

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090947** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.08.26**

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.11.29**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИСТОЩЕНИЯ CD5+ КЛЕТОК**

---

(31) **62/592,214**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.11.29**

**Бойтано Энтони, Кук Майкл,  
Палчаудхури Рахул, Макдонау Шон  
(US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/063175**

(87) **WO 2019/108863 2019.06.06**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**МАДЖЕНТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)**

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение представляет анти-CD5-антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты лекарственное средство-антитело для применения, например, для лечения нарушения стволовых клеток, рака или аутоиммунного заболевания, среди других гематологических и пролиферативных заболеваний. Описаны композиции и способы истощения популяций клеток CD5+, таких как раковые клетки CD5+ и иммунные клетки CD5+, и их можно использовать для лечения рака и аутоиммунных заболеваний непосредственно в качестве самостоятельной терапии путем уничтожения раковых клеток и аутореактивных иммунных клеток, которые экспрессируют CD5, и/или для подготовки пациента к трансплантации гематопозитических стволовых клеток, например, путем истощения популяций иммунных клеток CD5+, которые вступают в перекрестную реакцию с чужими гематопозитическими стволовыми клетками и вызывают иммунный ответ против них.

**A1**

**202090947**

**202090947**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-563012EA/011

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИСТОЩЕНИЯ CD5+ КЛЕТОК**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США No. 62/592214, поданной 29 ноября 2017 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Несмотря на достижения в области медицины, по-прежнему существует потребность в лечении патологий системы кроветворения, таких как заболевания определенной клетки крови, метаболические нарушения, рак и аутоиммунные состояния, среди других. Хотя гематопозитические стволовые клетки обладают значительным терапевтическим потенциалом, ограничением, препятствующим их использованию в клинике, была трудность, связанная с обеспечением приживления трансплантатов гематопозитических стволовых клеток у хозяина. Собственная иммунная система пациента часто атакует трансплантированные клетки и опосредует отторжение трансплантированных гематопозитических стволовых клеток. Для того чтобы избежать отторжения, пациента получает лечение разрушающими иммунную систему средствами перед трансплантацией гематопозитических стволовых клеток, например химиотерапевтическими средствами или облучением. К сожалению, попытки стимулировать переносимость гематопозитических стволовых клеток у пациента часто приводят к серьезным осложнениям. Таким образом, существует потребность в новых композициях и способах для улучшения трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

Сущность изобретения

В настоящее время существует потребность в композициях и способах лечения расстройств кроветворной системы, таких как аутоиммунные расстройства, а также в композициях и способах для стимулирования приживления экзогенных трансплантатов гематопозитических стволовых клеток, чтобы после трансплантации сохранялась мультипотентность и гематопозитическая функциональность этих клеток. В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет композиции и способы для непосредственного лечения различных нарушений кроветворной системы, метаболических нарушений, раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний, в числе прочих. Композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, нацелены на иммунные клетки для кондиционирования пациента-человека для трансплантации гематопозитических стволовых клеток для лечения заболевания, такого как, но не ограничиваясь этим, рак крови или аутоиммунное заболевание.

В другом аспекте изобретение дополнительно относится к композициям и способам для кондиционирования пациента, такого как пациент-человек, до получения лечения, включающего трансплантации гематопозитических стволовых клеток, с тем чтобы

способствовать приживлению трансплантатов гематопозитических стволовых клеток. Пациентом может быть пациент, страдающий аутоиммунным заболеванием или одним или несколькими заболеваниями крови, такими как рак, гемоглобинопатия или другая гематопозитическая патология, и, таким образом, нуждающийся в трансплантации гематопозитических стволовых клеток. Как описано в настоящем документе, гематопозитические стволовые клетки способны дифференцироваться во множество типов клеток в ростке кроветворения и могут вводиться пациенту для того, чтобы заселить или повторно заселить тип клеток, который является дефицитным у пациента. В определенных аспектах изобретение относится к антителам и конъюгатам антитело-лекарственное средство, способным связывать CD5, а также к способам их введения пациенту, для (i) непосредственно лечения заболевания крови, такого как аутоиммунное заболевание, путем селективного истощения популяция иммунных клеток, которые экспрессируют CD5, таких как аутореактивные Т-клетки, В-клетки или натуральные клетки киллеры (NK-клетки) и/или (ii) истощения популяции Т-клеток, В-клеток или NK-клеток перед введением трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту, тем самым снижая вероятность отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток. Исходная активность позволяет напрямую лечить широкий спектр аутоиммунных расстройств, так как CD5 может экспрессироваться Т-клеткой, В-клеткой или NK-клеткой, которые вступают в перекрестную реакцию с собственным антигеном и создают неадекватный иммунный ответ против него. Введение анти-CD5-антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство пациенту в этом случае может вызвать истощение популяции аутоиммунных клеток CD5+, таких как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими собственными антигенами, что приводит к лечению аутоиммунной патологии. Последняя активность способствует образованию среды, благоприятной для приживления гематопозитических стволовых клеток, в виде Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими чужеродными антигенами, экспрессируемыми гематопозитическими стволовыми клетками, такими как один или несколько чужеродные антигены МНС, экспрессируемые гематопозитическими стволовыми клетками, могут вызывать иммунный ответ против трансплантированных гематопозитических стволовых клеток и, таким образом, способствовать отторжению трансплантата. В этом последнем случае пациентам, страдающим от расстройства, такого как рак, аутоиммунное заболевание или другое состояние кроветворной системы, впоследствии можно вводить трансплантат гематопозитических стволовых клеток, чтобы, например, повторно заселить одну или несколько линий клеток крови, которые являются дефектными или истощенными у пациента. В одном аспекте изобретение, таким образом, предоставляет способы лечения различных гематопозитических состояний, таких как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, аденозиндезаминазная недостаточность-тяжелый комбинированный иммунодефицит, метахроматическая лейкодиетрофия, синдром Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-

Даймонда, инфекция вируса иммунодефицита человека и синдром приобретенного иммунного дефицита, а также раковые заболевания и аутоиммунные заболевания, среди других.

В одном аспекте изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD5+, например, у пациента-человека, такой как популяция CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток у человека-человека, путем введения пациенту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, таких как популяция CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток, пациенту-человеку, нуждающемуся в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, путем введения пациенту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5, например, до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки,.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу профилактики или снижения вероятности отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в лечении, включающем трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, путем введения, до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции эндогенных Т-клеток у пациента-человека, нуждающегося в лечении, включающем трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, путем введения, до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5.

В другом аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающему введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD5. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в количестве, достаточном для истощения популяции CD5+ клеток у пациента, такой как популяция CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток у человека-пациента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых

клеток, включающему: введение пациенту-человеку антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5, в количестве, достаточном для истощения популяции CD5+ клеток у пациента, такой как популяция CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток у пациента, и последующего введения пациенту трансплантата, включающего гематopoэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, продуцируемым линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

В некоторых вариантах осуществления любого из указанных выше аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие переменные домены:

V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDINSYLSWVQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWMGWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который включает вышеуказанные переменные домены.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления любого из указанных выше аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие переменные домены:

V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 9); и

V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
EIQLVQSGGGLVKPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWGMWI  
NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW  
YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который включает вышеуказанные переменные домены.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYSITSGYY (SEQ ID NO: 17);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность ISYSGFT (SEQ ID NO:

18);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность AGDRTGSWFAY (SEQ ID NO: 19);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDISNY (SEQ ID NO: 20);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность ATS (SEQ ID NO: 21); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность LQYASYPFT (SEQ ID NO: 22).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYIFTNYG (SEQ ID NO: 23);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность INTYNGEP (SEQ ID NO: 24);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность ARGDYGYEDY (SEQ ID NO: 25);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 26);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность YTS (SEQ ID NO: 27); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYSKLPWT (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, указанных в таблице 1, ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает комбинацию CDR, приведенных в таблице 1, ниже.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным переменным доменом, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD, и IgE.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксином.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин выбран из группы, состоящей из аматоксина, экзотоксина *A pseudomonas*, де-Буганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина и димера индолинбензодиазепина или их вариантов.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, например, популяции CD5<sup>+</sup> Т-клеток, CD5<sup>+</sup> В-клеток и/или CD5<sup>+</sup> НК-клеток у пациента-человека, путем введения пациенту эффективного количества антитела, его фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, способного связывать CD5.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, такой как популяция CD5<sup>+</sup> Т-клеток, CD5<sup>+</sup> В-клеток и/или CD5<sup>+</sup> НК-клеток, пациенту-человеку, нуждающемуся в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, путем введения до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, эффективного количества антитела, его фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, способного связывать CD5.

В другом аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающему введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело, его фрагмент

или конъюгат антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5 в количестве, достаточном для истощения популяции CD5+ клеток у пациента, такой как популяция CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток у человека-пациента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающему: введение пациенту-человеку антитела, его фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое связывается с CD5 в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента, например популяции CD5+ Т-клеток, CD5+ В-клеток и/или CD5+ NK-клеток у пациента, и последующего введения пациенту трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих четырех аспектов антитело или его фрагмент, которое связывается с CD5 (например, на поверхности CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетки или CD5+ NK-клетки), ковалентно связан с Fc-доменом, таким как димерный домен Fc, выделенный из человеческого антитела (например, выделенного из человеческого антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой мономерный Fc-домен, содержащий одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления N-конец антитела или его фрагмента связан с Fc-доменом. В некоторых вариантах осуществления C-конец антитела или его фрагмента связан с Fc-доменом. Домен Fc может быть конъюгирован с одной или несколькими копиями антитела или его фрагмента. Например, конъюгаты, которые можно использовать в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, включают димерные Fc-домены, в которых каждая полипептидная цепь Fc-домена конъюгирована с антителом или его фрагментом. Домен Fc, в свою очередь, может быть конъюгирован с цитотоксином, таким как цитотоксин, описанный в настоящем документе (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, экзотоксин A *pseudomonas*, де-Буганин, дифтерийный токсин, сапорин, майтансин, майтанзиноид, ауристин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазепаина, индолинбензодиазепин и димер индолинбензодиазепаина, или их вариант).

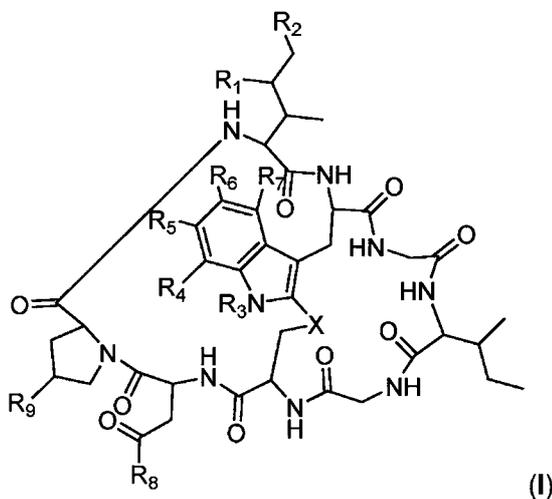
В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5 или его фрагмент ковалентно связаны с цитотоксином, таким как цитотоксин, описанный в настоящем документе (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, экзотоксин A *pseudomonas*, де-Буганин, дифтерийный токсин, сапорина, майтансин, майтанзиноид, ауристин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазепаина, индолинбензодиазепин и димер индолинбензодиазепаина, или их вариант). В некоторых вариантах осуществления N-конец антитела или его фрагмента связан с цитотоксином. В некоторых вариантах осуществления C-конец антитела или его фрагмента связан с цитотоксином. Цитотоксин, в свою очередь, может быть конъюгирован с Fc-доменом.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5 или его фрагмент ковалентно связано с цитотоксином на одном сайте антитела или его фрагмента (например,

с N- или C-конца антитела или его фрагмента) и ковалентно связано с Fc-доменом на другом сайт антитела или его фрагмента (например, противоположный конец антитела или его фрагмента).

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен изотипа IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен изотипа IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен изотипа IgG3 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен изотипа IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов цитотоксин представляет собой аматоксин или его производное, такой как  $\alpha$ -аманитин,  $\beta$ -аманитин,  $\gamma$ -аманитин,  $\varepsilon$ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота, и проамануллин. В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой аманитин. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, цитотоксин представляет собой аматоксин, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, имеющим формулу Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am представляет собой аматоксин. В некоторых вариантах осуществления аматоксин конъюгирован с линкером. В некоторых вариантах осуществления конъюгат аматоксин-линкер Am-L-Z представлен формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

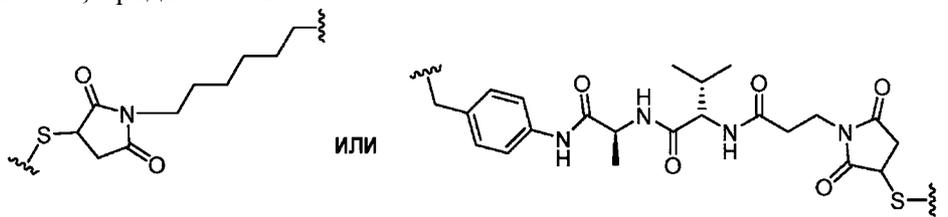
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, или необязательно замещенный гетероарилен; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетка или CD5+ NK-клетки.

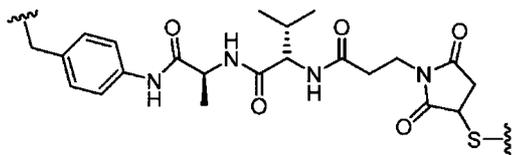
В некоторых вариантах осуществления Am включает точно один заместитель  $R_C$ .

В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой

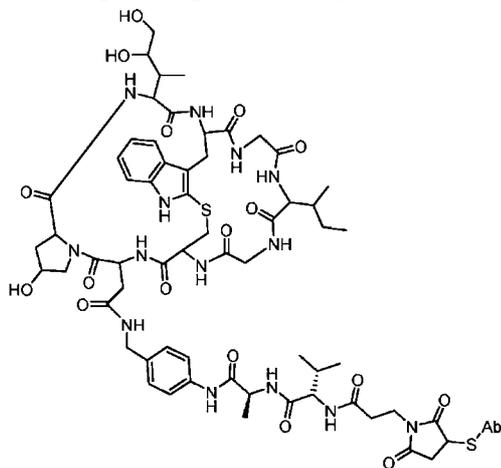


где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5 (например, из группы -SH остатка цистеина).

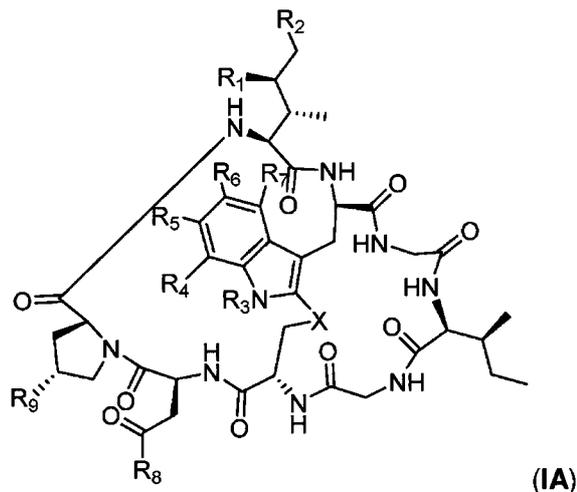
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен 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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

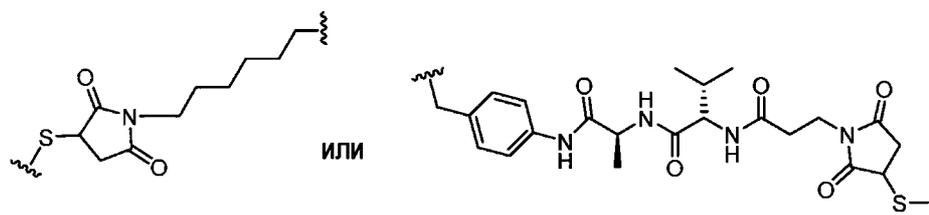
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен; , дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

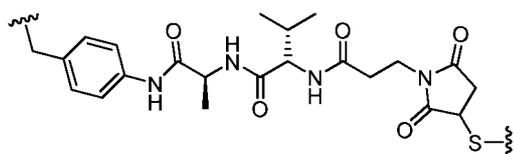
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетка или CD5+ NK-клетки; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

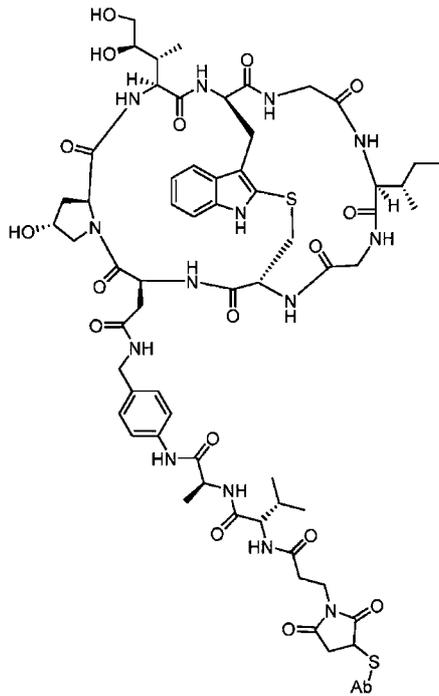
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



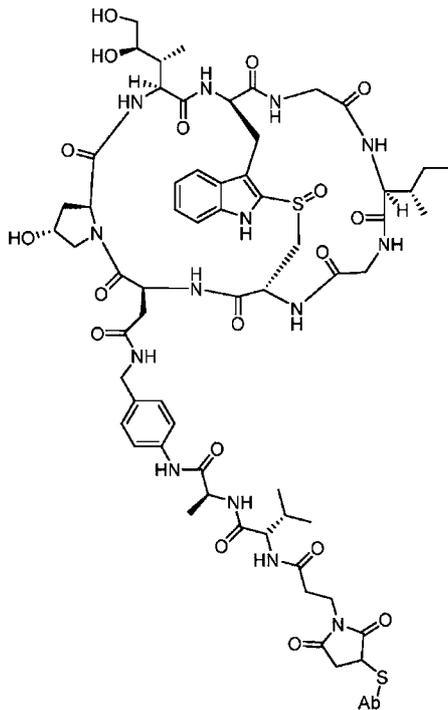
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



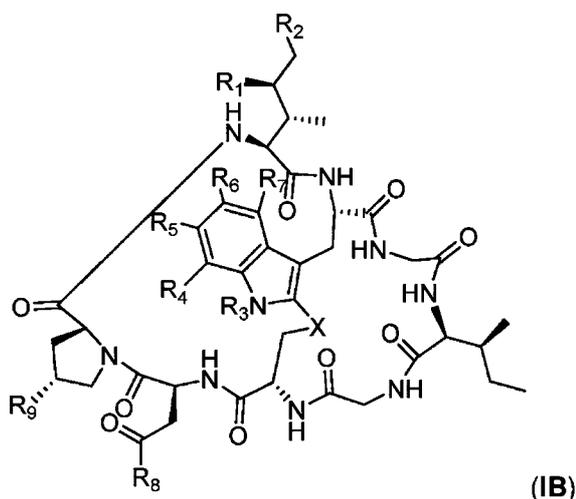
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

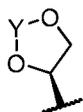
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен,

необязательно замещенный арилен, или необязательно замещенный гетероарилен;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетка или CD5+ NK-клетки; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

В некоторых вариантах осуществления R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:

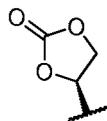


где Y представляет собой -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NR<sub>E</sub>)- или -C(R<sub>E</sub>R<sub>E</sub>')-; и R<sub>E</sub> и R<sub>E</sub>' представляют собой, каждый независимо, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный циклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный гетероциклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный арилен-R<sub>C</sub>, или необязательно замещенный гетероарилен-R<sub>C</sub>.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB), где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



R<sub>3</sub> представляет собой H или R<sub>C</sub>;

R<sub>4</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>5</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>6</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>7</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub> или NHR<sub>C</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; и

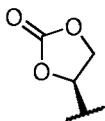
где R<sub>C</sub> и R<sub>D</sub>, каждый, такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am представлен формулой (IA) или формулой (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  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H, OH,  $OR_C$ ,  $R_C$  или  $OR_D$ ;

$R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

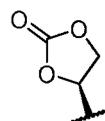
где X,  $R_C$  и  $R_C$ , каждый, такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

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

$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



$R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X и  $R_C$  такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

$R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, 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 X и  $R_C$  такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X или  $R_C$  такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

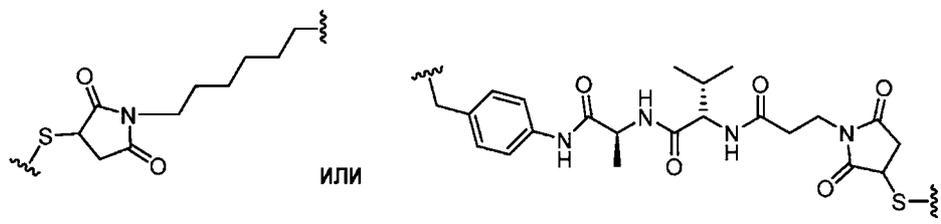
$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;

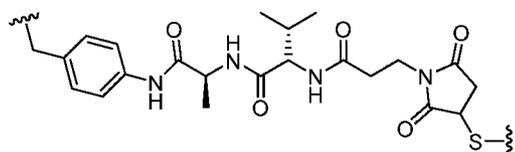
$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X и  $R_C$  такие, как определено выше.

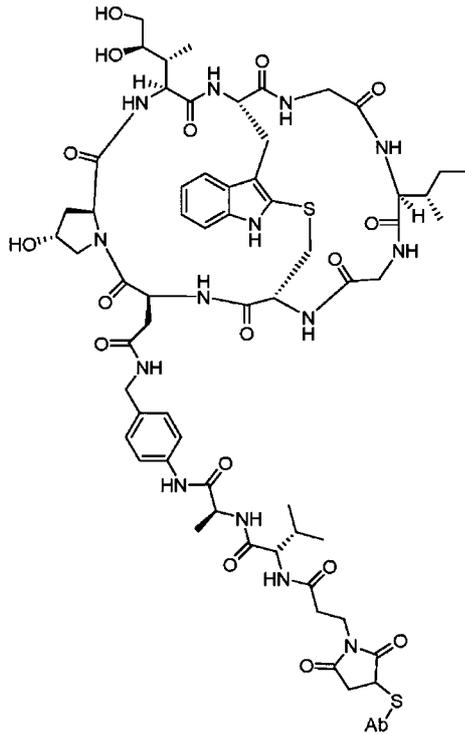
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



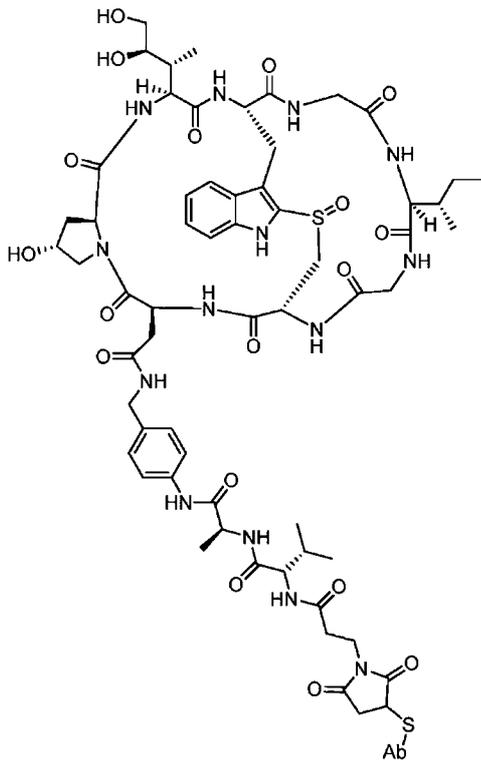
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



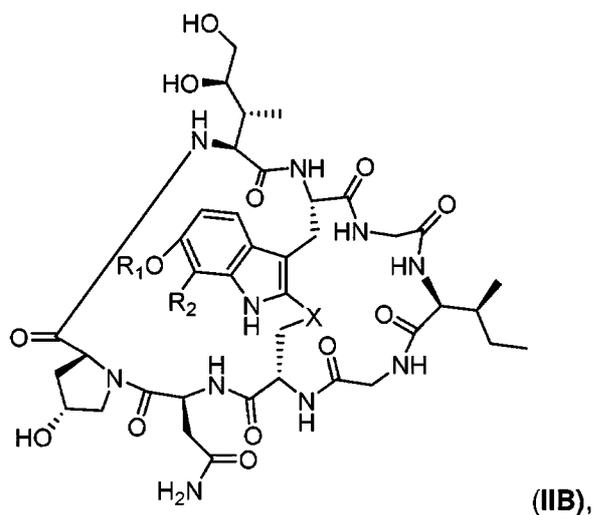
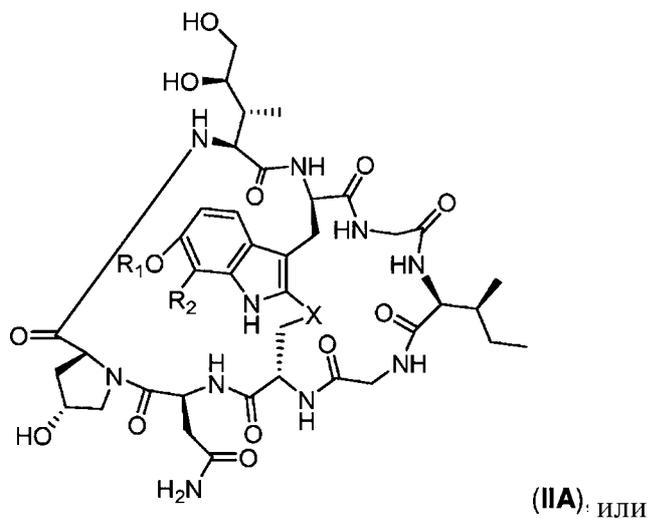
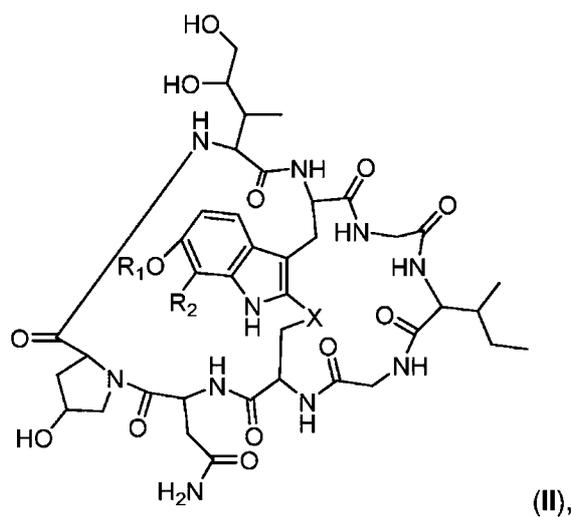
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (II), формулой (IIА) или формулой (IIВ)

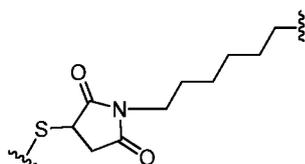


где X представляет собой S, SO или SO<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно

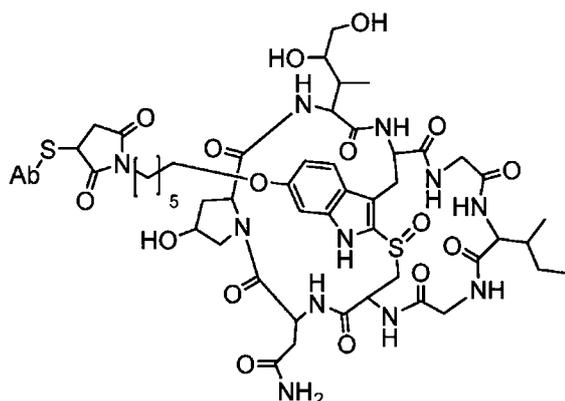
связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(CH_2)_n-$  звено, где n представляет собой целое число из 2-6.

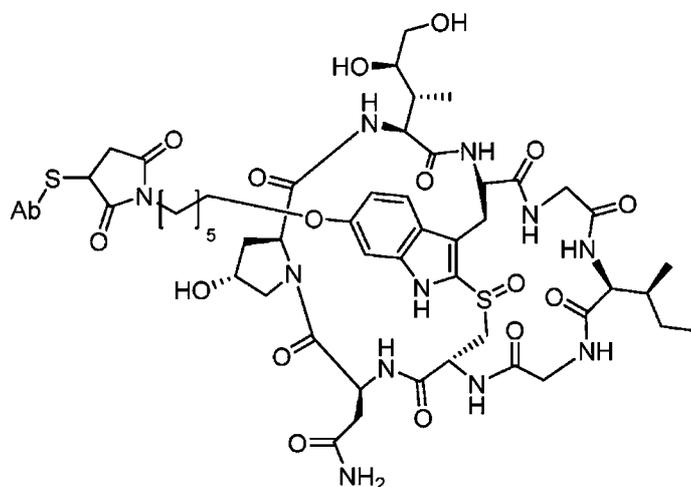
В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой линкер и R<sub>2</sub> представляет собой H, и линкер и химический фрагмент, вместе как L-Z, представляет собой



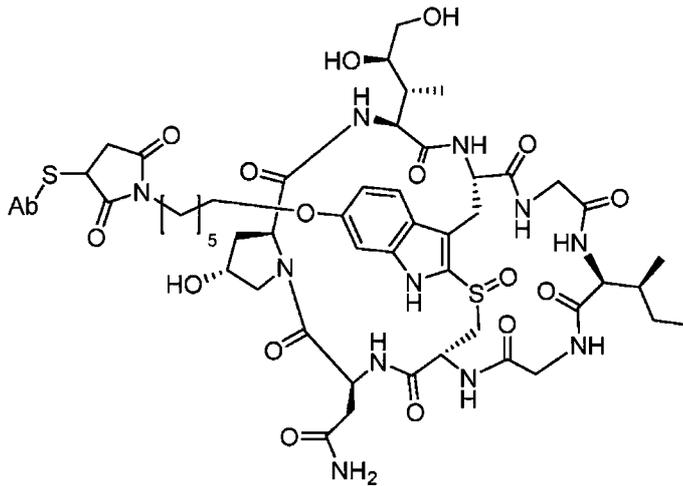
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой

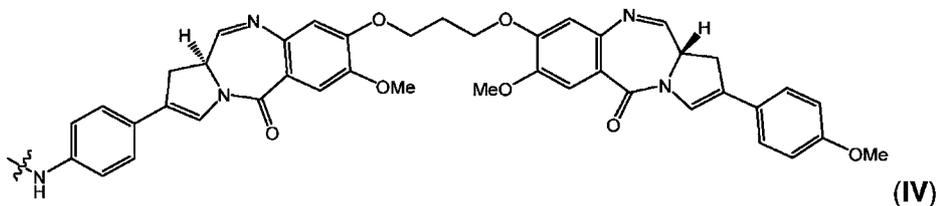


В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, цитотоксин представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристатина E и монометил ауристатина F. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер пирролбензодиазепина, представленный формулой (IV):



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера малеимидакапроила.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристатина E и монометил ауристатина F.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство интернализируется иммунной клеткой, такой как Т-клетка, В-клетка или НК-клетка (например, CD5+ Т-клетка, CD5+ В-клетка или CD5+ НК-клетка) после введения пациенту. Например, антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство могут быть интернализованы Т-клетками посредством опосредованного рецептором эндоцитоза (например, при связывании с CD5 клеточной

поверхностью). В некоторых вариантах осуществления цитотоксин, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, может высвободиться внутриклеточно путем химического расщепления (например, ферментативным или неспецифическим расщеплением линкера, описанного в настоящем документе). Затем цитотоксин может получить доступ к своей внутриклеточной мишени (такой как РНК-полимераза, ядерный митотический аппарат, ядерная ДНК, рибосомная РНК или топоизомеразы, среди прочих), чтобы способствовать гибели эндогенной иммунной клетки (например, CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетки или CD5+ NK-клетки) до трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство способны стимулировать некроз иммунной клетки, такой как Т-клетка, В-клетка или NK-клетка (например, CD5+ Т-клетка, CD5+ В-клетка или CD5+ NK-клетка). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут способствовать гибели эндогенной иммунной клетки (например, CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетки или CD5+ NK-клетки) перед трансплантационной терапией путем рекрутинга одного или нескольких белков комплемента, NK-клеток, макрофагов, нейтрофилов и/или эозинофилов в иммунную клетку при введении пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят аутологичный трансплантат, содержащий гематопозитические стволовые клетки. Например, аутологичные гематопозитические стволовые клетки могут быть удалены у пациента, такого как пациент, нуждающийся в терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, и впоследствии клетки могут быть введены (например, инфузирваны) пациенту для повторного заселения одного или нескольких типов клеток роста кроветворения. Извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть заново повторно реинфузированы субъекту, например, после поддержания *ex vivo* в течение одного или нескольких часов, дней или недель. Например, извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть повторно инфузирваны пациенту от 1 часа до приблизительно 1 недели, от 1 часа до приблизительно 72 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 48 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов после извлечения у пациента. В некоторых вариантах осуществления извлеченные гематопозитические стволовые клетки замораживают для длительного хранения перед повторной инфузией пациенту. Например, извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть заморожены и подвергнуты криоконсервации в течение от 1 недели до 1 года или дольше до повторной инфузии пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят аллогенный трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки. Например, аллогенные гематопозитические стволовые клетки могут быть удалены у донора, такого как донор, который соответствует HLA по отношению к пациенту, например, близкородственный член семьи пациента. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гематопозитические

стволовые клетки не соответствуют HLA по отношению к пациенту. После изъятия аллогенных гематопозитических стволовых клеток от донора клетки могут впоследствии вводиться (например, инфузировавшись) пациенту для повторного заселения одного или нескольких типов клеток роста кроветворения. Извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть заново инфузировааны субъекту, например, после поддержания *ex vivo* в течение одного или нескольких часов, дней или недель. Например, извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть инфузировааны пациенту от 1 часа до приблизительно 1 недели, от 1 часа до приблизительно 72 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 48 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов после извлечения у донора. В некоторых вариантах осуществления извлеченные гематопозитические стволовые клетки замораживают для длительного хранения перед инфузией пациенту. Например, извлеченные гематопозитические стволовые клетки могут быть заморожены и подвергнуты криоконсервации в течение от 1 недели до 1 года или дольше до инфузии пациенту.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация анти-CD5-антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство по существу очищена от крови пациента.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту от 1 часа до 7 дней (например, от 6 часов до 3 дней, от 12 часов до 36 часов или приблизительно 24 часов) после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации анти-CD5-антитела, антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления гематопозитические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток через два 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 дня, 3 дня, 4 дня, 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 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или более) после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток CD5<sup>+</sup> включает клетки CD34<sup>+</sup>. Например, доля клеток CD34<sup>+</sup> в популяции клеток CD5<sup>+</sup> может составлять около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, или 100% от общего количества клеток в популяции.

В некоторых вариантах осуществления гематопозитические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гематопозитической ткани, такой как костный мозг, и/или восстанавливать гемопоэз после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления после трансплантации пациенту гематопозитические стволовые клетки дают начало восстановлению популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, натуральных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления пациент страдает раком. Рак может представлять собой рак крови или тип лейкоза, такой как острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз или хронический лимфоидный лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления CD5<sup>+</sup> клетки включают раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство истощают раковые клетки у пациента. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут истощать 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или практически все раковые клетки у пациента.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство истощают раковые клетки крови (например, лейкозные клетки) у пациента. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки крови представляют собой клетки острого миелоидного лейкоза, клетки острого лимфоидного лейкоза, клетки хронического миелоидного лейкоза или клетки хронического лимфоидного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки крови представляют собой мегакарициты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток CD5<sup>+</sup> включает иммунные клетки, такие как CD5<sup>+</sup> Т-клетки, CD5<sup>+</sup> В-клетки и/или CD5<sup>+</sup> NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, способ используется для лечения одного или нескольких расстройств, таких как истощение популяции иммунных клеток у пациента, например, до терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, чтобы предотвратить или уменьшить вероятность отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с трансплантатом гематопозитических стволовых клеток, таких как чужеродные антигены МНС, экспрессируемые трансплантатом гематопозитических стволовых клеток. После трансплантации гематопозитические стволовые клетки могут создавать продуктивный гематопоз, чтобы восполнить

дефицитный тип клеток у пациента или тип клеток, которые активно погибают или были убиты, например, химиотерапевтическими методами. Например, пациент может страдать нарушением стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает гемоглобинопатией, такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия, и синдром Вискотта-Олдрича. Пациент может страдать иммунодефицитным состоянием, таким как врожденное иммунодефицитное состояние или приобретенное иммунодефицитное состояние (например, вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита). В некоторых вариантах осуществления пациент страдает метаболическим нарушением, таким как болезнь накопления гликогена, мукополисахаридоз, болезнь Гоше, болезнь Гурлера, сфинголипидоз, и метахроматическая лейкодистрофия. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает расстройством, выбранным из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака-Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, и ювенильного ревматоидного артрита. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает аутоиммунным заболеванием, таким как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона и диабет 1 типа. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает раком или миелопролиферативный синдром, таким как гематологическая злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает острым миелолейкозом, острым лимфоидным лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, хроническим лимфоидным лейкозом, множественной миеломой, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, или Неходжкинской лимфомой. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает миелодиспластическим заболеванием, таким как миелодиспластический синдром.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, способ применяют для непосредственного лечения рака, такого как рак, характеризующийся клетками CD5<sup>+</sup> (например, лейкоз, характеризующийся клетками CD5<sup>+</sup>), путем введения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которое истощает популяцию CD5<sup>+</sup> раковых клеток у пациента и/или путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, чтобы предотвратить или уменьшить вероятность отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с трансплантатом гематопозитических стволовых клеток, таких как чужеродные антигены МНС, экспрессируемые трансплантатом гематопозитических стволовых клеток. В последнем случае трансплантация может, в свою очередь, воссоздать, например, популяцию клеток, истощенных в процессе уничтожения раковых клеток. Рак может быть гематологической злокачественной опухолью, такой как

острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома или неходжкинская лимфома.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, способ применяют для лечения аутоиммунного заболевания, например, путем введения антитела против CD5, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, таким образом, чтобы истощить популяцию аутоиммунных клеток CD5+ (например, популяцию аутореактивных CD5+ Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток) и/или путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, чтобы предотвратить или уменьшить вероятность отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с трансплантатом гематопозитических стволовых клеток, таких как чужеродные антигены МНС, экспрессируемые трансплантатом гематопозитических стволовых клеток. В последнем случае трансплантация может, в свою очередь, воссоздать, например, популяцию клеток, истощенных в процессе уничтожения аутоиммунных клеток. Аутоиммунным заболеванием может быть, например, склеродермия, рассеянный склероз (MS), системная волчанка человека (SLE), ревматоидный артрит (RA), воспалительное заболевание кишечника (IBD), леченный псориаз, сахарный диабет 1 типа (диабет 1 типа), острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальная алопеция, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром (APS), апластическая анемия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатия, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, целиакия-герпетиформный дерматит, синдром холодной агглютинации, CREST-синдром, Дегоса синдром, дискоидная волчанка, вегето-сосудистая дистония, эндометриоз, первичная криоглобулинемия смешанного типа, фибромиалгия-фибромиозит, синдром Гудпасчера, заболевание Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическая и/или острая иммунная тромбоцитопеническая пурпура, идиопатический легочный фиброз, IgA нейропатия, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, синдром Кавасаки, красный плоский лишай, Лаймская болезнь, болезнь Меньера, смешанное поражение соединительной ткани (MCTD), миастения гравис, нейромиотония, опсо-миоклональный синдром (OMS), неврит зрительного нерва, атрофическая форма аутоиммунного тиреоидита, вульгарный пемфигус, пернициозная анемия, полихондрия, полимиозит и дерматомиозит, первичный биллиарный цирроз, узелковый полиартериит, олигандулярный синдром, ревматическая полимиалгия, первичная агаммаглобулинемия, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматический

полиартрит, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром скованного человека, синдром Такаюсу, темпоральный артериит (также известный как "гигантский клеточный артериит"), язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводиния ("вульварный вестибулит"), и гранулематоз Вегенера.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии, такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия, и синдром Вискотта-Олдрича. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения иммунодефицитного состояния, такого как врожденное иммунодефицитное состояние или приобретенное иммунодефицитное состояние (например, вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения метаболического нарушения, такого как болезнь накопления гликогена, мукополисахаридоз, болезнь Гоше, болезнь Гурлера, сфинголипидоз и метакроматическая лейкоцисторфия. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака - Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, и ювенильного ревматоидного артрита. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, такого как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона, и диабет 1 типа. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения рака или миелопролиферативного синдрома, такого как гематологическая злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения острого миелолейкоза, острого лимфоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоидного лейкоза, множественной миеломы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, или Неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает миелодиспластическим заболеванием, таким как миелодиспластический синдром. В этих вариантах осуществления способ может включать введение пациенту антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата, который связывается с CD5, такого как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или его конъюгат любого из аспектов или вариантов осуществления изобретения. Способ может дополнительно включать введение пациенту трансплантата гематопозитических стволовых клеток, например, согласно способу любого из аспектов или вариантов осуществления изобретения.

Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, изобретение предоставляет способ лечения рака непосредственно, такого как рак, характеризующийся клетками CD5+ (например, лейкоз, характеризующийся клетками CD5+). В этих вариантах осуществления способ может

включать введение пациенту антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата, связывающегося с CD5, такого как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или его конъюгата любого из аспектов или вариантов осуществления изобретения. Рак может быть гематологической злокачественной опухолью, такой как острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, или Неходжкинская лимфома.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, изобретение предоставляет способ лечения аутоиммунного заболевания, такого как MS, SLE, RA, IBD, псориаз, диабет 1 типа, ADEM, болезнь Аддисона, универсальная алопеция, анкилозирующий спондилит, APS, апластическая анемия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, AIED, ALPS, аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатия, болезнь Шагаса, CFIDS, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, целиакия-герпетиформный дерматит, синдром холодовой агглютинации, CREST-синдром, Дегоса синдром, дискоидная волчанка, вегето-сосудистая дистония, эндометриоз, первичная криоглобулинемия смешанного типа, фибромиалгия-фибромиозит, синдром Гудпасчера, заболевание Грейвса, GBS, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическая и/или острая иммунная тромбоцитопеническая пурпура, идиопатический легочный фиброз, IgA нейропатия, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, синдром Кавасаки, красный плоский лишай, Лаймская болезнь, болезнь Меньера, MCTD, миастения гравис, нейромиотония, OMS, неврит зрительного нерва, атрофическая форма аутоиммунного тиреоидита, вульгарный пемфикус, пернициозная анемия, полихондрия, полимиозит и дерматомиозит, первичный биллиарный цирроз, узелковый полиартериит, олигландулярный синдром, ревматическая полимиалгия, первичная агаммаглобулинемия, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматический полиартрит, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром скованного человека, синдром Такаясу, темпоральный артериит (также известный как "гигантский клеточный артериит"), язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводиния ("вульварный вестибулит"), и гранулематоз Вегенера. В этих вариантах осуществления, способ может включать введение пациенту антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата, который связывается с CD5, такого как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или его конъюгат любого из аспектов или вариантов осуществления изобретения.

В другом аспекте изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, способному связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с токсином.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом,

продуцируемым линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCRASQDINSYLSWVQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWMGWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который включает вышеуказанные вариабельные домены.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWVQKPKGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 9); и

V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность  
EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW

YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который включает вышеуказанные переменные домены.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYSITSGYY (SEQ ID NO: 17);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность ISYSGFT (SEQ ID NO: 18);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность AGDRTGSWFAY (SEQ ID NO: 19);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDISNY (SEQ ID NO: 20);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность ATS (SEQ ID NO: 21); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность LQYASYPFT (SEQ ID NO: 22).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYIFTNYG (SEQ ID NO:

23);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность INTYNGEP (SEQ ID NO:

24);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность ARGDYGYEDY (SEQ ID NO: 25);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 26);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность YTS (SEQ ID NO: 27); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYSKLPWT (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает вышеуказанные CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, указанных в таблице 1, ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое включает комбинацию CDR, приведенных в таблице 1, ниже.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD5 или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 258. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD5 с антителом или

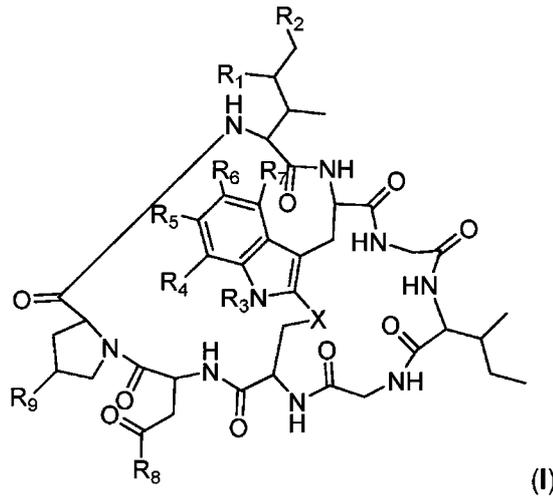
его антигенсвязывающим фрагментом, который включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 258.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным переменным доменом, scFv, диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

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

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлен формулой Ab-Cy, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а Cy представляет собой цитотоксин. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин выбран из группы, состоящей из аматоксина, экзотоксина *A pseudomonas*, де-Буганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансин, майтанзиноид, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или их варианта.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аматоксин или его производное, такое как α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аматоксин, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, имеющим формулу Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Z представляет собой химический фрагмент, Li представляет собой линкер, и Am представляет собой аматоксин. В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

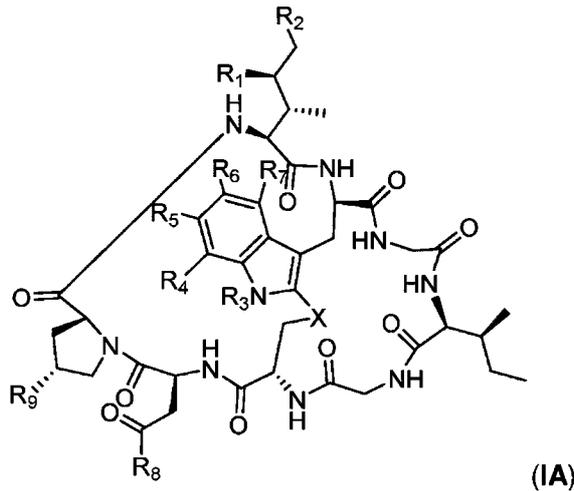
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен; дипептид, -

C(=O)-, пептид или их комбинация; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ T-клетки, CD5+ B-клетки или CD5+ NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA)



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>5</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>6</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>7</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

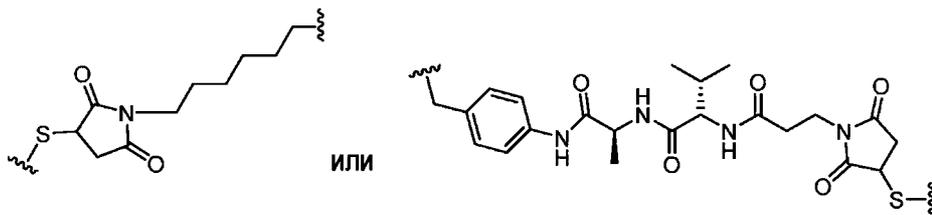
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

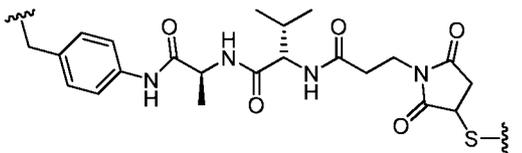
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ Т-клетки, CD5+ В-клетки или CD5+ NK-клетки; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

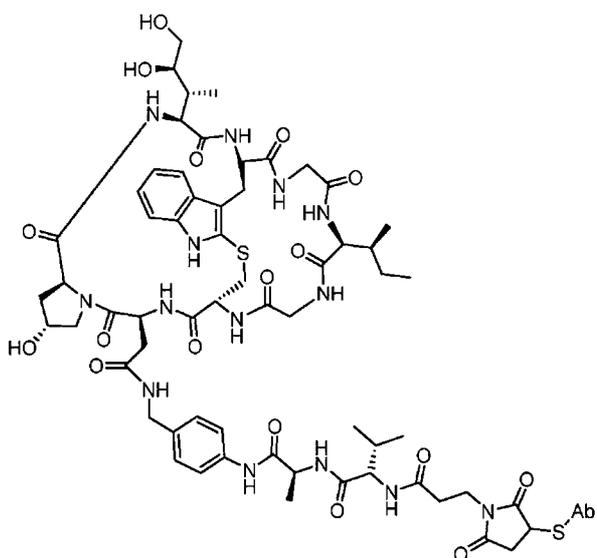
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



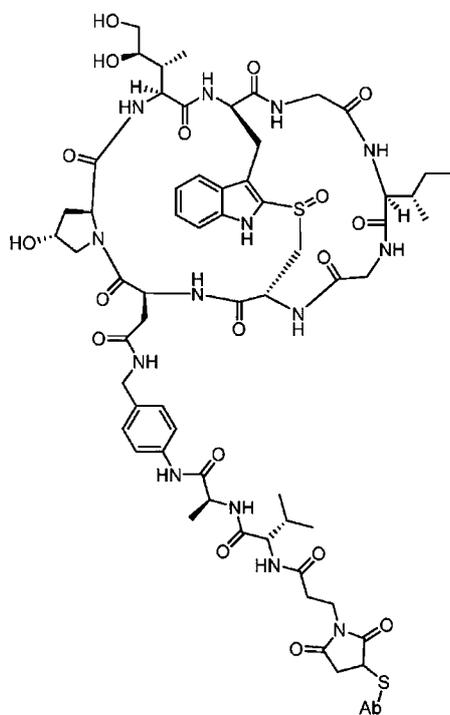
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



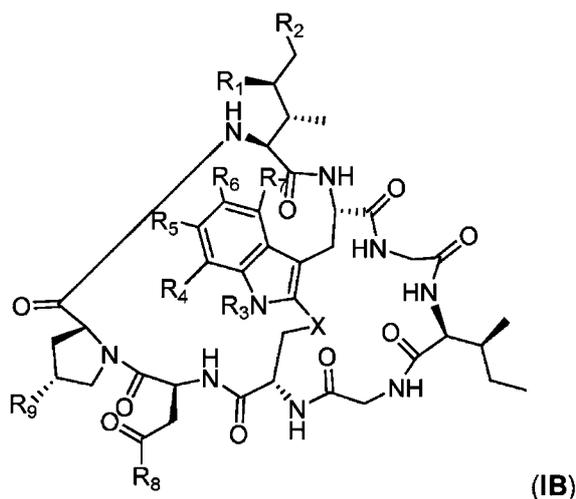
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил,

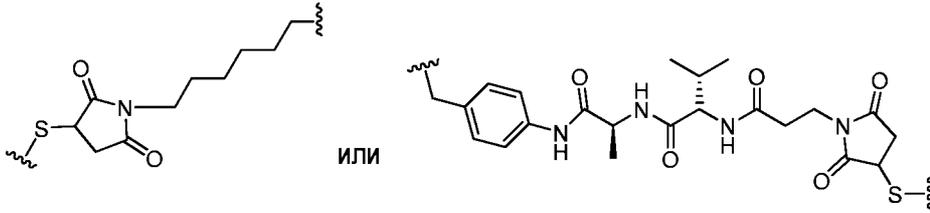
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -

C(=O)-, пептид или их комбинация;

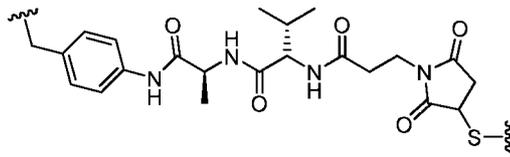
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5, например, на поверхности CD5+ T-клетки, CD5+ B-клетки или CD5+ NK-клетки; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

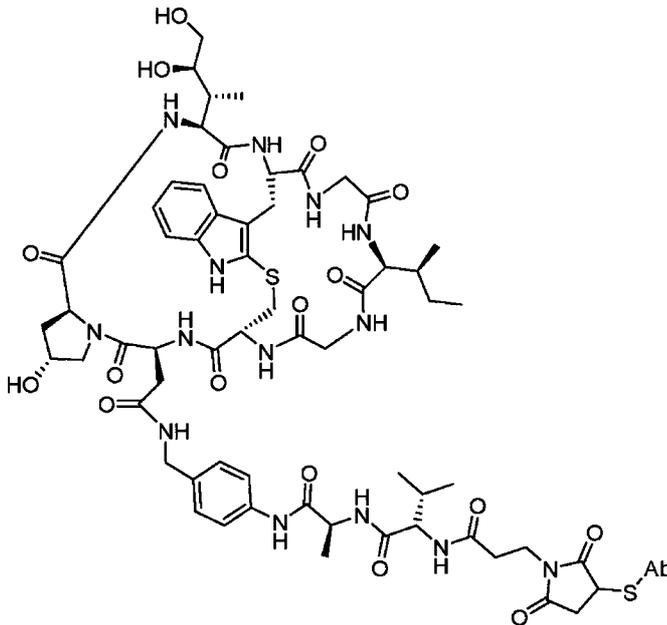
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



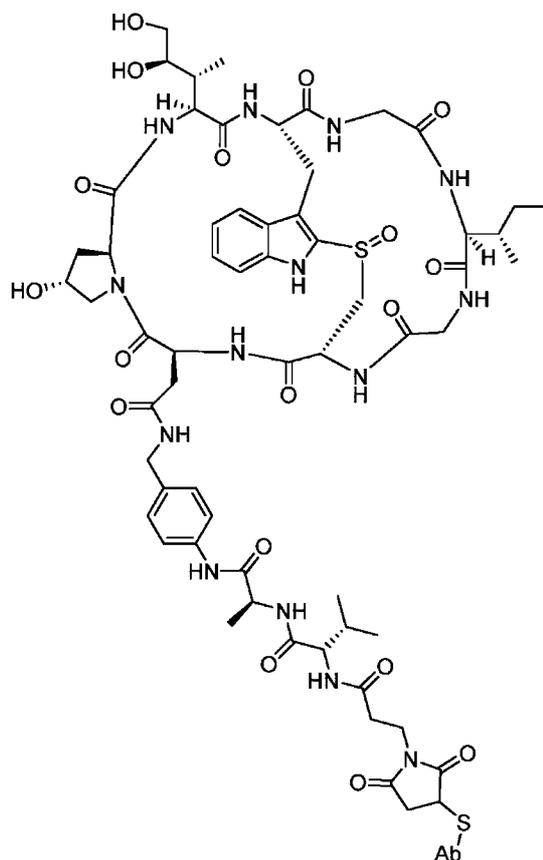
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



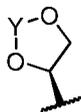
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



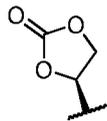
где  $Y$  представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; и

$R_E$  и  $R_{E'}$  представляют собой, каждый независимо, 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 гетероарил- $R_C$ .

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (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  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



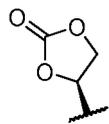
- $R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;  
 $R_4$  представляет собой H, OH,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;  
 $R_5$  представляет собой H, OH,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;  
 $R_6$  представляет собой H, OH,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;  
 $R_7$  представляет собой 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 X,  $R_C$  и  $R_D$ , каждый, такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (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  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



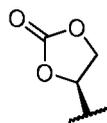
- $R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;  
 $R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H, OH,  $OR_C$ ,  $R_C$  или  $OR_D$ ;  
 $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;  
 $R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;  
 $R_9$  представляет собой H или OH; и  
 где  $R_C$  такой, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am представлен формулой (IA) или формулой (IB),

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

$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



- $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;  
 $R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;  
 $R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; и  
где X и R<sub>C</sub> такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой **(IA)** или формулой **(IB)**,

где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub> представляет собой R<sub>C</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>5</sub> представляет собой H, OH, или ОС<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; и

где X и R<sub>C</sub> такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой **(IA)** или формулой **(IB)**,

где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub> или R<sub>C</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; и

где X и R<sub>C</sub> такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой **(IA)** или формулой **(IB)**,

где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

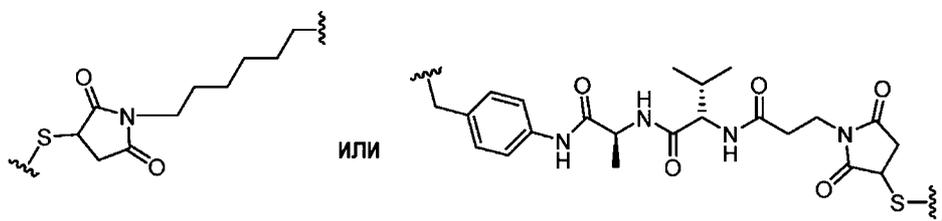
R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub> или NHR<sub>C</sub>;

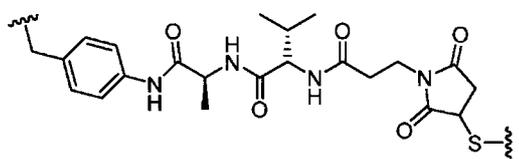
R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; и

где A и R<sub>C</sub> такие, как определено выше.

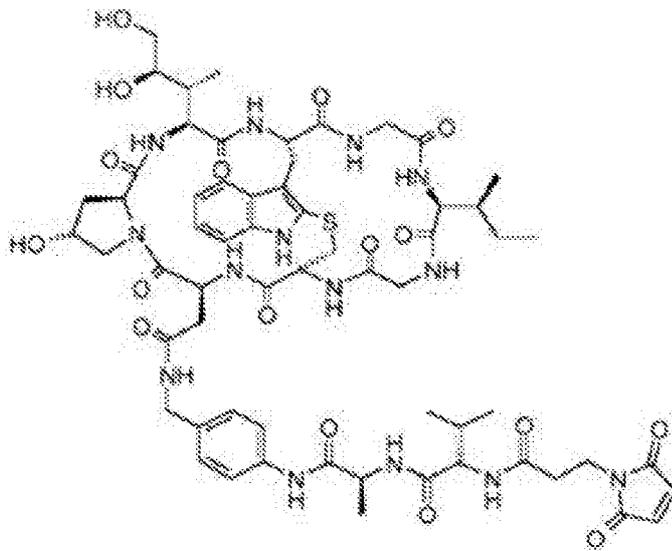
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой

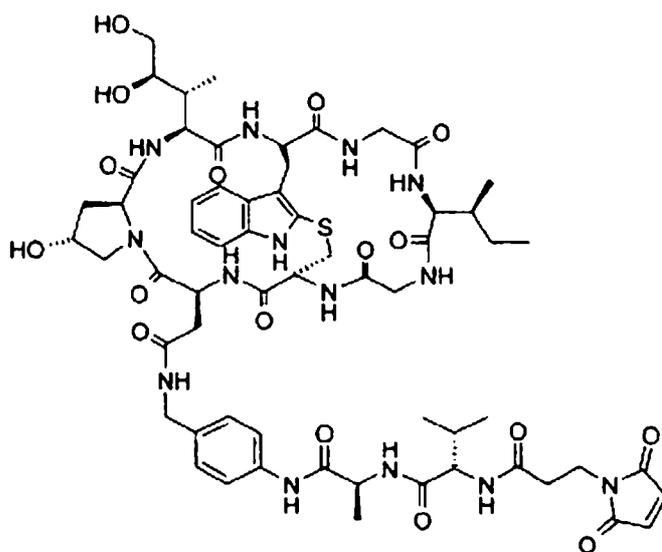


В некоторых вариантах осуществления предшественник Am-L-Z представляет собой



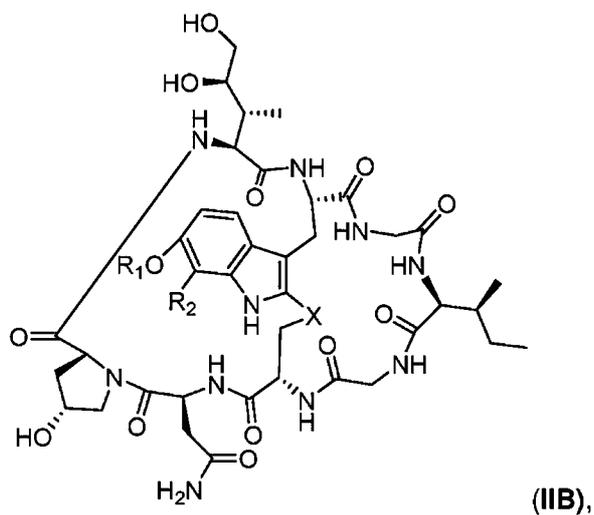
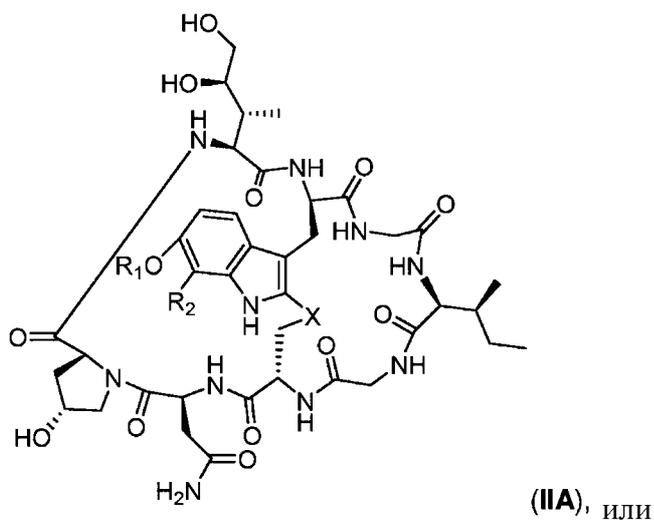
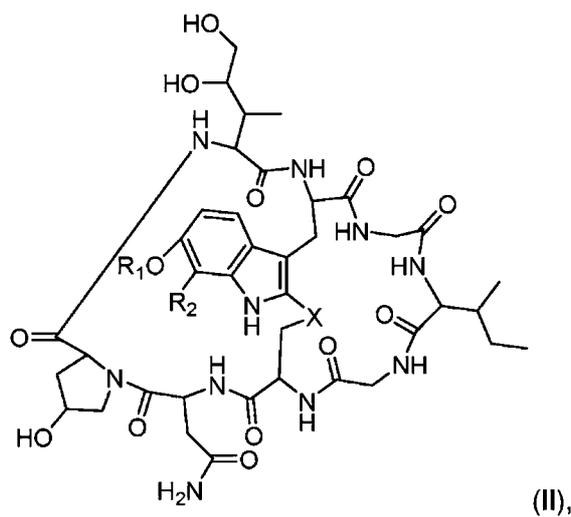
где малеимид взаимодействует с тиольной группой, находящейся на цистеине в антителе.

В некоторых вариантах осуществления предшественник Am-L-Z представляет собой



где малеимид взаимодействует с тиольной группой, находящейся на цистеине в антителе.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (II), формулой (IIA), или формулой (IIB)

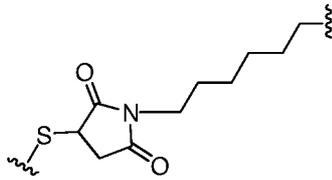


где X представляет собой S, SO, или SO<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно

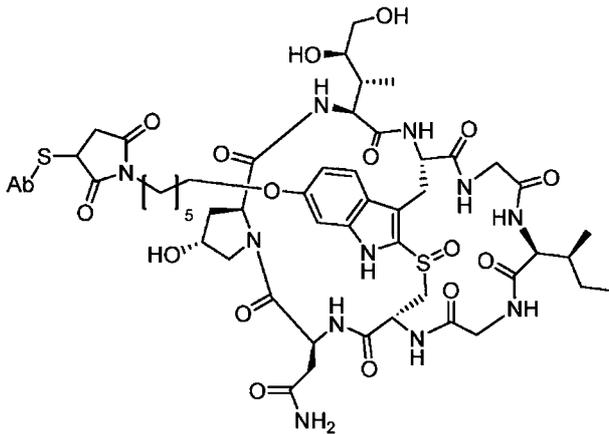
связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(CH)_n-$  звено, где n представляет собой целое число из 2-6.

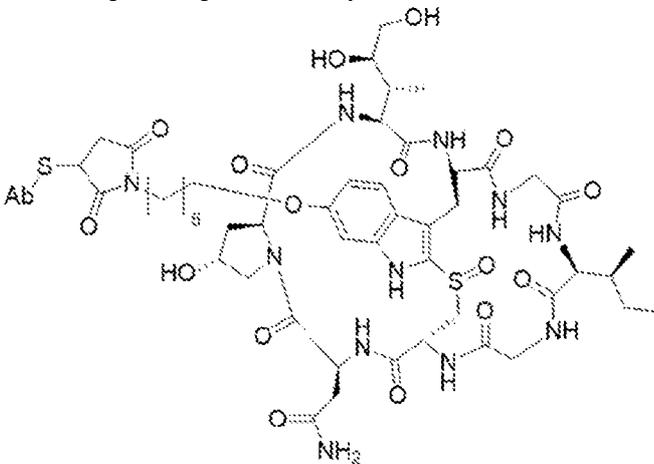
В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой линкер и R<sub>2</sub> представляет собой H, и линкер и химический фрагмент, вместе как L-Z, представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Ab-Z-L-Am представляет собой

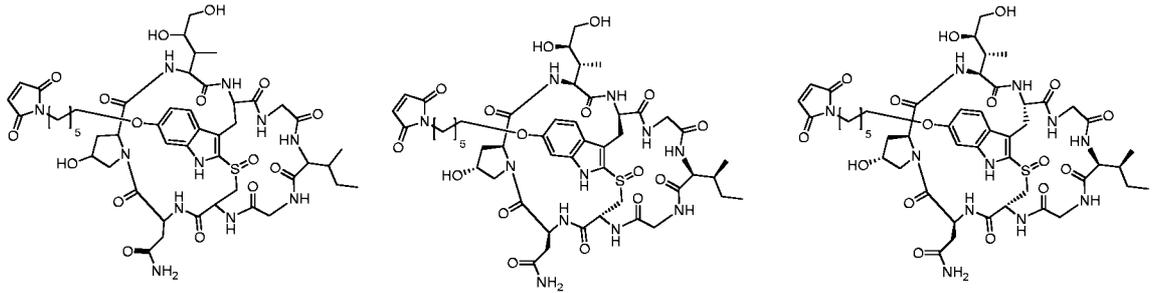


В некоторых вариантах осуществления Ab-Z-L-Am представляет собой



В некоторых вариантах осуществления предшественник Am-L-Z представляет собой

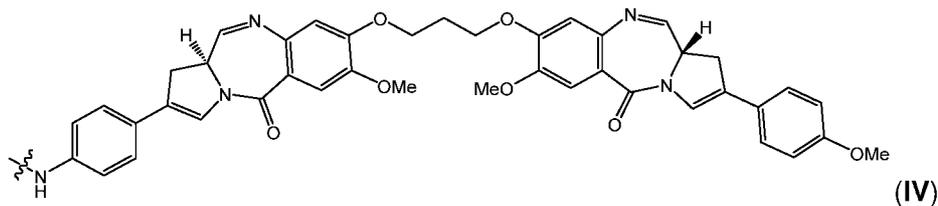
Один из:



где малеимид взаимодействует с тиольной группой, находящейся на цистеине в антителе.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристатина E и монометил ауристатина F. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубина, доксорубина, эпирубина и идарубина.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер пирролбензодиазепина, представленный формулой (IV):



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера малеимидокапроила.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристатина E и монометил ауристатина F.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубина, доксорубина, эпирубина и идарубина.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, любого из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для введения пациенту-человеку чрескожно, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, внутриглазно, интратуморально, парентерально, местно, интратекально или интрацеребровентрикулярно.

Краткое описание фигур

На фиг.1 графически изображены результаты анализа связывания клеточной линии

*in vitro*, в котором каждое из указанных анти-CD5-антител или отрицательного контроля (т.е. mIgG1) инкубировали с клетками MOLT-4 (то есть с клеточной линией Т-лимфобластов человека) с последующей инкубацией анти-IgG-антитела, конъюгированного с флуорофором. Сигнал измеряли с помощью проточной цитометрии и определяли как средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (ось Y) как функция концентрации анти-CD5-антитела (ось X).

На фиг. 1 графически изображены результаты анализа связывания первичных клеток *in vitro*, в котором каждое из указанных анти-CD5-антител или отрицательного контроля (т.е. hIgG1) инкубировали с первичными Т-клетками человека с последующей инкубацией конъюгированного с флуорофором анти-IgG антитела. Сигнал измеряли с помощью проточной цитометрии и определяли как средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (ось Y) как функция концентрации анти-CD5-антитела (ось X).

На фиг. 3А и 3В графически представлены результаты *in vitro* киллинг-анализа Т-клеток, включающий анти-CD5-аманитин ADC (т.е. 5D7-AM или “CD5 AM”), имеющий конъюгированный между цепями аманитин со средним отношением лекарственное средство-антитело (DAR) 6 (фиг. 3А) или сайт-специфический конъюгированный аманитин с DAR 2 (фиг. 3В). На фиг.3А показан киллинг-анализа Т-клеток анти-CD5-ADC по сравнению с неконъюгированным анти-CD5 5D7 антителом (т.е. «голая CD5»). На фиг. 3В показаны результаты анти-CD5-антитела по сравнению с анти-CD5 5D7-антителом, имеющим мутацию H435A, которая уменьшает период полувыведения антитела (т.е. «CD5 быстрый период полувыведения AM»). Результаты показывают количество жизнеспособных Т-клеток (ось Y) как функцию концентрации ADC (CD5 5D7 AM, CD5 5D7 D265C.H435A AM) или неконъюгированного антитела (CD5 5D7) (ось X), оцененную с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 4А-4В графически представлены результаты анализа истощения Т-клеток *in vivo*, показывающие абсолютные уровни Т-клеток (CD3+ клетки; ось Y) в периферической крови (фиг. 4А) и костном мозге (фиг. 4В) гуманизированной мыши NSG через 7 дней после однократного введения 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг анти-CD5 5D7аманитин ADC (т.е. CD5 5D7-AM), имеющего межцепочечный DAR 6. Для сравнения фиг. 4А-4В также показывают уровень истощения Т-клеток после лечения гуманизированных мышей NSG указанными контролями (т.е. 25 мг/кг анти-CD52 антитела; 3 мг/кг hIgG1-аманитин ADC (т.е. hIgG1-AM, 25 мг/кг hIgG1 или PBS).

На фиг. 5А-5С графически представлены результаты анализа истощения Т-клеток *in vivo*, показывающие абсолютные уровни Т-клеток (CD3+ клетки; ось Y) в периферической крови (фиг. 5А), костном мозге (фиг. 5В), и тимусе (фиг. 5С) гуманизированной мыши NSG через 7 дней после однократного введения 1 мг/кг или 3 мг/кг анти-CD5 5D7-аманитин ADC (т.е. 5D7-AM), имеющего сайт-специфический DAR 2. Для сравнения фиг. 5А-5С также показывают уровень истощения Т-клеток после лечения гуманизированных мышей NSG 3 мг/кг неконъюгированного анти-CD5 антитела или с указанными контролями (т.е. 3 мг/кг hIgG1-аманитин-ADC (“hIgG1-AM”) или PBS).

### Подробное описание

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD5 (также называемый лимфоцитарным антигеном T1/Leu-1), можно использовать в качестве терапевтических средств для (i) непосредственного лечения раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся клетками CD5+ и (ii) стимуляции приживления трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантационной терапии, путем истощения популяций иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию и создают иммунный ответ против “чужих” трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток. Эти терапевтические активности могут возникать, например, в результате связывания анти-CD5-антител или их антигенсвязывающих фрагментов с CD5, экспрессируемым на поверхности клетки, такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или иммунная клетка, которые вступают в перекрестную реакцию с “чужим” антигеном гемопоэтических стволовых клеток, вызывая тем самым гибель связанной клетки. В случае истощения популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для непосредственного лечения рака или аутоиммунного заболевания, такого как рак аутоиммунное заболевание, описанное в настоящем документе. В случае истощения популяции иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с “чужим” антигеном гемопоэтических стволовых клеток (например, “чужим” антигеном МНС, экспрессируемым трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток), антитело против CD5 или его антигенсвязывающий фрагмент, можно использовать для предотвращения или уменьшения вероятности отторжения трансплантата у пациента, который страдает расстройством, связанным со стволовыми клетками, раковым заболеванием или аутоиммунным заболеванием и который подвергается терапии, включающей трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В таких случаях истощение CD5+ иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими “чужими” антигенами стволовых клеток (например, одним или несколькими “чужими” антигенами МНС), позволяет успешно приживать трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки в трансплантате реципиента. По мере того как трансплантированные клетки приживаются, они могут вернуться в кроветворную ткань, где затем может начаться продуктивный гемопоэз. Трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут впоследствии дать начало популяции клеток, которые являются дефицитными или дефектными у реципиента трансплантата, таким как мегакариоциты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Таким образом, анти-CD5-антитела или их фрагменты можно использовать для стимуляции успешного приживления гемопоэтических стволовых клеток у пациента, такого как человек-пациент, страдающий

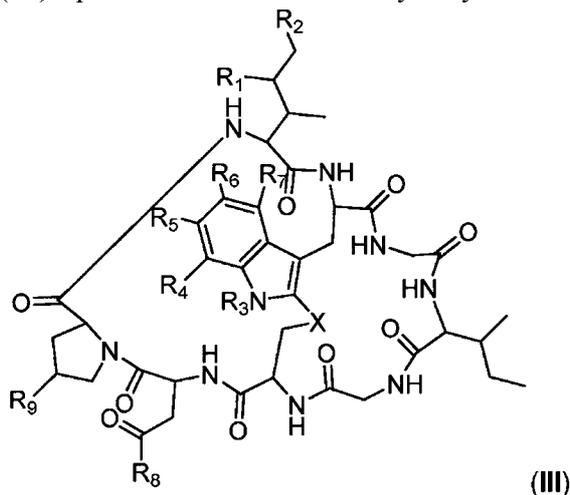
расстройством, связанным со стволовыми клетками, описанным в настоящем документе.

#### Определения

Как используется в настоящем документе, термин «приблизительно» относится к значению, которое находится в пределах 10% выше или ниже описываемого значения. Например, термин «приблизительно 5 нМ» обозначает диапазон от 4,5 нМ до 5,5 нМ.

Как используется в настоящем документе, термин «аматоксин» относится к члену семейства аматоксина пептидов, продуцируемых грибами *Amanita phalloides*, синтетическому аматоксину, вариантному аматоксину или его производным, таким как его вариант или производное, способным ингибировать активность РНК-полимеразы II. Также включены синтетические аматоксины (см., например, патент США No. 9676702, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Как описано в настоящем документе, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством линкерного фрагмента (L) (таким образом, образуя конъюгат (также называемый конъюгатом лекарственное средство-антитело (ADC)). Примеры способов конъюгации аматоксина и линкеров, подходящих для таких процессов, описаны ниже. Примеры линкерсодержащих аматоксинов, подходящих для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с композициями и способами, также описаны в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления аматоксины, полезные в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения в соответствии с формулой (III) ниже, такие как  $\alpha$ -аманитин,  $\beta$ -аманитин,  $\gamma$ -аманитин,  $\epsilon$ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин. Формула (III) представляет собой следующую:



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

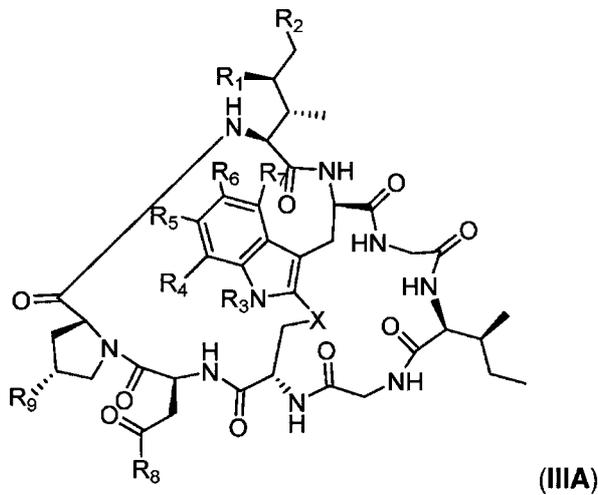
$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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

- $R_3$  представляет собой H или  $R_D$ ;  
 $R_4$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_5$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_6$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_7$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$  или  $OR_D$ ;  
 $R_9$  представляет собой H, OH или  $OR_D$ ;  
X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-; и

$R_D$  представляет собой optionally замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), optionally замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), optionally замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), optionally замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), optionally замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), optionally замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), optionally замещенный циклоалкил, optionally замещенный гетероциклоалкил, optionally замещенный арил, или optionally замещенный гетероарил.

Например, в одном варианте осуществления аморфоксины, которые могут быть использованы в сочетании с композициями и способами, описанными здесь, включают соединения в соответствии с формулой (IIIА), ниже:



где  $R_1$  представляет собой H, OH или  $OR_A$ ;  
 $R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;  
 $R_A$  и  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием optionally замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

- $R_3$  представляет собой H или  $R_D$ ;  
 $R_4$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_5$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_6$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;  
 $R_7$  представляет собой H, OH,  $OR_D$  или  $R_D$ ;

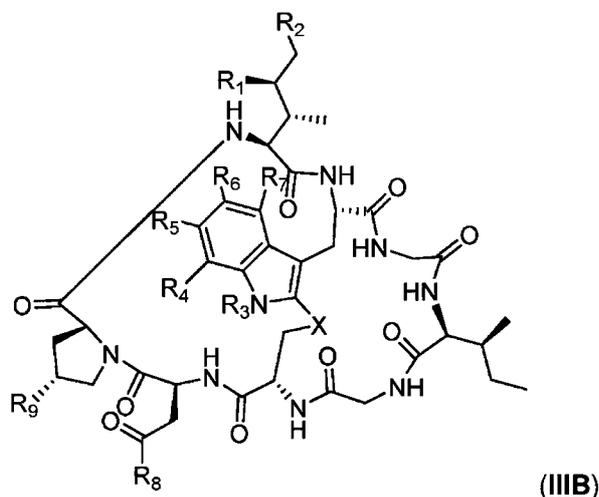
$R_8$  представляет собой  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  или  $\text{OR}_D$ ;

$R_9$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$  или  $\text{OR}_D$ ;

$X$  представляет собой  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$  или  $-\text{SO}_2-$ ; и

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил.

В одном варианте осуществления аматоксины, полезные в сочетании с композициями и способами, описанными здесь, также включают соединения в соответствии с формулой (IIIВ), ниже:



где  $R_1$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$  или  $\text{OR}_A$ ;

$R_2$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$  или  $\text{OR}_B$ ;

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

$R_3$  представляет собой  $\text{H}$  или  $R_D$ ;

$R_4$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}_D$  или  $R_D$ ;

$R_5$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}_D$  или  $R_D$ ;

$R_6$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}_D$  или  $R_D$ ;

$R_7$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}_D$  или  $R_D$ ;

$R_8$  представляет собой  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  или  $\text{OR}_D$ ;

$R_9$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$  или  $\text{OR}_D$ ;

$X$  представляет собой  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$  или  $-\text{SO}_2-$ ; и

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  гетероалкил), необязательно

замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил.

Как описано в настоящем документе, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством линкерного фрагмента. Примеры способов конъюгации аматоксина и линкеров, подходящие для таких процессов, описаны в разделе, озаглавленном «Линкеры для химической конъюгации», а также в таблице 1 ниже. Типичные линкерсодержащие аматоксины, используемые для конъюгации с антителом, антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе, показаны в структурных формулах (I), (IA), (IB), (II), (IIA), и (IIB), перечисленных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с конкретным антигеном или иммунологически реагирует с ним. Примеры антител включают поликлональные, моноклональные, генно-инженерные и иным образом модифицированные формы антител, включая, но не ограничиваясь ими, химерные антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгатные антитела (например, би- три- и четырехспецифичные антитела, диатела, триатела и тетратела) и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, фрагменты Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rlgG и scFv. Используемые в настоящем документе фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub> относятся к фрагментам антител, в которых отсутствует фрагмент Fc интактного антитела. Примеры этих фрагментов антител описаны в настоящем документе.

Как правило, антитела включают тяжелые и легкие цепи, содержащие антигенсвязывающие области. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен, CL. Области VH и VL могут быть разделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, располагаемых от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q)

классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела и которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Фрагментами антител могут быть, например, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, диатело, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv), триатело, аффитело, нанотело, аптамер, или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают, но не ограничиваются ими: (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub>, и C<sub>H</sub>1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V<sub>H</sub> и C<sub>H</sub>1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> отдельной области антитела, (v) dAb, включающий домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>; (vi) фрагмент dAb, который состоит из домена V<sub>H</sub> (см., например, Ward et al., Nature 341:544-546, 1989); (vii) dAb, который состоит из домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>; (viii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR); и (ix) комбинацию двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub>, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов посредством линкера, который позволяет построить из них единую белковую цепочку, в которой области V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> связываются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988 and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на полезность таким же образом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов или, в некоторых случаях, методами химического синтеза пептидов, известными в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «анти-CD5 антитело» или «антитело, которое связывается с CD5» относится к антителу, которое специфически связывается с CD5. Антитело, «которое связывает» интересующий антиген, то есть CD5, представляет собой антитело, способное связывать этот антиген с достаточной аффинностью, так что это антитело является полезным для нацеливания на клетку, экспрессирующую антиген. В предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с человеческим CD5 (hCD5), аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 261.

Используемый в настоящем документе термин «биспецифическое антитело»

относится к гибриднему антителу, имеющему два разных сайта связывания антигена. Биспецифические антитела представляют собой вид мультиспецифических антител и могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифического антитела будут связываться с двумя разными эпитопами, которые могут находиться на одной или разных белках-мишенях. Например, одна из специфичностей связывания может быть направлена на Т-клеточный поверхностный антиген, такой как CD5, другая может быть связана с другим Т-клеточным поверхностным антигеном или другим белком клеточной поверхности, таким как рецептор или субъединица рецептора, участвующий в пути передачи сигнала, который усиливает рост клеток, среди прочего.

Используемый в настоящем документе термин «область, определяющая комплементарность» (CDR) относится к гипервариабельной области, присутствующей как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи в вариабельных доменах антитела. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называют каркасными областями (FR). Положения аминокислот, которые очерчивают гипервариабельную область антитела, могут варьироваться в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области. Некоторые положения в пределах вариабельной области можно рассматривать как гибридные гипервариабельные положения в том смысле, что эти положения могут считаться находящимися в пределах гипервариабельной области при одном наборе критериев, при этом считаясь находящимися вне гипервариабельной области при другом наборе критериев. Одно или несколько из этих положений также может находиться в расширенных гипервариабельных областях. Описанные здесь антитела могут включать модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре каркасные области, главным образом, вследствие принятия конфигурации  $\beta$ -листа, соединенные тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие структуру  $\beta$ -листа, и в некоторых случаях образующие ее часть. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости посредством каркасных областей в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и с CDR из другой цепи антитела, способствуя образованию сайта связывания мишени антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD., 1987). Нумерация аминокислотных остатков иммуноглобулинов, как используется в настоящем описании, осуществляется согласно системе нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулина Kabat et al., если не указано иное.

Используемые в настоящем документе термины «состояние» и «кондиционирование» относятся к процессам, с помощью которых пациент готовится к получению трансплантата, содержащего гематопозитические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата гематопозитических стволовых клеток (например, как вытекает из устойчивого увеличения количества жизнеспособных

гемопозитических стволовых клеток в образце крови, выделенном от пациента после процедуры кондиционирования и последующей трансплантации гематопоэтических стволовых клеток. В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, пациента можно кондиционировать для терапии, включающей трансплантацию гематопоэтических стволовых клеток, путем введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый Т-клетками, такой как CD5. Как описано в настоящем документе, анти-CD5 антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином, чтобы образовать конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, способного связывать один или несколько вышеуказанных антигенов, пациенту, нуждающемуся в терапии, включающей трансплантацию гематопоэтических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата гематопоэтических стволовых клеток, например, путем селективного истощения эндогенных иммунных клеток, таких как CD5+ Т-клетки (например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки), CD5+ В-клетки и/или CD5+ NK-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими “чужими” антигенами, экспрессируемыми гематопоэтическими стволовыми клетками, такими как один или несколько “чужих” антигенов МНС, экспрессируемых трансплантатом гематопоэтических стволовых клеток. Это селективное истощение иммунных клеток, в свою очередь, предотвращает или снижает вероятность отторжения трансплантата после трансплантации экзогенного (например, аутологичного, аллогенного или сингенного) трансплантата гематопоэтических стволовых клеток.

Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» относится к соединению, образованному путем химического связывания 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 (например, анти-CD5 антителом и цитотоксином), связанными друг с другом. Примеры линкеров, которые можно использовать для образования конъюгата, включают пептидсодержащие линкеры, такие как те, которые содержат природные или неприродные аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры могут быть получены с использованием различных способов, описанных в настоящем документе и известных в данной области техники. В зависимости от реакционноспособных компонентов линкер может быть расщеплен, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в условиях щелочной среды, окислением, дисульфидным восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлоорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012).

Используемый в настоящем документе термин «реакция сочетания» относится к химической реакции, в которой два или более заместителя, подходящих для реакции друг с другом, взаимодействуют так, чтобы образовать химический фрагмент, который соединяет

(например, ковалентно) молекулярные фрагменты, связанные с каждым заместителем. Реакции сочетания включают те, в которых реакционноспособный заместитель, связанный с фрагментом, который представляет собой цитотоксин, такой как цитотоксин, известный в данной области техники или описанный в настоящем документе, взаимодействует с подходящим реакционноспособным заместителем, связанным с фрагментом, который представляет собой антител, его антигенсвязывающий фрагмент или антитело, такое как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или антитело, специфичное в отношении CD5, известное в данной области или описанное в настоящем документе. Примеры подходящих реакционноспособных заместителей включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галогеналкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ $\alpha,\beta$ -ненасыщенный карбонил, среди прочих), пару диен/диенофил (например, пара азид/алкин, среди прочих) и тому подобное. Реакции сочетания включают, без ограничения, алкилирование тиола, гидроксилалкилирование, алкилирование амина, конденсацию амина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение Гуйсгена, среди прочих), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционные модификации, известные в данной области техники или описанные в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «CRU (конкурентно репопулирующая единица)» относится к единице измерения стабильно привитых стволовых клеток, которую можно определить после трансплантации *in-vivo*.

Используемый в настоящем документе термин «отношение лекарственное средство-антитело» или «DAR» относится к количеству цитотоксинов, например, аматоксина, присоединенного к антителу ADC. DAR ADC может варьироваться от 1 до 8, хотя более высокие нагрузки также возможны в зависимости от количества сайтов связывания на антителе. Таким образом, в определенных вариантах осуществления ADC, описанный в настоящем документе, имеет DAR приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Используемый в настоящем документе термин «донор» относится к человеку или животному, у которых одна или несколько клеток выделены до введения этих клеток или их потомства реципиенту. Одна или несколько клеток могут представлять собой, например, популяцию гемопоэтических стволовых клеток.

Используемый в настоящем документе термин «диатело» относится к бивалентному антителу, содержащему две полипептидные цепи, в котором каждая полипептидная цепь включает домены  $V_H$  и  $V_L$ , соединенные слишком коротким линкером (например, линкер, состоящий из пяти аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярную связь доменов  $V_H$  и  $V_L$  на одной и той же пептидной цепи. Эта конфигурация вынуждает каждый домен соединяться с комплементарным доменом в другой полипептидной цепи, чтобы сформировать гомодимерную структуру. Соответственно, термин «триатела» относится к трехвалентным антителам, содержащим три пептидные цепи, каждая из которых содержит один домен  $V_H$  и один домен  $V_L$ , соединенные линкером, который является чрезвычайно

коротким (например, линкер, состоящий из 1-2 аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярную связь доменов  $V_H$  и  $V_L$  на одной и той же пептидной цепи. Для того чтобы сложиться в их нативные структуры, пептиды, сконфигурированные таким образом, обычно тримеризуются, чтобы расположить домены  $V_H$  и  $V_L$  соседних пептидных цепей, пространственно проксимально друг к другу (см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993).

Используемый в настоящем документе термин «иммуноглобулин с двумя переменными доменами» («DVD-Ig») относится к антигенсвязывающему белку, который объединяет переменные домены, связывающие мишень, двух антител посредством линкеров для создания четырехвалентного двух-целевого единого средства (см., например, Gu et al., Meth. Enzymol., 502:25-41, 2012).

Используемый в настоящем документе термин «эндогенный» описывает вещество, такое как молекула, клетка, ткань или орган (например, гематопозитическая стволовая клетка или клетка ростка кроветворения, такие как мегакариоцит, тромбоцит, кровяные пластинки, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаги, дендритная клетка, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоцит (например,  $CD4^+$  или  $CD8^+$  Т-лимфоцит) или В-лимфоцит), которые естественно присутствуют в конкретном организме, таком как пациент-человек, например, пациент-человек, подвергающийся терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, как описано в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «эффективность приживления» используется для обозначения способности гематопозитических стволовых и клеток-предшественников к повторному заселению ткани, независимо от того, циркулируют ли такие клетки естественным путем или обеспечиваются трансплантацией. Термин охватывает все события, окружающие или приводящие к приживлению, такие как возвращение клеток в клетки и колонизация клеток в интересующей ткани. Эффективность приживления или показатель приживления может быть оценен или количественно оценен с использованием любого клинически приемлемого параметра, известного специалистам в данной области, и может включать, например, оценку конкурентно репопулирующих единиц (CRU); включение или экспрессия маркера в ткани (тканях), в которые стволовые клетки поселились, колонизируются или приживаются; или путем оценки прогресса субъекта по прогрессированию заболевания, выживаемости кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников или выживаемости реципиента. Приживление также может быть определено путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в течение периода после трансплантации. Приживление также может быть оценено путем измерения восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного мозга.

Используемый в настоящем документе термин «эксципиент» относится к веществу, сформулированному вместе с активным ингредиентом лекарственного средства. Они могут

быть включены, например, с целью долгосрочной стабилизации или для придания терапевтического усиления активному ингредиенту в конечной лекарственной форме.

Используемый в настоящем документе термин “экзогенный” описывает вещество, такое как молекула, клетка, ткань или орган (например, Т-клетка, гематопозитическая стволовая клетка или клетка роста кроветворения, такие как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаги, дендритная клетка, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоцит или В-лимфоцит), который естественно не присутствуют в конкретном организме, таком как пациент-человек. Экзогенные вещества включают те, которые поступают из внешнего источника в организм или к культивируемому веществу, извлеченному из него.

Используемый в настоящем документе термин «каркасная область» или «область FW» включает аминокислотные остатки, которые примыкают к CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Остатки FW-области могут присутствовать, например, в человеческих антителах, гуманизированных антителах, моноклональных антителах, фрагментах антител, фрагментах Fab, фрагментах одноцепочечных антител, фрагментах scFv, доменах антител и биспецифических антителах, среди других.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, обычно включающего, по меньшей мере, две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях могут включать меньшее количество цепей, такие как антитела, встречающиеся в природе у верблюдов, которые могут содержать только тяжелые цепи.

Используемый в настоящем документе термин «гематопозитические стволовые клетки» («HSC») относятся к незрелым клеткам крови, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки крови, включающим различные линии, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, кровяные пластинки), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглия, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Такие клетки могут включать клетки CD34<sup>+</sup>. Клетки CD34<sup>+</sup> являются незрелыми клетками, которые экспрессируют маркер клеточной поверхности CD34. Считается, что у людей клетки CD34<sup>+</sup> включают субпопуляцию клеток со свойствами стволовых клеток, определенными выше, тогда как у мышей HSC представляют собой CD34<sup>-</sup>. Кроме того, HSC также относятся к длительно репопулирующим HSC (LT-HSC) и временно репопулирующим HSC (ST-HSC). LT-HSC и ST-HSC дифференцированы на основе функционального потенциала и экспрессии маркера клеточной поверхности. Например, человеческими HSC являются CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD49F<sup>+</sup> и lin<sup>-</sup> (отрицательные в отношении зрелых линейных маркеров, включая CD5, CD3, CD4, CD7,

CD8, CD10, CD11b, CD19, CD20, CD56, и CD235A). У мышей LT-HSC костного мозга представляют собой CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+, CD48- и lin- (отрицательные в отношении зрелых линейных маркеров, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, и IL7ra), тогда как ST-HSC представляют собой CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+, и lin- (отрицательные в отношении зрелых линейных маркеров, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, и IL7ra). Кроме того, ST-HSC менее спокойны и более пролиферативны, чем LT-HSC в условиях гомеостаза. Однако LT-HSC имеют больший потенциал самообновления (то есть они выживают в течение всей взрослой жизни и могут быть последовательно трансплантированы через последовательных реципиентов), тогда как ST-HSC имеют ограниченное самообновление (то есть они выживают только в течение ограниченного периода времени и не обладают потенциалом последовательной трансплантации). Любой из этих HSC можно использовать в описанных здесь способах. ST-HSC особенно полезны, потому что они высоко пролиферативны и, таким образом, могут быстрее привести к потомству дифференцированных клеток.

Используемый в настоящем документе термин «функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток» относится к функциональным свойствам гематопозитических стволовых клеток, которые включают 1) мультипотентность (что относится к способности дифференцироваться в несколько различных линий крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, кровяные пластинки), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглия, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновление (которое относится к способности гематопозитических стволовых клеток давать дочерние клетки, которые имеют эквивалентный потенциал, как у материнской клетки, и, кроме того, что эта способность может повторяться в течение всей жизни человека без истощения), и 3) способность гематопозитических стволовых клеток или их потомства повторно вводиться реципиенту трансплантата, после чего они размещаются в нише гематопозитических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Используемые в настоящем документе термины «антигены главного комплекса гистосовместимости» («МНС»), также называемые «главный комплекс гистосовместимости у человека» («HLA») в контексте человека) относятся к белкам, экспрессируемым на поверхности клетки, которые придают клетке уникальную антигенную идентичность. Антигены МНС/HLA представляют собой молекулы-мишени, которые распознаются Т-клетками и NK-клетками как происходящие из того же источника гематопозитических стволовых клеток, что и иммунные эффекторные клетки («свое»), или как происходящие из другого источника гематопозитических восстанавливающих клеток («чужое»). Различают два основных класса антигенов HLA: класс I HLA и класс II HLA. Антигены HLA класса I

(А, В и С у людей) делают каждую клетку узнаваемой как «свое», тогда как антигены HLA класса II (DR, DP и DQ у людей) участвуют в реакциях между лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками. Оба они были вовлечены в отторжение трансплантированных органов. Важным аспектом генной системы HLA является ее полиморфизм. Каждый ген, MHC класса I (A, B и C) и MHC класса II (DP, DQ и DR) существует в разных аллелях. Аллели HLA обозначены номерами и субиндексами. Например, два неродственных индивидуума могут нести HLA-B класса I, гены B5 и Bw41, соответственно. Аллельные гены различаются по одной или нескольким аминокислотам в  $\alpha$  и/или  $\beta$  домене(ах). Большие панели специфических антител или реагентов нуклеиновых кислот используются для определения типа HLA-гаплотипов индивидуумов с использованием лейкоцитов, которые экспрессируют молекулы класса I и класса II. Гены, обычно используемые для типирования HLA, представляют собой шесть белков MHC класса I и класса II, по два аллеля для каждого из HLA-A; HLA-B и HLA-DR. Гены HLA сгруппированы в «супер-локус», присутствующий в положении хромосомы bр21, который кодирует шесть классических генов HLA для трансплантации и, по меньшей мере, 132 гена, кодирующих белок, которые играют важную роль в регуляции иммунной системы, а также некоторых другие фундаментальные молекулярные и клеточные процессы. Полный локус имеет размер примерно 3,6 Мб, по крайней мере, с 224 локусами генов. Одним из эффектов этой кластеризации является то, что «гаплотипы», то есть набор аллелей, присутствующих в одной хромосоме, которая наследуется от одного из родителей, имеют тенденцию наследоваться как группа. Набор аллелей, унаследованных от каждого из родителей, образует гаплотип, в котором некоторые аллели имеют тенденцию связываться вместе. Выявление гаплотипов пациента может помочь предсказать вероятность нахождения подходящих доноров и помочь в разработке стратегии поиска, поскольку некоторые аллели и гаплотипы встречаются чаще, чем другие, и они распределены с различной частотой в разных расовых и этнических группах.

Используемый в настоящем документе термин «HLA-совместимый» относится к паре донор-реципиент, в которой ни один из антигенов HLA не является несовпадающим между донором и реципиентом, например донор, предоставляющий трансплантат гемопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. HLA-совместимые (то есть, где совпадают все 6 аллелей) пары донор-реципиент имеют сниженный риск отторжения трансплантата, поскольку эндогенные Т-клетки и NK-клетки с меньшей вероятностью распознают поступающий трансплантат как чужеродный и, следовательно, с меньшей вероятностью создают иммунный ответ против трансплантата.

Используемый в настоящем документе термин "HLA- несовместимый" относится к паре донор-реципиент, в которой, по меньшей мере, один антиген HLA, в частности в отношении HLA-A, HLA-B и HLA-DR, не совпадает между донором и реципиентом, например, донором, предоставляющим трансплантат гематопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в трансплантации гематопоэтических стволовых клеток. В

некоторых вариантах осуществления один гаплотип совпадает, а другой не совпадает. HLA-несовместимые пары донор-реципиент могут иметь повышенный риск отторжения трансплантата по сравнению с HLA-совместимыми парами донор-реципиент, поскольку эндогенные Т-клетки и NK-клетки с большей вероятностью распознают поступающий трансплантат как чужеродный в случае HLA-несовместимой пары донор-реципиент, и такие Т-клетки и NK-клетки, таким образом, с большей вероятностью вызывают иммунный ответ против трансплантата.

Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором, по существу, каждая часть белка (например, все CDR, каркасные области, домены C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> (например, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>), шарнирные и V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> домены) является по существу неиммуногенной у человека, с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Человеческое антитело могут продуцироваться в клетке человека (например, путем рекомбинантной экспрессии) или животным, не являющимся человеком, или прокариотическими или эукариотическими клетками, способными экспрессировать гены функциональности реаранжированного иммуноглобулина человека (например, тяжелой цепи и/или легкой цепи). Когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может включать линкерный пептид, не обнаруживаемый в нативных человеческих антителах. Например, F<sub>v</sub> может содержать линкерный пептид, такой как от двух до примерно восьми остатков глицина или других аминокислот, связывающий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считают, что такие линкерные пептиды происходят от человека. 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 человеческого иммуноглобулина (см., например, публикации PCT No. WO1998/24893; WO1992/01047; WO1996/34096; WO1996/33735; патенты США No. 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771; и 5939598). В одном варианте осуществления человеческое антитело получают с использованием рекомбинантных способов, так что картина гликозилирования антитела отличается от антитела, имеющего такую же последовательность, если оно существует в природе.

Используемый в настоящем документе термин «гуманизованное» антитело относится к химерному антителу, обычно содержащему аминокислотные последовательности из нечеловеческих CDR и каркасных областей человека. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело представляет собой человеческое антитело (антитело-реципиент), в котором остатки из CDR реципиента заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, обладающими желаемой специфичностью,

аффинностью и/или емкостью. В общем, гуманизированное антитело содержит, по существу, все, по меньшей мере, один, и, как правило, два переменных домена, в которых все или, по существу, все области CDR соответствуют этим нечеловеческим иммуноглобулинам. Все или по существу все области FW также могут быть теми же последовательностями человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно, консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Способы гуманизации антител известны в данной области и описаны, например, в Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; патенты США No: 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; и 6180370.

Используемый в настоящем документе термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, которая участвует в создании и поддержании врожденного или адаптивного иммунного ответа. Иммунные клетки включают лимфоциты, которые содержат рецептор, который специфически связывает и усиливает иммунный ответ против интересующего антигена, такого как собственный антиген, в случае аутоиммунной клетки. Типичные иммунные клетки включают тучные клетки, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты.

Как используется в настоящем документе пациенты, которые «нуждаются» в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включают пациентов, у которых обнаружен дефект или дефицит одного или нескольких типов клеток крови, а также пациентов, имеющих нарушение стволовых клеток. Гематопоэтические стволовые клетки, как правило, проявляют 1) мультипотентность и, таким образом, могут дифференцироваться в несколько различных клеточных линий крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, кровяные пластинки), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглия, остеокласты и лимфоциты (например, НК-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновление и, следовательно, могут давать дочерние клетки, которые имеют эквивалентный потенциал, как материнская клетка, и 3) способность повторно вводиться реципиенту трансплантата, после чего они размещаются в нише гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз. Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки могут быть введены пациенту с дефектом или дефицитом одного или более типов клеток роста кроветворения для повторного формирования дефектной или дефицитной популяции клеток *in vivo*. Например, пациент может страдать раковым заболеванием, и дефицит может быть вызван введением химиотерапевтического средства или другого лекарственного средства, которое истощает, выборочно или неспецифично, популяцию раковых клеток. Дополнительно или

альтернативно, пациент может страдать незлокачественной гемоглобинопатией, которая может вызвать дефект или дефицит одного или нескольких типов клеток крови, такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, и синдром Вискотта-Олдрича. Субъект может страдать тяжелым комбинированным иммунодефицитом аденозиндеаминазы (ADA SCID), HIV/AIDS, метахроматической лейкодистрофией, синдромом Даймонда-Блэкфана, и синдромом Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или быть подвержен наследственному заболеванию крови (например, серповидноклеточная анемия) или аутоиммунному заболеванию. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или быть подвержен злокачественному новообразованию, такому как злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из гематологических раков (например, лейкоз, лимфома, множественная миелома, или миелодиспластический синдром) и нейробластомы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или в противном случае подвержен метаболическому нарушению метаболическому нарушению. Например, субъект может страдать от или в противном случае подвержен метаболическому нарушению, выбранному из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, метахроматической лейкодистрофии, или любых других заболеваний или нарушений, которые могут получить пользу от способов лечения и видов терапий, описанных в настоящем документе, и включая, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулинемии М (IgM), болезнь Чедиака - Хигаши, врожденный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, незавершенный остеогенез, болезни накопления, большая талассемия, серповидноклеточная анемия, системный склероз, системная красная волчанка, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и такие заболевания или расстройства, которые описаны в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку оно относится к патологиям, которые можно лечить путем введения терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток. Дополнительно или альтернативно, пациент, «нуждающийся» в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, может быть пациентом, который страдает или не страдает одной из вышеуказанных патологий, но тем не менее демонстрирует пониженный уровень (например, по сравнению с таковым у здорового субъекта) одного или нескольких типов эндогенных клеток в ростке кроветворения, таких как мегакариоциты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Специалист в данной области может легко определить, снижается ли уровень одного или нескольких вышеупомянутых типов клеток или другого типа клеток крови по сравнению с другим здоровым субъектом, например, путем проточной цитометрии и методов сортировки флуоресцентно-активированных клеток, среди прочих способов,

известных в данной области.

Термин «выделенный» при использовании в контексте белка, например, антитела, относится к белку, который в силу своего происхождения или источника происхождения не связан с компонентами, ассоциированными с ним в естественных условиях, которые сопровождают его в его нативном состоянии; практически не содержит других белков того же вида; экспрессируется клеткой другого вида; или который не встречается в природе. Таким образом, белок, который синтезирован химическим путем или синтезирован в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит в природе, будет «выделенным» от ассоциированных с ним в природе компонентов. Белок также можно сделать по существу не содержащим ассоциированных с ним в природе компонентов путем выделения с использованием способов очистки белка, хорошо известных в данной области.

Термин «моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, встречающихся в природе мутаций или вариантов, возникающих во время получения препарата моноклонального антитела, где такие варианты могут присутствовать в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое mAb направлено против одной детерминанты на антигене. Определение «моноклональной» не следует истолковывать как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые подходят для контакта с тканями субъекта, такого как млекопитающее (например, человек), без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа и других проблемных осложнений, соразмерно с обоснованным соотношением польза/риск.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» означает смесь, содержащую терапевтическое соединение для введения субъекту, такому как млекопитающее, например, человеку, для предотвращения, лечения или контроля конкретного заболевания или состояния, поражающего млекопитающего, такого как аутоиммунное расстройство, рак или заболевание крови, среди прочего, например, как описано в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «реципиент» относится к пациенту, который получает трансплантат, такой как трансплантат, содержащий популяцию гематопозитических стволовых клеток. Трансплантированные клетки, вводимые реципиенту, могут быть, например, аутологичными, сингенными или аллогенными клетками.

Используемый в настоящем документе термин «отторжение» в контексте трансплантата, такого как трансплантат гематопозитических стволовых клеток, относится к процессу, посредством которого реципиент устанавливает иммунный ответ против

входящего трансплантата, тем самым снижая способность пересаженного материала (например, гематопозитических стволовых клеток) оставаться у реципиента. Неприятие трансплантированного трансплантата, такого как трансплантат гематопозитических стволовых клеток, может быть определено количественно, например, путем измерения количества или концентрации трансплантированных клеток в различных образцах, выделенных у пациента в различные моменты времени после трансплантации. Обнаружение того, что количество или концентрация трансплантированных клеток в образцах, выделенных от пациента, со временем уменьшается, например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 56%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более указывают, что пациент страдает отторжением трансплантата. И наоборот, обнаружение того, что количество или концентрация трансплантированных клеток в образцах, выделенных от пациента, остается стабильным во времени, например, уменьшением менее чем на 20%, 15%, 10%, 5% или менее, указывает на то, что пациент не страдает от отторжения трансплантата. Альтернативно, отторжение трансплантата можно определить количественно путем измерения количества или концентрации иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или НК-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантированными клетками в различных образцах, выделенных у пациента в различные моменты времени после трансплантации. Обнаружение того, что количество или концентрация иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или НК-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантированными клетками в образцах, выделенных от пациента, увеличивается с течением времени, например, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 56%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, или более, указывают на то, что пациент страдает отторжением трансплантата. И наоборот, обнаружение того, что количество или концентрация иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или НК-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантированными клетками в образцах, выделенных от пациента, со временем уменьшается, например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 56%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более, указывает на то, что пациент не страдает отторжением трансплантата.

Используемый в настоящем документе термин «образец» относится к образцу (например, кровь, компонент крови (например, сыворотка или плазма), моча, слюна, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость, ткани (например, плацентарной или дермальной), жидкости поджелудочной железы, образцу ворсин хориона и клетки), взятому у субъекта.

Используемый в настоящем документе термин “scFv” относится к одноцепочечному антителу Fv, в котором переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи антитела были связаны с образованием одной цепи. Фрагменты scFv содержат одну полипептидную цепь, которая включает переменную область легкой цепи антитела (V<sub>L</sub>) (например, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3) и переменную область тяжелой цепи антитела (V<sub>H</sub>) (например,

CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), разделенные линкером. Линкер, который соединяет области  $V_L$  и  $V_H$  фрагмента scFv, может представлять собой пептидный линкер, состоящий из протеиногенных аминокислот. Альтернативные линкеры можно использовать для увеличения устойчивости фрагмента scFv к протеолитической деградации (например, линкеры, содержащие D-аминокислоты), чтобы повысить растворимость фрагмента scFv (например, гидрофильные линкеры, такие как полиэтиленгликоль-содержащие линкеры 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 ослабления иммуногенности фрагмента scFv (для например, линкеры, содержащие сайты гликозилирования). Специалисту в данной области также должно быть понятно, что переменные области молекул scFv, описанных здесь, могут быть модифицированы таким образом, что они отличаются по аминокислотной последовательности от молекулы антитела, из которой они были получены. Например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям в аминокислотных остатках (например, в CDR и/или каркасных остатках), чтобы сохранить или усилить способность scFv связываться с антигеном, распознаваемым соответствующим антителом.

Термины «специфическое связывание» или «специфически связывается» в отношении взаимодействия антитела или фрагмента антитела со вторым химическим видом означают, что взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенная детерминанта или эпитопа) по химическому виду; например, антитело распознает и связывается с определенной структурой белка, а не с белками в целом. Если антитело является специфичным для эпитопа «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный немеченый А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом. В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с мишенью, например, CD5, если антитело имеет  $K_D$  для мишени, 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 менее (менее означает число, которое меньше  $10^{-12}$ , например,  $10^{-13}$ ). В одном варианте осуществления термин «специфическое связывание с CD5» или «специфически связывается с CD5», как используется в настоящем документе, относится к антителу или что связывается с CD5 и имеет константу диссоциации ( $K_D$ )  $1,0 \times 10^{-7}$  М или менее, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном варианте осуществления  $K_D$  определяют в соответствии со стандартной интерферометрией биослоя (BLI). Следует понимать, однако, что антитело может быть способно специфически связываться с двумя или более антигенами, которые связаны по последовательности. Например, в одном варианте осуществления антитело может специфически связываться с ортологами CD5 как человека, так и не относящимися к человеку (например, мыши или нечеловекообразного примата).

Используемые в настоящем документе термины «субъект» и «пациент» относятся к

млекопитающему, такому как человек, который получает лечение от конкретного заболевания или состояния, как описано в настоящем документе. Например, пациент, такой как пациент-человек, может быть тем, кто страдает аутоиммунным заболеванием, описанным в настоящем документе, и может быть введено антитело против CD5 или конъюгат антитело-лекарственное средство, описанное в настоящем документе, чтобы (i) истощить популяцию аутоиммунных клеток (например, популяция аутоиммунных CD5+ Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток) и/или (ii) истощить популяцию CD5+ иммунных клеток (например, CD5+ Т-клеток, В-клеток и/или NK клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с чужим антигеном, экспрессируемым гематopoэтическими стволовыми клетками, такими как чужой MHC-антиген, экспрессируемый трансплантатом гематopoэтических стволовых клеток, тем самым предотвращая или уменьшая вероятность отторжения трансплантата, до трансплантации гематopoэтических стволовых клеток.

Используемое в настоящем документе выражение «по существу очищено от крови» относится к моменту времени после введения терапевтического средства (такого как антитело против CD5 или его антигенсвязывающий фрагмент) пациенту, когда концентрация терапевтического средства в образце крови, выделенном у пациента, такова, что терапевтическое средство не может быть обнаружено обычными средствами (например, таким образом, что терапевтическое средство не обнаруживается выше шумового порога устройства или анализа, используемого для обнаружения терапевтического средства). Различные методы, известные в данной области, могут быть использованы для обнаружения антител или фрагментов антител, такие как анализы на основе ELISA, известные в данной области или описанные в настоящем документе. Дополнительные анализы, которые можно использовать для обнаружения антител и фрагментов антител, включают методы иммунопреципитации и иммуноблот-анализы, среди прочих, известные в данной области.

Используемое в настоящем документе выражение "нарушение стволовых клеток" в широком смысле относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, которое можно лечить или вылечить путем кондиционирования тканей-мишеней субъекта, например, путем абляции эндогенной популяции Т-клеток в ткани-мишени, и/или путем приживления или трансплантации стволовых клеток в тканях-мишенях субъекта. Например, было показано, что пациенты с диабетом I типа излечиваются путем трансплантации гематopoэтических стволовых клеток и могут получить пользу от кондиционирования в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе. Дополнительные расстройства, которые можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, ADA SCID, HIV/AIDS, метахроматическую лейкодиетрофию, синдром Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или быть подвержен наследственному заболеванию крови (например, серповидноклеточная анемия) или аутоиммунному заболеванию. Дополнительно или альтернативно, субъект может

иметь или быть подвержен злокачественному новообразованию, такому как злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из гематологических раков (например, лейкоз, лимфома, множественная миелома, или миелодиспластический синдром) и нейробластомы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или в противном случае подвержен метаболическому нарушению. Например, субъект может страдать от или в противном случае подвержен метаболическому нарушению, выбранному из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, метахроматической лейкодистрофии, или любых других заболеваний или нарушений, которые могут получить пользу от способов лечения и видов терапий, описанных в настоящем документе, и включая, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулинемии М (IgM), болезнь Чедиака - Хигаши, врожденный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, незавершенный остеогенез, болезни накопления, большая талассемия, серповидноклеточная анемия, системный склероз, системная красная волчанка, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и такие заболевания или расстройства, которые описаны в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку оно относится к патологиям, которые можно лечить путем введения терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток.

Используемый в настоящем документе термин «трансфекция» относится к любому из широкого спектра методов, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, такому как электропорация, липофекция, осаждение фосфатом кальция, трансфекция DEAE-декстраном и тому подобное.

Используемые в настоящем документе термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, в котором целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательных физиологических изменений или расстройств или содействие благоприятному фенотипу у пациента, который получает лечение. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, уменьшение количества аутоиммунных клеток, присутствующих в образце, выделенном у пациента, например, популяции CD5+ Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с собственным антигеном в случае непосредственного лечения аутоиммунного расстройства или с антигеном, экспрессируемым гематопозитическими стволовыми клетками, до трансплантации гематопозитических стволовых клеток в случае лечения аутоиммунного заболевания путем введения антитела против CD5 или его антигенсвязывающего фрагмента, и трансплантата гематопозитических стволовых клеток. Дополнительные благоприятные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гематопозитических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантации

гематопозитических стволовых клеток, после кондиционирующей терапии и последующего введения трансплантата экзогенных гематопозитических стволовых клеток пациенту. Благоприятные результаты терапии, описанные в настоящем документе, могут также включать увеличение количества клеток или относительную концентрацию одной или нескольких из клеток ростка кроветворения, таких как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаги, дендритная клетка, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоцит или В-лимфоцит, после кондиционирующей терапии и последующей терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток.

Используемые в настоящем документе термины «вариант» и «производное» используются взаимозаменяемо и относятся к природным синтетическим и полусинтетическим аналогам соединения, пептида, белка или другого вещества, описанного в настоящем документе. Вариант или производное соединения, пептида, белка или другого вещества, описанного в настоящем документе, может сохранять или улучшать биологическую активность исходного вещества.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» включает вектор нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, вектор ДНК, плазмид, вектор РНК, вирус или другой подходящий репликон. Векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, 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 можно использовать для экспрессии антител и фрагментов антител по изобретению, включают плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как области промотора и энхансера, которые направляют транскрипцию гена. Другие полезные векторы для экспрессии антител и фрагментов антител содержат полинуклеотидные последовательности, которые повышают скорость трансляции этих генов или улучшают стабильность или ядерный экспорт мРНК, который является результатом транскрипции генов. Эти элементы последовательности могут включать, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области и сайт сигнала полиаденилирования, чтобы направлять эффективную транскрипцию гена, содержащегося в векторе экспрессии. Векторы экспрессии, описанные здесь, 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 ноурсетрицин.

Используемый в настоящем документе термин «алкил» относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, 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 тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “алкилен” относится к двухвалентной алкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в алкильной цепи. Примеры алкилена включают метилен, этилен, пропилен, изопропилен и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкил” относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 1 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов (например, кислород, азот или серу, среди прочих) в цепи.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкилен” относится к двухвалентной гетероалкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в гетероалкильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или несколькими гетероатомами.

Используемый в настоящем документе термин “алкенил” относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкенильных групп включают винил, пропенил, изопропенил, бутенил, трет-бутилил, гексенил и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “алкенилен” относится к двухвалентной алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в алкенильной цепи. Примеры алкенилена включают этенилен, пропенилен, изопропенилен, бутенилен и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкенил” относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов (например, кислород, азот или серу, среди прочих) в цепи.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкенилен” относится к двухвалентной гетероалкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в гетероалкенильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или несколькими гетероатомами.

Используемый в настоящем документе термин “алкинил” относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкинильных групп включают пропаргил, бутинил, пентинил, гексинил и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “алкинилен” относится к двухвалентной алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в алкинильной цепи.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкинил” алкинил относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20

атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов (например, кислород, азот или серу, среди других) в цепи.

Используемый в настоящем документе термин “гетероалкинилен” относится к двухвалентной гетероалкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в гетероалкинильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или несколькими гетероатомами.

Используемый в настоящем документе термин “циклоалкил” относится к моноциклической или конденсированной, мостиковой или спиро-полициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и имеет, 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 тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “циклоалкилен” относится к двухвалентной циклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах внутри кольцевой структуры. Примеры циклоалкилена включают циклопропилен, циклобутилен, циклопентилен, циклогексилен и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “гетероциклоалкил” относится к моноциклической или конденсированной, мостиковой или спиро-полициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и имеет, например, от 3 до 12 кольцевых атомов на кольцевую структуру, выбранных из атомов углерода и гетероатомов, выбранных, например, из азота, кислорода и сера, среди других. Кольцевая структура может включать, например, одну или несколько оксогрупп на членах кольца углерода, азота или серы. Примеры гетероциклоалкилов включают в качестве примера, а не ограничения, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тетрагидротиофенил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, пиперазинил, хинуклидинил, и морфолинил.

Используемый в настоящем документе термин “гетероциклоалкилен” относится к двухвалентной гетероциклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах в структуре кольца.

Используемый в настоящем документе термин “арил” относится к моноциклической или полициклической ароматической кольцевой системе, содержащей, например, от 6 до 19 атомов углерода. Арильные группы включают, но не ограничиваются ими, фенил, флуоренил, нафтил и тому подобное. Двухвалентные положения могут быть одним или несколькими гетероатомами.

Используемый в настоящем документе термин “арилен” относится к двухвалентной арильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах.

Используемый в настоящем документе термин “гетероарил” относится к моноциклической гетероароматической или бициклической или трициклической гетероароматической группе с конденсированным кольцом, в которой один или несколько кольцевых атомов представляет собой гетероатом, например азот, кислород или серу. Гетероарильные группы включают пиридил, пирролил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, пиазолил, 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, 3H-индолил, бензимидазолил, имидазо[1,2-а]пиридил, бензотиазолил, бензоксазолил, хинолизинил, хиназолинил, пталазинил, 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 тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин “гетероарилен” относится к двухвалентной гетероарильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одинаковых или разных атомах. Двухвалентные положения могут быть одним или несколькими гетероатомами.

Если иное не ограничено определением отдельного заместителя, вышеуказанные 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” могут быть необязательно замещены, например, от 1 до 5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклоалкила, алкил арила, алкил гетероарила, алкил циклоалкила, алкил гетероциклоалкила, амино, аммония, ацила, ацилокси, ациламино, аминокарбонила, алкоксикарбонила, уреидо, карбамата, арила, гетероарила, сульфинила, сульфонила, алкокси, сульфанила, галогена, карбокси, тригалогенметила, циано, гидрокси, меркапто, нитро и тому подобное. Типичные заместители включают, но не ограничиваются ими, -X, -R, -OH, -OR, -SH, -SR, NH<sub>2</sub>, -NHR, -N(R)<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(R)<sub>3</sub>, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NC(=O)H, -NC(=O)R, -C(=O)H, -C(=O)R, -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)N(R)<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -S(=O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, -S(=O)R, -OP(=O)(OH)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)N(R)<sub>2</sub>, -C(=S)NH<sub>2</sub>, -C(=S)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NH)NH<sub>2</sub> и -C(=NR)N(R)<sub>2</sub>; где каждый X независимо выбран для каждого случая из F, Cl, Br и I; и каждый R независимо выбран для каждого случая из алкила, арила, гетероциклоалкила или гетероарила, защитную группу и пролекарственную группу. В тех случаях, когда группа описывается как «необязательно замещенная», эта группа может быть замещена одним или несколькими из указанных выше заместителей независимо для каждого случая. Замещение может включать ситуации, в

которых соседние заместители подверглись замыканию кольца, например замыканию кольца вицинальных функциональных заместителей, с образованием, например, лактамов, лактонов, циклических ангидридов, ацеталей, полуацеталей, тиоацеталей, аминалов и гемиаминалов, образованных замыканием кольца, например, для обеспечения защитной группы.

Следует понимать, что некоторые соглашения о наименовании радикалов могут включать монадикал или дирадикал в зависимости от контекста. Например, когда заместитель требует двух точек присоединения к остальной части молекулы, подразумевается, что заместитель представляет собой дирадикал. Например, заместитель, идентифицированный как алкил, который требует двух точек присоединения, включает дирадикалы, такие как  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ , и тому подобное. Другие условные обозначения радикалов четко указывают на то, что радикал является дирадикалом, таким как "алкилен," "алкенилен," "арилен," "гетероциклоалкилен," и тому подобное.

В тех случаях, когда заместитель представлен в виде дирадикала (т.е. имеет две точки присоединения к остальной части молекулы), следует понимать, что заместитель может быть присоединен в любой направленной конфигурации, если не указано иное

#### Анти-CD5 антитела

Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы для непосредственного лечения раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний, например, благодаря способности таких агентов убивать CD5+ раковые клетки (например, CD5+ лейкозные клетки) и CD5+ аутоиммунные клетки (например, CD5+ аутоиммунные Т-клетки, В-клетки и/или NK-клетки). В частности, анти-CD5 антитело, описанное в настоящем документе, конъюгировано с цитотоксином через линкер. Таким образом, если описаны анти-CD5 антитела, их конъюгаты также рассматриваются, если не указано иное.

Изобретение также частично основано на открытии того факта, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связываться с CD5, можно использовать в качестве терапевтических средств для стимуляции приживления трансплантированных гематопозитических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантационной терапии, путем предотвращения или снижения вероятности отторжения трансплантата, опосредованного иммунными клетками. Например, анти-CD5-антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связывать поверхностноклеточный CD5, экспрессируемый иммунными клетками, такими как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию и создают иммунный ответ против чужих антигенов гематопозитических стволовых клеток, таких как чужие антигены МНС, экспрессируемые трансплантатом гематопозитических стволовых клеток. Связывание таких антител и антигенсвязывающих фрагментов со специфическими для гематопозитических стволовых клеток иммунными клетками CD5+ может вызывать гибель связанной иммунной клетки, например, из-за антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности

или под действием цитотоксического средства, который конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Таким образом, истощение популяции CD5+ иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с чужими гематопозитическими стволовыми клетками, может облегчить приживление трансплантатов гематопозитических стволовых клеток нуждающемуся в этом пациенту, ослабляя способность иммунной системы реципиента вызывать иммунный ответ против вводимого трансплантата. Таким образом, пациент, страдающий расстройством, связанным со стволовыми клетками, раковым заболеванием, аутоиммунным заболеванием или другим заболеванием крови, описанным в настоящем документе, может быть подвергнут лечению, в виде предоставления трансплантата гематопозитических стволовых клеток субъекту для повторного заселения линии клеток, которая является дефектной и/или дефицитной у субъекта. У субъекта может быть дефицит популяции клеток, вызванный, например, химиотерапией, которая была введена субъекту с целью уничтожения раковых клеток, но которая в процессе истощила также и здоровые кроветворные клетки.

Например, изобретение, таким образом, предоставляет композиции и способы стимулирования приживления трансплантированных гематопозитических стволовых клеток путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый Т-клетками. Это введение может вызвать селективное истощение популяции эндогенных Т-клеток, таких как CD4+ и CD8+ Т-клетки. Это селективное истощение Т-клеток может, в свою очередь, предотвратить отторжение трансплантата после трансплантации экзогенного (например, аутологичного, аллогенного или сингенного) трансплантата гематопозитических стволовых клеток. Например, селективное истощение CD4+ и/или CD8+ Т-клеток с использованием антитела против CD5, антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитело-лекарственное средство или конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе, может ослаблять опосредованный Т-клетками иммунный ответ, который может происходить против трансплантированного трансплантата гематопозитических стволовых клеток. Изобретение частично основано на открытии того, что антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связываться с CD5, можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, для того, чтобы способствовать выживанию и потенциалу приживления трансплантированных гематопозитических стволовых клеток.

Приживление трансплантатов гематопозитических стволовых клеток вследствие введения антител против CD5 или их антигенсвязывающих фрагментов может проявляться в различных эмпирических измерениях. Например, приживление трансплантированных гематопозитических стволовых клеток может быть оценено путем оценки количества конкурентно репопулирующих единиц (CRU), присутствующих в костном мозге пациента, после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать CD5, и последующего введения трансплантата гематопозитических стволовых клеток. Кроме того, можно наблюдать приживление трансплантата гематопозитических стволовых

клеток путем включения репортерного гена, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию, дающую флуоресцентный, хромофорный или люминесцентный продукт, в вектор, с которым донорские гематопозитические стволовые клетки были трансфицированы и последующее отслеживание соответствующего сигнала в ткани, в которую помещены гематопозитические стволовые клетки, такой как костный мозг. Можно также наблюдать приживание гематопозитических стволовых клеток, например, путем оценки количества и выживаемости гематопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников, как определено анализами методами сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), известными в данной области техники. Приживание также может быть определено путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в течение периода после трансплантации и/или путем измерения восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного мозга.

В следующих разделах приведено описание антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые можно вводить пациенту, нуждающемуся в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, для стимуляции приживания трансплантатов гематопозитических стволовых клеток, а также способы введения таких терапевтических средств пациенту до трансплантации гематопозитических стволовых клеток.

#### Типичные антитела

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, включают антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD5 человека. Человеческий CD5 также называется LEU1 или T1. Человеческий CD5 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I, обнаруженный на поверхности тимоцитов, Т-лимфоцитов и подмножества В-лимфоцитов. Были идентифицированы две изоформы человеческого CD5. Изоформа 1 содержит 438 аминокислот и описана в Jones. et al. (1988) *Nature* 323 (6086), 346-349 и ниже (NCBI Reference Sequence: NP\_001333385.1):

```
MVCSQSWGRS SKQWEDPSQASKVCQRLNCG VPLSLGPFLV TYTPQSSIIICYGQL
GSFSNCSHSRNDMCHS  LGLTCLEPQKTTPPTTRPPPTTTPEPTAPP  RLQLVAQSGG
QHCAGVVEFYSGSLGGTISY  EAQDKTQDLE  NFLCNNLQCG  SFLKHLPETE
AGRAQDPGEP  REHQPLPIQWKIQNSSCTSL  EHCFRKIKPQ  KSGRVLALLC
SGFQPKVQSR  LVGGSSICEG  TVEVRQGAQWAALCDSSAR  SSLRWEEVCR
EQQCGSVNSY  RVLDA GDPTS  RGLFCPHQKL
SQCHELWERN SYCKKVFVTCQDPNPAGLAAGTVASIIAL  VLLVLLVVC
GPLAYKKLVK  KFRQKKQRQWIGPTGMNQNM  SFHRNHTATV  RSHAENPTAS
HVDNEYSQPP RNSHLSAYPA LEGALHRSSMQPDNSSDSY DLHGAQRL (SEQ ID NO:
261)
```

Было показано, что Т-клетки экспрессируют CD5, который является молекулой клеточной адгезии и участвует как в пролиферативном ответе активированных Т-клеток, так и в хелперной функции Т-клеток. Также было показано, что он действует как рецептор, доставляя костимулирующие сигналы к Т-клеткам, взаимодействуя с CD72, белком клеточной поверхности, эксклюзивным для В-клеток. Антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD5, могут подавлять активацию Т-клеток и опосредованные Т-клетками иммунные ответы против трансплантатов гематопозитических стволовых клеток, например, путем ингибирования взаимодействия между CD5 и CD72. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD5, также можно использовать для прямого уничтожения CD5+ Т-клеток, например, путем конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксином (таким как цитотоксин, описанный в настоящем документе или известный в данной области) или с использованием неконъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного рекрутировать белки комплемента в Т-клетку.

Кроме того, было показано, что подмножества активированных В-клеток экспрессируют CD5, и этот паттерн экспрессии особенно распространен среди аутореактивных В-клеток (Werner-Favre et al., *European Journal of Immunology* 19: 1209-1231 (1989), раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Также было показано, что CD5 экспрессируется подмножествами NK-клеток; особенно среди пациентов с множественной миеломой было показано, что они содержат популяции CD5+ (CD5LOW+) NK-клеток низкой плотности, и этот поверхностный антиген вовлечен в активацию NK-клеток (Ishiyama et al., *Anticancer Research* 14:725-730 (1994), раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Таким образом, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD5, можно использовать для ослабления активации В-клеток и NK-клеток. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD5, также можно использовать для прямого уничтожения CD5+ В-клеток и NK-клеток, например, путем конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксином (таким как цитотоксин, описанный в настоящем документе или известный в данной области) или с использованием неконъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного рекрутировать белки комплемента в В-клетку или NK-клетку.

Настоящее изобретение охватывает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с полипептидом CD5, например, человеческим полипептидом CD5, и их применения. В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с полипептидом CD5, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR). В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления переменная

область тяжелой цепи включает CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает одну или несколько CDR VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, и SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает две или несколько CDR VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, и SEQ ID NO: 19. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 17, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 18, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 19.

В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR). В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает одну или несколько CDR VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, и SEQ ID NO: 22. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает две или несколько CDR VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 21, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 22.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 17, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 18, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, которая включает CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 21, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько CDR (т.е. одна или несколько CDR тяжелой цепи, имеющая SEQ ID NO: 17-19, и/или одна или несколько CDR легкой цепи, имеющая SEQ ID NO: 20-22) могут включать консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD5-специфичности антитела (т.е. специфичности, сходной с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 17-19 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 20-22).

В определенных вариантах осуществления антитело против CD5 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышиное антитело 5D7 или его гуманизированный вариант. Мышиное антитело 5D7 связывается с человеческим CD5 и

описано в патентной публикации США No. 20008/0245027, содержание которой касающееся последовательностей антитела, раскрытых в ней, включено в настоящее изобретение посредством ссылки. SEQ ID NO: 29-34, описанные в таблице 4, соответствуют CDR мышинового анти-CD5-антитела 5D7. Гуманизированный вариант анти-CD5 антитела 5D7 описан в SEQ ID NO: 257 (гуманизованная переменная область тяжелой цепи) и SEQ ID NO: 258 (гуманизованная переменная область легкой цепи). В одном варианте осуществления ADC и их применения, описанные в настоящем документе, включают антитело, содержащее CDR, представленные в SEQ ID NO: 29-34. В другом варианте осуществления ADC и их применения, описанные в настоящем документе, включают антитело, содержащее переменные области тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 257 и 258, соответственно.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 257. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 257, например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления антитело включает модифицированную переменную область тяжелой цепи (НС), содержащую переменный домен НС, содержащий SEQ ID NO: 257, или вариант SEQ ID NO: 257, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 257 в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных заменах, добавлениях или делециях; (ii) отличается от SEQ ID NO: 257 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 257 в 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных заменах, добавлениях или делециях и/или (iv) включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере, примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичной SEQ ID NO: 257, где в любом из (i)-(iv), аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная переменная область тяжелой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 257, сохраняя при этом специфичность связывания CD5 антитела, то есть обладает специфичностью связывания, сходной с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO: 257.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 258. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 258, например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 258. В некоторых вариантах осуществления

антитело включает модифицированную переменную область легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO: 258, или вариант SEQ ID NO: 258, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 258 в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных заменах, добавлениях или делециях; (ii) отличается от SEQ ID NO: 258 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 258 в 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных заменах, добавлениях или делециях и/или (iv) включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере, примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичной SEQ ID NO: 258, где в любом из (i)-(iv), аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная переменная область легкой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 258, сохраняя при этом специфичность связывания CD5 антитела, то есть обладает специфичностью связывания, сходной с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO: 258.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 257, например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, которая включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 258, например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 258. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, которая включает SEQ ID NO: 258.

В другом варианте осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает одну или несколько CDR VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, и SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает две или несколько CDR VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, и SEQ ID NO: 31. В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи включает CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 29, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 30, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 31.

В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR). В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает одну или несколько CDR VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, и SEQ ID NO: 34. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает две или несколько CDR VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, и SEQ ID NO: 34. В одном варианте осуществления переменная область легкой цепи включает CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 34.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 29, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 30, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, которая включает CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько CDR (т.е. одна или несколько CDR тяжелой цепи, имеющая SEQ ID NO: 29-31, и/или одна или несколько CDR легкой цепи, имеющая SEQ ID NO: 32-34) могут включать консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD5-специфичности антитела (т.е. специфичности, сходной с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 29-31 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 32-34).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связываться с антигеном CD5, могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе, таких как иммунизация, техники компьютерного моделирования и методы отбора *in vitro*, такие как фаговый дисплей и дисплейные платформы на основе клеток, описанные ниже.

Анти-CD5 антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают те, которые имеют одну или обе из следующих переменных областей, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с ней (например, аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности):

V<sub>L</sub>, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDINSYLSWVQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

$V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWGMWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 2).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности  $V_L$  и  $V_H$ , описаны, например, в патенте США No. 5869619, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD5 и их антигенсвязывающим фрагментам, таким как антитело he1. В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают цепи  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR, содержащиеся в цепях  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR, содержащиеся в цепях  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и остальные последовательности  $V_L$  и  $V_H$  имеют по меньшей мере 85% идентичность последовательностей (например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей) последовательностям  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8).

Дополнительные анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают антитела, которые имеют одну или обе из следующих переменных областей, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с ней (например, аминокислотная последовательность, имеющая 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более, идентичность последовательности к ней):

$V_L$ , имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 9); и

$V_H$ , имеющую аминокислотную последовательность  
EIQLVQSGGGLVKPGGSRVISCASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW  
YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности  $V_L$  и  $V_H$ , описаны, например, в патенте США No. 5869619, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, таким как антитело he3. В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR, содержащиеся в цепях  $V_L$  и  $V_H$  антитела, которое включает цепи  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR, содержащиеся в цепях  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, и остальные последовательности  $V_L$  и  $V_H$  имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательностей (например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностей) последовательностям  $V_L$  и  $V_H$  SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеуказанные последовательности CDR, описаны, например, в патенте США No. 5869619, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, например, анти-CD5-антитела, которые описаны в патентах США No. 5821123; 5766886; 5770196;

7153932; 5621083; 6649742; 6146631; 5756699; 5744580; 6376217; 5837491; и 6146850, описания каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки, поскольку они относятся к анти-CD5-антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, например, антитела, продуцируемые линией клеток гибридомы, депонированной как ATCC CRL 8000 (мышинное антитело против CD5 ОКТ1). Такие антитела описаны в патентах США No. 4515894; 4657760; и 4363799, описания каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки, поскольку они относятся к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают антитела, которые имеют одну или несколько или все из следующих CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYSITSGYY (SEQ ID NO: 17);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность ISYSGFT (SEQ ID NO: 18);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность AGDRTGSWFAY (SEQ ID NO: 19);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDISNY (SEQ ID NO: 20);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность ATS (SEQ ID NO: 21); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность LQYASYPFT (SEQ ID NO: 22).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности CDR, описаны, например, в патенте США No. 8679500, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают антитела, которые имеют одну или несколько или все из следующих CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYIFTNYG (SEQ ID NO: 23);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность INTYNGEP (SEQ ID NO: 23);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность ARGDYGYEDY (SEQ ID NO: 25);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 26);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность YTS (SEQ ID NO: 27); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYSKLPWT (SEQ ID NO: 28).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности CDR, описаны, например, в патенте США No. 8679500.

Анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают антитела, которые имеют одну или несколько или все из следующих CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности CDR, описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2008/0254027, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, например, анти-CD5-антитела, которые описаны в публикации заявки PCT No. WO1992/014491, такие как анти-CD5-антитела, продуцируемые гибридной клеточной линией депонированной в Институте Пастера под No. 1-1025 10 января 1991 года. Раскрытие публикации заявки PCT No. WO1992/014491 включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5-антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, например, анти-CD5-антитела, которые описаны в патенте США No. 6010902 и 7192736, публикации заявки на патент США No. 2011/0250203 и 2017/0129128, и публикации заявки PCT No. WO2016/172606; WO1994/023747; и WO1996/041608; описания каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки, поскольку они относятся к анти-CD5-антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD5-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают антитела, которые включают комбинацию областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, представленные в таблице 1, ниже

Таблица 1.

Ab No.	Название	CDRH1	SEQ ID NO:	CDRH2	SEQ ID NO:	CDRH3	SEQ ID NO:
1	1D8	SGYSFTGYTM	35	LINPYNGGTT	36	CARDYYGSSPDFDYW	37
2	3I21	SGYSFTDYTM	38	LINPYNGGTM	39	CARDNYGSSPDFDYW	40
3	4H10	SGYSFTGYTM	41	LINPYNGGTM	42	CARDNYGSSPYFDYW	43
4	8J23	SGYSFTGYTM	44	LINPYNGGTM	45	CARDNYGSSPYFDYW	46
5	5O4	SGYSFTGYTM	47	LINPYNGGTT	48	CARDYYGSSPDFDYW	49
6	4H2	SGFTFSNYAM	50	SISSGGNTF	51	CVRYYYGVTYWYFDV W	52
7	5G2	SGFTFSSYAM	53	SISSGGSTY	54	CVRYYYGIRYWYFDV W	55
8	8G8	SGYSFTAYNI	56	SIDPYYGDTK	57	CARRMITMGDWYFDV W	58
9	6M4	SGYSFTAYSM	59	SIDPYYGDTK	60	CARRMITTGDWYFDV W	61
10	2E3	SGYTFTNFAI	62	LISSNSGDVS	63	CARHYGAHNYFDYW	64
11	4E24	SGYTFTNFAI	65	LISTSSGDVS	66	CARHYGANNYFDYW	67
12	4F10	SGYTFTNFAI	68	LISSNSGDVS	69	CARHYGAHNYFDYW	70
13	7J9	SGYTFTNFAI	71	LISSNSGDVS	72	CARHYGAHNYFDYW	73
14	7P9	SGFNIKDTYM	74	RIDPANGNTK	75	CAREENYYGTYFYFDY W	76
15	8E24	SGYSFTSYWM	77	MIHPSDSETR	78	CARWGDHDDAMDFW	79

16	6L18	SGFSLTNYDV	80	VIWSSGNTD	81	CARNHGDGYFNWYFD VW	82
17	7H7	SGFSLTNYDV	83	VIWSSGNTD	84	CARNHGDGYYNWYF DVW	85
18	1E7	SGFTFSNYGM	86	AINSNGDITY	87	CARGTAWFTYW	88
19	8J21	SGYSFTGYTM	89	LINPYNGGTR	90	CARDGDDGWDIDVW	91
20	7I11	SGYIFANYGM	92	WINTYTGEPT	93	CARRGTYWHFDVW	94
21	8M9	SGYNFTNYGM	95	WINTYTGEPT	96	CARRGSYWHFDVW	97
22	1P21	SGYTFTNYGM	98	WINTYTGEPT	99	CARRSTLVFDYW	100
23	2H11	SGYTFTDYYI	101	WIYPGGGNTR	102	CARNGYWYFDVW	103
24	3M22	SGYTFTDYYI	104	WIYPGGGNTR	105	CARNGYWYFDVW	106
25	5M6	SGNTFTNFYL	107	CIYPGNVKTK	108	CAKEGDYDGTAYFDY W	109
26	5H8	SGYTFTNYGM	110	WINTYTGEPT	111	CARRRDGNFDYW	112
27	7I19	SEFTFSNYAM	113	TISSGGSYTY	114	CVRHGYFDVW	115
28	1A20	SGYTFTSYRM	116	RIDPYDSGTH	117	CAFYDGAYW	118
29	8E15	SGFNIKDTYM	119	RIDPANGNTK	120	CASYDPDYW	121
30	8C10	SGYSFTDYTM	122	LINPYNGGTR	123	CARDTTATYYFDYW	124
31	3P16	SGYMFTNHGM	125	WINTYTGEPT	126	CARRVATYFDVW	127
32	4F3	SGYMFTNYGM	128	WINTYTGEPT	129	CTRRSHITLDYW	130
33	5M24	SGYIFTNYGM	131	WINTYTGEPT	132	CARRRTTAFDYW	133
34	5O24	SGFNIKDYYI	134	WIDPENGRTE	135	CNNGNYVRHYYFDY	136

						W	
35	7B16	SGYTFINYGM	137	WINTYTGEPT	138	CTRRREITFDYW	139
36	1E8	SGYTFTDYFI	140	EIYPGSSNTY	141	CARSGISPFTYW	142
37	2H16	SGYIFTGYNI	143	AVYPGNGDTS	144	CAKYDRFFASW	145

Ab No.	Название	CDRL1	SEQ ID NO:	CDRL2	SEQ ID NO:	CDRL3	SEQ ID NO:
1	1D8	SQGISNHL	146	YFTSS	147	CQQYSNLPYTF	148
2	3I21	SQGIRNYL	149	YFTSS	150	CQQYSNLPYTF	151
3	4H10	SQGISNHL	152	YFTSS	153	CQQYSNLPYTF	154
4	8J23	SQGINNYL	155	YYTSS	156	CQQYSKIPYTC	157
5	5O4	SQGISNHL	158	YFTSS	159	CQQYSNLPYTF	160
6	4H2	SQSVDHDGDSYM	161	YAASN	162	CQQNYEDPTF	163
7	5G2	SQSVDYDGDSYM	164	YAASN	165	CQQSNEDPTF	166
8	8G8	SQDISNYL	167	YYTSR	168	CQQGDALPWTF	169
9	6M4	SQDISTYL	170	FYTSR	171	CQQGNSLPFTF	172
10	2E3	TSSISSSYL	173	YGTSN	174	CQQWSSRPPTF	175
11	4E24	NSSVSSSYL	176	YGTSN	177	CQQYSGYPLTF	178
12	4F10	TSSISSSYL	179	YGTSN	180	CQQYSDYPLTF	181
13	7J9	TSSISSSYL	182	YGTSN	183	CQQRSYFPPTF	184
14	7P9	SENIYYNL	185	YNANS	186	CKQVYDVPPTF	187
15	8E24	SENIYGYF	188	YNAKT	189	CQHHYGTPTF	190
16	6L18	SQDINNYI	191	HYTST	192	CLQYDNLWTF	193
17	7H7	SQDINKYI	194	HYTST	195	CLQYDNLWTF	196
18	1E7	SENIYSYL	197	YNAKT	198	CQHHYGYPYTF	199
19	8J21	SQGIRNYL	200	YHTST	201	CQQYSNLPLTF	202
20	7I11	SQDVRTDV	203	YSASF	204	CQQHYTSPWTF	205
21	8M9	SQDVITAV	206	YSASY	207	CQQHYSTPWTF	208

22	1P21	SQSIGTSI	209	KSASE	210	CQQSNRWPLTF	211
23	2H11	SSQSLLNQKNYL	212	YWAST	213	CQNDYDYPYTF	214
24	3M22	SSSVSSSYL	215	YSTSN	216	CHQYHRSPLTF	217
25	5M6	SENIYYNL	218	YNANS	219	CQQTFDVPWTF	220
26	5H8	SQTIGTSI	221	KNASE	222	CQQSNSWPLTY	223
27	7I19	SQSLLYSSDQKN YL	224	YWAST	225	CQQYYNYPLTF	226
28	1A20	NSSVSYM	227	YDTSK	228	CQQWSSNPFTF	229
29	8E15	SENIYYNL	230	YNANS	231	CKQAYDVPWTF	232
30	8C10	SSSLSYM	233	YDTSN	234	CQQWSSFPTF	235
31	3P16	SQRIGTSM	236	KSASE	237	CQQSNSWPLTF	238
32	4F3	SQSIGTSI	239	KSASE	240	CQQSNSWPLTF	241
33	5M24	SQNIGTSI	242	KDASE	243	CQQSDSWPLTF	244
34	5O24	ISSVSYM	245	YATSN	246	CQQWSSNPRTF	247
35	7B16	SQTIATSI	248	KNASE	249	CQQSNSWPLTF	250
36	1E8	SQSLVHSNGNTY L	251	YKVSN	252	CWQNTHFPQTF	253
37	2H16	NESVEYSGTSLM	254	SAASN	255	CQQSRQVPLTF	256

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности CDR таблицы 1, описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2011/0250203, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к анти-CD5 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Антитела и их фрагменты для использования в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают варианты описанных выше антител, такие как фрагменты антитела, которые содержат или не содержат Fc-домен, а также гуманизированные варианты антител нечеловеческого происхождения, описанных в настоящем документе, и антитело-подобные белковые каркасы (например, домены <sup>10</sup>Fn3), содержащие один или несколько или все из CDR или их эквивалентных областей антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе. Типичные антигенсвязывающие фрагменты вышеуказанных антител включают иммуноглобулин с двойным переменным доменом, одноцепочечную молекулу Fv (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, Fv-фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> молекулу и тандемной ди-scFv, среди прочего.

Вышеуказанные анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в различных аспектах изобретения, изложенных в настоящем документе, в том числе, например, в способах истощения клеток CD5<sup>+</sup> у человека-субъекта. Вышеупомянутые анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с агентом, например цитотоксином, например аматоксином, как описано в настоящем документе. Дополнительные анти-CD5-антитела, которые можно использовать в аспектах настоящего изобретения, описаны в патенте США No. 8679500, опубликованной патентной заявке США No. US2011/0250203, и опубликованной патентной заявке США No. US2008/0254027, каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Дополнительные анти-CD5-антитела, которые можно использовать в аспектах настоящего изобретения, включают, например, моноклональное антитело T101, описанное Dillman et al., *J. Clin. Oncol.* (1984), 2(8):881-891, и моноклональное антитело Leu-1, описанное Miller et al., *Blood* (1983), 62(5):988-95.

В одном варианте осуществления антитело против CD5 или его связывающий фрагмент включает модифицированную область Fc, где указанная модифицированная область Fc включает, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию относительно области Fc дикого типа, так что указанная молекула имеет измененную аффинность к или связывание с FcγR (FcγR). Определенные положения аминокислот в области Fc, как известно из кристаллографических исследований, обеспечивают прямой контакт с FcγR. Конкретно аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (петля В/С), аминокислоты 297-299 (петля С'/Е) и аминокислоты 327-332 (петля F/G). (см. Sondermann et al., 2000 *Nature*, 406: 267-273). Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать варианты областей Fc, включающие модификацию по меньшей мере одного остатка, который осуществляет прямой контакт с FcγR на основе структурного и

кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления Fc-область анти-CD5-антитела (или его фрагмента) включает аминокислотную замену в аминокислоте 265 в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), специально включенная в настоящий документ в качестве ссылки. “EU-индекс по Кабату” относится к нумерации человеческого антитела IgG1 EU. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию D265A. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию D265C. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела (или его фрагмента) включает аминокислотную замену в аминокислоте 234 в соответствии с EU-индексом по Кабату. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию L234A. В некоторых вариантах осуществления Fc-область анти-CD5 антитела (или его фрагмента) включает аминокислотную замену в аминокислоте 235 в соответствии с EU-индексом по Кабату. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию L235A. В еще одном варианте осуществления, область Fc включает мутацию L234A и L235A. В дополнительном варианте осуществления, область Fc включает мутацию D265C, L234A, и L235A. В еще одном дополнительном варианте осуществления, область Fc включает мутацию D265C, L234A, L235A и H435A. В дополнительном варианте осуществления, область Fc включает мутацию D265C и H435A.

Антитела по изобретению могут быть дополнительно сконструированы для дополнительной модуляции периода полужизни антитела путем введения дополнительных мутаций Fc, таких как описанные, например, в (Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-24), (Zalevsky et al. (2010) *Nat Biotechnol* 28: 157-9), (Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279: 6213-6), (Hinton et al. (2006) *J Immunol* 176: 346-56), (Shields et al. (2001) *J Biol Chem* 276: 6591-604), (Petkova et al. (2006) *Int Immunol* 18: 1759-69), (Datta-Mannan et al. (2007) *Drug Metab Dispos* 35: 86-94), (Vaccaro et al. (2005) *Nat Biotechnol* 23: 1283-8), (Yeung et al. (2010) *Cancer Res* 70: 3269-77) и (Kim et al. (1999) *Eur J Immunol* 29: 2819-25), и включают положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Типичные мутации, которые могут быть сделаны по отдельности или в комбинации, представляют собой мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, N433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с цитотоксином (например, аматоксин) посредством остатка цистеина в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина вводят путем мутации в Fc-домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, остаток цистеина может быть выбран из группы, состоящей из Cys118, Cys239, и Cys265. В одном варианте осуществления Fc-область анти-CD5 антитела (или его фрагмента) включает аминокислотную замену в аминокислоте 265 в соответствии с EU-индексом по Кабату. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию D265C. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию D265C и H435A.

Таким образом, в одном варианте осуществления область Fc включает мутацию, приводящую к уменьшению периода полужизни. Антитело с коротким периодом полужизни может быть выгодным в определенных случаях, когда ожидается, что антитело будет функционировать как короткоживущее терапевтическое средство, например, стадия кондиционирования, описанная в настоящем документе, когда антитело вводят с последующим введением HSC. В идеале, антитело должно быть по существу очищено перед доставкой HSC, которые также могут обычно экспрессировать CD5, но не являются мишенью для антитела против CD5, в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления область Fc включает мутацию в положении 435 (EU-индекс по Кабату). В одном варианте осуществления мутация является мутацией H435A.

Вышеуказанные анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в различных аспектах изобретения, изложенных в настоящем документе, в том числе, например, в способах истощения клеток CD5<sup>+</sup> у человека-субъекта. Вышеуказанные анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с агентом, например цитотоксином, например аматоксином, как описано в настоящем документе.

#### Способы идентификации анти-CD5-антител

Способы высокопроизводительного скрининга библиотек антител или фрагментов антител для молекул, которые связываются с CD5, могут быть использованы для идентификации и сродства зрелых агентов, полезных для кондиционирования пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии гемопоэтическими стволовыми клетками, и/или для непосредственного лечения рака или аутоиммунного заболевания, как описано в настоящем документе. Такие способы включают методы дисплея *in vitro*, известные в данной области, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клетки млекопитающего, рибосомный дисплей, мРНК-дисплей и кДНК-дисплей, среди других. Использование фагового дисплея для выделения антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают биологически значимые молекулы, было рассмотрено, например, в 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, описания каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки, поскольку они относятся к методам дисплея *in vitro*. Были построены рандомизированные комбинаторные библиотеки пептидов для отбора полипептидов, которые связывают антигены клеточной поверхности, как описано в Kay, *Perspect. Drug Discovery Des.* 2:251-268, 1995 и Kay et al., *Mol. Divers.* 1:139-140, 1996, описания каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки, поскольку они относятся к описанию антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно представлены фаговым дисплеем в виде функциональных молекул (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, *Trends Biotechnol.* 10:80-84 1992, описания каждого из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки, поскольку они относятся к

использованию методов дисплея *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и scFv, были экспрессированы в форматах дисплея *in vitro* (см., например, 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, описания каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки, поскольку они относятся к платформам дисплея *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул). Эти методы, среди прочего, могут использоваться для идентификации и улучшения аффинности антител или фрагментов антител, которые связываются с CD5, которые, в свою очередь, можно использовать для истощения CD5<sup>+</sup> Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток у пациента (например, пациент-человек), нуждающегося в трансплантации гематopoэтических стволовых клеток и/или страдающего раком или аутоиммунным заболеванием, описанным в настоящем документе.

Дополнительные методы могут быть использованы для идентификации антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD5 на поверхности клетки (например, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки) и которые, например, интернализуются клеткой, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Например, описанные выше способы дисплея *in vitro* могут быть адаптированы для скрининга антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD5 на поверхности Т-клетки, В-клетки или НК-клетки и которые впоследствии интернализуются. Фаговый дисплей представляет собой один из таких методов, который можно использовать вместе с этой парадигмой скрининга. Чтобы идентифицировать анти-CD5-антитела и их фрагменты, которые связываются с CD5 и впоследствии интернализуются Т-клетками, В-клетками и/или НК-клетками, специалист в данной области может использовать методы фагового дисплея, описанные в Williams et al., *Leukemia* 19:1432-1438, 2005, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Например, используя методы мутагенеза, известные в данной области, могут быть получены рекомбинантные фаговые библиотеки, которые кодируют антитела, фрагменты антител, такие как фрагменты scFv, фрагменты Fab, диатела, триатела, и <sup>10</sup>Fn3 домены, среди прочих, или антитела, которые содержат рандомизированные аминокислотные кассеты (например, в одной или нескольких или всех из CDR или их эквивалентных областей или антитела или фрагмента антитела). Каркасные области, шарнир, домен Fc и другие области антител или фрагментов антител могут быть сконструированы таким образом, что они являются неиммуногенными для человека, например, благодаря наличию последовательностей антител зародышевой линии человека или последовательностей, которые демонстрируют только незначительные вариации относительно к человеческим зародышевым антителам.

Используя методы фагового дисплея, описанные здесь или известные в данной области, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела или фрагменты антител, ковалентно связанные с фаговыми частицами, можно инкубировать с антигеном CD5, например, сначала инкубируя фаговую библиотеку с блокаторами (такими как например, молочный белок, бычий сывороточный альбумин и/или IgG для удаления

антител, кодирующих фаг, или их фрагментов, которые проявляют неспецифическое связывание с белком, и фаг, который кодирует антитела или их фрагменты, которые связывают домены Fc, и затем инкубируют фаговую библиотеку с популяцией Т-клеток, В-клеток или NK-клеток, которые являются CD5<sup>+</sup>. Фаговую библиотеку можно инкубировать с Т-клетками, В-клетками или NK-клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы CD5-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могли связываться с CD5 клеточной поверхностью и впоследствии интернализироваться Т-клетками. В-клетки или NK-клетки (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C). Фагосодержащие антитела или их фрагменты, которые не проявляют достаточной аффинности к CD5, чтобы позволить связывание и интернализацию Т-клетками, В-клетками или NK-клетками, могут быть впоследствии удалены путем промывки клеток, например, холодным (4°C) 0,1 М глициновым буфером при pH 2,8. Фаг, связанный с антителами или их фрагментами, которые были интернализированы Т-клетками, В-клетками и/или NK-клетками, можно идентифицировать, например, путем лизиса клеток и выделения интернализированного фага из среды для культивирования клеток. Затем фаг можно амплифицировать в бактериальных клетках, например, путем инкубации бактериальных клеток с выделенным фагом в среде 2xYT с использованием способов, известных в данной области. Фаг, выделенный из этой среды, может быть затем охарактеризован, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты гена(ов), кодирующего антитела или их фрагменты, встроенные в геном фага. Кодированные антитела или их фрагменты могут впоследствии быть получены *de novo* химическим синтезом (например, фрагментов антител, такие как фрагменты scFv) или рекомбинантной экспрессией (например, полноразмерных антител).

Примерным способом эволюции антител против CD5 *in vitro* для применения с композициями и способами, описанными здесь, является фаговый дисплей. Библиотеки фагового дисплея могут быть созданы путем создания спроектированной серии мутаций или вариаций в кодирующей последовательности для CDR антитела или аналогичных областей антителоподобного каркаса (например, петли BC, CD и DE <sup>10</sup>Fn3 доменов). Последовательность, кодирующая матрицу антитела, в которое эти мутации вводят, может представлять собой, например, наивную последовательность зародышевой линии человека. Эти мутации могут быть выполнены с использованием стандартных методов мутагенеза, известных в данной области. Таким образом, каждая мутантная последовательность кодирует антитело, соответствующее матрице, за исключением одной или нескольких аминокислотных вариаций. Векторы ретровирусного и фагового дисплея могут быть сконструированы с использованием стандартных методов конструирования векторов, известных в данной области техники. Векторы фагового дисплея P3 вместе с совместимыми векторами экспрессии белка можно использовать для создания векторов фагового дисплея для диверсификации антител.

Мутированная ДНК обеспечивает разнообразие последовательностей, и каждый трансформированный фаг демонстрирует один вариант исходной матричной

аминокислотной последовательности, кодируемой ДНК, что приводит к фаговой популяции (библиотеке), отображающей огромное количество различных, но структурно связанных аминокислотных последовательностей. Ожидается, что благодаря четко определенной структуре гипервариабельных областей антител вариации аминокислот, введенные в скрининг фагового дисплея, изменят свойства связывания связывающего пептида или домена без значительного изменения его общей молекулярной структуры.

При типичном скрининге фаговая библиотека может контактировать с и иметь возможность связываться с CD5 или его эпитопом. Для облегчения разделения связывающих и несвязывающих, удобно иммобилизовать мишень на твердой подложке. Фаг, несущий CD5-связывающий фрагмент, может образовывать комплекс с мишенью на твердой подложке, тогда как несвязывающий фаг остается в растворе и может быть смыт избытком буфера. Связанный фаг может затем высвободиться из мишени путем изменения буфера до экстремального значения pH (pH 2 или pH 10), изменения ионной силы буфера, добавления денатуратов или других известных средств.

Выделенный фаг может быть затем амплифицирован путем инфицирования бактериальных клеток, и процесс скрининга может быть повторен с новым пулом, который в настоящее время обеднен несвязывающимися антителами и обогащен антителами, которые связываются с CD5. Извлечение даже нескольких связывающих фагов является достаточным для амплификации фага для последующей итерации скрининга. После нескольких раундов отбора последовательности генов, кодирующих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из отобранных клонов фага в пуле связывания, определяют обычными методами, таким образом определяя пептидную последовательность, которая придает аффинность связывания фага с мишенью. Во время метода пэннинга разнообразие последовательностей популяции уменьшается с каждым раундом отбора до тех пор, пока не останутся желательные пептидсвязывающие антитела. Последовательности могут сходиться на небольшом количестве родственных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Увеличение количества фагов, извлеченных в каждом раунде отбора, указывает на то, что конвергенция библиотеки произошла на экране.

Другой способ идентификации анти-CD5-антител включает использование гуманизированных антител нечеловеческого происхождения, которые связываются с CD5, например, согласно следующей процедуре. Антитела нечеловеческого происхождения, которые связываются с CD5, могут быть гуманизированы, например, согласно следующей процедуре. Консенсусные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека известны в данной области (см., например, "VBASE" human germline sequence database; 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, описания каждой из которых включены в настоящий документ посредством ссылки, поскольку они относятся к консенсусным последовательностям тяжелой цепи и легкой цепи человеческого антитела. Используя установленные процедуры, специалист в данной области может

идентифицировать каркасные остатки вариабельного домена и CDR консенсусной последовательности антитела (например, путем выравнивания последовательности). Можно заменить одну или несколько CDR вариабельных доменов тяжелой цепи и/или легкой цепи консенсусного антитела человека одной или несколькими соответствующими CDR антитела нечеловеческого происхождения, которое связывается с CD5, для получения гуманизированного антитела. Этот обмен CDR может быть выполнен с использованием методов генной инженерии, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники.

Один пример вариабельного домена консенсусного антитела человека включает вариабельный домен тяжелой цепи **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVAVISENGSD TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGAVSYFDVWGQGLT**LVTVSS (SEQ ID NO: 259) и вариабельный домен легкой цепи **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLES**GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYNSLPYTFGGGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 260), идентифицированный в патенте США No. 6054297, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к консенсусным последовательностям человеческого антитела. CDR в вышеуказанных последовательностях показаны жирным шрифтом.

Для получения гуманизированных антител можно рекомбинантно экспрессировать полинуклеотид, кодирующий вышеуказанную консенсусную последовательность, в которой одна или несколько CDR вариабельной области были заменены одной или несколькими последовательностями CDR вариабельной области антитела нечеловеческого происхождения, которое связывается с CD5. Поскольку аффинность антитела к CD5 определяется, главным образом, последовательностями CDR, ожидается, что полученное гуманизированное антитело будет проявлять аффинность к CD5, примерно такую же, как аффинность антитела нечеловеческого происхождения, из которого было получено гуманизированное антитело. Способы определения аффинности антитела к целевому антигену включают, например, методы на основе ELISA, описанные здесь и известные в данной области, а также поверхностный плазмонный резонанс, анизотропию флуоресценции и изотермическую калориметрию титрования, среди других.

Способность интернализации полученных антител или их фрагментов может быть оценена, например, с использованием анализов интернализации радионуклидов, известных в данной области. Например, анти-CD5-антитела или их фрагменты, идентифицированные с использованием способов дисплея *in vitro*, описанных здесь или известных в данной области, могут быть функционализированы путем включения радиоактивного изотопа, такого как <sup>18</sup>F, <sup>75</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>122</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>129</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>211</sup>At, <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>99</sup>Tc, <sup>169</sup>Yb, <sup>186</sup>Re, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>177</sup>Lu, <sup>77</sup>As, <sup>72</sup>As, <sup>86</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, или <sup>225</sup>Ac. Например, радиоактивные галогены, такие как <sup>18</sup>F, <sup>75</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>122</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>129</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>211</sup>At, могут быть включены в антитела или их фрагменты, используя шарики, такие как полистирольные шарики,

содержащие электрофильные галогеновые реагенты (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Радиоактивно меченые антитела или их фрагменты можно инкубировать с Т-клетками, В-клетками и/или НК-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 неинтернализированных антител или их фрагментов (например, с использованием холодного (4°C) 0,1 М глицинового буфера с pH 2,8). Интернализированные антитела или их фрагменты могут быть идентифицированы путем обнаружения испускаемого излучения (например,  $\gamma$ -излучения) образующихся Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток по сравнению с испускаемым излучением (например,  $\gamma$ -излучением) восстановленного промывочного буфера.

Для получения рекомбинантного антитела против CD5 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных методов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически 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 здесь. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Об экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США No. 5648237, 5789199, и 5840523. (см. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающий экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Клетки позвоночных также можно использовать в качестве хозяев. Например, могут быть полезны клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия почки эмбриона человека (293 или 293 клетки, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки детеныша хомячка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (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 крысы buffalo (BRL 3A); human lung cells (W138); клетки легкого человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR- CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и

клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеточных 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.), pp. 255-268 (2003). В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, Y0, NS0, Sp20 клетка).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

Цитотоксины

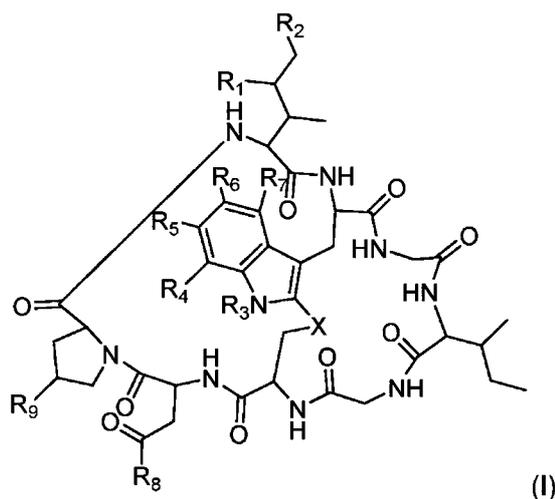
Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь (например, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD5), могут быть конъюгированы с цитотоксином, таким как экзотоксин A *pseudomonas*, де-Буганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, сапорин, майтансин, майтанзиноид, ауристати́н, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазефина, индолинбензодиазепин, и димер индолинбензодиазефина, или их вариант, или другим цитотоксическим соединением, описанным здесь или известным в данной области, для того, чтобы (i) непосредственно лечить рак или аутоиммунное заболевание, описанное в настоящем документе, или (ii) истощить эндогенные иммунные клетки с целью предотвращения или уменьшения вероятности отторжения гематопозитических стволовых клеток при трансплантации пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с интернализированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, так что после клеточного поглощения антитела или антигенсвязывающего фрагмента цитотоксин может получить доступ к своей внутриклеточной мишени и уничтожить эндогенные Т-клетки, В-клетки и/или НК клетки. Подходящие цитотоксины, подходящие для использования с композициями и способами, описанными здесь, включают ДНК-интеркалирующие средства (например, антрациклины), средства, способные разрушать ядерный митотический аппарат (например, алкалоиды барвинка, майтансин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин и его производные), средства, способные нарушать биосинтез белка (например, средства, которые проявляют активность р-РНК-N-гликозидазы, такие как сапорин и А-цепь рицина), среди других, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аматоксин или его производное.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аматоксин или его производное, такое как  $\alpha$ -аманитин,  $\beta$ -аманитин,  $\gamma$ -аманитин,  $\epsilon$ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин. Структуры различных

встречающихся в природе аматоксинов представлены формулой III и раскрыты, например, Zanotti et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 1987, 450-459.

В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой аманитин. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с аматоксином, чтобы образовать конъюгат, представленный формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент и Am представляет собой аматоксин. Многие положения в отношении аматоксинов или их производных могут служить в качестве положения для ковалентного связывания линкерного фрагмента L и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, могут быть связаны с аматоксином, чтобы образовать конъюгат, представленный формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Z представляет собой химический фрагмент, L представляет собой линкер и Am представляет собой аматоксин. В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

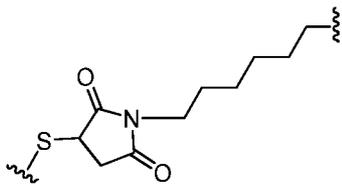
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5.

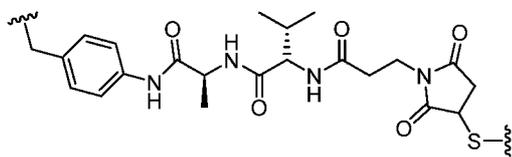
В некоторых вариантах осуществления Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает -(CH)<sub>2n</sub>- звено, где n представляет собой целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкер включает -((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), где n равно 6. В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой

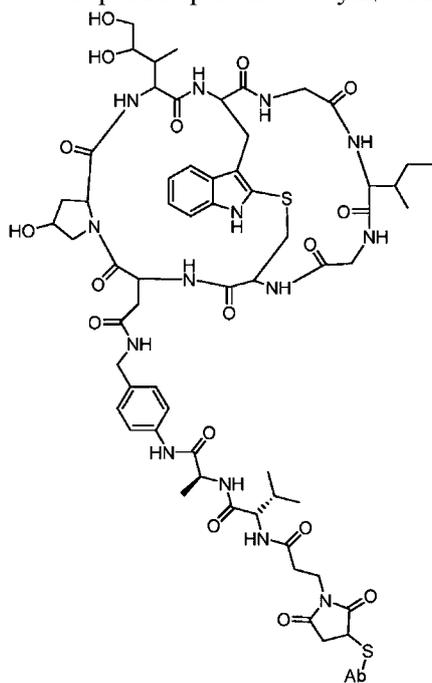


где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD117 (например, из группы -SH остатка цистеина).

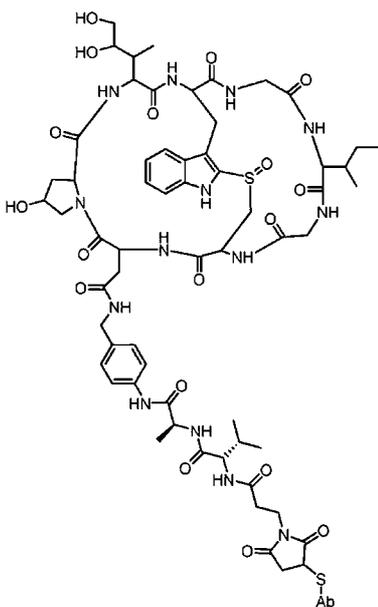
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



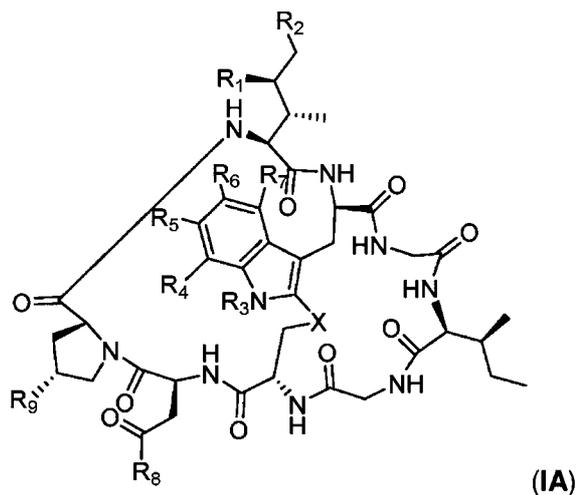
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен 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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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 алкил (например,  $C_1$ - $C_6$  алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например,  $C_1$ - $C_6$  гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например,  $C_2$ - $C_6$  алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

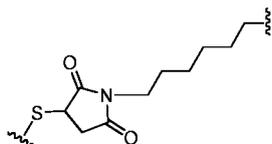
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например,  $C_1$ - $C_6$  алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен ( $C_1$ - $C_6$  гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например,  $C_2$ - $C_6$  алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например,  $C_2$ - $C_6$  алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен,

необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

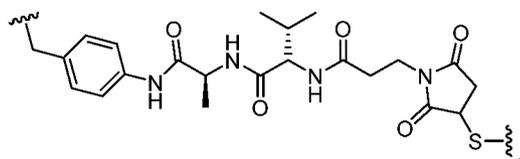
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

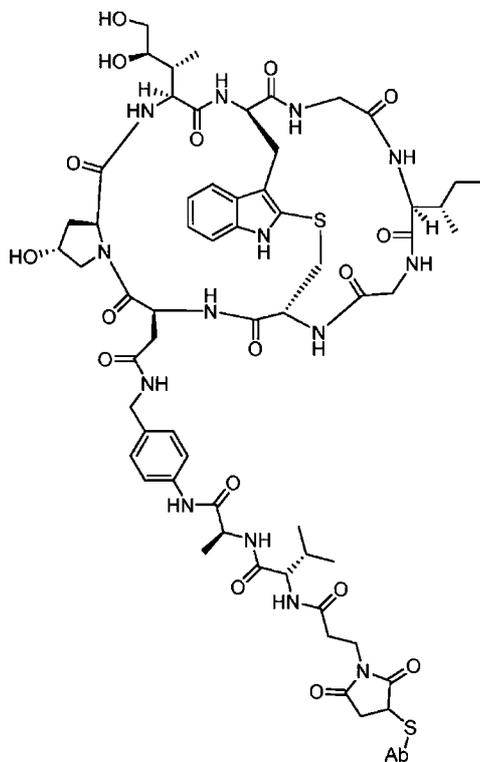
В некоторых вариантах осуществления линкер включает -((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), где n равно 6. В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



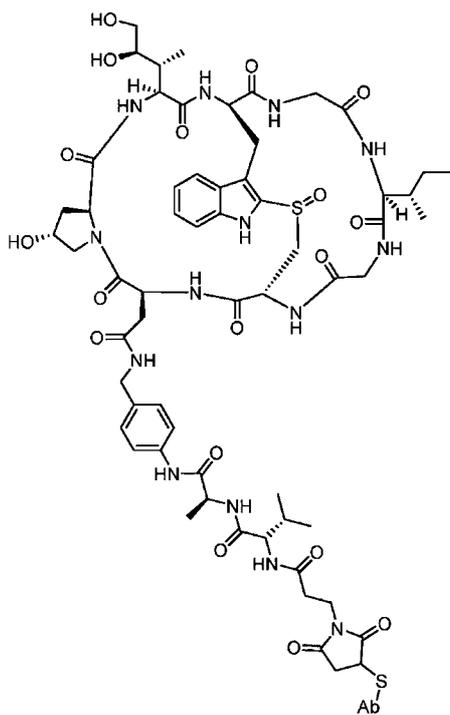
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



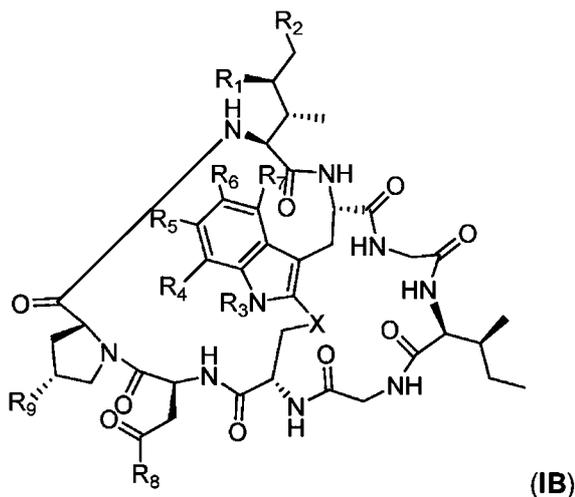
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

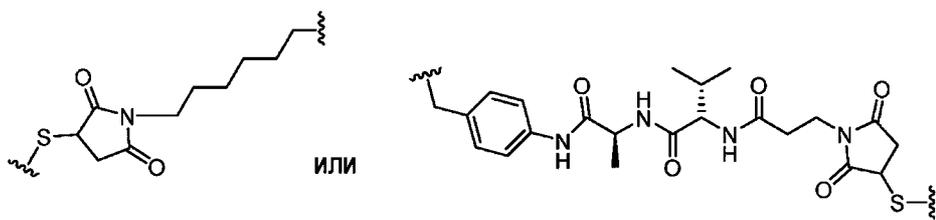
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

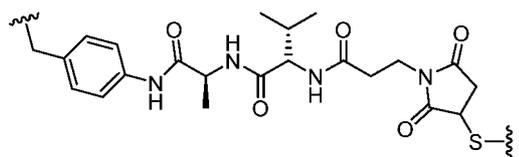
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5; и

где Am включает точно один заместитель R<sub>C</sub>.

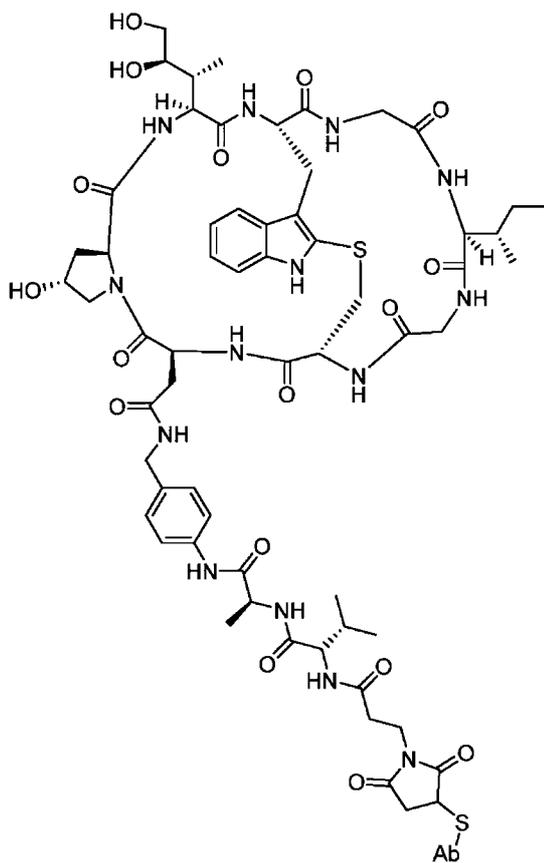
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



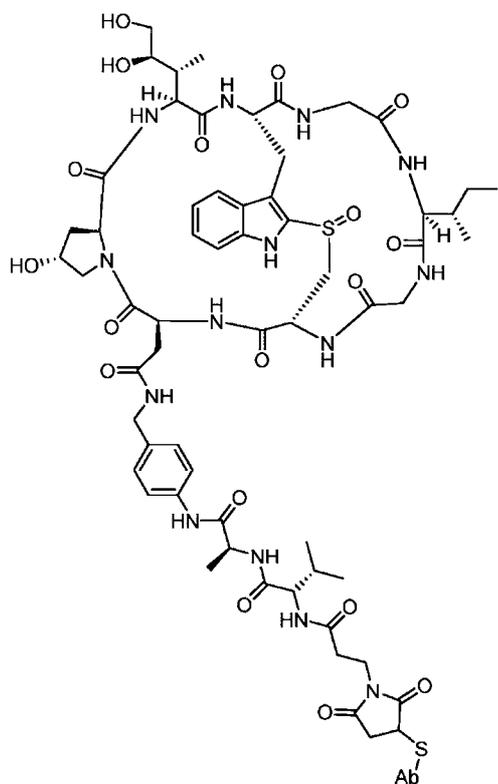
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



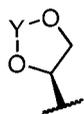
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; и

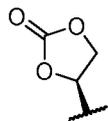
$R_E$  и  $R_{E'}$  представляют собой, каждый независимо, необязательно замещенный  $C_1-C_6$  алкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен- $R_C$ , необязательно 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 гетероариллен- $R_C$ .

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой **(IA)** или формулой **(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  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются 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

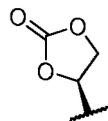
где  $R_C$  и  $R_D$ , каждый, такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой **(IA)** или формулой **(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  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H, OH,  $OR_C$ ,  $R_C$  или  $OR_D$ ;

$R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

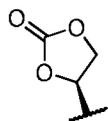
где X и  $R_C$  такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

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

$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



$R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X и  $R_C$  такие, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2016/0002298, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

$R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, 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  $R_C$  такой, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2014/0294865, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

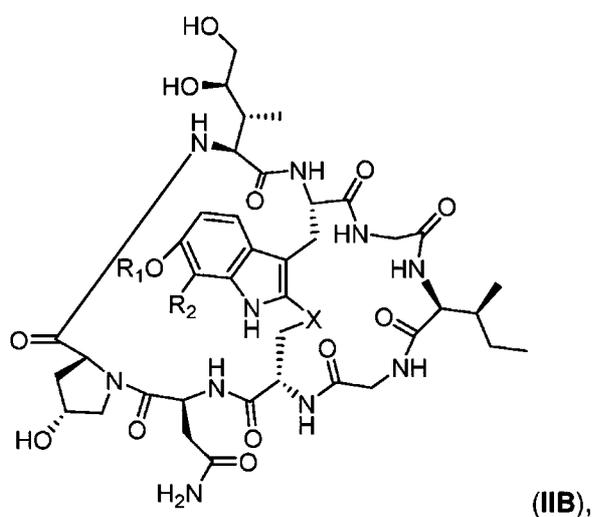
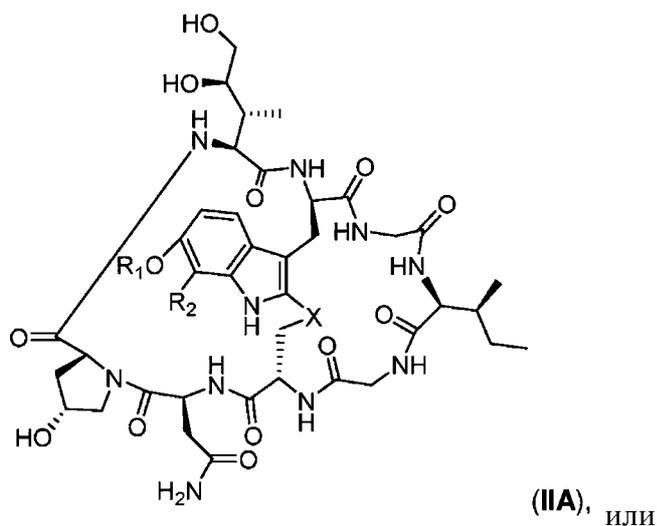
$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H, OH,  $OR_C$ , или  $R_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

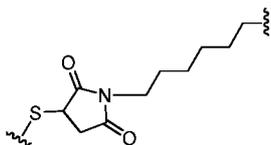
где  $R_C$  такой, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2015/0218220, раскрытие которой



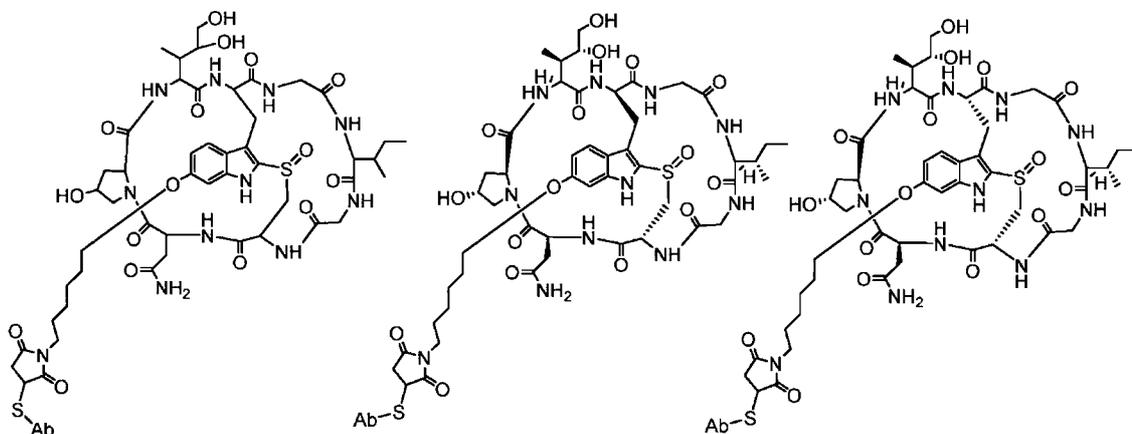


где X представляет собой S, SO, или SO<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - звено, где n представляет собой целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой линкер и R<sub>2</sub> представляет собой H, и линкер и химический фрагмент, вместе как L-Z, представляет собой



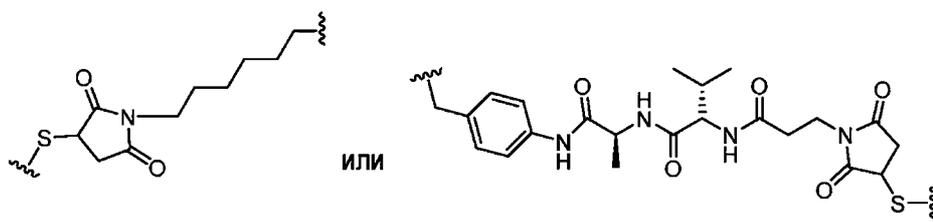
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab является одним из:



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой  $\alpha$ -аманитин. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -аманитин представляет собой соединение формулы III. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -аманитин формулы III присоединяется к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с CD5 через линкер L. Линкер L может быть присоединен к  $\alpha$ -аманитину формулы III в любом из нескольких возможных положений (например, любое из R<sup>1</sup>-R<sup>9</sup>), чтобы получить конъюгат  $\alpha$ -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>1</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>2</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>3</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>4</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>5</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>6</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>7</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>8</sup>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sup>9</sup>. 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 (РАВ). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент РАВ-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент РАВ-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$  звено, где n представляет собой целое число из 1-6

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(\text{CH}_2)_n-$  звено, где n представляет собой целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкер

представляет собой -PAB-Cit-Val-((C=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val-((C=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляет собой



Антитела и антигенсвязывающие фрагменты для использования с композициями и способами, описанными здесь, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, с использованием методов конъюгации, известных в данной области или описанных здесь. Например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD5, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, как описано в US 2015/0218220, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку она относится, например, к аматоксинам, таким как  $\alpha$ -аманитин и его варианты, а также ковалентным линкерам, которые можно использовать для ковалентной конъюгации. Способы синтеза получения аматоксинов описаны, например, в патенте США No. 9676702, который включен в настоящее описание посредством ссылки в отношении способов синтеза, раскрытых в нем.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты для использования с композициями и способами, описанными здесь, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, с использованием способов конъюгации, известных в данной области техники или описанных здесь. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD5, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, как описано в US 2015/0218220, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку она относится, например, к аматоксинам, таким как  $\alpha$ -аманитин и его варианты, а также ковалентным линкерам, которые можно использовать для ковалентной конъюгации.

Типичные конъюгаты антитело-лекарственное средство, применимые в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, могут быть образованы реакцией антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с аматоксином, который конъюгирован с линкером, содержащим заместитель, подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. Аматоксины, которые конъюгированы с линкером, содержащим заместитель, подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе, или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные здесь, включают, без ограничения, 7'C-(4-(6-(малеими́до)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеими́до)гексанами́до)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(6-(малеими́до)гексанами́до)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеими́до)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-



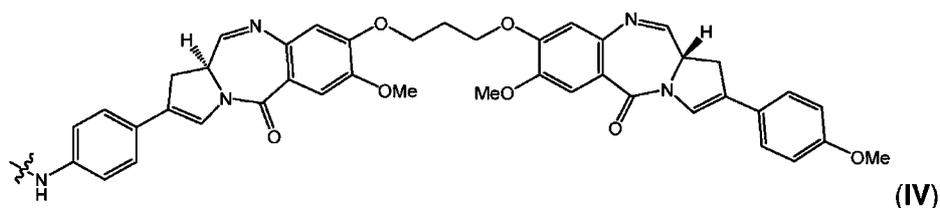
аматоксин; 7'C-((3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)-R-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(3-карбоксивпропанамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 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)циклогексанкарбоксамидо)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-ойл)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-диазаикосил)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)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-S-метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)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-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; б'О-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексил)-аматоксин; б'О-(5-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)-аматоксин; б'О-(2-((6-(малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)-аматоксин; б'О-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; б'О-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; б'О-(6-(2-бромацетамидо)гексил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(азидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(гекс-5-иноиламино)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; б'О-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-добенз[b, f]азоцин-5-ил)-6-оксогексанамидо)гексил)-аматоксин; б'О-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)-аматоксин; б'О-(6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)-аматоксин; б'О-((6-аминоокси)гексил)-аматоксин; и б'О-(6-(2-иодоацетамидо)гексил)-аматоксин. Вышеуказанные линкеры, среди прочих полезные в сочетании с композициями и способами, описанными здесь, описаны, например, в публикации заявки на патент США No. 2015/0218220, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Дополнительные цитотоксины, которые могут быть конъюгированы с антителами, и их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD5 для использования при непосредственном лечении рака, аутоиммунного заболевания или для кондиционирования пациента (например, пациента-человека) при подготовке к терапии, включающей трансплантацию гематопоэтической стволовой клетки, включает, без ограничения, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен, адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, альтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминоклевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антареликс, антидорсальный морфогенетический белок-1, антиандроген, карцинома предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколин глицинат, модуляторы генов апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновая кислота, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатиридин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины, бензоилстауроспорин, производные бета-лактама, бета-алетин, бетакламицин В, бетулиновую кислоту, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрен, бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен А, бизелезин, брефлат, блеомицин А2, блеомицин В2, бропиримин, будотитан, сульфоксимин бутионина, кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина (например, 10-гидроксикамптотецин), капецитабин, карбоксамидаминотриазол, карбоксамидотриазол, карзелезин, ингибиторы казеинкиназы, кастаноспермин, цекропин В, цетрореликс, хлорины, сульфонамид хлорхиноксалина, цикапрост, цис-порфириин, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллисмидин А, коллисмидин В, комбретастатин А4, аналог

комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, криснотол, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, окфосфат цитарабина, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, 2'-дезоксикоформицин (DCF), дезлорелин, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенилспиромустин, дискодермолид, докозанол, долазетрон, доксифлуридин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эделфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпителины, эпистерид, эстрамустин и его аналоги, этопозид, этопозид 4'-фосфат (также упоминается как этопофос), экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, фластерон, флударабин, гидрохлорид фтордауноруницина, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, тексафирин гадолиния, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомогаррингтонин (ННТ), гиперин, ибандроновую кислоту, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, иобенгуан, иоддоксорубицин, ипомеанол, иринотекан, ироплакт, ирсогладин, избенгазол, джасплакинолид, кагалалид F, ламелларин-N-триацетат, ланреотид, леинамицин, ленограстим, сульфат лентинана, лептостатин, летрозол, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобоплатин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, локсорибин, луртотекан, тексафирин лютеция, лизофиллин, мазопрокол, маспин, ингибиторы матриксной металлопротеиназы, меногарил, мербарон, метерелин, метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, мифепристон, милтефосин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол, митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, микапероксид В, мирапорон, 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, пегаспаргазу, пелдезин, пентозана полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритрексим, подофиллотоксин, порфирамицин, ингибиторы пурин-нуклеозид-фосфорилазы, ралтитрексед, ризоксин, роглетимид, рогитукин, рубигинон В1, рубоксил, сафингол, саинтопин, саркофитол А, сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфозивую кислоту, спикамицин D, спиромустин, стипиамид, сульфинозин, таллимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин, триметрексад, верамин, винорелбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и зиласкорб, среди других.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер пирролбензодиазепина, представленный формулой (IV):



Различные линкеры могут быть использованы для конъюгирования антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе (например, антител, их антигенсвязывающих фрагментов, которые распознают и связывают CD5 с цитотоксической молекулой.

Термин «линкер», используемый в настоящем документе, означает двухвалентный химический фрагмент, включающий ковалентную связь или цепь атомов, которые ковалентно присоединяют антитело или его фрагмент (Ab) к лекарственному фрагменту (D) с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (ADC; Ab-Z-L-D, где D представляет собой цитотоксин). Подходящие линкеры имеют два реакционноспособных конца, один для конъюгации с антителом, а другой для конъюгации с цитотоксином. Реакционноспособный конец конъюгации антитела линкера (реакционноспособный фрагмент, Z) обычно представляет собой сайт, который способен конъюгировать с антителом через цистеин тиоловую или лизин аминную группу на антителе, и, таким образом, обычно представляет собой тиолреактивную группу, такую как группа с двойной связью (как в малеимиде) или уходящая группа, такая как хлор, бром, йод или R-сульфанильная группа, или амин-реакционноспособную группу, такую как карбоксильная группа; в то время как реакционноспособный конец конъюгации антитела линкера обычно представляет собой сайт, который способен к конъюгации с цитотоксином посредством образования амидной связи с основной аминогруппой или карбоксильной группой на цитотоксине, и, таким образом, обычно является карбоксильной или основной амино-группой. Когда термин «линкер» используется при описании линкера в конъюгированной форме, один или оба реакционноспособных конца будут отсутствовать (например, реакционноспособный фрагмент Z, преобразованный в химический фрагмент Z) или неполными (например, являясь только карбонилем карбоновой кислоты) из-за образования связей между линкером и/или цитотоксином и между линкером и/или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Такие реакции конъюгации описаны ниже в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает лекарственное средство из антитела во внутриклеточной среде. В других вариантах осуществления линкерная единица не расщепляется, и лекарственное средство высвобождается, например, в результате разложения антител. Линкеры, используемые для настоящих ADC, предпочтительно являются стабильными внеклеточно, предотвращают агрегацию молекул ADC и поддерживают ADC свободно растворимым в водной среде и в мономерном состоянии. Перед транспортировкой или доставкой в клетку ADC предпочтительно является

стабильным и остается интактным, то есть антитело остается связанным с фрагментом лекарственное средство. Линкеры являются стабильными вне клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер будет: (i) поддерживать специфические свойства связывания антитела; (ii) допускать внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственное средство; (iii) оставаться стабильными и неповрежденными, т.е. не расщепленными, до тех пор, пока конъюгат не будет доставлен или транспортирован к его целевому месту; и (iv) сохраняют цитотоксический, убивающий клетки эффект или цитостатический эффект цитотоксического фрагмента. Стабильность ADC может быть измерена с помощью стандартных аналитических методов, таких как масс-спектрометрия, ВЭЖХ и методика разделения/анализа LC/MS. Ковалентное присоединение антитела и фрагмента лекарственное средство требует, чтобы линкер имел две реакционноспособные функциональные группы, то есть бивалентность в реакционноспособном смысле. Бивалентные линкерные реагенты, которые полезны для присоединения двух или более функциональных или биологически активных фрагментов, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, известны, и описаны способы получения их конъюгатов (Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p. 234-242).

Линкеры включают те, которые могут быть расщеплены, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в условиях щелочной среды, окислением, дисульфидным восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлоорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012, раскрытие которых включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации).

Линкеры, гидролизуемые в кислых условиях, включают, например, гидразоны, семикарбазоны, тиосемикарбазоны, цис-аконитовые амиды, ортоэфир, ацетали, кетали или тому подобное. (см., например, патенты США No. 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, таких как в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно pH лизосомы.

Линкеры, расщепляемые в восстанавливающих условиях, включают, например, дисульфид. Из уровня техники известны различные дисульфидные линкеры, включая, например, те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуол), SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al.,

1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США No. 4880935, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

Примеры линкеров, полезных для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают те, которые содержат электрофилы, такие как акцепторы Михаэля (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, среди прочих, подходящие для реакции с присутствующими нуклеофильными заместителями в антителах или антигенсвязывающих фрагментах, таких как аминокислотные и тиоловые фрагменты. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают, без ограничения, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидили йодоацетат (SIA), сульфо-SMCC, m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидил йодоацетат, среди прочих, описанных, например, Liu et al., 18:690-697, 1979, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно полезны для конъюгации средств, разрушающих микротрубочки, таких как ауристатины, которые описаны Doronina et al., *Bioconjugate Chem.* 17:14-24, 2006, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, как описано в настоящем документе, включают линкеры, способные высвободить цитотоксин с помощью процесса 1,6-элиминации («саморасщепляющаяся» группа), такие как p-аминобензиловый спирт (PABC), 6-малеимидогексановая кислота, pH-чувствительные карбонаты и другие реагенты, описанные в Jain et al., *Pharm. Res.* 32:3526-3540, 2015, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления линкер включает саморасщепляющуюся группу, такую как вышеупомянутая PAB или PABC (парааминобензилоксикарбонил), которые раскрыты, например, Carl et al., *J. Med. Chem.* (1981) 24:479-480; Chakravarty et al (1983) *J. Med. Chem.* 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; W098/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; W02004/032828). Другие такие химические фрагменты, способные к этому процессу («саморасщепляющиеся линкеры»), включают метилкарбаматы и гетероарильные группы, такие как аминотиазолы, аминокимидазолы, аминопиримидины и тому подобное. Линкеры, содержащие такие гетероциклические саморасщепляющиеся группы, раскрыты, например, в публикации патента США No. 20160303254 и 20150079114, и патенте США No. 7754681; Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237; US

2005/0256030; de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830; и US 7223837.

Линкеры, чувствительные к ферментативному гидролизу, могут быть, например, пептидсодержащим линкером, который расщепляется внутриклеточным ферментом пептидаза или протеаза, включая, но не ограничиваясь этим, лизосомальную или эндосомальную протеазу. Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства является то, что средство, как правило, ослабляется при конъюгировании, и стабильность в сыворотке крови конъюгатов обычно высока. В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер имеет длину не менее двух аминокислот или не менее трех аминокислот. Типичные аминокислотные линкеры включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры подходящих пептидов включают те, которые содержат аминокислоты, такие как валин, аланин, цитруллин (Cit), фенилаланин, лизин, лейцин и глицин. Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотный линкерный компонент, включают остатки, встречающиеся в природе, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Типичные дипептиды включают валин-цитруллин (vc или val-cit) и аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Типичные трипептиды включают глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, такой как Val-Cit, Ala-Val или Phe-Lys, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Arg или Trp-Cit. Линкеры, содержащие дипептиды, такие как Val-Cit или Phe-Lys раскрыты, например, в патенте США No. 6214345, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, поскольку он относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления дипептид используется в комбинации с саморасщепляющимся линкером.

Линкеры, подходящие для использования в настоящем документе, дополнительно могут включать одну или несколько групп, выбранных из C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилена, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилена, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилена, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилена, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилена, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилена, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена, гетероарилена, и их комбинаций, каждая из которых может быть необязательно замещенной. Неограничивающие примеры таких групп включают (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, и -(C=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - звенья, где n представляет собой целое число из 1-6, независимо выбранные для каждого случая.

В некоторых вариантах осуществления линкер может включать одно или несколько из гидразина, дисульфида, тиоэфира, дипептида, п-аминобензильной (РАВ) группы, гетероциклической саморасщепляющейся группы, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинила, необязательно замещенного C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, необязательно замещенного гетероциклоалкила,

необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероарила, ацила,  $-C(=O)-$ , или  $-(CH_2CH_2O)_n-$  группы, где  $n$  представляет собой целое число из 1-6. Специалисту в данной области понятно, что одна или несколько из перечисленных групп могут присутствовать в форме двухвалентного (дирадикального) вида, например,  $C_1-C_6$  алкилен и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает *p*-аминобензильную группу (PAB). В одном варианте осуществления *p*-аминобензильная группа расположена между цитотоксическим лекарственным средством и сайтом расщепления протеазой в линкере. В другом варианте осуществления *p*-аминобензильная группа является частью *p*-аминобензилоксикарбонильной группы. В другом варианте осуществления *p*-аминобензильная группа является частью *p*-аминобензиламидо-группы.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает комбинацию одного или нескольких пептидов, олигосахаридов,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, или Ala-PAB.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(C=O)(CH_2)_n-$  звено, где  $n$  представляет собой целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(CH_2)_n-$  звено, где  $n$  представляет собой целое число от 2 до 6.

В определенных вариантах осуществления линкер ADC представляет собой *N*-бета-малеимидопропил-Val-Ala-пара-аминобензил (BMP-Val-Ala-PAB).

Линкеры, которые можно использовать для конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксическим средством, включают линкеры, которые ковалентно связаны с цитотоксическим средством на одном конце линкера, а на другом конце линкера содержат химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которое связывается с CD5, включают, без ограничения, гидроксильные группы остатков серина, треонина и тирозина; аминогруппы остатков лизина; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиоловые группы остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галогенарильные (например, фтороарил), галогенгетероарильные (например, фторгетероарил), галогеналкильные и галогенгетероалкильные фрагменты не встречающихся в природе аминокислот.

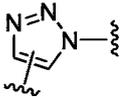
Примеры линкеров, полезных для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают те, которые содержат электрофилы, такие как акцепторы Михаэля

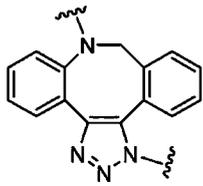
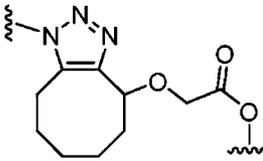
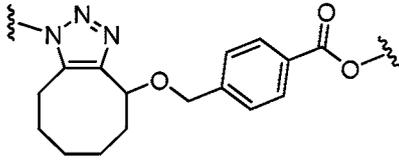
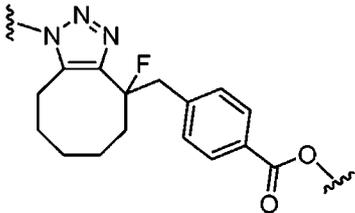
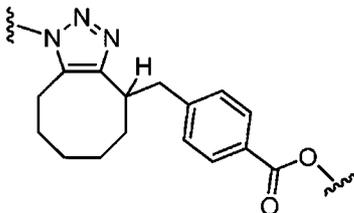
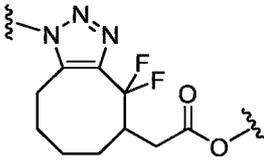
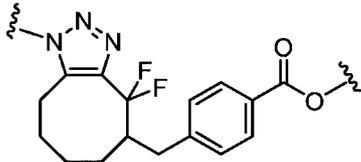
(например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения, и альдегиды, среди прочих, подходящие для реакции с присутствующими нуклеофильными заместителями в антителях или антигенсвязывающих фрагментах, таких как аминовые и тиоловые фрагменты. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают, без ограничения, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидили йодоацетат (SIA), сульфо-SMCC, m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидил йодоацетат, среди прочих, описанных, например, Liu et al., 18:690-697, 1979, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно полезны для конъюгации средств, разрушающих микротрубочки, таких как ауристатины, которые описаны Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации.

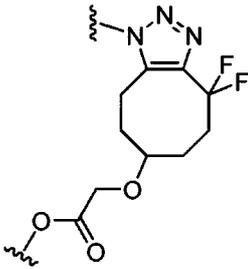
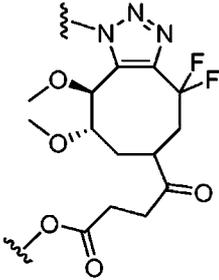
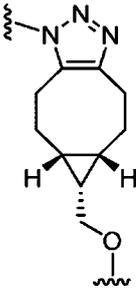
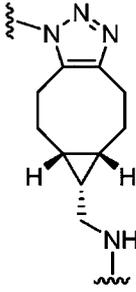
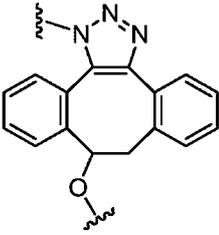
Специалисту в данной области будет понятно, что любая одна или несколько химических групп, фрагментов и признаков, раскрытых в настоящем документе, могут быть объединены множеством способов с образованием линкеров, полезных для конъюгации антител и цитотоксинов, как описано в данном документе. Дополнительные линкеры, полезные в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в опубликованной патентной заявке США No. 2015/0218220, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

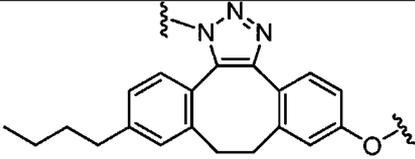
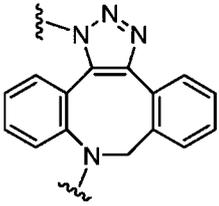
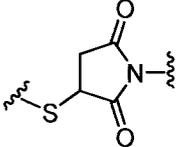
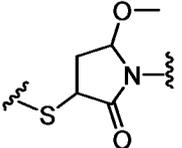
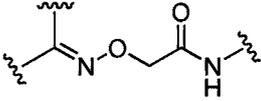
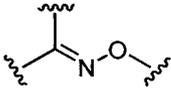
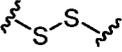
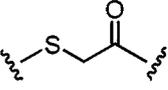
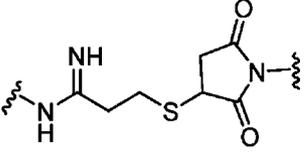
Линкеры, используемые в сочетании с конъюгатами антитело-лекарственное средство, описанными в настоящем документе, включают, без ограничения, линкеры, содержащие химические фрагменты, образованные реакциями сочетания, как показано в таблице 2 ниже. Волнистые линии обозначают точки присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту и цитотоксической молекуле, соответственно.

Таблица 2. Типичные химические фрагменты, образованные реакциями сочетания при образовании конъюгатов антитело-лекарственное средство

Типичные реакции сочетания	Химические фрагменты Z, образованные реакциями 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	

<p>[3+2] циклоприсоединение, этерификация</p>	
<p>[3+2] циклоприсоединение, этерификация</p>	
<p>[3+2] циклоприсоединение, этерификация</p>	
<p>[3+2] циклоприсоединение, этерификация</p>	
<p>[3+2] циклоприсоединение, этерификация</p>	

[3+2] циклоприсоединение, этерификация	
[3+2] циклоприсоединение	
реакция присоединения Михаэля	
реакция присоединения Михаэля	
Конденсация имина, амидирование	
Конденсация имина	
образование дисульфида	
алкилирование тиола	
конденсация, реакция присоединения Михаэля	

Специалист в данной области поймет, что реакционноспособный заместитель Z, присоединенный к линкеру, и реакционноспособный заместитель на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, участвуют в реакции ковалентного связывания с образованием химического фрагмента Z и распознают реакционноспособный заместитель Z. Следовательно, конъюгаты антитело-лекарственное средство, применимые в сочетании

со способами, описанными в настоящем документе, могут быть образованы реакцией антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, как описано здесь, линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, включающий реакционноспособный заместитель Z, подходящий для реакции с реакционноспособным заместителем на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, с образованием химического фрагмента Z. Как показано в таблице 3, примеры подходящих реакционноспособных заместителей на линкере и антителе или его антигенсвязывающем фрагменте включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галогеналкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ $\alpha,\beta$ -ненасыщенный карбонил, среди прочих), пару диен/диенофил (например, пара азид/алкин, или диен/ $\alpha,\beta$ -ненасыщенный карбонил, среди прочих) и тому подобное. Реакции сочетания между реакционноспособными заместителями с образованием химического фрагмента Z включают, без ограничения, алкилирование тиола, гидроксилалкилирование, алкилирование амина, конденсацию амина или гидроксиламина, образование гидразина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение Гуйсгена, среди прочих), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционные модификации, известные в данной области техники или описанные в настоящем документе. Предпочтительно, линкер содержит электрофильную функциональную группу для реакции с нуклеофильной функциональной группой на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают, без ограничения, нуклеофильные группы, такие как (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковой цепи, например, лизин, (iii) тиольные группы боковой цепи, например, цистеин и (iv) сахарные гидроксильные или аминогруппы, где антитело является гликозилированным. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают, без ограничения, гидроксильные группы остатков серина, треонина и тирозина; аминогруппы остатков лизина; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиоловые группы остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галогенарильные (например, фтороарил), галогенгетероарильные (например, фторгетероарил), галогеналкильные и галогенгетероалкильные фрагменты не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные заместители, присутствующие в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают аминовые или тиоловые фрагменты. Некоторые антитела имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, то есть цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реактивными для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстановителем, таким как DTT (дитиотреитол). Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически образует два

реакционноспособных тиоловых нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела посредством реакции лизинов с 2-иминотиоланом (реагент Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут быть введены в антитело (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, получения мутантных антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатков цистеина). В патенте США No. 7521541 описаны сконструированные антитела путем введения реакционноспособных аминокислот цистеина.

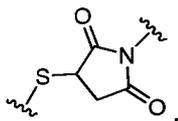
В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный фрагмент Z, присоединенный к линкеру, представляет собой нуклеофильную группу, которая взаимодействует с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, но не ограничиваются ими, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы может взаимодействовать с электрофильной группой на антителе и образует ковалентную связь с антителом. Подходящие нуклеофильные группы на линкере включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амина, гидроксил, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид. В некоторых вариантах осуществления Z является продуктом реакции между реакционно-способными нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителах, или их антигенсвязывающих фрагментах, такими как аминная и тиоловая группы, и реакционноспособным электрофильным заместителем Z. Например, Z может быть акцептором Михаэля (например, малеимидом), активированным эфиром, электронодефицитным карбонильным соединением или альдегидом, среди других.

В некоторых вариантах осуществления ADC включает антитело против CD5, конъюгированное с аматоксином любой из формул I, IA, IB, II, IIА или IIВ, как описано в настоящем документе, через линкер и химический фрагмент Z. В некоторых вариантах осуществления линкер включает 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  $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n$  - звено, где n представляет собой целое число из 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val- $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n$  -.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(\text{CH}_2)_n$  - звено, где n представляет собой целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val- $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n$  -. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val- $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n$  -, где n равно 6.

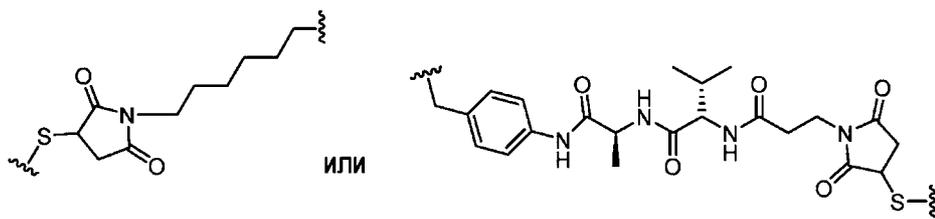
В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z выбран из таблицы

1. В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z представляет собой



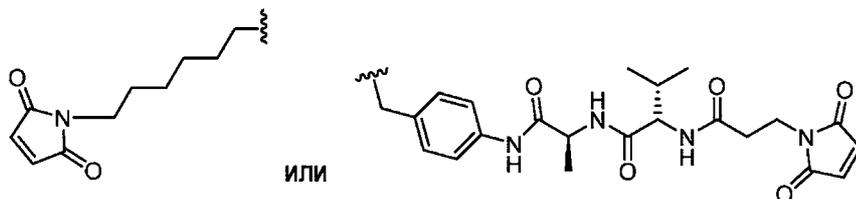
где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD5 (например, из группы -SH остатка цистеина).

В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



Специалисту в данной области понятно, что структура группы линкер-реакционноспособный заместитель, перед конъюгированием с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом включает малеимид в качестве группы Z. Описанные выше линкерные фрагменты и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочих, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в опубликованной патентной заявке США No. 2015/0218220 и опубликованной патентной заявке No. WO2017/149077, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления структура группы линкер-реакционноспособный заместитель, перед конъюгированием с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

В ADC формулы I, как описано в настоящем документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с одной или несколькими фрагментами цитотоксического лекарственного средства (D), например, от примерно 1 до примерно 20 лекарственных фрагментов на антитело через линкер L и химический фрагмент Z, как описано в настоящем документе. ADC по настоящему изобретению могут быть получены несколькими путями с использованием реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области, включая: (1) реакцию реакционноспособного

заместителя антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с двухвалентным линкерным реагентом с образованием Ab-Z-L, как описано здесь выше, с последующей реакцией с лекарственным фрагментом D; или (2) реакцию реакционноспособного заместителя лекарственного фрагмента с двухвалентным линкерным реагентом с образованием D-L-Z с последующей реакцией с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь выше, с образованием ADC формулы D-L-Z-Ab, такого как Am-Z-L-Ab. Дополнительные способы получения ADC описаны в настоящем документе.

В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет один или несколько остатков лизина, которые можно химически модифицировать для введения одной или нескольких сульфгидрильных групп. ADC затем образуется путем конъюгирования через атом серы сульфгидрильной группы, как описано здесь выше. Реагенты, которые можно использовать для модификации лизина, включают, но не ограничиваются ими, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолан гидрохлорид (реагент Траута).

В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь одну или несколько углеводных групп, которые могут быть химически модифицированы, чтобы иметь одну или несколько сульфгидрильных групп. ADC затем образуется путем конъюгирования через атом серы сульфгидрильной группы, как описано здесь выше.

В еще одном аспекте антитело может иметь одну или несколько углеводных групп, которые могут быть окислены с образованием альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al., *J. Med. Chem.* 1989, 32(3), 548-55). ADC затем образуется путем конъюгирования через соответствующий альдегид, как описано здесь выше. Другие протоколы модификации белков для присоединения или ассоциации цитотоксинов описаны в Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

Способы конъюгирования линкер-лекарственные фрагменты с белками-мишенями, такими как антитела, иммуноглобулины или их фрагменты, найдены, например, в патенте США No. 5208020; патенте США No. 6441163; WO2005037992; WO2005081711; и WO2006/034488, все из которых настоящим прямо включены в качестве ссылки в полном объеме.

Альтернативно, слитый белок, содержащий антитело и цитотоксическое средство, можно получить, например, рекомбинантными методами или синтезом пептидов. Длина ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо смежные друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не разрушает требуемые свойства конъюгата.

#### Способы лечения

Как описано в настоящем документе, терапия, включающая трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, может быть назначена субъекту, нуждающемуся в лечении, для заселения или повторного заселения одного или нескольких типов клеток

крови. Гематопозитические стволовые клетки, как правило, проявляют мультипотентность и, таким образом, могут дифференцироваться в несколько различных клеточных линий крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, кровяные пластинки), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглия, остеокласты и лимфоциты (например, НК-клетки, В-клетки и Т-клетки). Гематопозитические стволовые клетки дополнительно способны к самообновлению и, таким образом, могут давать дочерние клетки, которые имеют эквивалентный потенциал, как материнская клетка, а также обладают способностью реинтродуцироваться реципиенту трансплантата, после чего они размещаются в нише гематопозитических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Таким образом, гематопозитические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или дефицитом одного или нескольких типов клеток гематопозитической линии, для восстановления дефектной или дефицитной популяции клеток *in vivo*, для лечения патологии, связанной с дефектом или истощением в популяции эндогенных клеток крови. Композиции и способы, описанные здесь, могут, таким образом, использоваться для лечения незлокачественной гемоглобинопатии (например, гемоглобинопатия, выбранная из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотта-Олдрича). Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные здесь, могут быть использованы для лечения иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные здесь, могут быть использованы для лечения приобретенного иммунодефицита (например, приобретенный иммунодефицит, выбранный из группы, состоящей из ВИЧ и СПИДа). Композиции и способы, описанные здесь, могут быть использованы для лечения метаболического нарушения (например, метаболическое нарушение, выбранное из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза и метакроматической лейкоцистозии).

Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные здесь, могут быть использованы для лечения злокачественного или пролиферативного расстройства, такого как гематологический рак, миелопролиферативный синдром. В случае лечения рака композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть применены пациенту перед терапией, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, для истощения популяции иммунных клеток, которые вступают в перекрестную реакцию с и создают иммунный ответ против чужих гематопозитических стволовых клеток, таких как клетки, экспрессирующие один или несколько чужих антигенов МНС. Это служит для предотвращения или уменьшения вероятности отторжения трансплантированных трансплантатов гематопозитических стволовых клеток, позволяя трансплантированным гематопозитическим стволовым клеткам попасть в нишу стволовых

клеток и установить продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может воссоздать популяцию клеток, истощенных во время эрадикации раковых клеток, например, во время системной химиотерапии. Примеры гематологических злокачественных опухолей, которые можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, и неходжкинская лимфома, а также другие раковые заболевания, включая нейробластому.

Дополнительные заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, аденозиндезаминазную недостаточность и тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром гипериммуноглобулина М, болезнь Чедиака-Хигаши, врожденный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, незавершенный остеогенез, болезни накопления, большая талассемия, системный склероз, системная красная волчанка, рассеянный склероз, и ювенильный ревматоидный артрит.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты, описанные здесь, могут быть использованы для индукции толерантности к трансплантации солидного органа. Например, композиции и способы, описанные здесь, могут быть использованы для истощения или удаления популяции иммунных клеток перед трансплантацией гематопозитических стволовых клеток. После такого истощения клеток из тканей-мишеней популяция стволовых клеток или клеток-предшественников от донора органов (например, гематопозитических стволовых клеток от донора органов) может быть введена реципиенту трансплантата и после приживания таких стволовых клеток или клеток-предшественников, может быть достигнут временный или стабильный смешанный химеризм, что обеспечивает долгосрочную переносимость органа трансплантата без необходимости в дополнительных иммуносупрессивных средствах. Вероятность отторжения трансплантированного трансплантата может быть уменьшена, или отторжение может быть полностью предотвращено путем введения антитела против CD5 или его антигенсвязывающего фрагмента. Таким образом, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для индукции переносимости трансплантата у реципиента трансплантата солидного органа (например, трансплантат почки, трансплантат легкого, трансплантат печени и трансплантат сердца, среди других). Композиции и способы, описанные здесь, хорошо подходят для использования в связи с индукцией толерантности к трансплантации солидного органа, например, потому что низкий процент временного или стабильного приживания донора является достаточным для индукции длительной толерантности трансплантированного органа.

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для непосредственного лечения раковых заболеваний, таких как раковые заболевания, характеризующиеся клетками, которые являются CD5+. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для

лечения лейкоза, особенно у пациентов с лейкозными клетками CD5+. Истощая CD5+ раковые клетки, такие как лейкозные клетки, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для непосредственного лечения различных видов рака. Примеры раковых заболеваний, которые можно лечить таким образом, включают гематологические злокачественные опухоли, такие как острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, и неходжкинская лимфома,

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения аутоиммунных расстройств. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, такому как пациент-человек, страдающему аутоиммунным расстройством, чтобы убить CD5+ иммунную клетку. Иммунная клетка CD5+ может представлять собой аутореактивный лимфоцит, такой как Т-клетка, которая экспрессирует рецептор Т-клетки, который специфически связывает и устанавливает иммунный ответ против собственного антигена. Путем истощения аутореактивных CD5+ клеток, композиции и способы, описанные здесь, могут использоваться для лечения аутоиммунных патологий, таких как описанные ниже. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания путем истощения популяции эндогенных гематопозитических стволовых клеток перед терапией, включающей трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут занять нишу, созданную стадией истощения эндогенных клеток, и установить продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может воссоздать популяцию клеток, истощенных во время аутоиммунной эрадикации клеток.

Аутоиммунные заболевания, которые можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, псориаз, псориатический артрит, сахарный диабет 1 типа (диабет 1 типа), ревматоидный артрит (RA), системную волчанку человека (SLE), рассеянный склероз (MS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), лимфоцитарный колит, острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальную алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром (APS), апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, целиакия-герпетиформный дерматит, синдром холодной агглютинации, CREST-синдром, Дегоса синдром, дискоидную волчанку, вегето-сосудистую дистонию, эндометриоз, первичную криоглобулинемию смешанного типа, фибромиалгия-фибромиозит, синдром Гудпасчера, заболевание Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS),

тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическую и/или острую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, идиопатический легочный фиброз, IgA нейропатию, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, синдром Кавасаки, красный плоский лишай, Лаймскую болезнь, болезнь Меньера, смешанное поражение соединительной ткани (MCTD), миастению гравис, нейромитонию, опсо-миоклональный синдром (OMS), неврит зрительного нерва, атрофическую форму аутоиммунного тиреоидита, вульгарный пемфигус, пернициозную анемию, полихондрию, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узелковый полиартериит, олигандулярный синдром, ревматическую полимиалгию, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматический полиартрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром скованного человека, синдром Такаюсу, темпоральный артериит (также известный как "гигантский клеточный артериит"), язвенный колит, коллагенозный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводиния ("вульварный вестибулит"), и гранулематоз Вегенера.

Например, используя композиции и способы, описанные в настоящем документе, специалист в данной области может вводить субъекту, страдающему аутоиммунным заболеванием, анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для лечения аутоиммунной патологии. Например, субъект может страдать от склеродермии, рассеянного склероза, язвенного колита, болезни Крона, и/или диабета 1 типа. Для облегчения одного или несколько из этих состояний, врач в данной области может назначить и ввести субъекту антитело против CD5 или его фрагмент, такое как антитело или его фрагмент, которое связано с цитотоксическим средством. Антитело или его фрагмент могут быть конъюгированы с цитотоксическим средством с использованием методов конъюгации и линкеров, подробно описанных выше. Различные цитотоксические средства могут быть конъюгированы с антителом против CD5 или его антигенсвязывающим фрагментом, чтобы истощить популяцию эндогенных, аутореактивных CD5+ Т-клеток, В-клеток или NK-клеток у субъекта. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с аматоксином или другим фрагментом цитотоксина, описанным здесь.

При подготовке к терапии врач может оценить количество или концентрацию аутореактивных Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от субъекта. Это может быть сделано, например, с использованием методов анализа FACS, известных в данной области. Специалист в данной области может затем ввести субъекту антитело или его фрагмент либо отдельно, либо конъюгированным с цитотоксином, чтобы истощить популяцию аутореактивных Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток. Для оценки эффективности терапии, врач может определить количество или концентрацию аутореактивных Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от пациента, в момент, следующий за введением антитела против CD5, или его фрагмента. Определение того, что количество или концентрация аутореактивных Т-клеток, В-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от субъекта после терапии, относительно количества или концентрации Т-клеток, В-клеток или NK-клеток до начала терапии обеспечивает признак

того, что пациент реагирует на антитело против CD5 или его фрагмент.

Конъюгаты антител с лекарственными средствами, содержащие анти-CD5-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, также можно использовать в сочетании с CAR T терапией. В частности, эффективное количество конъюгата анти-CD5-антитело лекарственное средство можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, до CAR T лечения для истощения нативных Т-клеток. Истощение нативных Т-клеток, экспрессирующих CD5, с использованием способов и композиций, описанных в настоящем документе, может обеспечить более эффективный перенос сконструированных Т-клеток, используемых в CAR T-терапии.

#### Способы введения и дозирования

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, можно вводить пациенту (например, пациенту-человеку, нуждающемуся в терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток) в различных лекарственных формах. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантации гематопозитических стволовых клеток и/или страдающему раковым заболеванием или аутоиммунным заболеванием, в форме водного раствора, такого как водный раствор, включающий один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. Типичные фармацевтически приемлемые эксципиенты для использования с композициями и способами, описанными здесь, представляют собой модификаторы вязкости. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методик, известных в данной области техники.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, можно вводить различными путями, такими как пероральный, чрескожный, подкожный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, внутриглазной или парентерально. Наиболее подходящий путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретного вводимого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пациента, способов получения фармацевтической композиции, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста пациента, массы тела, пола, тяжести заболеваний, подвергаемых лечению, питания пациента и скорости экскреции пациента.

Эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанная в настоящем документе, может составлять, например, от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг/кг (например, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,01 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг) массы тела на однократное введение (например, болюс), многократное введение или непрерывное введение, или для достижения оптимальной концентрации в сыворотке (например, концентрации в сыворотке приблизительно 0,0001- приблизительно 5000 мкг/мл (например, приблизительно 0,0001-0,001 мкг/мл, приблизительно 0,001-0,01 мкг/мл, приблизительно 0,01-0,1 мкг/мл,

приблизительно 0,1-1 мкг/мл, приблизительно 1-10 мкг/мл, приблизительно 10-100 мкг/мл, приблизительно 100-1000 мкг/мл, приблизительно 1000-2000 мкг/мл, приблизительно 2000-3000 мкг/мл или приблизительно 3000-5000 мкг/мл) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Дозу можно вводить один или несколько раз (например, 2-10 раз) в день, неделю или месяц субъекту (например, человеку), проходящему кондиционирующую терапию при подготовке к получению трансплантата гематопоэтических стволовых клеток. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гематопоэтических стволовых клеток, например, во время, которое оптимально истощает CD5+ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, которые вступают в перекрестную реакцию с чужим антигеном гематопоэтических стволовых клеток, таким как чужой антиген МНС, до трансплантации гематопоэтических стволовых клеток. Например, анти-CD5-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить пациенту, подвергающемуся терапии, включающей трансплантацию гематопоэтических стволовых клеток, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней или приблизительно 7 дней) или более до введения экзогенного трансплантата гематопоэтических стволовых клеток. Время полужизни антитела может составлять от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа или приблизительно 24 часа).

В одном варианте осуществления антитело против CD5 (или его Fc-содержащий фрагмент) имеет уменьшенное время полужизни (по сравнению с Fc-областью дикого типа), где Fc-область антитела содержит мутацию H435A (нумерация в соответствии с EU-индексом).

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем описании, специалист в данной области может подготовить пациента, такого как пациент-человек, чтобы

способствовать приживлению экзогенных трансплантатов гематопозитических стволовых клеток перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. С этой целью, специалист в данной области техники может ввести пациенту-человеку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способное связываться с CD5, такое как анти-CD5 антитело, описанное здесь. Антитело или его фрагмент могут быть ковалентно конъюгированы с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная здесь или известная в данной области техники, или доменом Fc. Например, анти-CD5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ковалентно конъюгированы с цитотоксином, таким как экзотоксин *A pseudomonas*, де-Буганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, сапорин, майтансин, майтанзиноид, ауристин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазефина, индолинбензодиазепин, димер индолинбензодиазефина, или его вариант. Это конъюгирование может быть выполнено с использованием методик образования ковалентных связей, описанных здесь или известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство впоследствии могут быть введены пациенту, например, внутривенным введением до трансплантации экзогенных гематопозитических стволовых клеток (таких как аутологичные, сингенные или аллогенные гематопозитические стволовые клетки) пациенту.

Анти-CD5 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества эндогенных Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток, таких как резидентные Т-клетки костного мозга, например, на примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или более до трансплантации гематопозитических стволовых клеток. Например, анти-CD5 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества эндогенных Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток, таких как резидентные Т-клетки костного мозга, например, примерно на 10%-20%, примерно на 20-30%, примерно на 30-40%, примерно на 40-50%, примерно на 50-60%, примерно на 60-70%, примерно на 70%-80%, примерно на 80%-90%, примерно на 90%-95%, или более до трансплантации гематопозитических стволовых клеток. Например, анти-CD5 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества эндогенных Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток, таких как резидентные Т-клетки костного мозга, например, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, или более до трансплантации гематопозитических стволовых клеток. Снижение количества

Т-клеток можно контролировать с использованием обычных методов, известных в данной области, таких как анализ FACS клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены Т-клеток, в образце крови, взятой у пациента с различными интервалами во время кондиционирующей терапии. Например, специалист в данной области может отобрать образец костного мозга у пациента в различные моменты времени во время кондиционирующей терапии и определить степень уменьшения эндогенных Т-клеток путем проведения анализа FACS для выяснения относительных концентраций Т-клеток в образце с использованием антител, которые связываются с антигенами Т-клеточного маркера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, когда концентрация Т-клеток достигает минимального значения в ответ на кондиционирующую терапию антителом против CD5, его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство, врач может завершить кондиционирующую терапию и может начать подготовку пациента к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Анти-CD5 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, таких как модификатор вязкости. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методик, известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в дозе, например, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг до (например, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,01 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг) введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней или приблизительно 7 дней) или более до введения экзогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

После завершения кондиционирующей терапии пациент может затем получить инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых

клеток, например, от того же врача, который проводил кондиционирующую терапию, или от другого врача. Врач может вводить пациенту инфузию аутологичных, сингенных или аллогенных гематопозитических стволовых клеток, например, в дозе от приблизительно  $1 \times 10^3$  до приблизительно  $1 \times 10^9$  гематопозитических стволовых клеток/кг (от приблизительно  $1 \times 10^3$  гематопозитических стволовых клеток до приблизительно  $1 \times 10^4$ , от приблизительно  $1 \times 10^4$  гематопозитических стволовых клеток до приблизительно  $1 \times 10^5$ , от приблизительно  $1 \times 10^5$  гематопозитических стволовых клеток до приблизительно  $1 \times 10^6$ , от приблизительно  $1 \times 10^6$  гематопозитических стволовых клеток до приблизительно  $1 \times 10^7$ , или от приблизительно  $1 \times 10^8$  гематопозитических стволовых клеток до приблизительно  $1 \times 10^9$ ).

Врач может контролировать приживание трансплантата гематопозитических стволовых клеток, например, путем взятия образца крови у пациента и определения увеличения концентрации гематопозитических стволовых клеток или клеток ростка кроветворения (таких как мегакариоциты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты) после введения трансплантата. Этот анализ можно проводить, например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 месяцев или более после терапии, включающей трансплантацию гематопозитических стволовых клеток (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 13 недель, приблизительно 14 недель, приблизительно 15 недель, приблизительно 16 недель, приблизительно 17 недель, приблизительно 18 недель, приблизительно 19 недель, приблизительно 20 недель, приблизительно 21 неделя, приблизительно 22 недели, приблизительно 23 недели, приблизительно 24 недели, или более). Обнаружено, что концентрация гематопозитических стволовых клеток или клеток ростка кроветворения увеличилась (например, на примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 100%, примерно 200%

примерно 500% или более) после трансплантационной терапии относительно концентрации соответствующего типа клеток до трансплантационной терапии указывает на то, что лечение анти-CD5-антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство успешно способствует приживлению трансплантированного трансплантата гематопоетических стволовых клеток.

#### Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области техники описание того, как композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть применены, получены и оценены, и предназначены исключительно для иллюстрации изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением.

#### Пример 1: *In vitro* анализ связывания анти-CD5-антител.

Для определения характеристик связывания анти-CD5-антитела 5D7 hIgG1 проводили исследования связывания антитела при 25 градусах Цельсия в 1x PBS, дополненном 0,1% масс./об. бычьего сывороточного альбумина с помощью Pall ForteBio Octet Red96 с использованием биослойной интерферометрии (BLI). Очищенное человеческое анти-CD5-антитело (5D7) иммобилизировали на биосенсорах с анти-Fc человека (АНС; Pall ForteBio 18-5063) и инкубировали с 50 нМ очищенного человеческого CD5 эктодомена). Характеристики связывания анти-CD5-антитела 5D7 приведены в таблице 3. Анти-CD5-антитело человека 5D7, используемое в примерах 1-5, представляет собой гуманизованную версию мышинового антитела 5D7 (см. US 2008/0254027). Последовательности антитела 5D7, используемые в настоящем документе, описаны в SEQ ID NO: 257 и 258 (аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи) и SEQ ID NO: 29-34 (CDR тяжелой и легкой цепи).

Таблица 3: Кинетика связывания 5D7 с человеческим CD5 эктодоменом

Антитело	Кон. (нМ)	Ответ (нМ)	$K_D$ (М)	$K_{ON}$ (1/Мс)	$K_{DIS}$ (1/с)	Полный $R^2$
5D7	50	0,6696	1,41E-10	2,39E+05	3,36E-05	0,9996

#### Пример 2: *In vitro* анализ связывания клеточной линии анти-CD5-антител

Клетки MOLT-4 (то есть иммортализованная клеточная линия Т-лимфобластов человека) высевали в количестве 20000 клеток/лунку и окрашивали с титрованием указанных мышинных антител против CD5 (т.е. L17F12, UCNT2, 205919, и CRIS-1) в течение 2 часов при 4°C. Вторичное анти-мышинное AF488 краситель в постоянном количестве добавляли в течение 30 минут при 4°C. После промывки планшеты пропускали на проточном цитометре и определяли связывание указанного антитела (и отрицательный контроль, т.е. mIgG1) на основании средней геометрической интенсивности флуоресценции в канале AF488. Результаты этих анализов представлены на фиг. 1.

Как показано на фиг.1, мышинные анти-CD5-антитела L17F12 (Thermo Fisher), UCNT2 (BioLegend), 205919 (Novus Biologicals), и CRIS-1 (Novus Biologicals) связывались

с человеческими Т-лимфобластными клетками (т.е. клетками MOLT-4), с  $EC_{50}=207$  пМ (L17), 354 пМ (UCH), 1350 пМ (205) и 43 пМ (CRIS).

Пример 3: *In vitro* анализ связывания первичных клеток с анти-CD5-антителами

Первичные Т-клетки человека высевали при  $8 \times 10^4$  клеток/лунку и окрашивали титрованием человеческого анти-CD5-антитела 5D7 в течение 2 часов при  $37^\circ\text{C}$ . Вторичное анти-мышинное AF488 краситель в постоянном количестве добавляли в течение 30 минут при  $4^\circ\text{C}$ . После промывки планшеты пропускали на проточном цитометре и определяли связывание анти-CD5-антитела (и отрицательный контроль, т.е. hIgG1) на основании средней геометрической интенсивности флуоресценции в канале AF488. Результаты этих анализов представлены на фиг. 2.

Как показано на фиг.2, анти-CD5-антитело 5D7 связывалось с первичными Т-клетками человека с  $EC_{50}=3,0$  пМ.

Пример 4. *In vitro* анализ конъюгата анти-CD5-аматоксинового антитела с лекарственным средством (ADC) с использованием анализа уничтожения Т-клеток *in vitro*

Анти-CD5 антитело 5D7 конъюгировали с аматоксином (аманитин) с расщепляемым линкером с образованием анти-CD5 5D7ADC. Были протестированы анти-CD5 5D7-ADC, имеющие отношение лекарственное средство к антителу (DAR) примерно 6 (межцепочечный DAR6), а также анти-CD5 5D7-ADC, имеющие DAR примерно 2 (полученные с использованием сайт-специфической конъюгации через D265C мутации). Кроме того, быстрый вариант полураспада анти-CD5 5D7-ADC был получен путем введения мутации H435A в область Fc.

Каждый анти-CD5 5D7-ADC оценивали с использованием анализа уничтожения Т-клеток человека *in vitro*.

Криоконсервированные отрицательно отобранные первичные Т-клетки человека оттаивали и стимулировали анти-CD3-антителами и IL-2. В начале анализа  $2 \times 10^4$  Т-клеток высевали на лунку 384-луночного планшета, и указанные ADC или неконъюгированное анти-CD5-антитело добавляли в лунки при различных концентрациях от 0,003 нМ до 30 нМ перед помещением в инкубатор с  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . После пяти дней культивирования клетки анализировали проточной цитометрией. Клетки окрашивали маркером жизнеспособности 7-AAD и запускали на объемном проточном цитометре.

Количество жизнеспособных Т-клеток (фиг. 3А и 3В) определяли с помощью FSC vs SSC и 7-AAD. Неконъюгированное анти-CD5 5D7-антитело служило в качестве компаратора (фиг. 3А).

Как показано на фиг.3А, анти-CD5 5D7-ADC, имеющие DAR около 6, демонстрируют сильное и специфическое уничтожение Т-клеток человека ( $IC_{50}=3,7$  пм), тогда как Т-клетки остаются жизнеспособными в присутствии неконъюгированных («голых») анти-CD5 5D7 антител. Как показано на фиг. 3В, ADC, имеющие сайт-специфический (D265C) DAR около 2, сохранили мощный уровень уничтожения Т-клеток ( $IC_{50}=5,0$  пм), аналогичный уровню DAR 6 ADC. Вариант анти-CD5 5D7-ADC с быстрым периодом полувыведения (H435A) демонстрировал сходный уровень гибели Т-клеток

(IC50=4,9 пм; фиг. 3B).

Пример 5. Анализ истощения Т-клеток с использованием мышинной модели hNSG

*In vivo* анализы истощения Т-клеток проводили с использованием гуманизированных мышей NSG (Jackson Laboratories). Анти-CD5 5D7 антитело конъюгировали с аматоксином (аманитин) с расщепляемым линкером с образованием анти-CD5 5D7-ADC. Анти-CD5 5D7-ADC получали либо в виде DAR около 6, либо в качестве DAR около 2, как описано выше. Каждый анти-CD5 5D7ADC (DAR6 или DAR2) вводили в виде одной внутривенной инъекции (0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг для ADC DAR6, или 1 мг/кг или 3 мг/кг для ADC DAR2) гуманизированной мыши. Образцы периферической крови, костного мозга или тимуса собирали в день 7, и абсолютное количество CD3+ Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии (см. фиг. 4А-4С для ADC DAR2 и 5А-5С для ADC DAR6).

Как показано на фиг. 4А-4В, гуманизированные NSG-мыши, получавшие 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг DAR6 анти-CD5 5D7-ADC, обнаруживали сильное истощение Т-клеток в периферической крови или костном мозге, в то время как Т-клетки тимуса истощались после получения 1 мг/кг или 3 мг/кг DAR6 анти-CD5 5D7-ADC. Отрицательные контроли, используемые в этом эксперименте *in vivo*, включали человеческий IgG1, не специфичный к CD5 (в виде голого антитела (huIgG1) и конъюгированный с аматоксином (huIgG1-AM). Как описано на фиг.4А-4В, huIgG1 голые и конъюгированные контроли не оказывали влияния на истощение Т-клеток в периферической крови (фиг.4А) и костном мозге (фиг.4В), поскольку эти контроли были сопоставимы с контролем PBS. Антитело против CD52 (антитело YTH34.5) также использовали в качестве контроля, и оно также могло истощать Т-клетки периферические и костного мозга в дозе 25 мг/кг.

Как показано на фиг. 5А-5С, у гуманизированных NSG-мышей, получивших лечение 1 мг/кг сайта или 3 мг/кг сайт-специфического DAR2 анти-CD5 5D7-ADC, обнаруживают сильное истощение Т-клеток в Т-клетках периферической крови, костном мозге и тимуса. На каждой из фиг.5А-5С голое антитело 5D7 также использовали в качестве контроля. Антитело 5D7 было способно истощать периферические Т-клетки (относительно неспецифического человеческого контроля IgG1 или PBS), как показано на фиг.5А, но не могло истощать ни Т-клетки костного мозга, ни Т-клетки тимуса, тогда как 5D7-AM ADC был эффективен при истощении как костного мозга, так и тимуса, как показано на фиг. 5В и 5С.

Таблица 4 Краткое описание последовательности

Идентификатор последовательности	Описание	Последовательность
SEQ ID NO:1	Вариабельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDI NSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY

		CQQYDESPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 2	Вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVQSGPGLKKPGGSVRISCAASGYTF TNYGMNWVKQAPGKGLRWMGWINTHT GEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQIN SLRAEDTATYFCTRREGYDWY FDVWGGQTTVTVSS
SEQ ID NO: 3	CDR-H1	GYTFTNY
SEQ ID NO: 4	CDR-H2	NTHTGE
SEQ ID NO: 5	CDR-H3	RGYDWYFDV
SEQ ID NO: 6	CDR-L1	RASQDINSYLS
SEQ ID NO: 7	CDR-L2	RANRLVD
SEQ ID NO: 8	CDR-L3	QQYDESPWT
SEQ ID NO: 9	Вариабельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDI NSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 10	Вариабельная область тяжелой цепи	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTF TNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHY GEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQIN SLRAEDTAVYFCTRREGYDWYFDVWVWQ GGTTVTVSS
SEQ ID NO: 11	CDR-H1	GYTFTNY
SEQ ID NO: 12	CDR-H2	NTHYGE
SEQ ID NO: 13	CDR-H3	RRGYDWYFDV
SEQ ID NO: 14	CDR-L1	RASQDINSYLS
SEQ ID NO: 15	CDR-L2	RANRLES
SEQ ID NO: 16	CDR-L3	QQYDESPWT
SEQ ID NO: 17	CDR-H1	GYSITSGYY
SEQ ID NO: 18	CDR-H2	ISYSGFT
SEQ ID NO: 19	CDR-H3	AGDRTGSWFAY
SEQ ID NO: 20	CDR-L1	QDISNY

SEQ ID NO: 21	CDR-L2	ATS
SEQ ID NO: 22	CDR-L3	LQYASYPFT
SEQ ID NO: 23	CDR-H1	GYIFTNYG
SEQ ID NO: 24	CDR-H2	INTYNGEP
SEQ ID NO: 25	CDR-H3	ARGDYGYEDY
SEQ ID NO: 26	CDR-L1	QGISNY
SEQ ID NO: 27	CDR-L2	YTS
SEQ ID NO: 28	CDR-L3	QQYSKLPWT
SEQ ID NO: 29	5D7 CDR-H1	FSLSTSGMG
SEQ ID NO: 30	5D7 CDR-H2	WWDDD
SEQ ID NO: 31	5D7 CDR-H3	RRATGTGFDY
SEQ ID NO: 32	5D7 CDR-L1	QDVGTA
SEQ ID NO: 33	5D7 CDR-L2	WTSTRHT
SEQ ID NO: 34	5D7 CDR-L3	YNSYNT
SEQ ID NO: 35-256		См. Таблицу 1 для обзора SEQ ID NO: 35-256
SEQ ID NO: 257	Вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного 5D7 (CDR выделены жирным шрифтом)	<b>QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSL</b> <b>STSGMGV</b> GWIRQAPGKGLEWVAHIWW <b>DDDVYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLK</b> LSSVTAADTAVYYC <b>VRRRATGTGFDY</b> WGQGT <b>LVTVSS</b>
SEQ ID NO: 258	Вариабельная область легкой цепи гуманизированного 5D7 (CDR выделены жирным шрифтом)	NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>QASQDV</b> <b>GTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHT</b> GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS <b>SLQPEDIATY</b> FCHQYNSYNTFGSGTKLEIK
SEQ ID NO: 259	вариабельный домен тяжелой цепи консенсусной последовательности человека (CDR выделены жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <b>CAASGFT</b> <b>FSDYAMSWVRQAPGKGLEWVAVISEN</b> <b>GSDTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ</b> MNSLRAEDTAVYYC <b>ARDRGGAVSYFD</b> <b>VWGQGT</b> LVTVSS

SEQ ID NO: 260	переменный домен легкой цепи консенсусной последовательности человека (CDR выделены жирным шрифтом)	<b>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDV</b> <b>SSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESG</b> <b>VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY</b> <b>CQYNSLPYTFGQGTKVEIKRT</b>
SEQ ID NO: 261	Аминокислотная последовательность CD5 человека	MVCSQSWGRS SKQWEDPSQA SKVCQRLNCG VPLSLGPFLV TYTPQSSIIC YGQLGSFSNCSHSRNDMCHS LGLTCLEPQK TTPPTTRPPP TTTPEPTAPP RLQLVAQSGG QHCAGVVEFYSGSLGGTISY EAQDKTQDLE NFLCNNLQCG SFLKHLPETE AGRAQDPGEP REHQPLPIQWKIQNSSCTSL EHCFRKIKPQ KSGRVLALLC SGFQPKVQSR LVGGSSICEG TVEVRQGAQWAALCDSSSAR SSLRWEEVCR EQQCGSVNSY RVLDA GDPTS RGLFCPHQKL SQCHELWERN SYCKKVFVTC QDPNPAGLAA GTVASIILAL VLLVLLVVC GPLAYKKLVK KFRQKKQRQWIGPTGMNQNM SFHRNHTATV RSHAENPTAS HVDNEYSQPP RNSHLSAYPA LEGALHRSSMQPDNSSDSY DLHGAQRL

#### Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно способно к дополнительным модификациям, и настоящая заявка предназначена для охвата любых вариантов, применений или адаптаций изобретения, следуя, в общем, принципам изобретения и включая такие отклонения от изобретения, которые входят в известную или общепринятую практику в области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше, и следуют из объема формулы изобретения.

Другие варианты осуществления находятся в пределах формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

2. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

3. Способ предотвращения отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом-человеком трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

4. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

5. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

6. Способ, включающий:

a. введение пациенту-человеку анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD5, в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином; и

b. затем введение пациенту трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

7. Способ по любому из п.п. 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

8. Способ по любому из п.п. 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает набор CDR варибельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR варибельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела ОКТ1, продуцируемого линией клеток гибридомы с номером доступа ATCC CRL 8000.

9. Способ по любому из п.п. 1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие варибельные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWMGWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRGRGYDWY  
FDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2); или

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
NIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDVGTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHTGVP  
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 258); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQAPGKGLEWVAHIWDDDD  
VYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWGQGLV  
TVSS (SEQ ID NO: 257).

10. Способ по любому из п.п. 1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

11. Способ по любому из п.п. 1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность EIQLVQSGGGLVKPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWGMWI NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

12. Способ по любому из п.п. 1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

13. Способ по любому из п.п. 1-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом, интактного антитела, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

14. Способ по п. 13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Способ по любому из п.п. 1-14, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD, и IgE.

16. Способ по п. 15, где изотип IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

17. Способ по любому из п.п. 1-16, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из

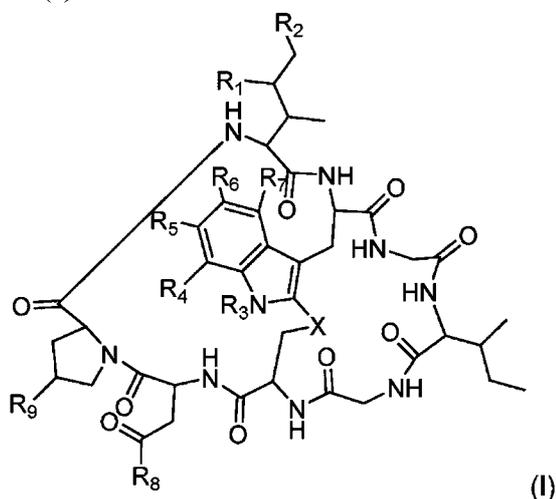
экзотоксина *A pseudomonas*, де-Буганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатиона, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или его варианта.

18. Способ по п. 17, где цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

19. Способ по п. 18, где ингибитор РНК-полимеразы представляет собой ингибитор РНК-полимеразы II.

20. Способ по п. 19, где ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой аматоксин.

21. Способ по любому из п.п. 1-16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am аматоксин, представленный формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$ , или  $R_D$ ;

$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый независимо, 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$ , или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)-, или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил,

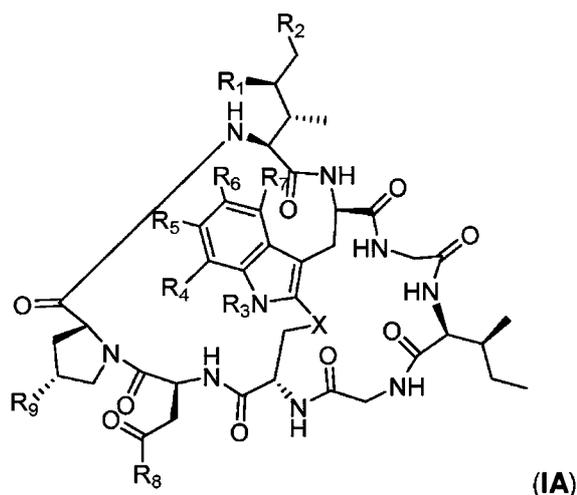
необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарил; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

22. Способ по п. 21, где Am-L-Z представлен формулой (IA).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно

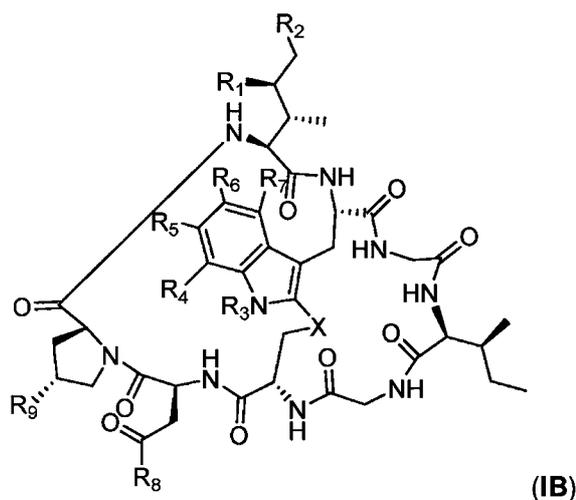
замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте; и

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

23. Способ по п. 21, где Am-L-Z представлен формулой (IB).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

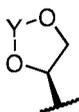
$R_D$  представляет собой optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкил, optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкинил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинил, optionally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

L представляет собой optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкилен, optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкинилен, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинилен, optionally замещенный циклоалкилен, optionally замещенный гетероциклоалкилен, optionally замещенный арилен, optionally замещенный гетероарилен, дипептид,  $-C(=O)-$ , пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель  $R_C$ .

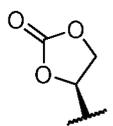
24. Способ по п. 22 или 23, где  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$ , или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; и

$R_E$  и  $R_{E'}$  представляют собой, каждый независимо, optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкинилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинилен- $R_C$ , optionally замещенный циклоалкилен- $R_C$ , optionally замещенный гетероциклоалкилен- $R_C$ , optionally замещенный арилен- $R_C$ , или optionally замещенный гетероарилен- $R_C$ .

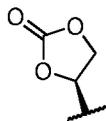
25. Способ по п. 24, где  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



26. Способ по п. 22 или 23, где  $R_1$  представляет собой H, OH или  $OR_A$ ;

$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



$R_3, R_4, R_6,$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

27. Способ по п. 22 или 23, где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

$R_4, R_6,$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

28. Способ по п. 22 или 23, где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3, R_6,$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

29. Способ по п. 22 или 23, где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

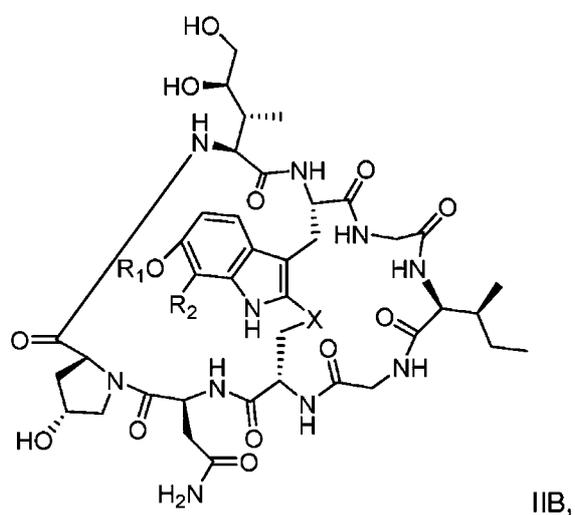
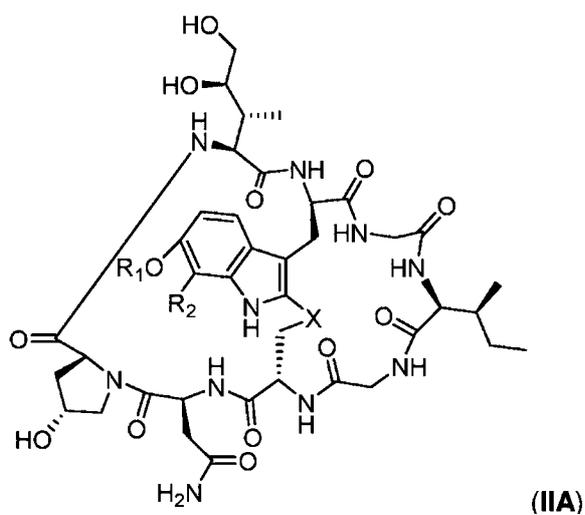
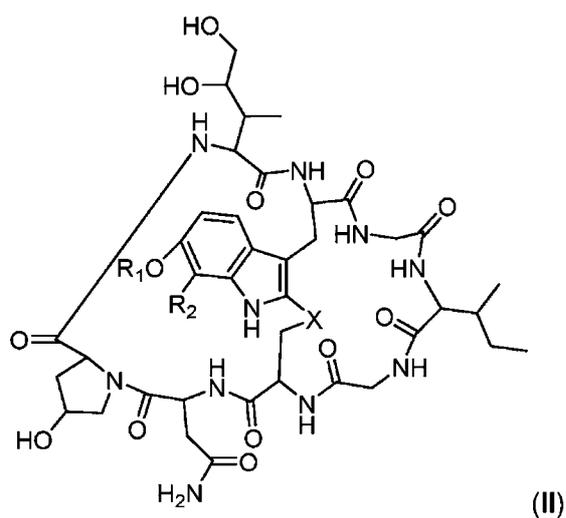
$R_3, R_6,$  и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_8$  представляет собой  $OR_C$  или  $NHR_C$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

30. Способ по любому из п.п. 1-16, где антители или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой  $Ab-L-Z-Am$ , где  $Ab$  представляет собой антители или его антигенсвязывающий фрагмент,  $Z$  представляет собой химический фрагмент,  $L$  представляет собой линкер, и  $Am$  представляет собой аматоксин, и конъюгат аматоксин-линкер  $Am-L-Z$  представлен формулой (II), формулой (III), или формулой (IV)



где X представляет собой S, SO, или SO<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и

R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его

антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте;

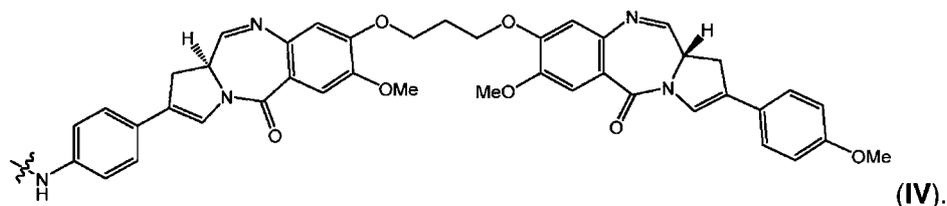
где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

31. Способ по любому из п.п. 1-16, где цитотоксин представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

32. Способ по любому из п.п. 1-16, где цитотоксин представляет собой ауристин, например, ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристина E и монометил ауристина F.

33. Способ по любому из п.п. 1-16, где цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

34. Способ по любому из п.п. 1-16, где цитотоксин представляет собой производное димера пирролбензодиазепина, представленное формулой (IV)



35. Способ по любому из п.п. 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, интернализируется иммунной клеткой после введения пациенту.

36. Способ по любому из п.п. 1-35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно стимулировать некроз иммунной клетки.

37. Способ по любому из п.п. 1-34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно рекрутировать один или несколько белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

38. Способ по любому из п.п. 35-37, где иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки и НК-клетки.

39. Способ по любому из п.п. 3-38, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

40. Способ по п. 39, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 1 часа до 7 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

41. Способ по п. 39, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 6 часов до 3 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

42. Способ по п. 39, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 12 часов до 36 часов после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

43. Способ по п. 39, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту через 24 часа после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

44. Способ по любому из п.п. 3-43, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство поддерживают функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток через два или несколько дней после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

45. Способ по любому из п.п. 3-44, где гематопозитические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

46. Способ по любому из п.п. 3-44, где гематопозитические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

47. Способ по п. 46, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-совместимыми по отношению к пациенту.

48. Способ по п. 46, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми по отношению к пациенту.

49. Способ по любому из п.п. 1-48, где популяция клеток CD5+ включает клетки CD34+.

50. Способ по любому из п.п. 1, 2, и 4-49, где популяция клеток CD5+ включает Т-клетки.

51. Способ по любому из п.п. 3-50, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гематопозитической ткани и/или восстанавливать гематопоз после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

52. Способ по любому из п.п. 3-51, где при трансплантации пациенту гематопозитические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, натуральных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

53. Способ по любому из п.п. 1-52, где пациент страдает расстройством, связанным

со стволовыми клетками.

54. Способ по любому из п.п. 1-53, где пациент страдает гемоглобинопатией.

55. Способ по п. 54, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотта-Олдрича.

56. Способ по п. 55, где гемоглобинопатия представляет собой анемию Фанкони.

57. Способ по п. 55, где гемоглобинопатия представляет собой апластическую анемию.

58. Способ по п. 55, где гемоглобинопатия представляет собой серповидноклеточную анемию.

59. Способ по п. 55, где гемоглобинопатия представляет собой талассемию.

60. Способ по любому из п.п. 1-59, где пациент страдает миелодиспластическим заболеванием.

61. Способ по любому из п.п. 1-60, где пациент страдает иммунодефицитным состоянием.

62. Способ по п. 61, где иммунодефицитное состояние представляет собой врожденный иммунодефицит.

63. Способ по п. 61, где иммунодефицитное состояние представляет собой приобретенный иммунодефицит.

64. Способ по п. 63, где приобретенный иммунодефицит представляет собой вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита.

65. Способ по любому из п.п. 1-64, где пациент страдает метаболическим нарушением.

66. Способ по п. 65, где метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, и метахроматической лейкоцистозии.

67. Способ по любому из п.п. 1-66, где пациент страдает раком.

68. Способ по п. 67, где рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и нейроblastомы.

69. Способ по п. 67, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

70. Способ по п. 67, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

71. Способ по п. 67, где рак представляет собой лимфоидный лейкоз.

72. Способ по п. 67, где рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

73. Способ по п. 67, где рак представляет собой хронический лимфоидный лейкоз.

74. Способ по п. 67, где рак представляет собой множественную миелому.

75. Способ по п. 67, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

76. Способ по п. 67, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

77. Способ по любому из п.п. 1-76, где пациент страдает расстройством, выбранным

из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака-Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита.

78. Способ по любому из п.п. 1-77, где пациент страдает аутоиммунным расстройством.

79. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого рассеянного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, Дегоса синдрома, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, заболевания Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой иммунной тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA нейропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, красного плоского лишая, Лаймской болезни, болезни Меньера, смешанного поражения соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, атрофической формы аутоиммунного тиреоидита, вульгарного пемфигуса, пернициозной анемии, полихондрии, полимиозита и дерматомиозита, первичного биллиарного цирроза, узелкового полиартериита, олигландулярного синдрома, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматического полиартрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, синдрома Такаюсу, темпорального артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии, и гранулематоза Вегенера.

80. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

81. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

82. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

83. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.
84. Способ по п. 78, где аутоиммунное расстройство представляет собой диабет 1 типа.
85. Способ по любому из п.п. 53-84, где способ лечит расстройство или рак.
86. Способ лечения расстройства, связанного со стволовыми клетками, у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.
87. Способ лечения гемоглобинопатии у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.
88. Способ по п. 87, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотга-Олдрича.
89. Способ по п. 87, где гемоглобинопатия представляет собой анемию Фанкони.
90. Способ по п. 87, где гемоглобинопатия представляет собой апластическую анемию.
91. Способ по п. 87, где гемоглобинопатия представляет собой серповидноклеточную анемию.
92. Способ по п. 87, где гемоглобинопатия представляет собой талассемию.
93. Способ лечения миелодиспластического заболевания у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.
94. Способ лечения иммунодефицитного состояния у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.
95. Способ по п. 94, где иммунодефицитное состояние представляет собой врожденный иммунодефицит.
96. Способ по п. 94, где иммунодефицитное состояние представляет собой приобретенный иммунодефицит.
97. Способ по п. 96, где приобретенный иммунодефицит представляет собой вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита.
98. Способ лечения метаболического нарушения у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

99. Способ по п. 98, где метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, и метахроматической лейкоцистозии.

100. Способ лечения рака у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

101. Способ по п. 100, где рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и нейроblastомы.

102. Способ по п. 100, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

103. Способ по п. 100, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

104. Способ по п. 100, где рак представляет собой лимфоидный лейкоз.

105. Способ по п. 100, где рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

106. Способ по п. 100, где рак представляет собой хронический лимфоидный лейкоз.

107. Способ по п. 100, где рак представляет собой множественную миелому.

108. Способ по п. 100, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

109. Способ по п. 100, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

110. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака - Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

111. Способ лечения аутоиммунного расстройства у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

112. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого рассеянного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида,

кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, Дегоса синдрома, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгит-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, заболевания Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой иммунной тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA нейтропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, красного плоского лишая, Лаймской болезни, болезни Меньера, смешанного поражения соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, атрофической формы аутоиммунного тиреоидита, вульгарного пемфигуса, пернициозной анемии, полихондрии, полимиозита и дерматомиозита, первичного биллиарного цирроза, узелкового полиартериита, олигандулярного синдрома, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматического полиартрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, синдрома Такаюсу, темпорального артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии, и гранулематоза Вегенера.

113. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

114. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

115. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

116. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.

117. Способ по п. 111, где аутоиммунное расстройство представляет собой диабет 1 типа.

118. Способ по любому из п.п. 86-117, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

119. Способ по любому из п.п. 86-117, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие переменные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDINSYLSWVQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQYDESPWTFGGGKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWGMWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY

FDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2); или

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVGTA VAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHTGVP  
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 258); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQAPGKGLEWVAHIWDDDD  
VYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWGQGTLV  
TVSS (SEQ ID NO: 257).

120. Способ по любому из п.п. 86-117, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

121. Способ по любому из п.п. 86-117, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
 EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
 NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW  
 YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

122. Способ по любому из п.п. 86-117, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

123. Способ по любому из п.п. 86-122, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным переменным доменом, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

124. Способ по п. 123, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

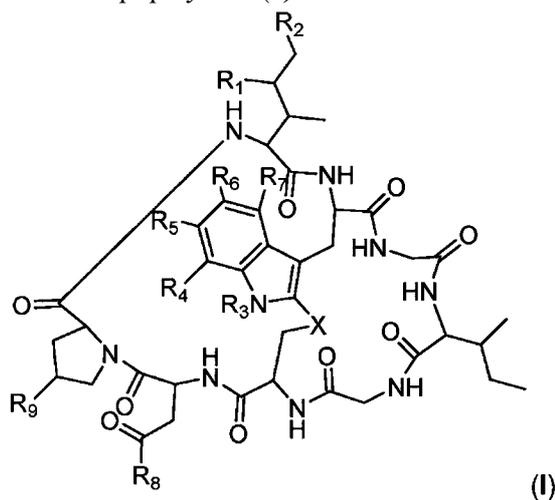
125. Способ по любому из п.п. 86-124, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD, и IgE.

126. Способ по п. 125, где изотип IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

127. Способ по любому из п.п. 86-126, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из экзотоксина A pseudomonas, де-Буганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или его варианта.

128. Способ по любому из п.п. 86-126, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am представляет собой аматоксин,

представленный формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$ , или  $R_D$ ;

$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый независимо, 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

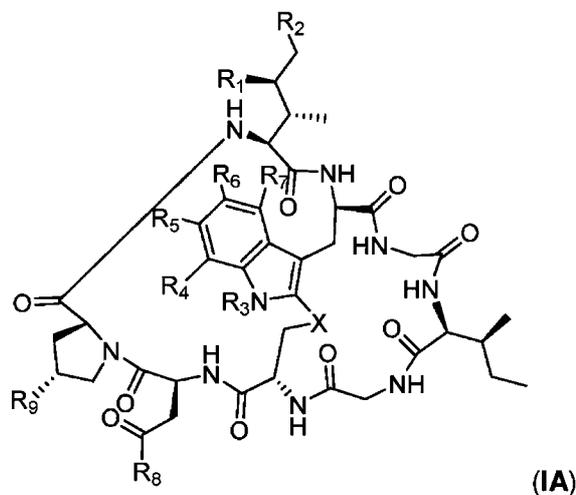
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его

антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

129. Способ по п. 128, где Am-L-Z представлен формулой (IA).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

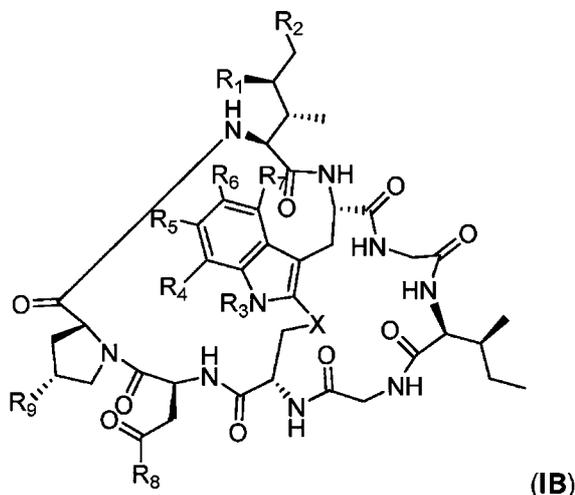
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции

сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

130. Способ по п. 128, где Am-L-Z представлен формулой (IB).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub>, или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)-, или SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

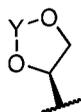
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид

или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

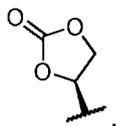
131. Способ по п. 129 или 130, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NR<sub>E</sub>)- или -C(R<sub>E</sub>R<sub>E</sub>')-; и

R<sub>E</sub> и R<sub>E</sub>' представляют собой, каждый независимо, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный циклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный гетероциклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный арилен-R<sub>C</sub>, или необязательно замещенный гетероарилен-R<sub>C</sub>.

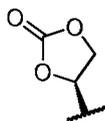
132. Способ по п. 131, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



133. Способ по п. 129 или 130, где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, или OR<sub>A</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, или OR<sub>B</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>5</sub> представляет собой OR<sub>C</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; and

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH.

134. Способ по п. 129 или 130, где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub> представляет собой R<sub>C</sub>;

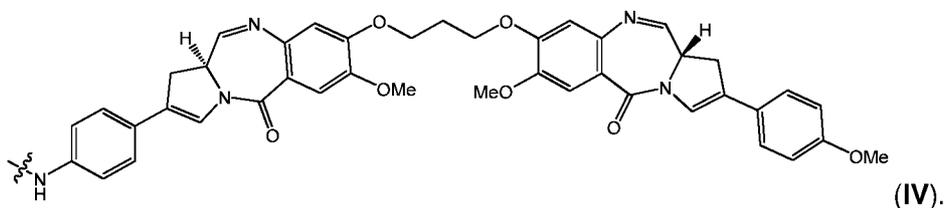




монометил ауристатин F.

140. Способ по любому из п.п. 86-126, где цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

141. Способ по любому из п.п. 86-126, где цитотоксин представляет собой производное димера пирролбензодиазепина, представленное формулой (IV)



142. Конъюгат, представленный формулой Ab-Cy, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с CD5, и Cy представляет собой цитотоксин, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из экзотоксина A pseudomonas, де-Буганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или его варианта.

143. Конъюгат по п. 142, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC HB 8000.

144. Конъюгат по п. 142, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

- d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);
- e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);
- f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

145. Конъюгат по п. 142, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

- a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);
- b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);
- c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);
- d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);
- e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и
- f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

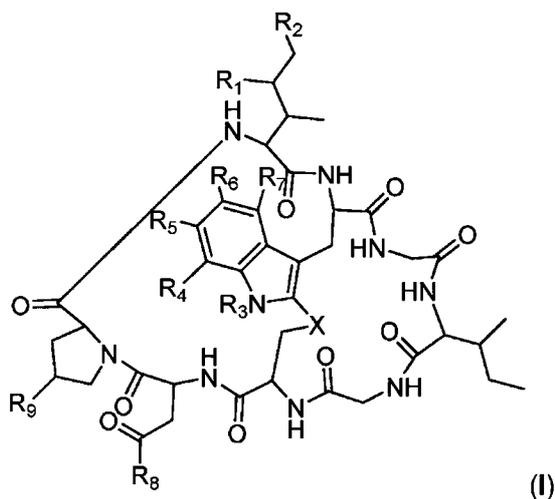
146. Конъюгат по любому из п.п. 142-145, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным переменным доменом, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

147. Конъюгат по п. 146, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

148. Конъюгат по любому из п.п. 142-147, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

149. Конъюгат по п. 148, где IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

150. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где C<sub>у</sub> представляет собой аматоксин (Am), представленный формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый независимо, 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

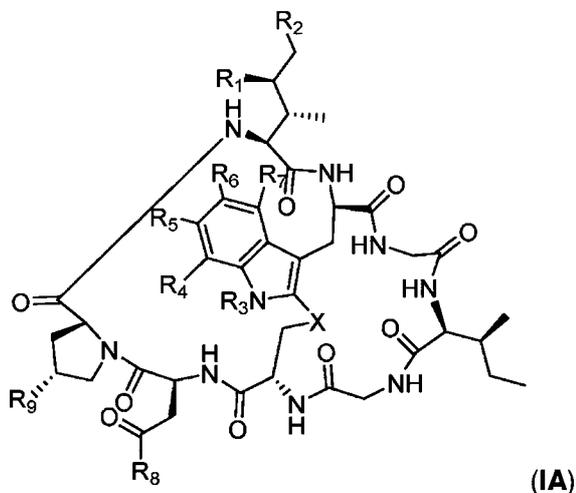
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, или необязательно замещенный гетероарилен; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

151. Конъюгат по п. 150, где Am представляет собой аматоксин, представленный формулой (IA).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

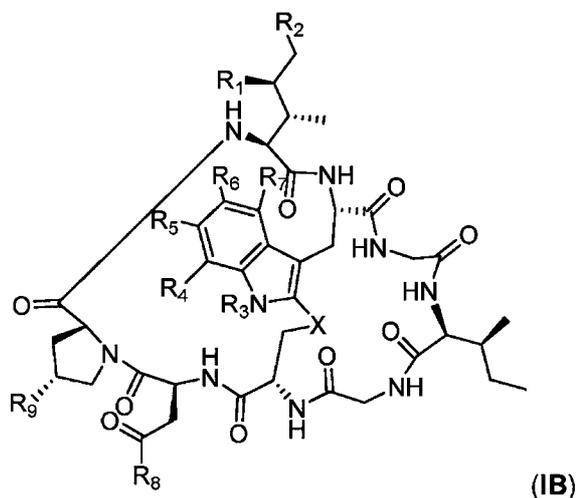
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции

сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

152. Конъюгат по п. 150, где Am представляет собой аматоксин, представленный формулой (IB).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

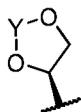
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно

замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид,  $-C(=O)-$ , пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель  $R_C$ .

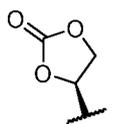
153. Конъюгат по п. 147 или 148, где  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; и

$R_E$  и  $R_{E'}$  представляют собой, каждый независимо, 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- $R_C$ .

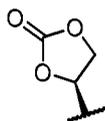
154. Конъюгат по п. 153, где  $R_A$  и  $R_B$ , вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



155. Конъюгат по п. 151 или 152, где  $R_1$  представляет собой H, OH или  $OR_A$ ;

$R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



$R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

156. Конъюгат по п. 151 или 152, где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub> представляет собой R<sub>C</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>5</sub> представляет собой H, OH, или ОС<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH.

157. Конъюгат по п. 151 или 152, где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub> или R<sub>C</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH.

158. Конъюгат по п. 151 или 152, где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

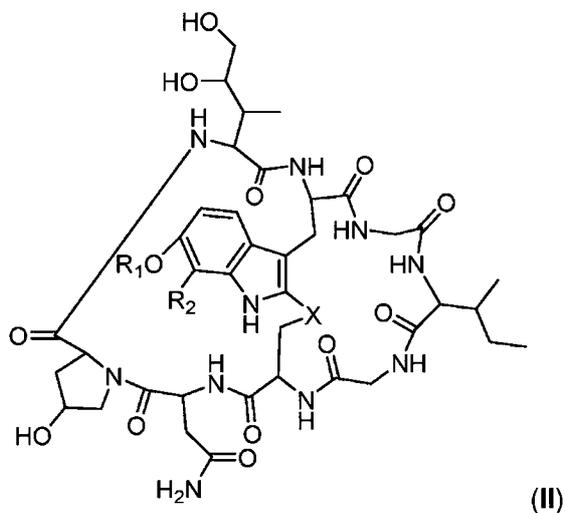
R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

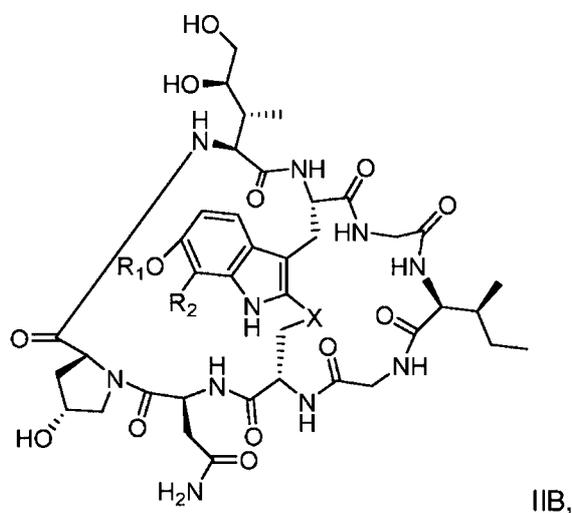
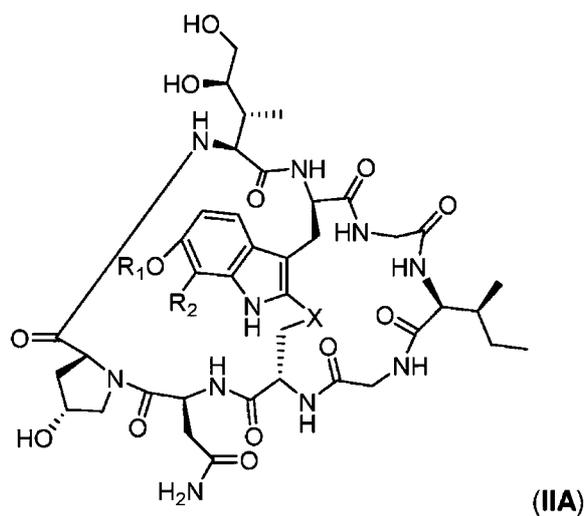
R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>8</sub> представляет собой OR<sub>C</sub> или NHR<sub>C</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH.

159. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где Су представляет собой аматоксин (Am), представленный формулой (II), формулой (III), или формулой (IV)





где X представляет собой S, SO, или SO<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и

R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте;

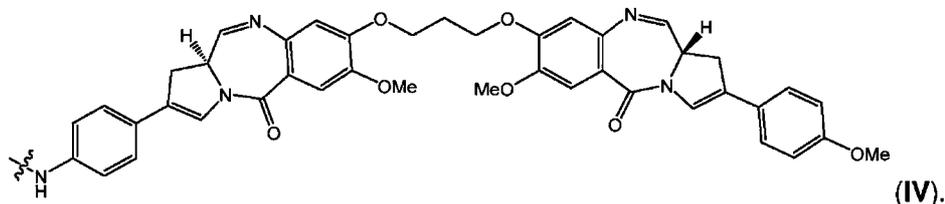
где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

160. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где Су представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

161. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где Су представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометил ауристина E и монометил ауристина F.

162. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где Су представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

163. Конъюгат по любому из п.п. 142-148, где Су представляет собой производное димера пирролбензодиазепина, представленное формулой (IV)



164. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из п.п. 138-159 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

165. Фармацевтическая композиция по п.164, где фармацевтическая композиция составлена для чрескожного, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, интратуморального, парентерального, интратекального или интрацеребровентрикулярного введения пациенту-человеку.

166. Фармацевтическая композиция по п. 165, где фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения пациенту-человеку.

167. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента

168. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

169. Способ предотвращения отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до получения пациентом-человеком трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

170. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

171. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента.

172. Способ, включающий:

a. введение пациенту-человеку анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента; и

b. затем введение пациенту трансплантата, включающего гематopoэтические стволовые клетки.

173. Способ по любому из п.п. 167-172, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

174. Способ по любому из п.п. 167-172, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает набор CDR вариабельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR вариабельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела ОКТ1, продуцируемого линией клеток гибридомы с номером доступа ATCC CRL 8000.

175. Способ по любому из п.п. 167-172, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVITICRASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWMGWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2); или

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
NIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDVGTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHTGVP  
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 258); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQAPGKGLEWVAHIWDDDD  
VYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWGQGLV  
TVSS (SEQ ID NO: 257).

176. Способ по любому из п.п. 167-172, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

177. Способ по любому из п.п. 167-172, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие переменные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность EIQLVQSGGGLVKPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI NTHYGEPTYADSFKGTRTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

178. Способ по любому из п.п. 167-172, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

179. Способ по любому из п.п. 167-178, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, гуманизированного антитела, биспецифического антитела, иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом, интактного антитела, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

180. Способ по п. 179, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

181. Способ по любому из п.п. 167-180, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

182. Способ по п. 181, где IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

183. Способ по любому из п.п. 167-182, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент интернализируется иммунной клеткой после введения пациенту.

184. Способ по любому из п.п. 167-183, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно стимулировать некроз иммунной клетки.

185. Способ по любому из п.п. 167-182, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно рекрутировать один или несколько белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

186. Способ по любому из п.п. 183-185, где иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки и NK-клетки.

187. Способ по любому из п.п. 169-186, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

188. Способ по п. 187, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 1 часа до 7 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

189. Способ по п. 187, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 6 часов до 3 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

190. Способ по п. 187, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 12 часов до 36 часов после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

191. Способ по п. 187, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту через 24 часа после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

192. Способ по любому из п.п. 169-191, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство поддерживают функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток через два или несколько дней после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

193. Способ по любому из п.п. 169-192, где гематопозитические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

194. Способ по любому из п.п. 169-192, где гематопозитические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

195. Способ по п. 194, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-совместимыми по отношению к пациенту.

196. Способ по п. 194, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми по отношению к пациенту.

197. Способ по любому из п.п. 169-196, где популяция клеток CD5+ включает клетки CD34+.

198. Способ по любому из п.п. 167, 168, и 170-197, где популяция клеток CD5+ включает Т-клетки.

199. Способ по любому из п.п. 169-198, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гематопозитической ткани и/или восстанавливать гематопоз после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

200. Способ по любому из п.п. 169-199, где при трансплантации пациенту гематопозитические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, натуральных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

201. Способ по любому из п.п. 167-200, где пациент страдает расстройством, связанным со стволовыми клетками.

202. Способ по любому из п.п. 167-201, где пациент страдает гемоглобинопатией.

203. Способ по п. 202, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотта-Олдрича.

204. Способ по п. 203, где гемоглобинопатия представляет собой анемию Фанкони.

205. Способ по п. 203, где гемоглобинопатия представляет собой апластическую анемию.

206. Способ по п. 203, где гемоглобинопатия представляет собой серповидноклеточную анемию.

207. Способ по п. 203, где гемоглобинопатия представляет собой талассемию.

208. Способ по любому из п.п. 167-207, где пациент страдает миелодиспластическим заболеванием.

209. Способ по любому из п.п. 167-208, где пациент страдает иммунодефицитным состоянием.

210. Способ по п. 209, где иммунодефицитное состояние представляет собой врожденный иммунодефицит.

211. Способ по п. 209, где иммунодефицитное состояние представляет собой приобретенный иммунодефицит.

212. Способ по п. 211, где приобретенный иммунодефицит представляет собой вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита.

213. Способ по любому из п.п. 167-212, где пациент страдает метаболическим нарушением.

214. Способ по п. 213, где метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, и метахроматической лейкоцистозии.

215. Способ по любому из п.п. 167-214, где пациент страдает раком.

216. Способ по п. 215, где рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественная миелома, и нейробластомы.

217. Способ по п. 215, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

218. Способ по п. 215, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

219. Способ по п. 215, где рак представляет собой лимфоидный лейкоз.

220. Способ по п. 215, где рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

221. Способ по п. 215, где рак представляет собой хронический лимфоидный лейкоз.

222. Способ по п. 215, где рак представляет собой множественную миелому.

223. Способ по п. 215, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

224. Способ по п. 215, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

225. Способ по любому из п.п. 167-224, где пациент страдает расстройством, выбранным из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака - Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита.

226. Способ по любому из п.п. 167-225, где пациент страдает аутоиммунным расстройством.

227. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого рассеянного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного

заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакия-герпетиформного дерматита, синдрома холодной агглютинации, CREST-синдрома, Дегоса синдрома, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, заболевания Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой иммунной тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA нейтропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, красного плоского лишая, Лаймской болезни, болезни Меньера, смешанного поражения соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, атрофической формы аутоиммунного тиреоидита, вульгарного пемфигуса, пернициозной анемии, полихондрии, полимиозита и дерматомиозита, первичного биллиарного цирроза, узелкового полиартериита, олигандулярного синдрома, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматического полиартрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, синдрома Такаясу, темпорального артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии, и гранулематоза Вегенера.

228. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

229. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

230. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

231. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.

232. Способ по п. 226, где аутоиммунное расстройство представляет собой диабет 1 типа.

233. Способ по любому из п.п. 201-232, где способ лечит расстройство или рак.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,  
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

2. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

3. Способ предотвращения отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

4. Способ истощения популяции клеток CD5+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

5. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

6. Способ, включающий:

a. введение пациенту-человеку анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD5, в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином; и

b. затем введение пациенту трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

7. Способ лечения расстройства, связанного со стволовыми клетками, у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

8. Способ лечения гемоглобинопатии у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

конъюгировано с цитотоксином.

9. Способ лечения миелодиспластического заболевания у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

10. Способ лечения иммунодефицитного состояния у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

11. Способ лечения метаболического нарушения у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

12. Способ лечения рака у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с CD5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

13. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака - Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

14. Способ лечения аутоиммунного расстройства у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

15. Способ по любому из п.п. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

16. Способ по любому из п.п. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает набор CDR вариабельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR вариабельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела ОКТ1, продуцируемого линией клеток гибридомы с номером доступа ATCC CRL 8000.

17. Способ по любому из п.п. 1-14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

а.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCRASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRL

VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 1); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLRWGWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 2); или

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVGTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHTGVP  
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 258); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQAPGKGLEWVAHIWDDDD  
VYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWGQGLV  
TVSS (SEQ ID NO: 257).

18. Способ по любому из п.п. 1-14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

19. Способ по любому из п.п. 1-14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWVQKPKGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 9); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
EIQLVQSGGGLVKPGGSRVIRSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
NTHYGEPTYADSFKGRTRTFLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW  
YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

20. Способ по любому из п.п. 1-14, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID  
NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO:  
12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ  
ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ  
ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO:  
15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID  
NO: 16).

21. Способ по любому из п.п. 1-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом, интактного антитела, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

22. Способ по п. 21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Способ по любому из п.п. 1-22, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD, и IgE.

24. Способ по п. 23, где изотип IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

25. Способ по любому из п.п. 1-24, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из экзотоксина A pseudomonas, де-Буганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатиона, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-

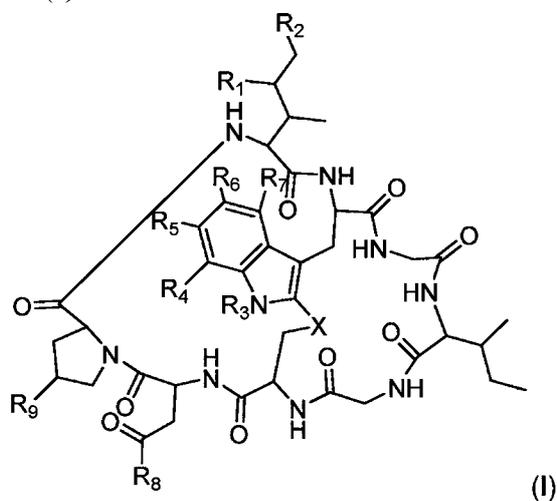
38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или его варианта.

26. Способ по п. 25, где цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

27. Способ по п. 26, где ингибитор РНК-полимеразы представляет собой ингибитор РНК-полимеразы II.

28. Способ по п. 27, где ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой аматоксин.

29. Способ по любому из п.п. 1-24, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am аматоксин, представленный формулой (I)



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub>, или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)-, или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или

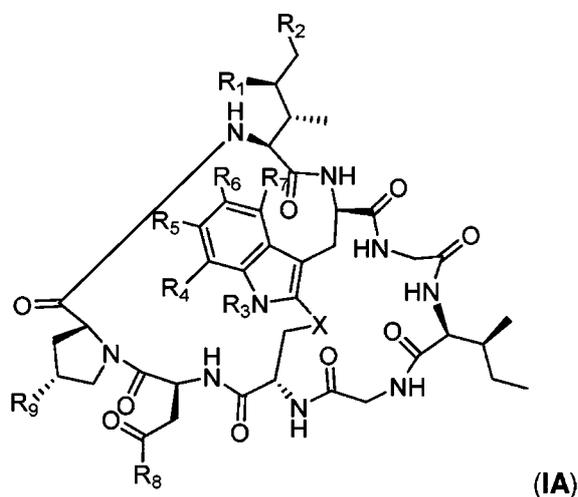
необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, optionally замещенный циклоалкилен, optionally замещенный гетероциклоалкилен, optionally замещенный арилен, optionally замещенный гетероарилен; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

30. Способ по п. 29, где Am-L-Z представлен формулой (IA).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием optionally замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил,

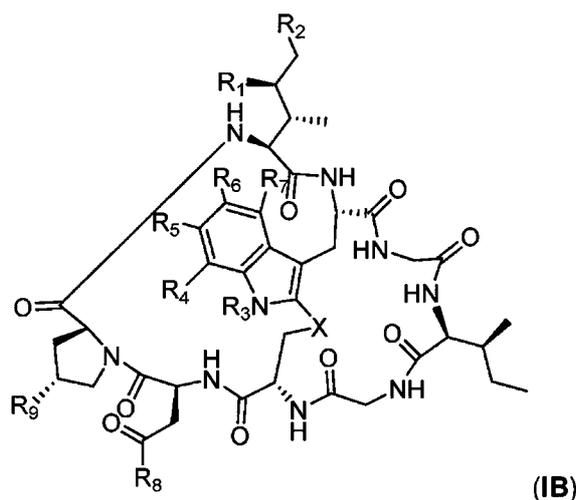
необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антигене или его антигенсвязывающем фрагменте; и

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

31. Способ по п. 29, где Am-L-Z представлен формулой (IB).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub>, или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно

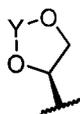
замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

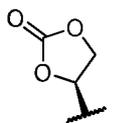
32. Способ по п. 30 или 31, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NR<sub>E</sub>)-, или -C(R<sub>E</sub>R<sub>E</sub>')-; и

R<sub>E</sub> и R<sub>E</sub>' представляют собой, каждый независимо, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный циклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный гетероциклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный арилен-R<sub>C</sub>, или необязательно замещенный гетероарилен-R<sub>C</sub>.

33. Способ по п. 32, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:

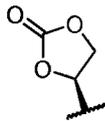


32. Способ по п. 30 или 31, где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH или OR<sub>A</sub>;

(a) R<sub>2</sub> представляет собой H, OH или OR<sub>B</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с

образованием:



$R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

(b)  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

$R_4$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

(c)  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH; или

(d)  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_3$ ,  $R_6$ , и  $R_7$  представляют собой, каждый, H;

$R_4$  и  $R_5$  представляют собой, каждый независимо, H или OH;

$R_8$  представляет собой  $OR_C$  или  $NHR_C$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

35. Способ по любому из п.п. 1-24, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой  $Ab-L-Z-Am$ , где  $Ab$  представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  $Z$  представляет собой химический фрагмент,  $L$  представляет собой линкер, и  $Am$  представляет собой аматоксин, и конъюгат аматоксин-линкер  $Am-L-Z$  представлен формулой (II), формулой (III), или формулой (IV)



антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте;

где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

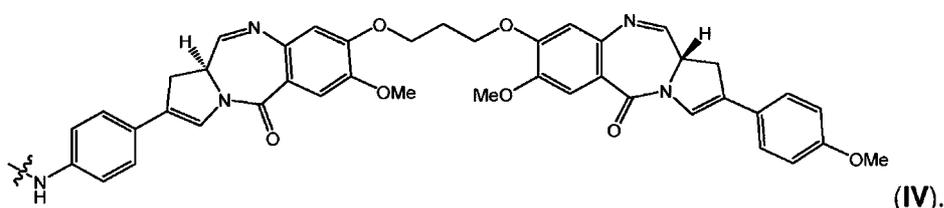
36. Способ по любому из п.п. 1-24, где цитотоксин представляет собой:

(a) майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

(b) ауристин;

(c) ауристин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина; или

(d) производное димера пирролбензодиазепина, представленное формулой (IV)



37. Способ по п. 36, где ауристин выбран из группы, состоящей из монометил ауристина E и монометил ауристина F.

38. Способ по любому из п.п. 1-6 и 15-37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, интернализируется иммунной клеткой после введения пациенту.

39. Способ по любому из п.п. 1-6 и 15-38, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно стимулировать некроз иммунной клетки.

40. Способ по любому из п.п. 1-6 и 15-37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно рекрутировать один или несколько белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

41. Способ по любому из п.п. 38-40, где иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки и NK-клетки.

42. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-41, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

43. Способ по п. 42, где:

(a) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 1 часа до 7 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином;

(b) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 6 часов до 3 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином;

(c) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 12 часов до 36 часов после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

(d) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту через 24 часа после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

44. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-1, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство поддерживают функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток через два или несколько дней после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

45. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-44, где гематопозитические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

46. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-44, где гематопозитические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

47. Способ по п. 46, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-совместимыми по отношению к пациенту или гематопозитические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми по отношению к пациенту.

48. Способ по любому из п.п. 1, 2, 4-6 и 15-47, где популяция клеток CD5+ включает клетки CD34+.

49. Способ по любому из п.п. 1, 2, 4-6 и 15-48, где популяция клеток CD5+ включает Т-клетки.

50. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-49, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гематопозитической ткани и/или восстанавливать гематопозез после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

51. Способ по любому из п.п. 3-6 и 15-50, где при трансплантации пациенту гематопозитические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, натуральных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

52. Способ по любому из п.п. 1-6 и 15-51, где пациент страдает расстройством, связанным со стволовыми клетками, гемоглобинопатией, миелодиспластическим

заболеванием, иммунодефицитным состоянием, метаболическим нарушением, раком или аутоиммунным расстройством.

53. Способ по п. 8 или 52, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотта-Олдрича.

54. Способ по п. 10 или 52, где иммунодефицитное состояние представляет собой врожденный иммунодефицит или приобретенный иммунодефицит.

55. Способ по п. 54, где приобретенный иммунодефицит представляет собой вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита.

56. Способ по п. 11 или 52, где метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, и метахроматической лейкодистрофии.

57. Способ по п. 12 или 52, где рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

58. Способ по п. 12 или 52, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

59. Способ по п. 12 или 52, где рак представляет собой острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз или хронический лимфоидный лейкоз.

60. Способ по п. 12 или 52, где рак представляет собой множественную миелому.

61. Способ по п. 12 или 52, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому.

62. Способ по любому из п.п. 1-6 и 15-61, где пациент страдает расстройством, выбранным из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака-Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита.

63. Способ по п. 14 или 52, где аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого рассеянного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, синдрома холодной агглютинации, CREST-синдрома, Дегоса синдрома, дискоидной волчанки,

вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, заболевания Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой иммунной тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA нейтропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, красного плоского лишая, Лаймской болезни, болезни Меньера, смешанного поражения соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, атрофической формы аутоиммунного тиреоидита, вульгарного пемфигуса, пернициозной анемии, полихондрии, полимиозита и дерматомиозита, первичного биллиарного цирроза, узелкового полиартериита, олигандулярного синдрома, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматического полиартрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, синдрома Такаясу, темпорального артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии, и гранулематоза Вегенера.

64. Способ по п. 14 или 52, где аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона или диабет 1 типа.

65. Способ по любому из п.п. 52-64, где способ лечит расстройство или рак.

66. Конъюгат, представленный формулой Ab-Cy, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с CD5, и Cy представляет собой цитотоксин, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из экзотоксина A *pseudomonas*, де-Буганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтанзиноида, ауристатиона, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, и димера индолинбензодиазепина, или его варианта.

67. Конъюгат по п. 66, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC HB 8000.

68. Конъюгат по п. 66, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID

NO: 8); или

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

69. Конъюгат по п. 66, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

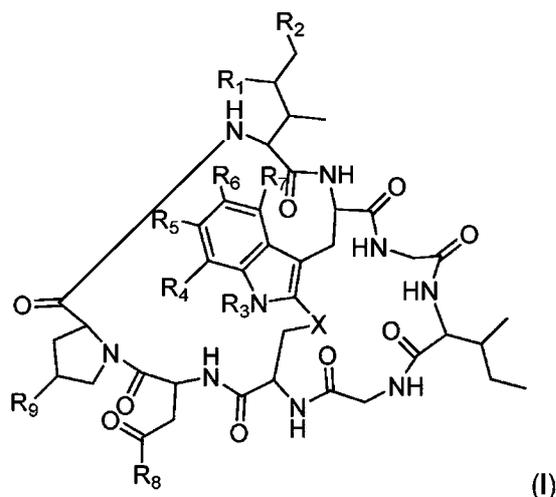
70. Конъюгат по любому из п.п. 66-69, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или антигена-связывающего фрагмента, иммуноглобулина с двойным переменным доменом, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и tandemной ди-scFv.

71. Конъюгат по п. 70, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

72. Конъюгат по любому из п.п. 66-71, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

73. Конъюгат по п. 72, где IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

74. Конъюгат по любому из п.п. 66-72, где Су представляет собой аматоксин (Am), представленный формулой (I)



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  $R_B$ , когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

$R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляют собой, каждый независимо, 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  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

$R_C$  представляет собой -L-Z;

$R_D$  представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

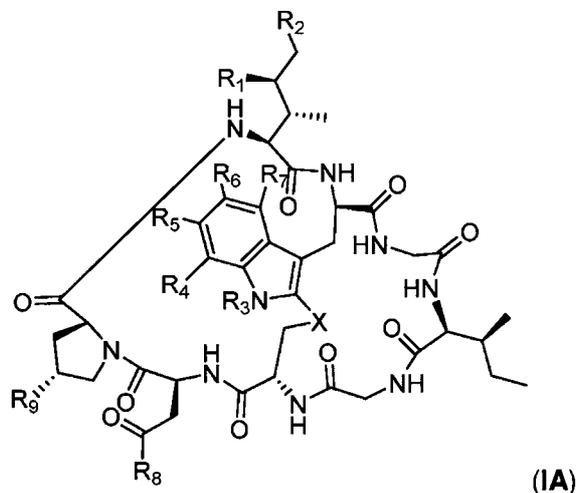
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, или необязательно замещенный гетероарилен; дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и

реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

75. Конъюгат по п. 74, где Am представляет собой аматоксин, представленный формулой (IA).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub>, или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

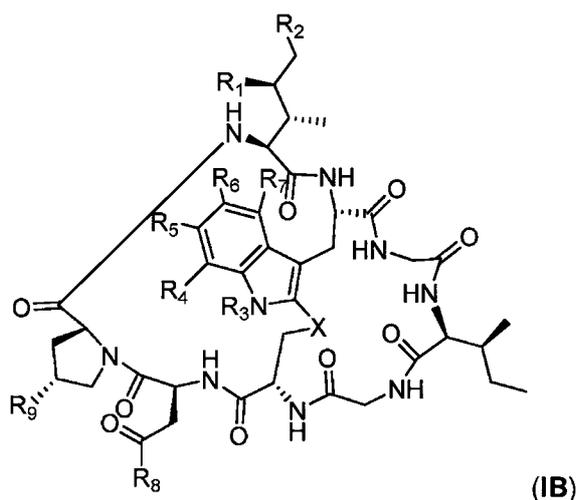
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид

или их комбинация;

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

76. Конъюгат по п. 74, где Am представляет собой аматоксин, представленный формулой (IB).



где R<sub>1</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>A</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>B</sub> или OR<sub>C</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, когда присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

R<sub>3</sub> представляет собой H, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH, NH<sub>2</sub>, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, NHR<sub>C</sub> или NR<sub>C</sub>R<sub>D</sub>;

R<sub>9</sub> представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub> или OR<sub>D</sub>;

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>-;

R<sub>C</sub> представляет собой -L-Z;

R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил;

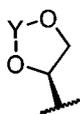
L представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>

алкинилен, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антители или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am включает ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

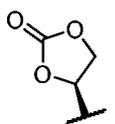
77. Конъюгат по п. 71 или 72, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где Y представляет собой -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NR<sub>E</sub>)- или -C(R<sub>E</sub>R<sub>E'</sub>)-; и

R<sub>E</sub> и R<sub>E'</sub> представляют собой, каждый независимо, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный циклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный гетероциклоалкилен-R<sub>C</sub>, необязательно замещенный арилен-R<sub>C</sub>, или необязательно замещенный гетероарилен-R<sub>C</sub>.

78. Конъюгат по п. 77, где R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:

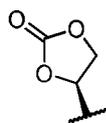


79. Конъюгат по п. 75 или 76, где:

(a) R<sub>1</sub> представляет собой H, OH или OR<sub>A</sub>;

R<sub>2</sub> представляет собой H, OH или OR<sub>B</sub>;

R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub>, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединяются с образованием:



R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>5</sub> представляет собой OR<sub>C</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH;

(b) R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub> представляет собой R<sub>C</sub>;

R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>5</sub> представляет собой H, OH, или ОС<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH;

(c) R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H, OH, OR<sub>C</sub> или R<sub>C</sub>;

R<sub>8</sub> представляет собой OH или NH<sub>2</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH; или

(c) R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

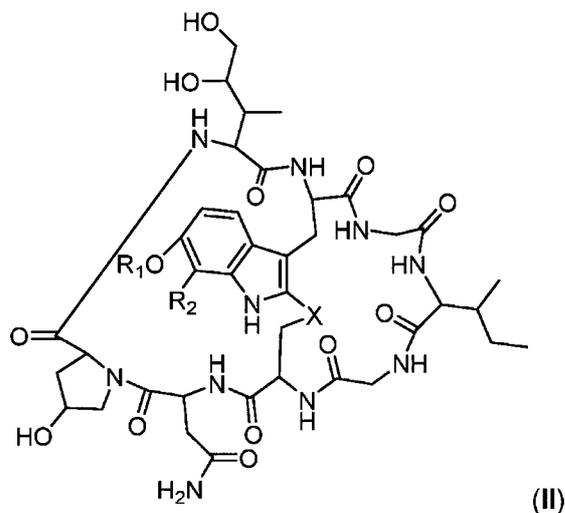
R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, и R<sub>7</sub> представляют собой, каждый, H;

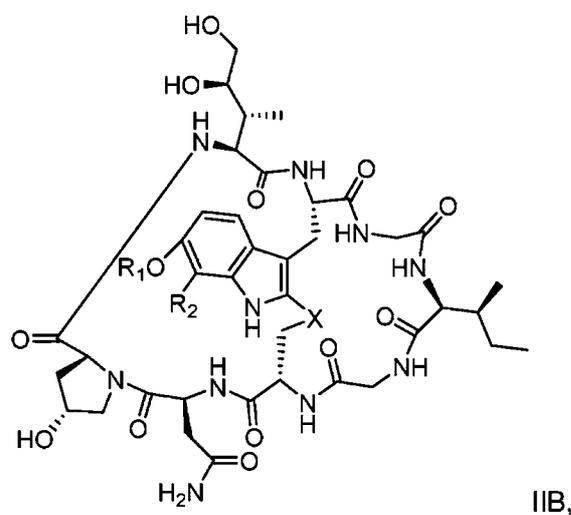
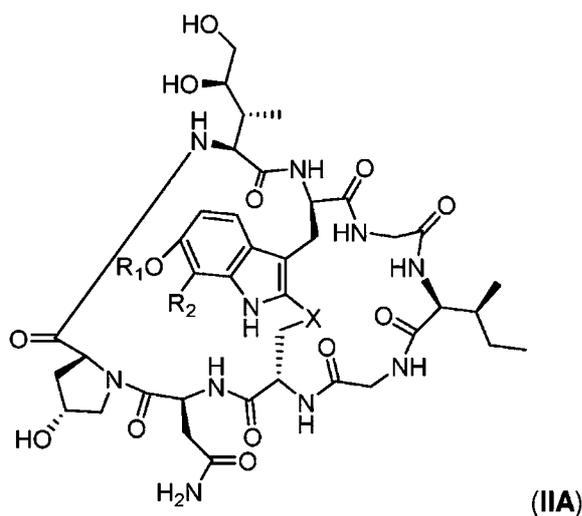
R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой, каждый независимо, H или OH;

R<sub>8</sub> представляет собой OR<sub>C</sub> или NHR<sub>C</sub>; и

R<sub>9</sub> представляет собой H или OH.

80. Конъюгат по любому из п.п. 66-72, где Су представляет собой аматоксин (Am), представленный формулой (II), формулой (III), или формулой (IV)





где X представляет собой S, SO, или SO<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте; и

R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте;

где, когда R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и когда R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

81. Конъюгат по любому из п.п. 66-72, где:

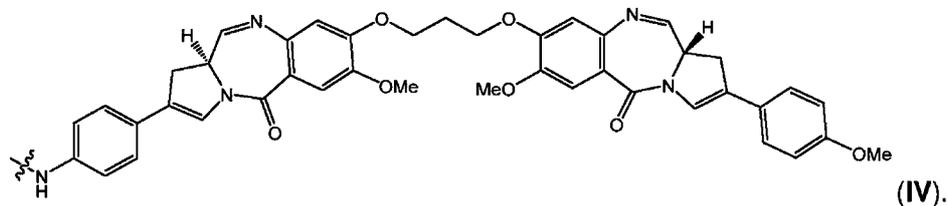
(a) Су представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4;

(b) Су представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из

монометил ауристатина Е и монометил ауристатина F;

(с) Су представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина; или

(d) Су представляет собой производное димера пирролбензодиазепина, представленное формулой (IV)



82. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из п.п. 66-80 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

83. Фармацевтическая композиция по п.82, где фармацевтическая композиция составлена для чрескожного, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, интратуморального, парентерального, интратекального или интрацеребровентрикулярного введения пациенту-человеку.

84. Фармацевтическая композиция по п. 83, где фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения пациенту-человеку.

85. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента

86. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

87. Способ предотвращения отторжения трансплантата гематопозитических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до получения пациентом-человеком трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

88. Способ истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гематопозитических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, до получения пациентом трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

89. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили анти-CD5-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5<sup>+</sup> у пациента.

90. Способ, включающий:

а. введение пациенту-человеку анти-CD5-антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD5+ у пациента;  
и

б. затем введение пациенту трансплантата, включающего гематопозитические стволовые клетки.

91. Способ по любому из п.п. 85-90, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC CRL 8000.

92. Способ по любому из п.п. 85-90, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает набор CDR вариабельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR вариабельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела ОКТ1, продуцируемого линией клеток гибридомы с номером доступа ATCC CRL 8000.

93. Способ по любому из п.п. 85-90, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие вариабельные домены:

а.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCRASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRL  
VDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 1); и

б.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QIQLVQSGPGLKPKGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLRWGMWI  
NTHTGEPTYADDFKGRFTFSLDTSKSTAYLQINSLRAEDTATYFCTRRGYDWY  
FDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 2); или

а.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
NIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDVGTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTRHTGVP  
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 258); и

б.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQAPGKGLEWVAHIWDDDD  
VYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWGQGLV  
TVSS (SEQ ID NO: 257).

94. Способ по любому из п.п. 85-90, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие области, определяющие комплементарность (CDR):

а. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 3);

б. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHTGE (SEQ ID NO: 4);

с. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYDWYFDV (SEQ ID NO: 5);

д. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 6);

е. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLVD (SEQ ID NO: 7); и

- f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 8); или
- g. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность FSLSTSGMG (SEQ ID NO: 29);
- h. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность WWDDD (SEQ ID NO: 30);
- i. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRATGTGFDY (SEQ ID NO: 31);
- j. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность QDVGTA (SEQ ID NO: 32);
- k. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность WTSTRHT (SEQ ID NO: 33);
- l. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность YNSYNT (SEQ ID NO: 34).

95. Способ по любому из п.п. 85-90, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие переменные домены:

a.  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRL  
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9); и

b.  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность  
EIQLVQSGGGLVKPGGSRVCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWI  
NTHYGEPTYADSFKGRTRTFLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDW  
YFDVWGQGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

96. Способ по любому из п.п. 85-90, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает следующие CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GYTFTNY (SEQ ID NO: 11);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность NTHYGE (SEQ ID NO: 12);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RRGYDWYFDV (SEQ ID NO: 13);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 14);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность RANRLES (SEQ ID NO: 15); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQYDESPWT (SEQ ID NO: 16).

97. Способ по любому из п.п. 85-96, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального

антитела, гуманизированного антитела, биспецифического антитела, иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом, интактного антитела, одноцепочечной молекулы Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub> молекулы и тандемной ди-scFv.

98. Способ по п. 97, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

99. Способ по любому из п.п. 85-98, где антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

100. Способ по п. 99, где IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

101. Способ по любому из п.п. 85-100, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент интернализируется иммунной клеткой после введения пациенту.

102. Способ по любому из п.п. 85-101, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно стимулировать некроз иммунной клетки.

103. Способ по любому из п.п. 85-100, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно рекрутировать один или несколько белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

104. Способ по любому из п.п. 101-103, где иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки и NK-клетки.

105. Способ по любому из п.п. 87-104, где трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

106. Способ по п. 105, где:

(a) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 1 часа до 7 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 6 часов до 3 дней после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(c) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту в промежутке от 12 часов до 36 часов после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(d) трансплантат, включающий гематопозитические стволовые клетки, вводят пациенту через 24 часа после того, как кровь пациента практически очищается от концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с цитотоксином.

107. Способ по любому из п.п. 87-106, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство поддерживают функциональный потенциал гематопозитических стволовых клеток через два или несколько дней после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

108. Способ по любому из п.п. 87-107, где гематопозитические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту или гематопозитические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

109. Способ по п. 108, где гематопозитические стволовые клетки являются HLA-совместимыми по отношению к пациенту или гематопозитические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми по отношению к пациенту.

110. Способ по любому из п.п. 87-109, где популяция клеток CD5+ включает клетки CD34+.

111. Способ по любому из п.п. 85, 86, и 88-110, где популяция клеток CD5+ включает Т-клетки.

112. Способ по любому из п.п. 87-111, где гематопозитические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гематопозитической ткани и/или восстанавливать гематопоз после трансплантации гематопозитических стволовых клеток пациенту.

113. Способ по любому из п.п. 87-112, где при трансплантации пациенту гематопозитические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, натуральных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

114. Способ по любому из п.п. 85-113, где пациент страдает расстройством, связанным со стволовыми клетками, гемоглобинопатией, миелодиспластическим заболеванием, иммунодефицитным состоянием, метаболическим нарушением, раком или аутоиммунным расстройством.

115. Способ по п. 114, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии, и синдрома Вискотта-Олдрича.

116. Способ по п. 114, где иммунодефицитное состояние представляет собой врожденный иммунодефицит или приобретенный иммунодефицит.

117. Способ по п. 116, где приобретенный иммунодефицит представляет собой вирус иммунодефицита человека или синдром приобретенного иммунного дефицита.

118. Способ по п. 114, где метаболическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, и метахроматической лейкодистрофии.

119. Способ по п. 114, где рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественная миелома, и нейробластомы.

120. Способ по п. 114, где рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

121. Способ по п. 114, где рак представляет собой острый миелолейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз или хронический лимфоидный

лейкоз.

122. Способ по п. 114, где рак представляет собой множественную миелому.

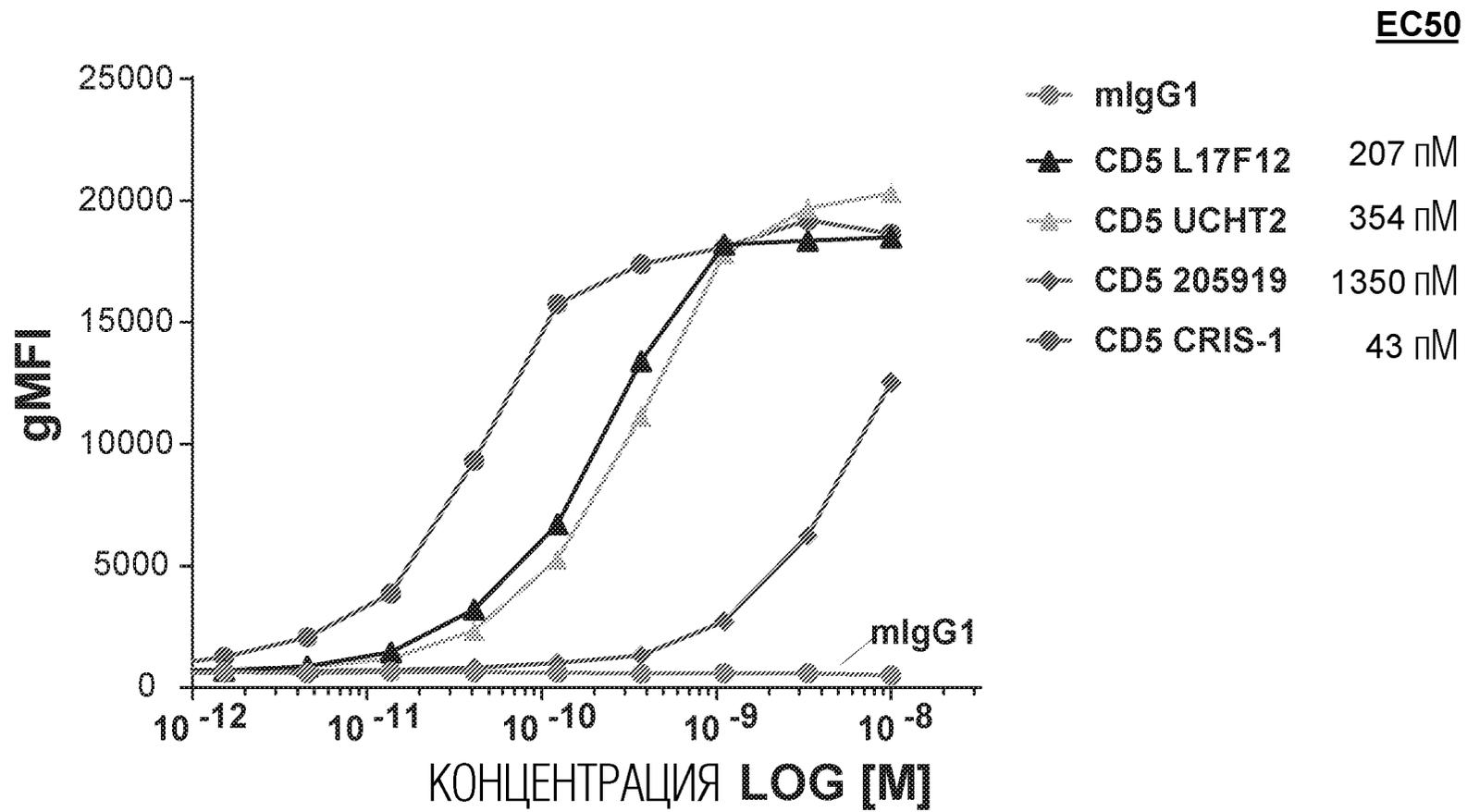
123. Способ по п. 114, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому.

124. Способ по любому из п.п. 85-123, где пациент страдает расстройством, выбранным из группы, состоящей из аденозиндезаминазной недостаточности и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака - Хигаши, врожденного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, незавершенного остеогенеза, болезни накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, и ювенильного ревматоидного артрита.

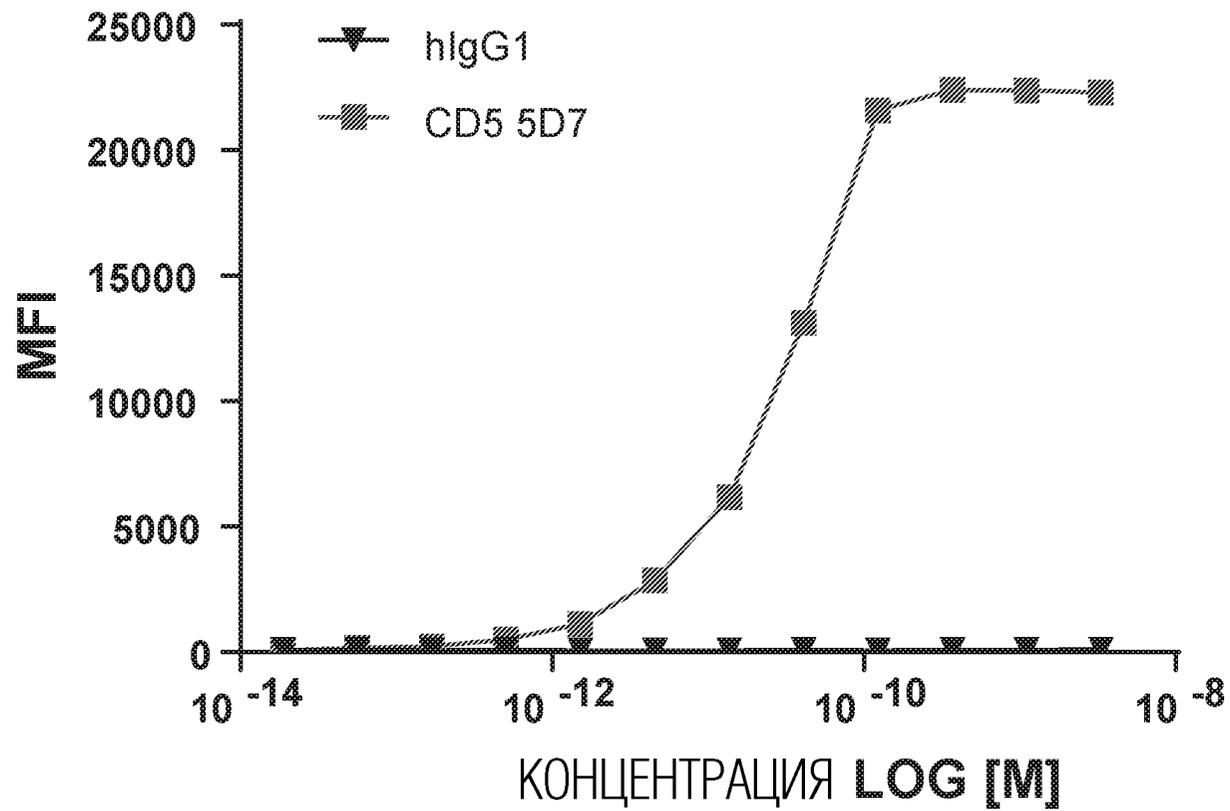
125. Способ по п. 114, где аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого рассеянного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакия-герпетиформного дерматита, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, Дегоса синдрома, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, заболевания Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой иммунной тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA нейтропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, красного плоского лишая, Лаймской болезни, болезни Меньера, смешанного поражения соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, атрофической формы аутоиммунного тиреоидита, вульгарного пемфигуса, пернициозной анемии, полихондрии, полимиозита и дерматомиозита, первичного биллиарного цирроза, узелкового полиартериита, олигландулярного синдрома, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматического полиартрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, синдрома Такаясу, темпорального артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии, и гранулематоза Вегенера.

126. Способ по п. 114, где аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона или диабет 1 типа.

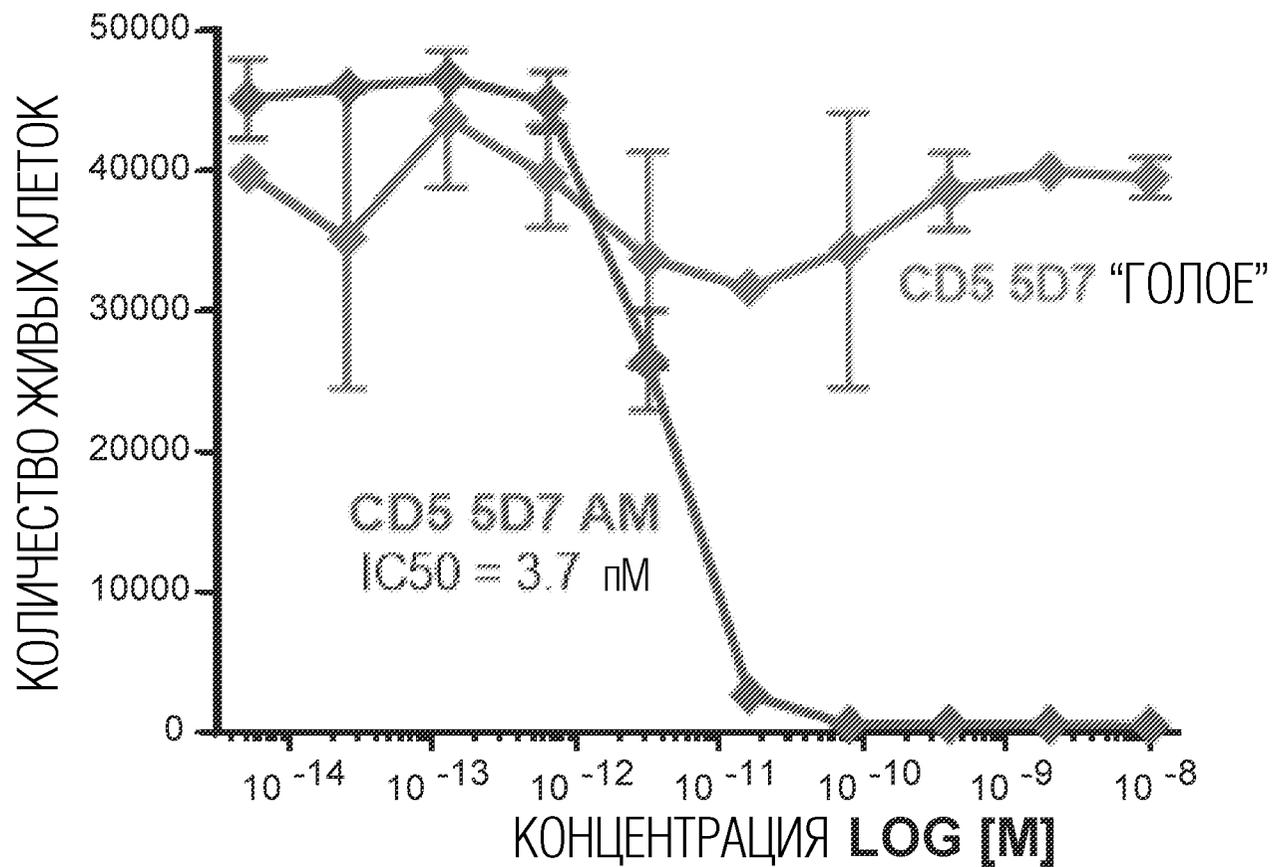
127. Способ по любому из п.п. 114-126, где способ лечит расстройство или рак.



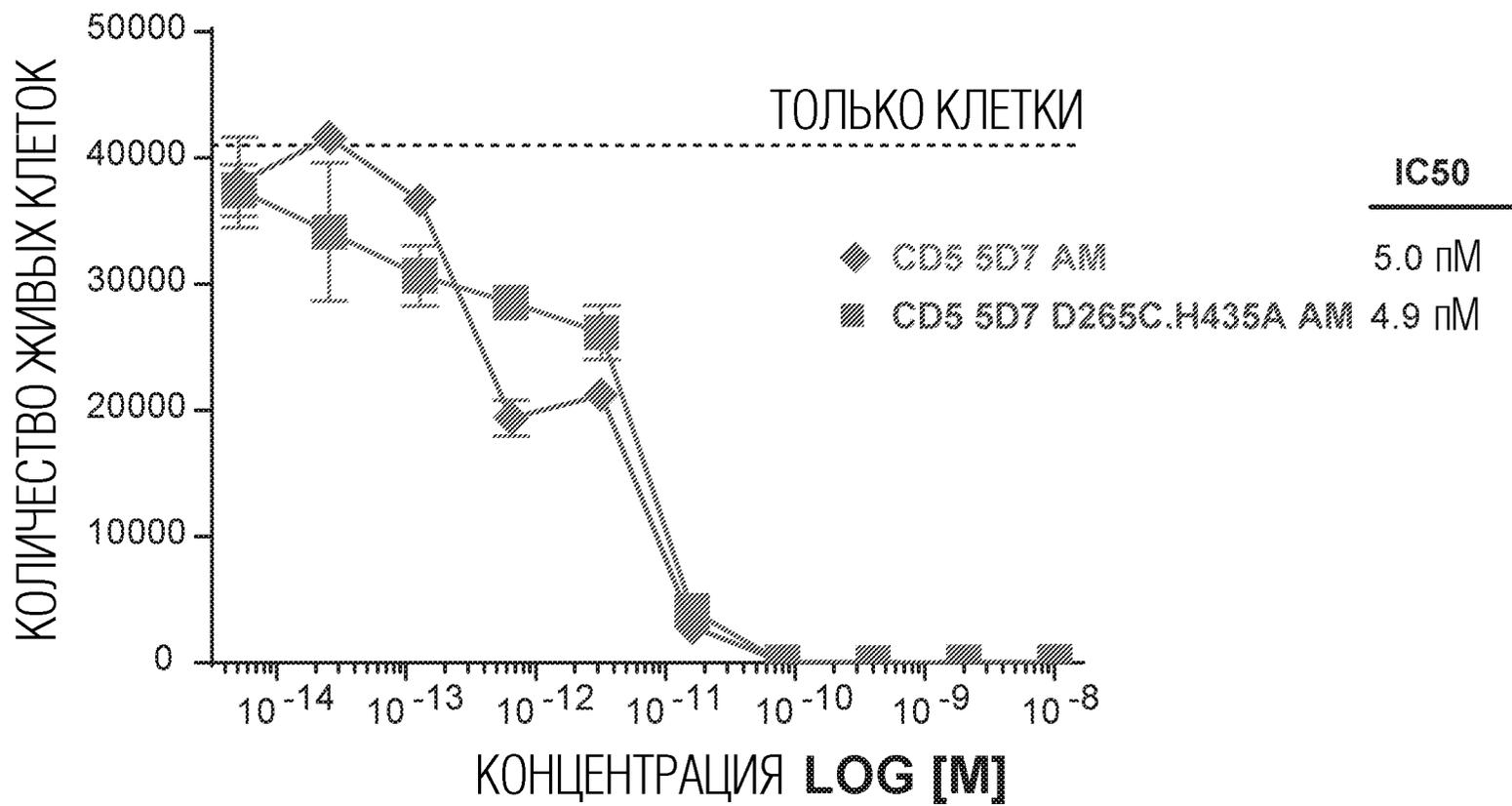
ФИГ. 1



ФИГ. 2

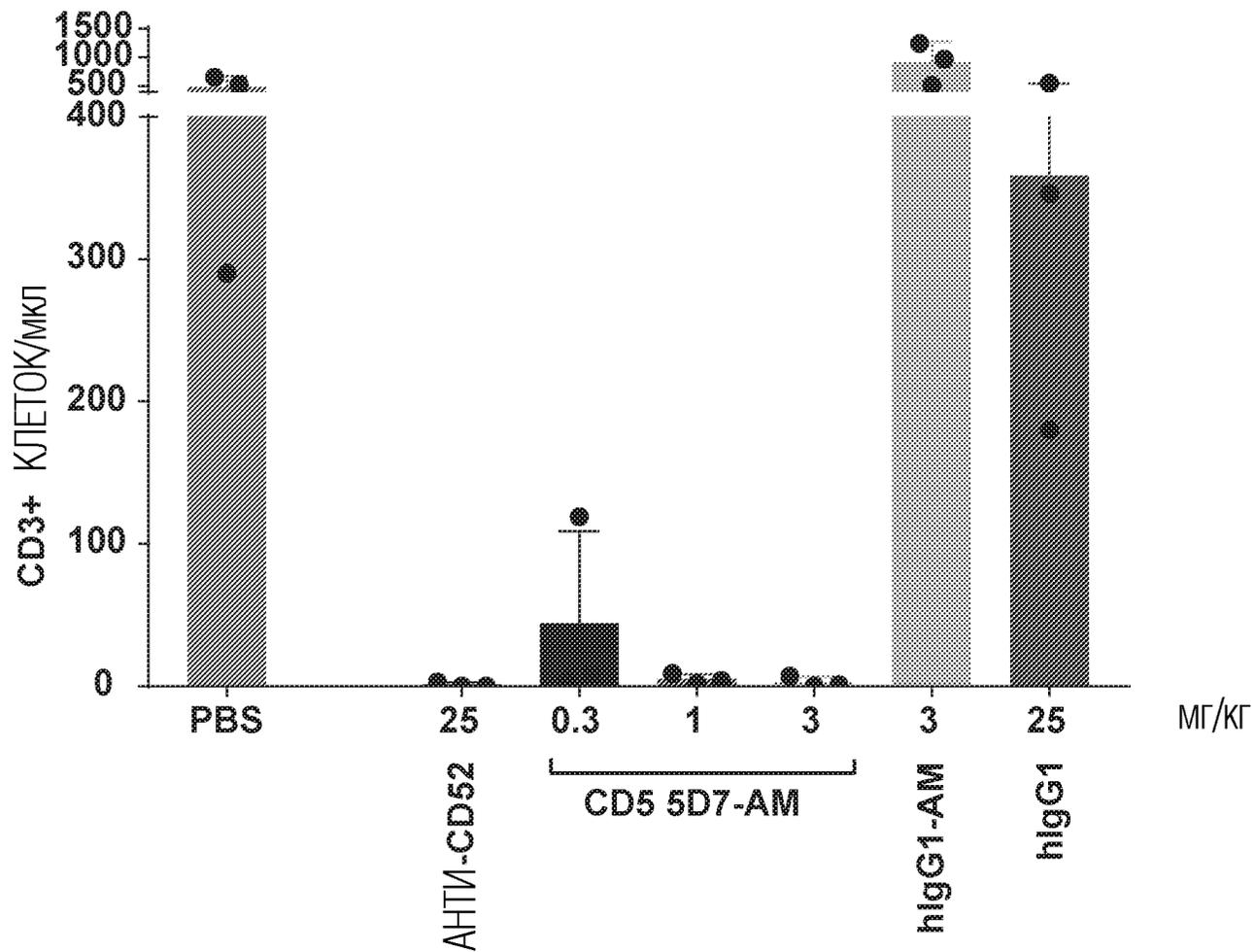


ФИГ. 3А

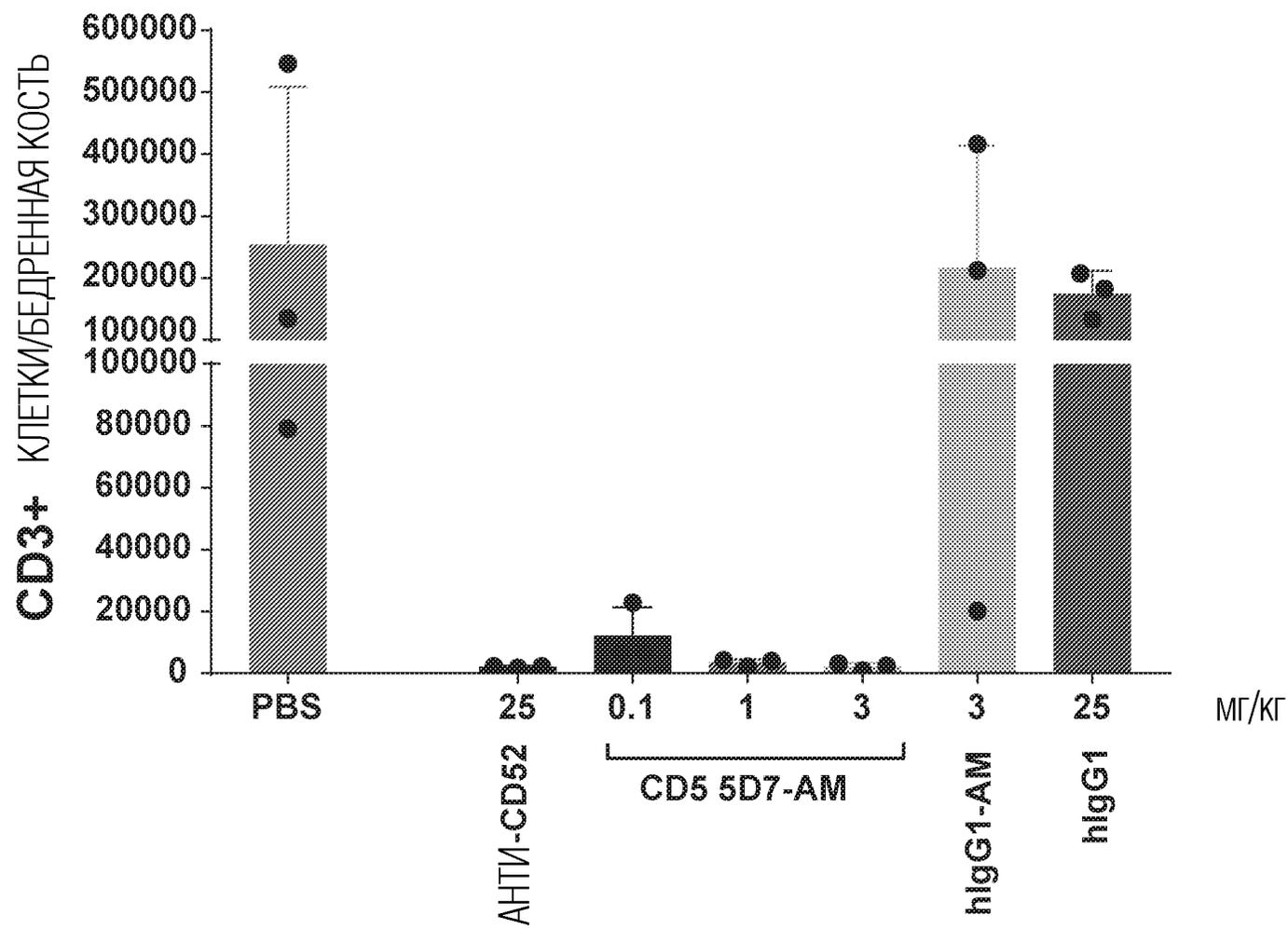


ФИГ. 3В

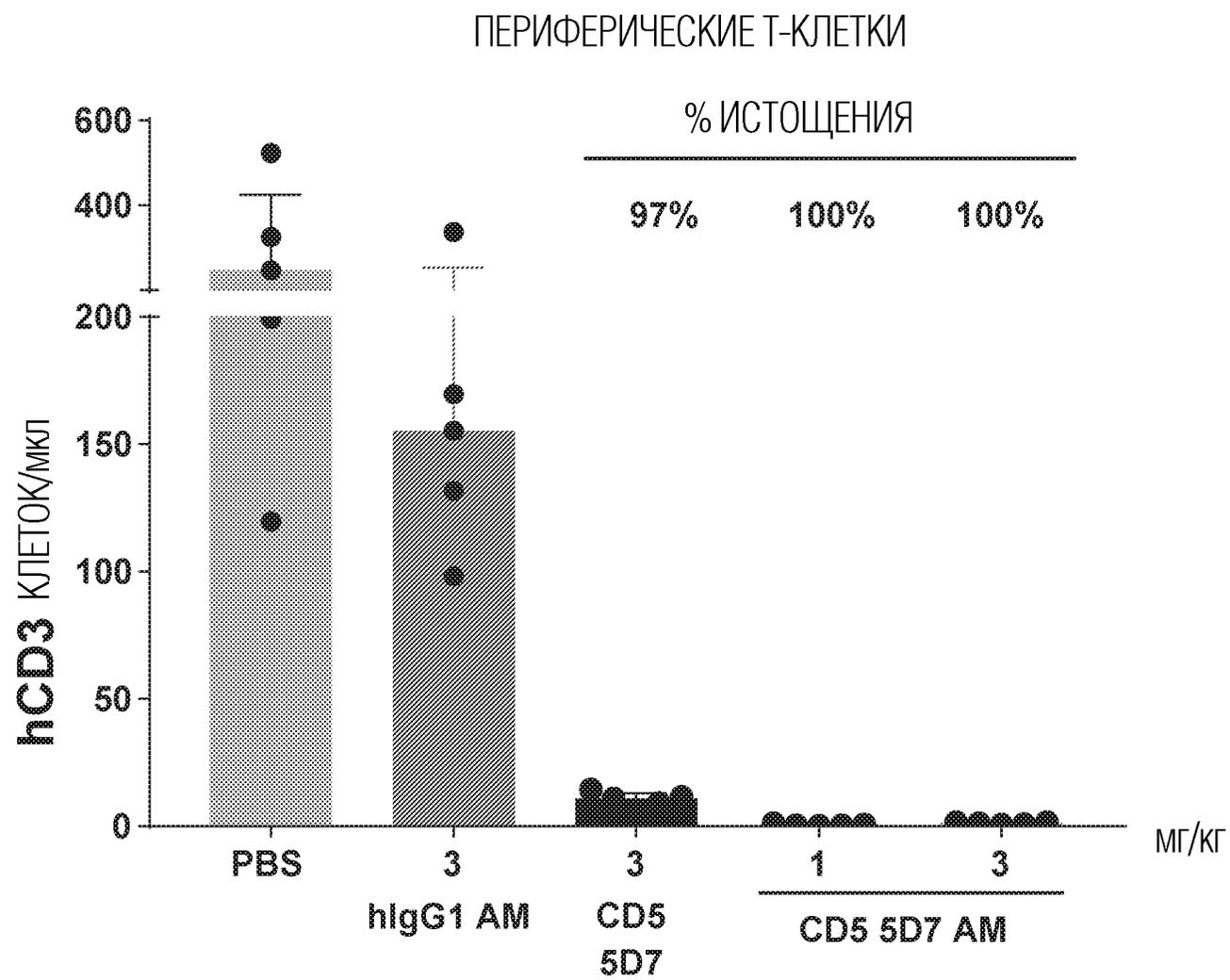
# ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ Т-КЛЕТКИ



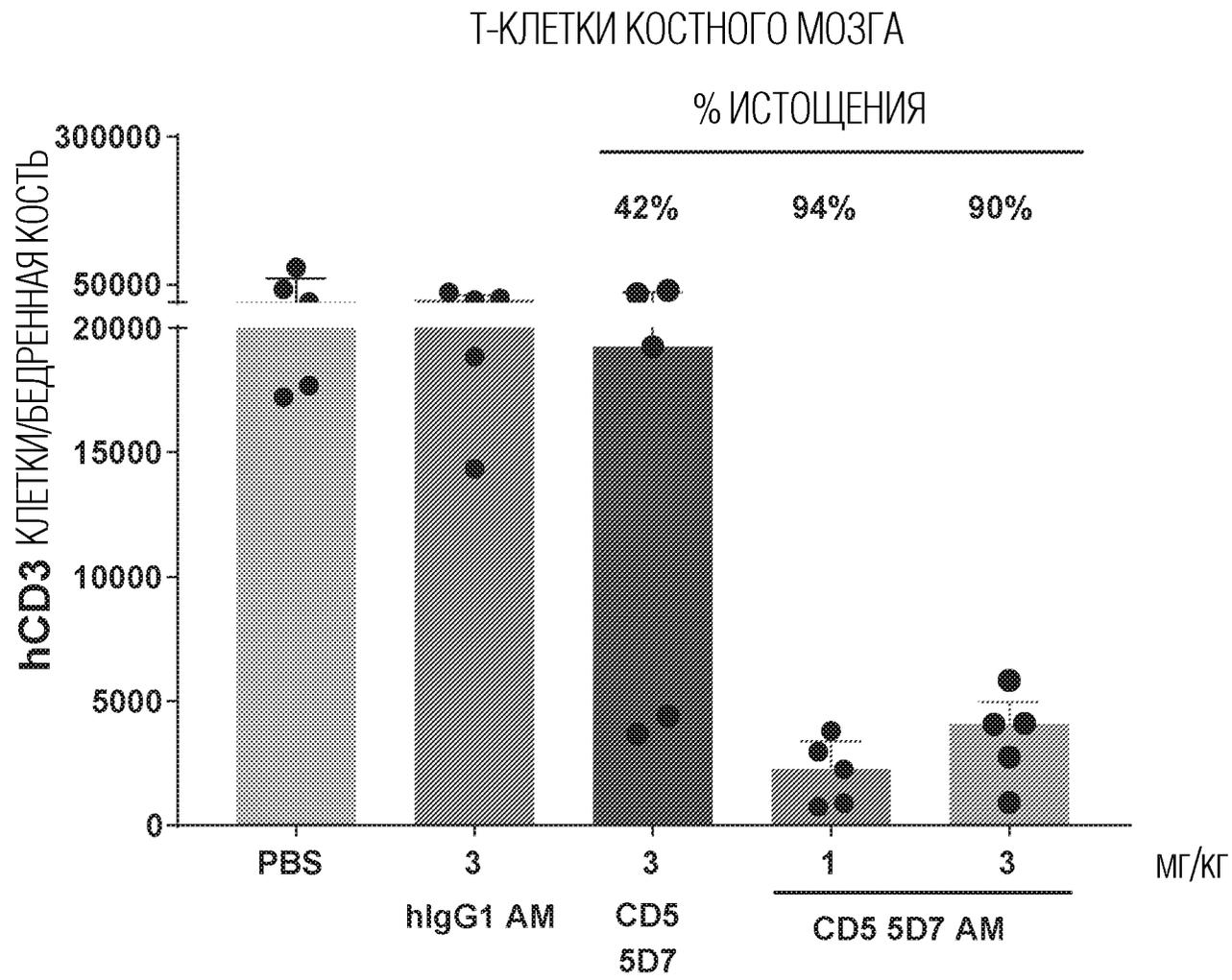
ФИГ. 4А



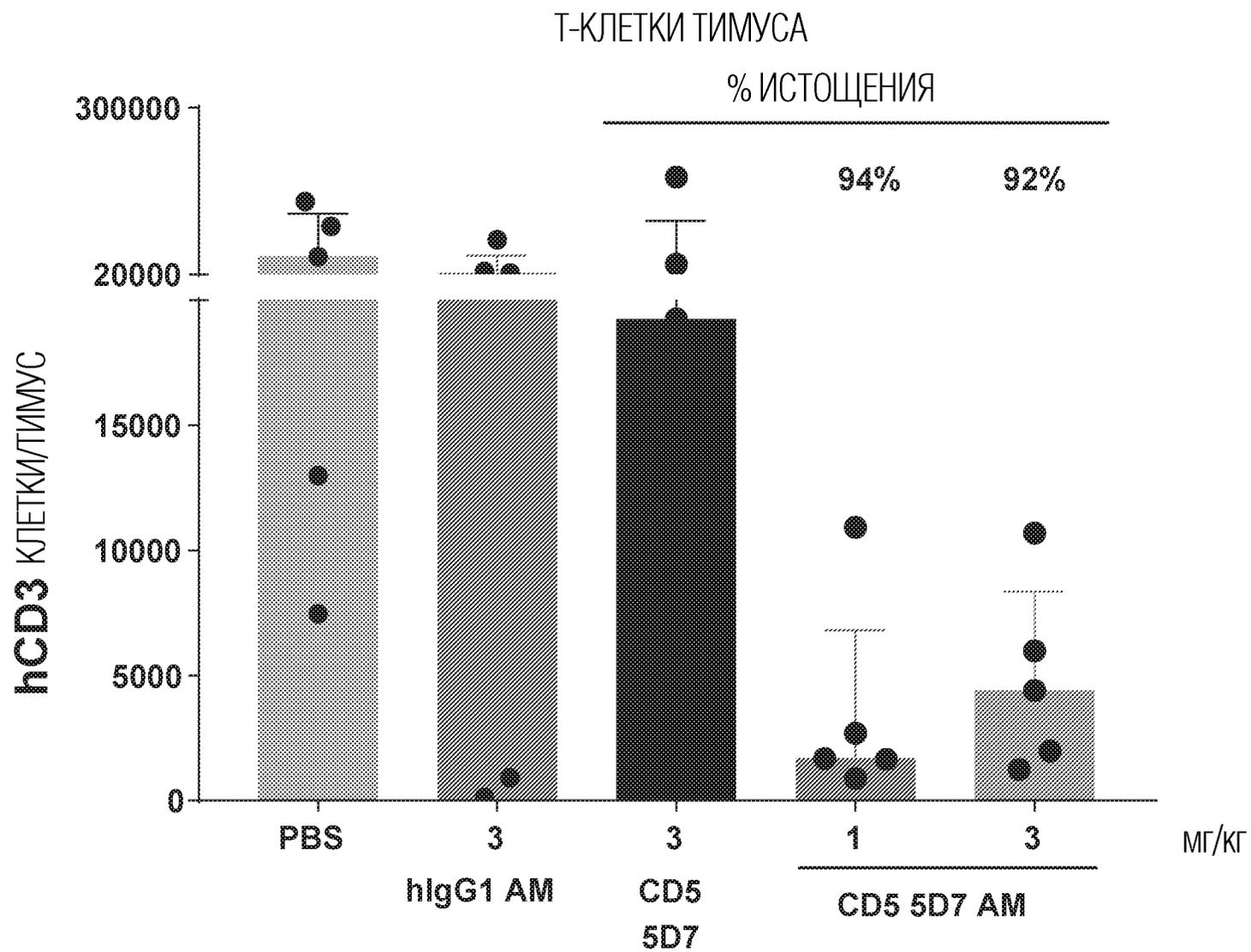
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С