способ по любому из пп.1-77, где антитело против CD137 представляет собой IgG1 или IgG4.

83. Антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфично связывают человеческий CD137, где указанное антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и включает легкой цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

84. Антитело против CD137 по п.83, которое является интактным антителом.

85. Конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), включающий антитело против CD137 или его антигенсвязывающую часть по п.83, где антитело, его антигенсвязывающая часть, конъюгированы с цитотоксином через линкер.

86. ADC по п.85, где цитотоксином является связывающее микротрубочки средство или ингибитор РНК-полимеразы.

87. ADC по п.86, где ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин.

88. ADC против CD137 по п.87, где аматоксином является аманитин.

89. ADC против CD137 по п.88, где аманитин выбран из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, аманулина, аманулиновой

кислоты и проаманулина.

90. Фармацевтическая композиция, включающая ADC по любому из пп.85-89 и фармацевтически активный носитель.

91. Способ лечения отторжения трансплантата или РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту-человеку эффективного количества ADC по любому из пп.78-83, где пациент-человек ранее получил трансплантат.

92. Способ по п.91, где пациент-человек получил трансплантат не больше чем за 4 дня до введения ADC.

93. Способ лечения пациента-человека, подвергающегося риску или имеющего отторжение трансплантата или РТПХ, где указанный способ включает введение эффективного количества ADC по любому из пп.78-83 пациенту-человеку, подвергающемуся риску или имеющему отторжение трансплантата или РТПХ, и затем введение трансплантата субъекту-человеку.

94. Способ по любому из пп.91-93, где ADC вводят пациенту-человеку в однократной дозе.

95. Конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), включающий антитело против CD137, конъюгированное с цитотоксином через линкер.

96. ADC по п.95, где антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и включает вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно.

97. ADC по п.95 или 96, где антитело является химерным или гуманизированным антителом.

98. ADC по п.96, где вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32.

99. ADC по любому из пп.95-98, где антитело имеет изотип IgG1 или IgG4.

100. ADC по любому из пп.95-99, где цитотоксином является связывающее микротрубочки средство или ингибитор РНК-полимеразы.

101. ADC по п.100, где ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин.

102. ADC по п.101, где аматоксином является аманитин.

103. ADC по п.102, где аманитин выбран из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина.

104. Фармацевтическая композиция, включающая ADC по любому из пп.95-103 и фармацевтически приемлемый носитель.

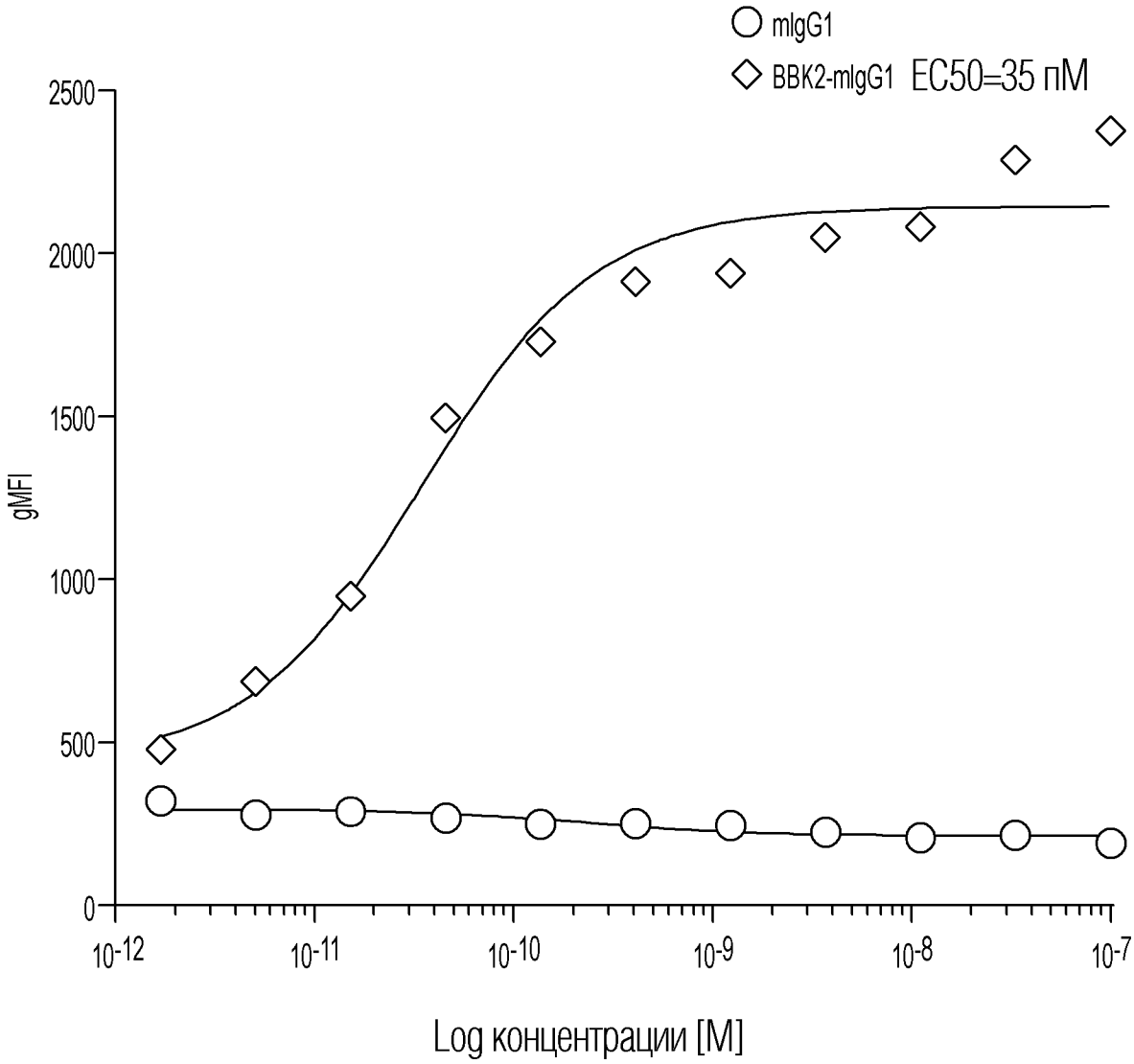
105. Способ лечения отторжения трансплантата или РТПХ у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту-человеку эффективного количества ADC по любому из пп.95-103, где пациент-человек ранее получил трансплантат.

106. Способ по п.105, где пациент-человек получил трансплантат не больше чем за 4 дня до введения ADC.

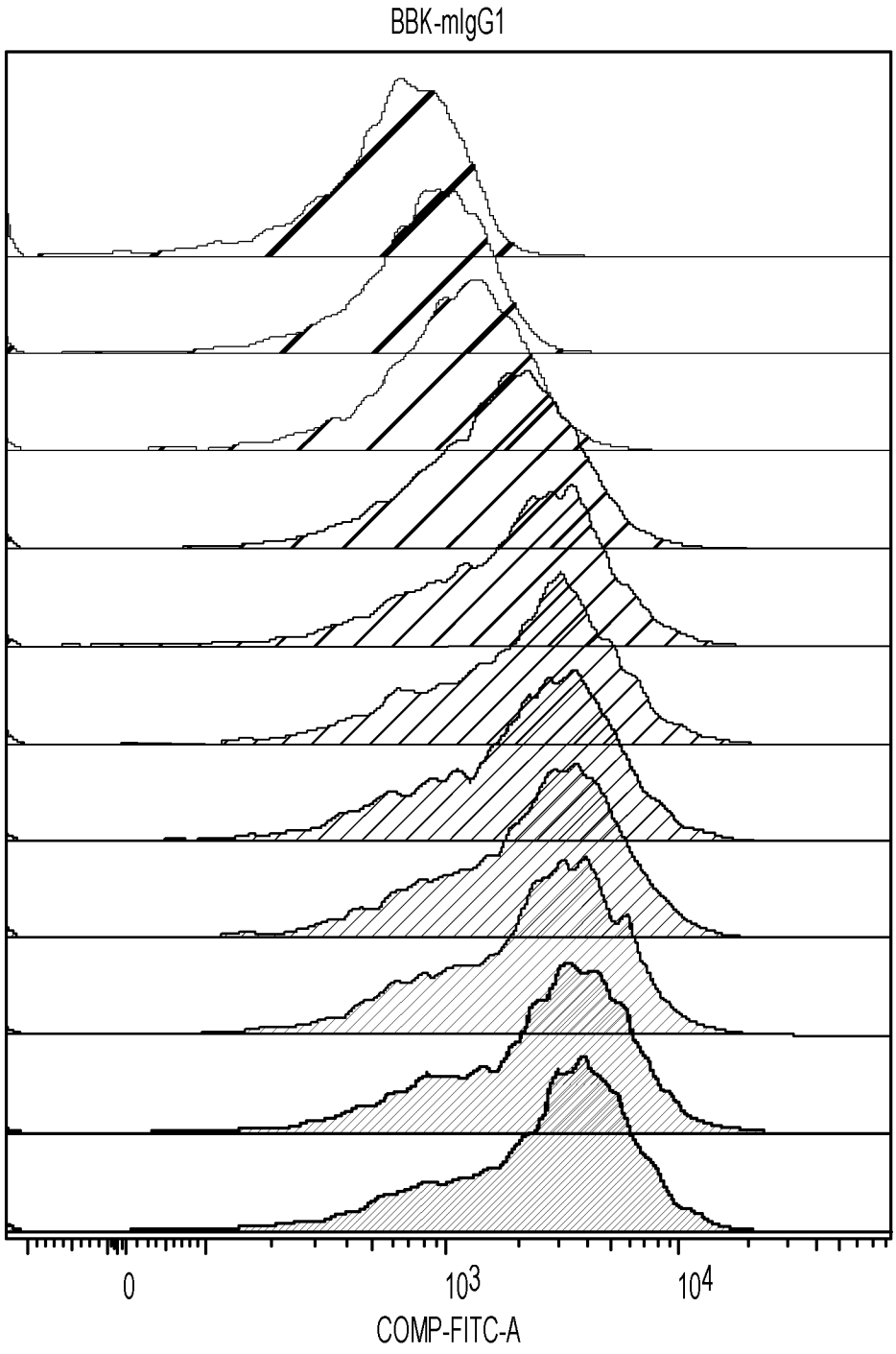
107. Способ лечения пациента-человека, подвергающегося риску или имеющего отторжение трансплантата или РТПХ, где указанный способ включает введение эффективного количества ADC по любому из пп.95-103 пациенту-человеку, подвергающемуся риску или имеющему отторжение трансплантата или РТПХ, и затем введение трансплантата субъекту-человеку.

108. Способ по любому из пп.103-107, где ADC вводят пациенту-человеку в однократной дозе.

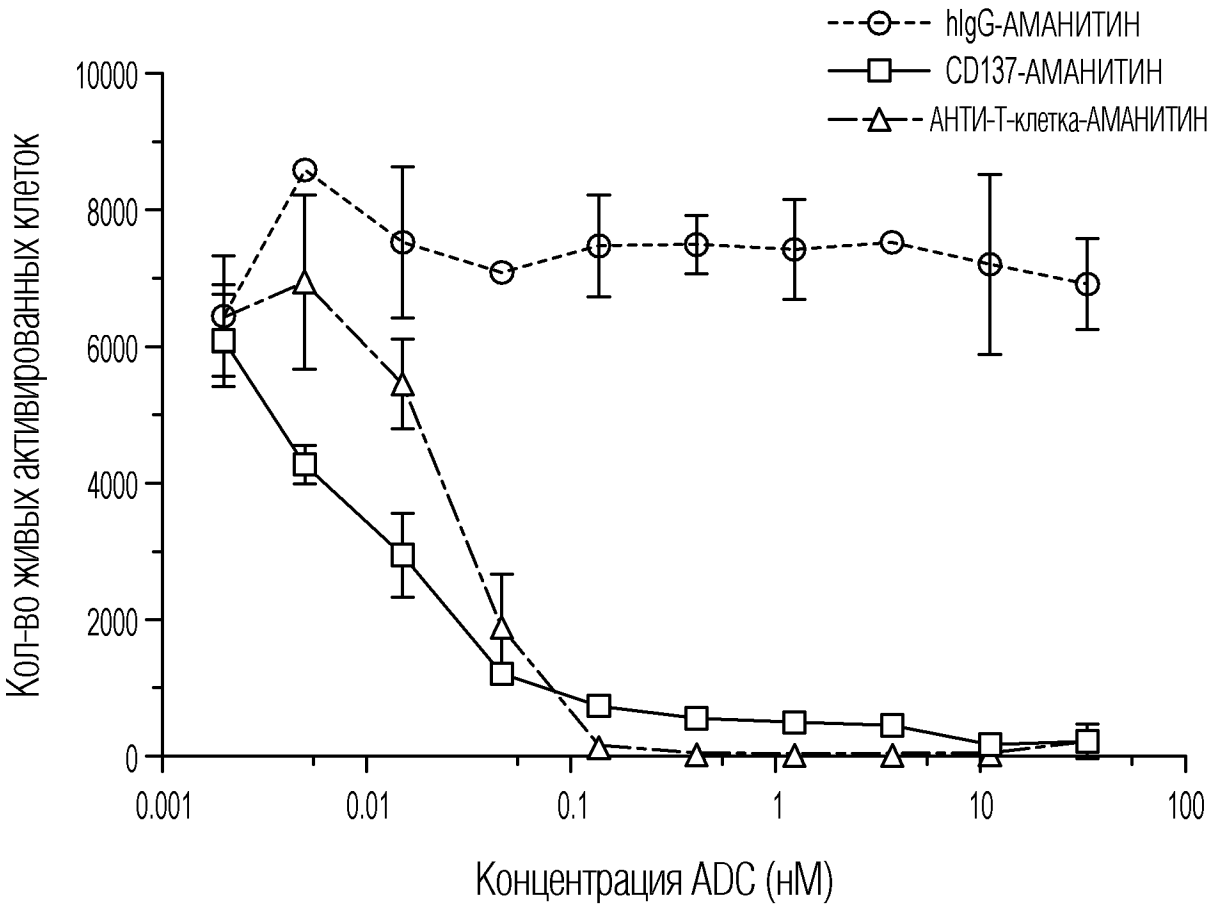
По доверенности


mIgG1
BBK2-mIgG1 EC50=35 пМ
gMFI
2500
2000
1500
1000
500
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
Log концентрации [М]

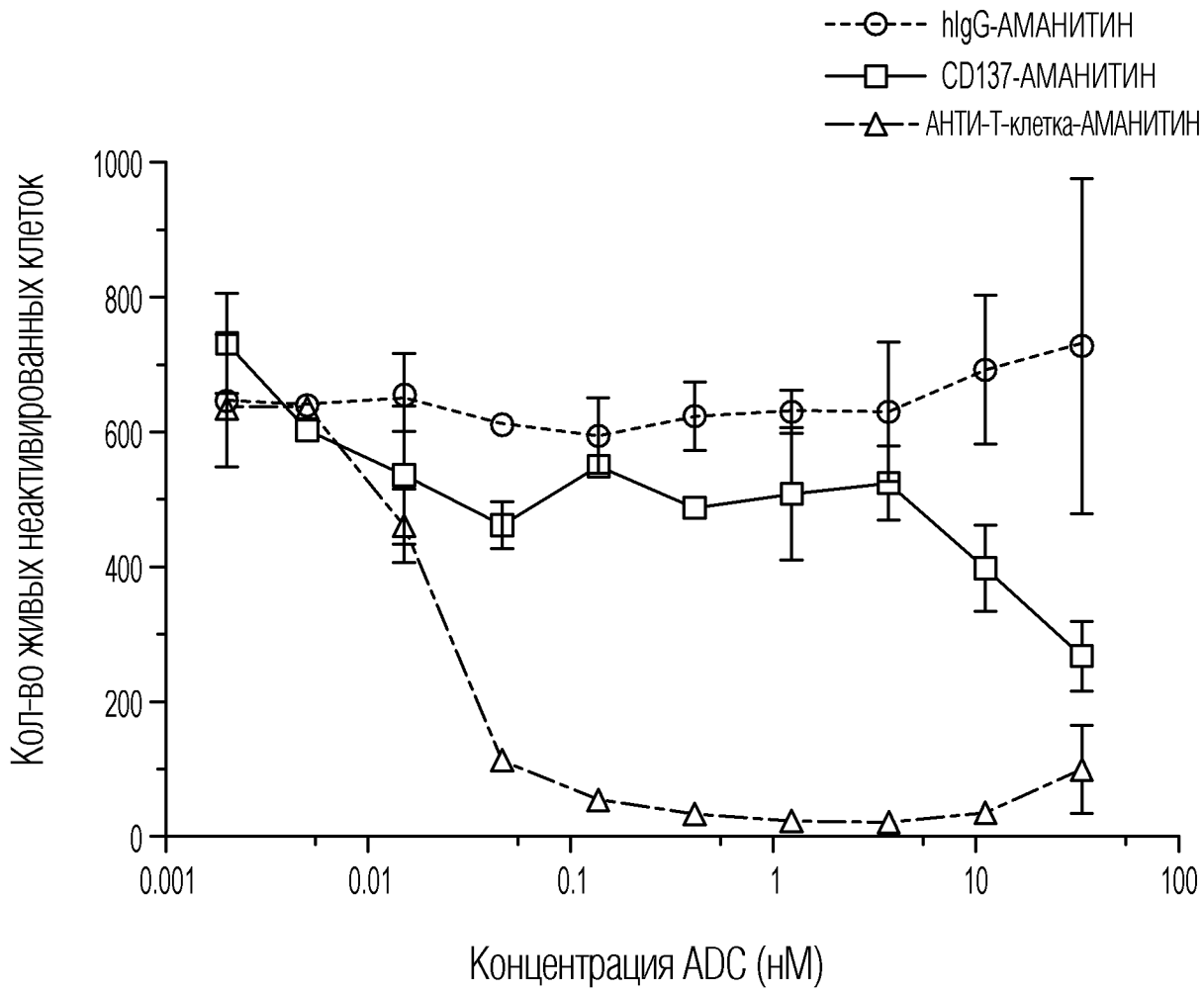
ФИГ. 1А



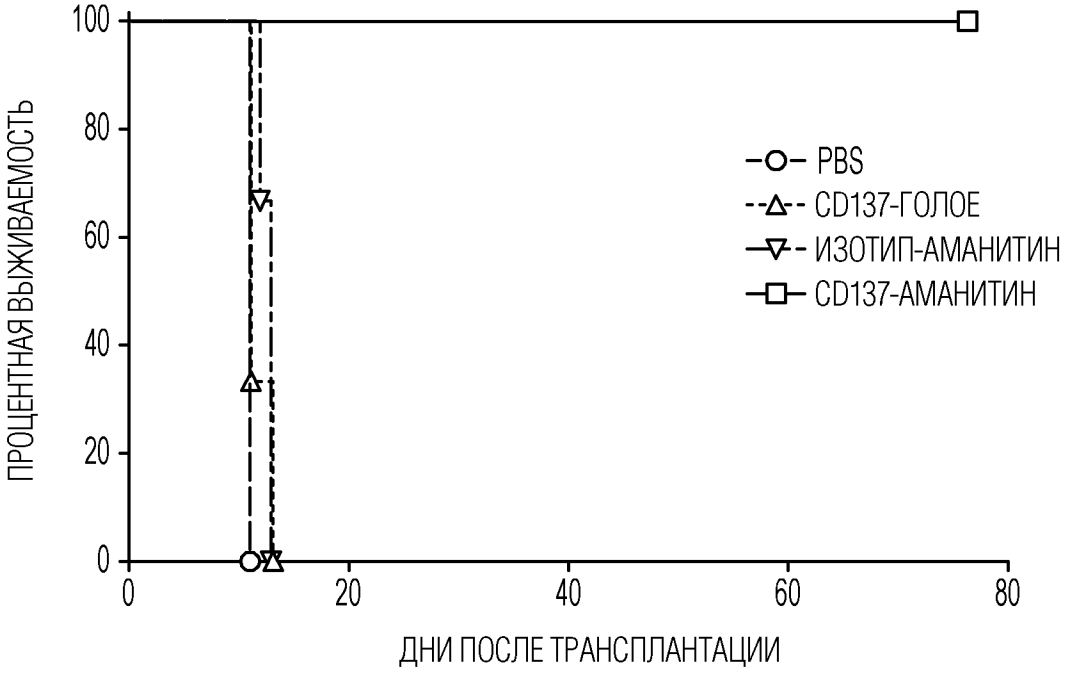
ФИГ. 1B


hIgG-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН
АНТИ-Т-клетка-АМАНИТИН
Кол-во живых активированных клеток
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация ADC (нМ)

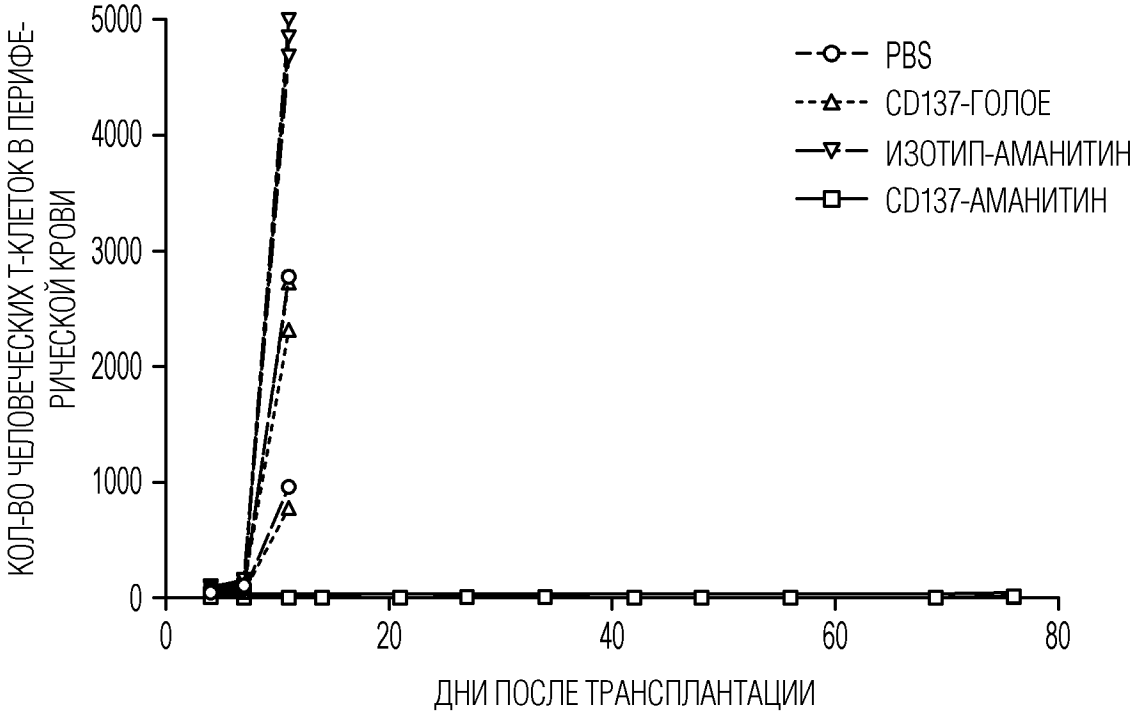
ФИГ. 2А


hIgG-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН
АНТИ-Т-клетка-АМАНИТИН
Кол-во живых неактивированных клеток
1000
800
600
400
200
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация ADC (нМ)

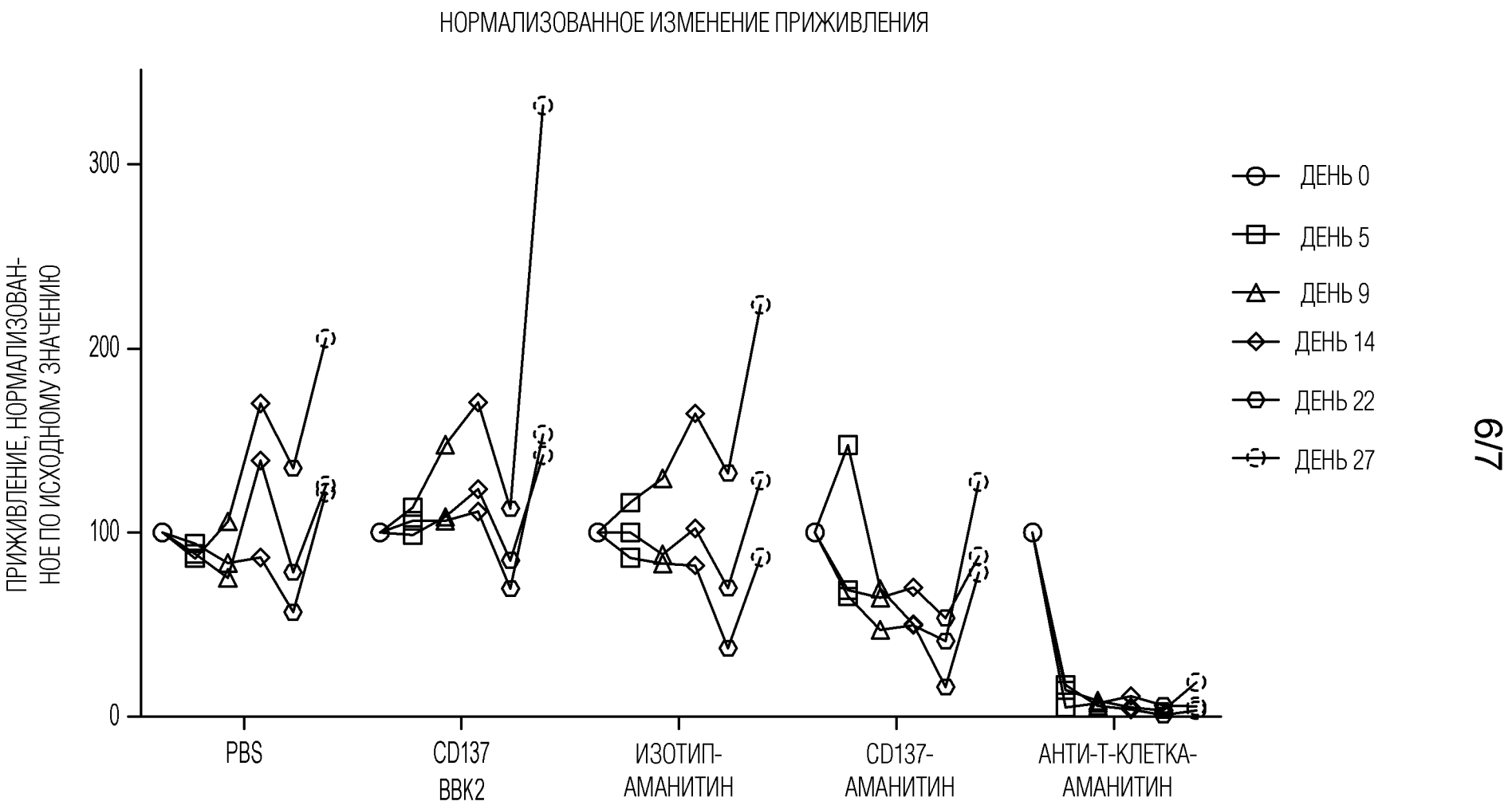
ФИГ. 2В


ПРОЦЕНТНАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
ДНИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
PBS
CD137-ГОЛОЕ
ИЗОТИП-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН

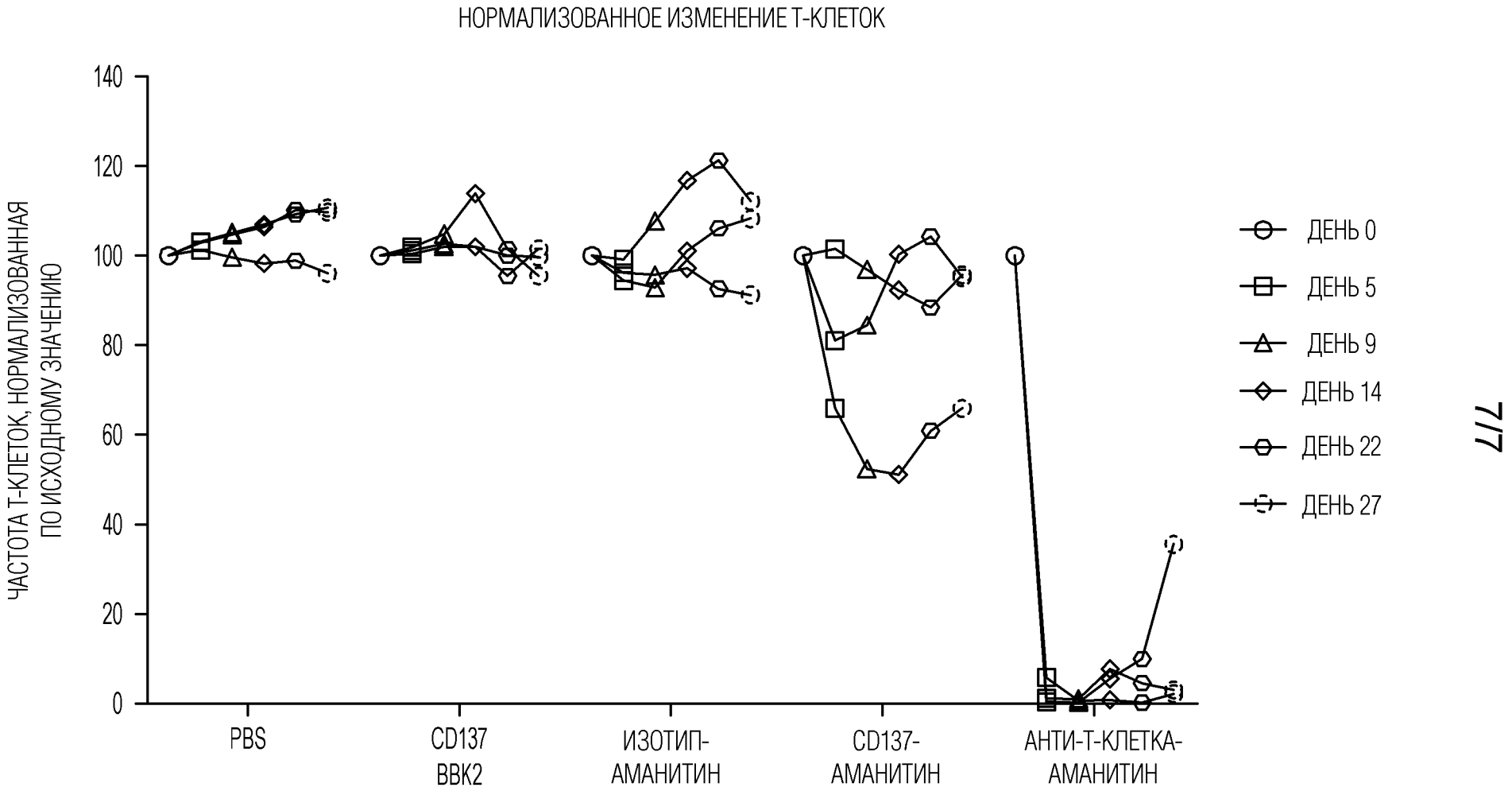
ФИГ. 3


КОЛ-ВО ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕ-РИЧЕСКОЙ КРОВИ
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
ДНИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
PBS
CD137-ГОЛОЕ
ИЗОТИП-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН

ФИГ. 4


НОРМАЛИЗОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЖИВЛЕНИЯ
ПРИЖИВЛЕНИЕ, НОРМАЛИЗОВАННОЕ ПО ИСХОДНОМУ ЗНАЧЕНИЮ
300
200
100
0
PBS
CD137 BBK2
ИЗОТИП-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН
АНТИ-Т-КЛЕТКА-АМАНИТИН
ДЕНЬ 0
ДЕНЬ 5
ДЕНЬ 9
ДЕНЬ 14
ДЕНЬ 22
ДЕНЬ 27

ФИГ. 5А


НОРМАЛИЗОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ Т-КЛЕТОК
ЧАСТОТА Т-КЛЕТОК, НОРМАЛИЗОВАННАЯ ПО ИСХОДНОМУ ЗНАЧЕНИЮ
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS
CD137 BBK2
ИЗОТИП-АМАНИТИН
CD137-АМАНИТИН
АНТИ-Т-КЛЕТКА-АМАНИТИН
ДЕНЬ 0
ДЕНЬ 5
ДЕНЬ 9
ДЕНЬ 14
ДЕНЬ 22
ДЕНЬ 27

ФИГ. 5B