

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090922 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.03.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.11.29

---

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИСТОЩЕНИЯ CD2+ КЛЕТОК

---

(31) 62/592,169

(32) 2017.11.29

(33) US

(86) PCT/US2018/063171

(87) WO 2019/108860 2019.06.06

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

(72) Изобретатель:  
Бойтано Энтони, Кук Майкл,  
Палчаудхури Рахул, Макдонау Шон  
(US)

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

(57) Изобретение относится к анти-CD2-антителам, их антигенсвязывающим фрагментам и их конъюгатам антитело-лекарственное средство для применения в качестве агентов для лечения расстройства стволовых клеток, рака или аутоиммунного заболевания, среди других гематологических и пролиферативных заболеваний. Описанные здесь композиции и способы могут быть использованы для истощения популяций CD2+ клеток, таких как CD2+ раковые клетки и CD2+ иммунные клетки, и могут быть использованы для подготовки пациента к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

202090922

A1

A1

202090922

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-562982EA/022

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИСТОЩЕНИЯ CD2+ КЛЕТОК**

#### **РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/592,169, поданной 29 ноября 2017 г., содержание которой включено в настоящее описание в виде ссылки.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Несмотря на достижения в области медицины, остается потребность в лечении патологий кроветворной системы, таких как заболевания конкретных клеток крови, нарушения обмена веществ, раковых заболеваний и аутоиммунных состояний и др.

Хотя гемопоэтические стволовые клетки обладают значительным терапевтическим потенциалом, ограничением, препятствующим их клиническому применению, являются трудности, связанные с приживлением трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток у хозяина. Собственная иммунная система пациента часто атакует трансплантированные клетки и приводит к отторжению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток. Чтобы избежать отторжения, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток пациента обрабатывают агентами, разрушающими иммунную систему, например химиотерапевтическими агентами или облучением. К сожалению, попытки стимулировать у пациента переносимость гемопоэтических стволовых клеток часто приводят к серьезным осложнениям. Таким образом, существует потребность в новых композициях и способах для улучшения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящее время существует потребность в композициях и способах лечения расстройств кроветворной (гемопоэтической) системы, таких как аутоиммунные расстройства, а также в композициях и способах обеспечения приживления экзогенных трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток с сохранением после трансплантации мультипотентной и гемопоэтической функциональности этих клеток.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам непосредственного лечения, в частности, различных нарушений кроветворной системы, нарушений обмена веществ, раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний. Композиции и способы, раскрытые в настоящем описании, нацелены на иммунные клетки для кондиционирования пациента-человека к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для лечения заболевания, такого как, без ограничения, рак крови или аутоиммунное заболевание.

В одном из аспектов изобретение также относится к композициям и способам кондиционирования пациента, такого как пациент-человек, к получению терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, способствующим приживлению трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток. Пациент может страдать от аутоиммунного заболевания или одним или более заболеваниями крови, такими как рак, гемоглобинопатия или другая патология кроветворной системы, и, следовательно,

нуждается в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

В контексте настоящего описания, гемопоэтические стволовые клетки способны дифференцироваться во множество типов клеток гемопоэтической линии и могут быть введены пациенту для заселения или репопуляции клеток у пациента с дефицитом этих клеток.

В некоторых аспектах изобретение относится к антителам и конъюгатам антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2, а также к способам их введения пациенту для (i) непосредственного лечения заболевания крови, такого как аутоиммунное заболевание, путем избирательного истощения популяция иммунных клеток, экспрессирующих CD2, таких как аутореактивные Т-клетки или натуральные киллеры (NK), и/или (ii) истощения популяции Т-клеток или NK-клеток до введения пациенту трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, тем самым уменьшая вероятность отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Первая активность позволяет осуществлять непосредственное лечение широкого спектра аутоиммунных расстройств, так как CD2 может экспрессироваться Т-клеткой или NK-клеткой, которая перекрестно реагирует и стимулирует неадекватный иммунный ответ против собственного антигена. Введение пациенту анти-CD2-антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство в этом случае может вызвать истощение популяции аутоиммунных CD2<sup>+</sup> клеток, таких как Т-клетки или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с одним или более аутоантигенами, таким образом обеспечивая лечение аутоиммунной патологии. Последняя активность способствует созданию среды, обеспечивающей приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, поскольку Т-клетки и/или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с одним или более несобственными (чужеродными) антигенами, экспрессируемыми гемопоэтическими стволовыми клетками (например, несобственными МНС антигенами) могут вызывать иммунный ответ против трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток и, таким образом, способствовать отторжению трансплантата. В этом последнем случае пациентам, страдающим от расстройства, такого как рак, аутоиммунное заболевание или другое состояние гемопоэтической системы, впоследствии можно вводить трансплантат гемопоэтических стволовых клеток, например, для репопуляции одной или более популяций кровяных клеток, которые у пациента являются дефектными или находятся в недостаточном количестве. Настоящее изобретение также относится к способам лечения различных гемопоэтических состояний, таких как, в частности, серповидно-клеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с дефицитом аденозиндезаминазы, метахроматическая лейкодистрофия, анемия Даймонда-Блекфена и синдром Швахмана-Даймонда, инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, и синдром приобретенного иммунодефицита, а также рак и аутоиммунные заболевания.

В одном из аспектов изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD2<sup>+</sup>, например, у пациента-человека, такой как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или

CD2+ NK-клеток у человека, путем введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции клеток CD2+ у человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, такой как популяция CD2+ Т-клеток и/или CD2+ NK-клеток у человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, путем введения пациенту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2, например, до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ предотвращения или уменьшения вероятности отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, путем введения до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки, эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции эндогенных Т-клеток у пациента-человека, нуждающегося в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, путем введения до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки, эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2.

В другом аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки, причем пациенту предварительно ввели антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в количестве, достаточном для истощения популяции CD2+ клеток у пациента, такой как популяция CD2+ Т-клеток и/или CD2+ NK-клеток у человека-пациента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающему: введение пациенту-человеку антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2, в количестве, достаточном для истощения популяции CD2+ клеток у пациента, такой как популяция CD2+ Т-клеток и/или CD2+ NK-клеток у пациента, и последующее введение пациенту трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых аспектов анти-

CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы ATCC HB 11423. В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 анти-CD2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, продуцируемым линией клеток гибридомы ATCC HB 11423.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области (CDR):

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 1);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO: 2);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY (SEQ ID NO: 3);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLLHSSGNTYLN (SEQ ID NO: 4);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность LVSKLES (SEQ ID NO: 5); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 1);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO: 2);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY (SEQ ID NO: 3);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLLHSSGNTYLN (SEQ ID NO: 4);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность LVSKLES (SEQ ID NO: 5); и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой i) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 3; и содержащие переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 5; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 6; ii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие переменную область тяжелой цепи,

содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 14; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 15; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 16 или 17; и содержащие переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 18; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 19; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 20; iii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7, и содержащие переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8; iv) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9, и содержащие переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10; или v) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 21 или 22, и содержащие переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гуманизированного антитела, биспецифического антитела, двойного переменного домена иммуноглобулина, молекулы одноцепочечного Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин выбирают из группы, состоящей из аматоксина, экзотоксина A *Pseudomonas*, деБуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатиона, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина или их вариантов.

В другом аспекте изобретение относится к способу истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, такой как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD2<sup>+</sup> NK-клеток у человека, путем введения пациенту эффективного количества антитела его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, связывающих CD2.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, такой как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD2<sup>+</sup> NK-клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, путем введения до получения пациентом трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки, эффективного количества анти-CD2 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство.

В другом аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение пациенту-человеку трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки, причем пациенту предварительно ввели антитело, его фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2, в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента, такой как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD2<sup>+</sup> NK-клеток у пациента-человека.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу, например, лечения пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающему: введение пациенту-человеку антитела, его фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD2, в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента, такой как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD2<sup>+</sup> NK-клеток у пациента, и последующего введения пациенту трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих четырех аспектов антитело или его фрагмент, которые связываются с CD2 (например, на поверхности CD2<sup>+</sup> Т-клеток или CD2<sup>+</sup> NK-клеток), ковалентно связаны с Fc-доменом, таким как димерный Fc-домен, выделенный из человеческого антитела (например, выделенный из человеческого антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления Fc-домен 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. Fc-домен может быть конъюгирован с одной или более копиями антитела или его фрагмента. Например, конъюгаты, которые можно использовать в сочетании с представленными в настоящем описании способами, включают димерные Fc-домены, в которых каждая полипептидная цепь Fc-домена конъюгирована с антителом или его фрагментом. Fc-домен, в свою очередь, может быть конъюгирован с цитотоксином, таким как цитотоксин, представленный в настоящем описании (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, экзотоксин A *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, сапорин, майтансин, майтансиноид, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазефина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазефина или их варианты).

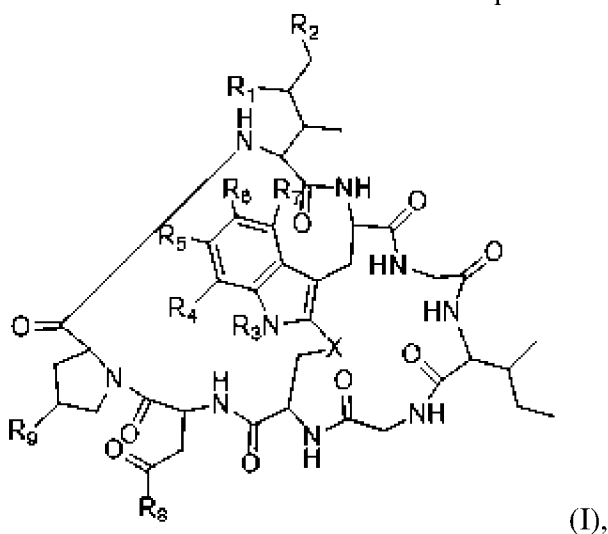
В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его фрагмент ковалентно связаны с цитотоксином, таким как цитотоксин, представленный в настоящем описании (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, экзотоксин A *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, сапорин, майтансин, майтансиноид, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазефина, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазефина или их варианты). В некоторых вариантах осуществления N-конец антитела или его

фрагмента связан с цитотоксином. В некоторых вариантах осуществления С-конец антитела или его фрагмента связан с цитотоксином. Цитотоксин, в свою очередь, может быть конъюгирован с Fc-доменом.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его фрагмент ковалентно связаны с цитотоксином на одном участке антитела или его фрагмента (например, N- или С-конце антитела или его фрагмента) и ковалентно связаны с Fc-доменом на другом участке антитела или его фрагмента (например, противоположном конце антитела или его фрагмента).

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

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов цитотоксин представляет собой аматоксин или его производное, такое как  $\alpha$ -аманитин,  $\beta$ -аманитин,  $\gamma$ -аманитин,  $\epsilon$ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин. В одном из вариантов осуществления цитотоксин представляет собой аманитин. В некоторых вариантах осуществления любого из указанных выше аспектов цитотоксин представляет собой аматоксин, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело, конъюгированное с цитотоксином, представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело, 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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми

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

$R_3$  представляет собой  $H$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_5$  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>;

$R_7$  представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

$R_8$  представляет собой  $OH$ ,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

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

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

$R_C$  представляет собой  $-L-Z$ ;

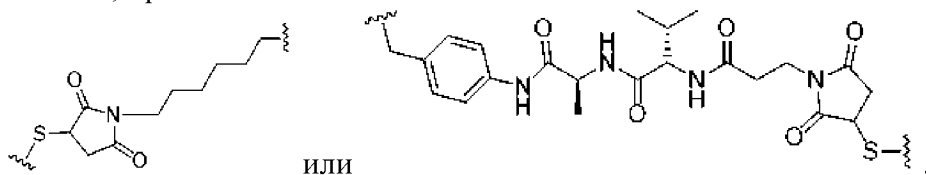
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например,  $C_1$ - $C_6$  алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например,  $C_1$ - $C_6$  гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  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<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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ T-клетки или CD2+ NK клетки.

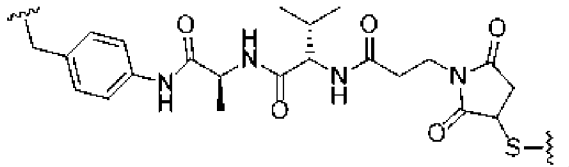
В некоторых вариантах осуществления Am содержит ровно один R<sub>C</sub> заместитель.

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

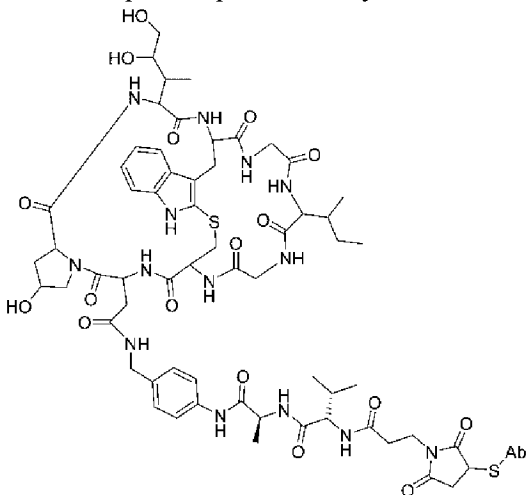


где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD117 (например, из -SH группы остатка цистеина).

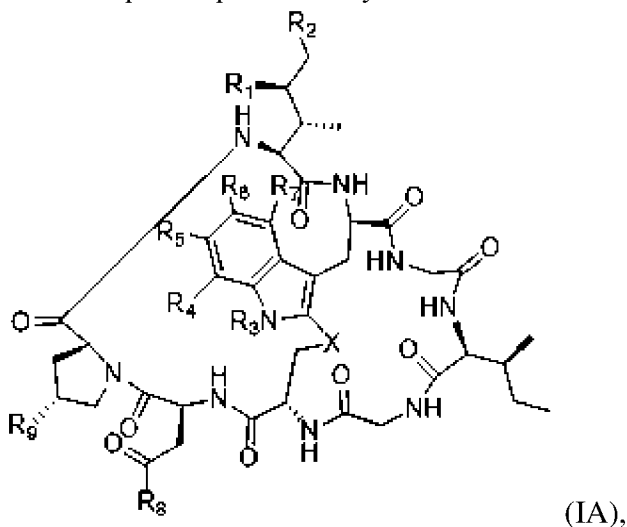
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой:



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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

R<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>;

$R_7$  представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

$R_8$  представляет собой  $OH$ ,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

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

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

$R_C$  представляет собой  $-L-Z$ ;

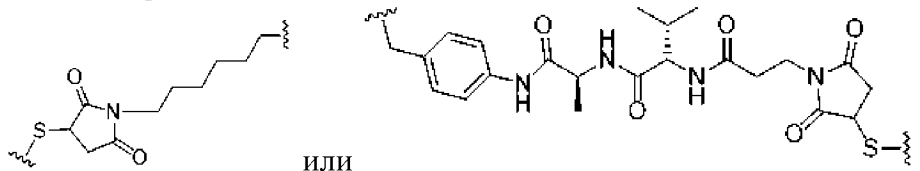
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный 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;

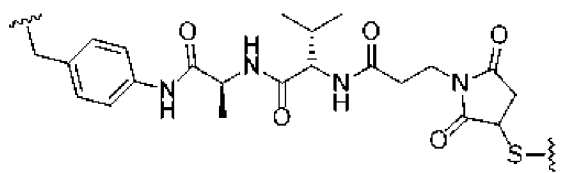
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антители или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ Т-клетки или CD2+ NK клетки; и

где  $A_m$  содержит ровно один заместитель  $R_C$ .

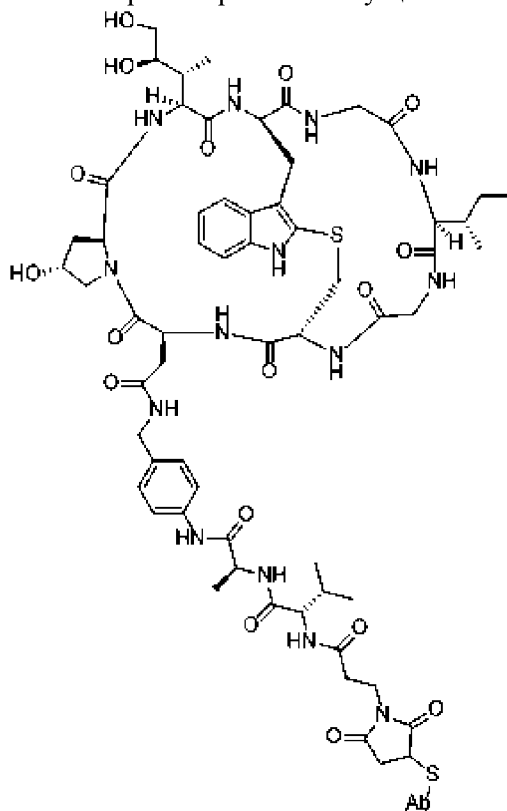
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



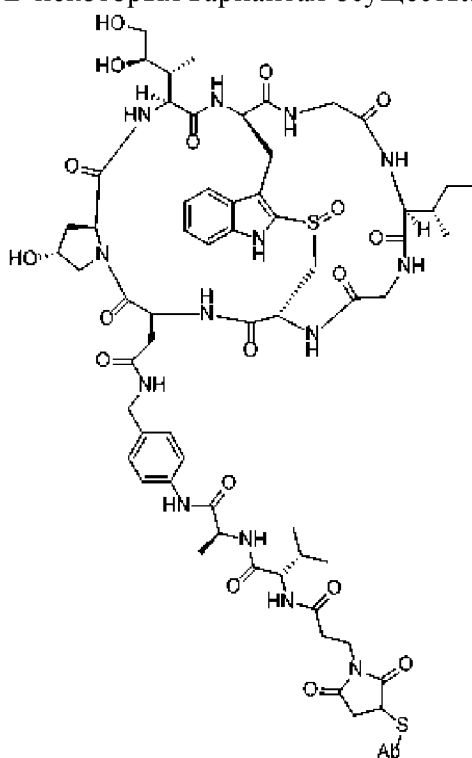
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



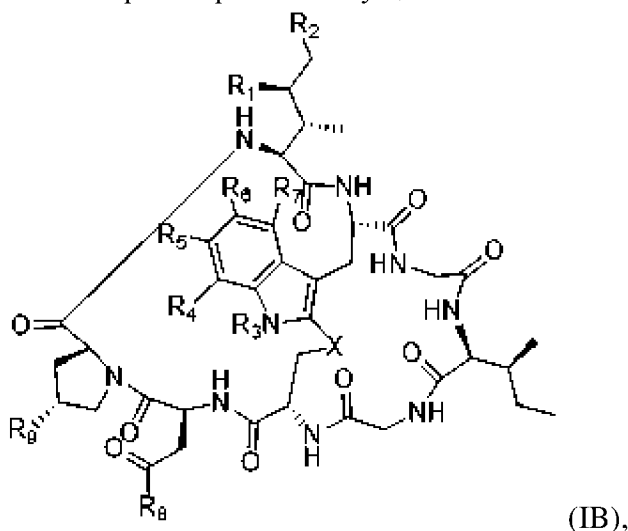
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

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

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

X представляет собой -S-, -S(O)- или -SO<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 на антители или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ T-клетки или CD2+ NK клетки; и

где Am содержит ровно один заместитель  $R_C$ .

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



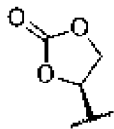
где Y представляет собой -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NR<sub>E</sub>)- или -C(R<sub>E</sub>R<sub>E'</sub>)-; и

каждый из R<sub>E</sub> и R<sub>E'</sub> независимо представляет собой 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>, если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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

причем каждый из X, R<sub>C</sub> и R<sub>D</sub> является таким, как определено выше.

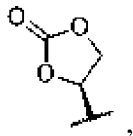
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или

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, объединены с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

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

каждый из  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_9$  представляет собой H или OH; и

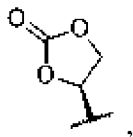
причем X и  $R_C$  является таким, как определено выше.

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, объединены с образованием:



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

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

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

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

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

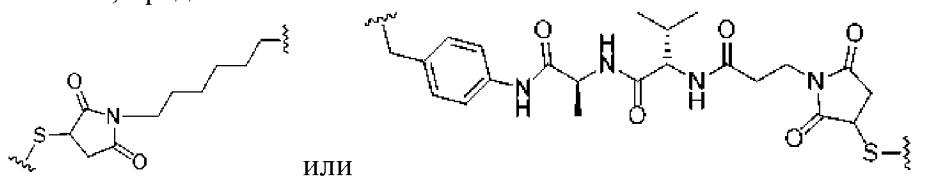
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;  
 каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;  
 каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $R_C$ ;  
 $R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;  
 $R_9$  представляет собой H или OH; и  
 причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

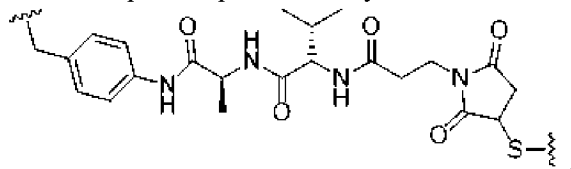
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;  
 каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;  
 каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;  
 $R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;  
 $R_9$  представляет собой H или OH; и  
 причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

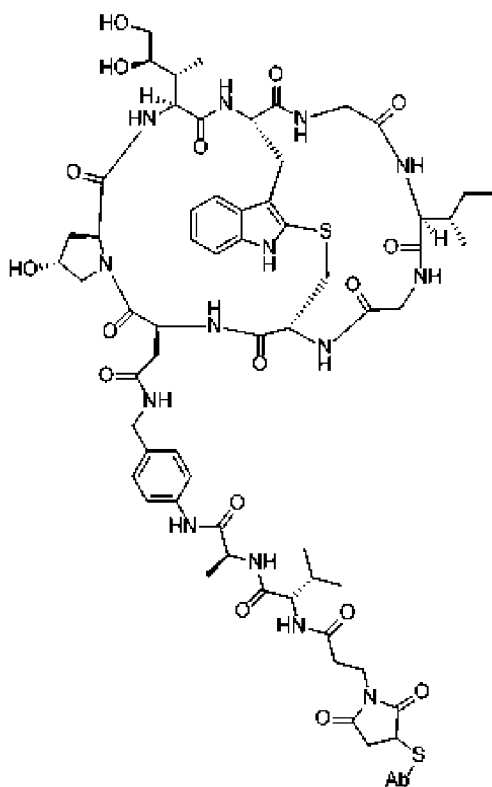
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



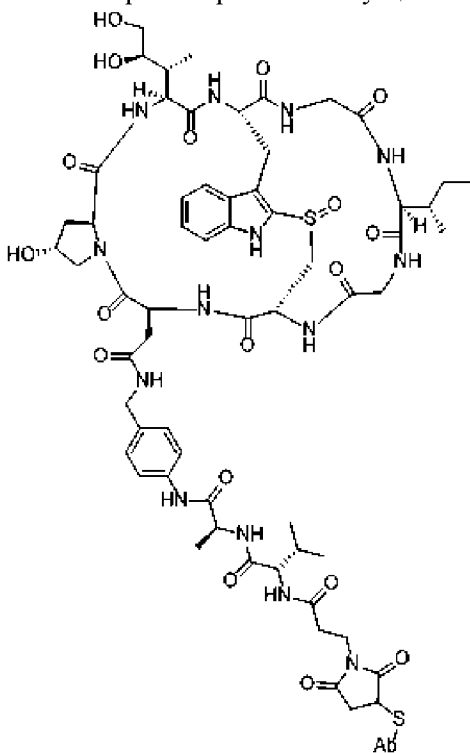
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



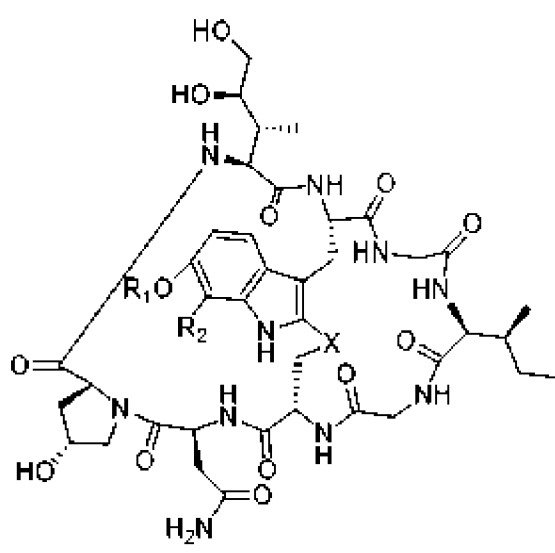
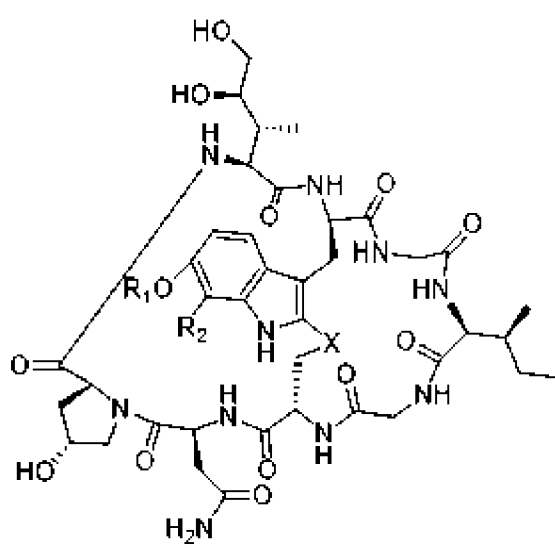
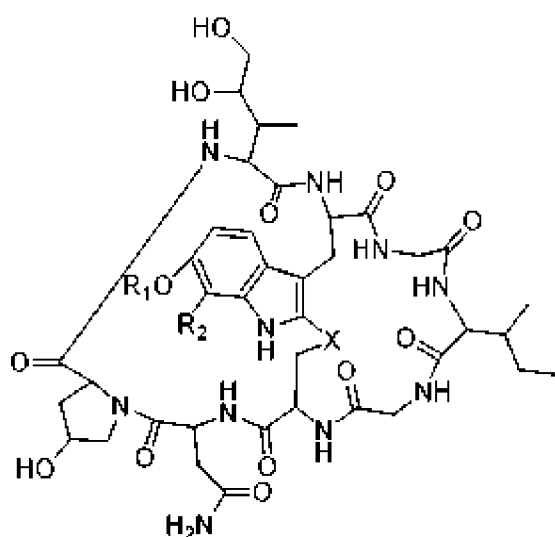
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



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



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

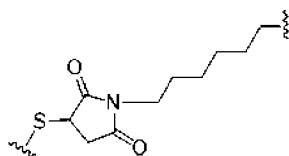


где X представляет собой S, SO или SO<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере,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

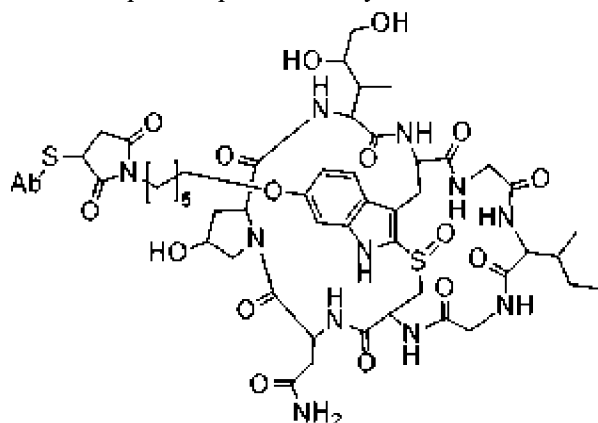
антигенсвязывающем фрагменте; и  $R_2$  представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; причем, когда  $R_1$  представляет собой H, то  $R_2$  представляет собой линкер, и когда  $R_2$  представляет собой H, то  $R_1$  представляет собой линкер.

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

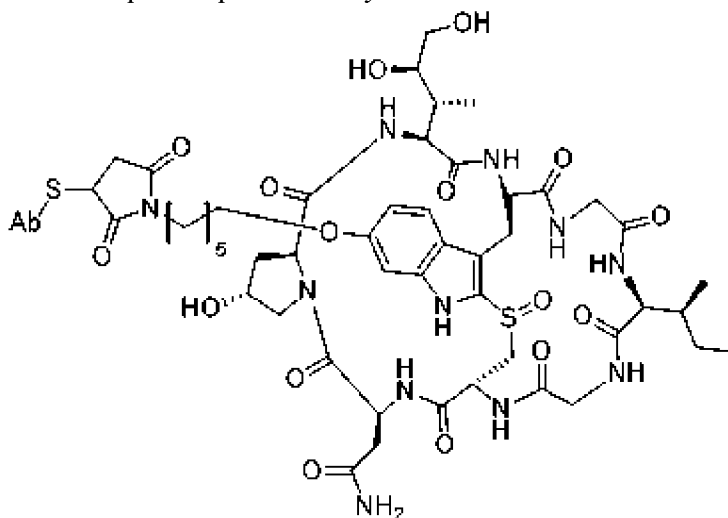
В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  представляет собой линкер, и  $R_2$  представляет собой H, причем линкер и химический фрагмент, вместе как L-Z, представляет собой



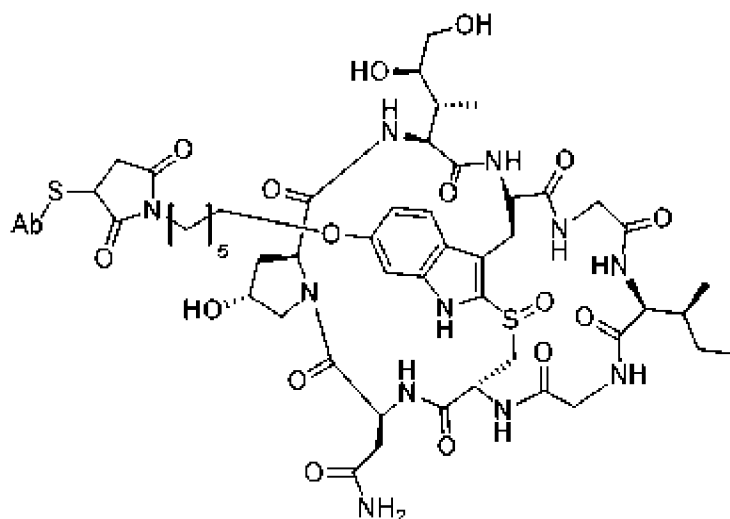
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



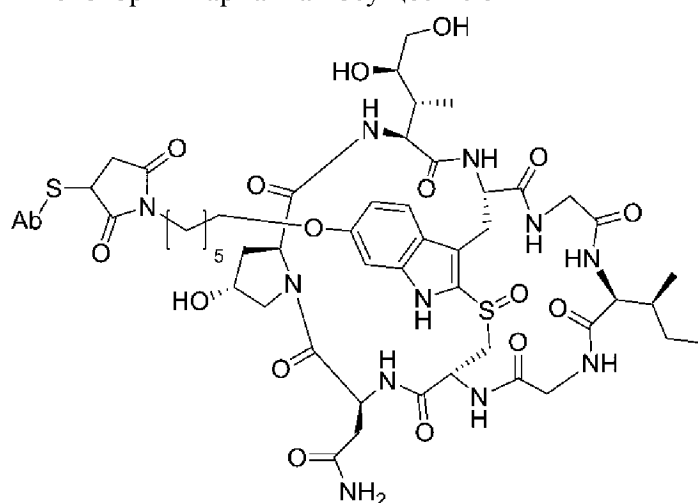
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



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

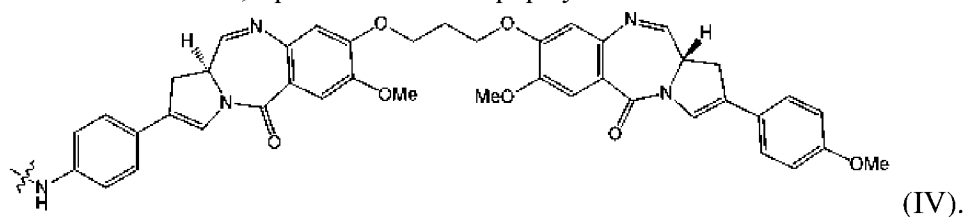


В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов цитотоксин представляет собой мейтансиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина E и монометилауристатина 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 пирролобензодиазепина, представленный формулой



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через малеимидакапроильный линкер.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристин,

выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина Е и монометилауристатина F.

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

В некоторых вариантах осуществления после введения пациенту антитело или его антигенсвязывающий фрагмент интернализуется в иммунной клетке, такой как Т-клетка или НК-клетка (например, CD2+ Т-клетка или CD2+ НК-клетка). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть интернализованы в Т-клетках через опосредованный рецептором эндоцитоз (например, после связывания с клеточной поверхностью CD2). В некоторых вариантах осуществления цитотоксин, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, может высвобождаться внутриклеточно в результате химического расщепления (например, ферментативного или неспецифического расщепления линкера, представленного в настоящем описании). Затем цитотоксин может получить доступ к своей внутриклеточной мишени (такой как, в частности, РНК-полимераза, аппарат митотического веретена, ядерная ДНК, рибосомная РНК или топоизомеразы), обеспечивая гибель эндогенной иммунной клетки (например, CD2+ Т-клетки или CD2+ НК-клетки) до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство способны стимулировать некроз иммунной клетки, такой как Т-клетка или НК-клетка (например, CD2+ Т-клетка или CD2+ НК-клетка). В некоторых вариантах осуществления при введении пациенту антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут способствовать гибели эндогенной иммунной клетки (например, CD2+ Т-клетки или CD2+ НК-клетки) перед трансплантационной терапией путем рекрутирования одного или более белков комплемента, НК-клеток, макрофагов, нейтрофилов и/или эозинофилов в иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят аутологичный трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки. Например, аутологичные гемопоэтические стволовые клетки могут быть получены от пациента, такого как пациент, нуждающийся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и впоследствии клетки могут быть введены (например, путем инфузии) пациенту для репопуляции одного или более типов клеток гемопоэтической линии. Изъятые гемопоэтические стволовые клетки могут быть повторно введены субъекту, например, после их поддержания *ex vivo* в течение одного или более часов, дней или недель. Например, изъятые гемопоэтические стволовые клетки могут повторно вводиться пациенту через от 1 часа до 1 недели, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов или от 1 часа до 24 часов после их извлечения из пациента. В некоторых вариантах осуществления извлеченные гемопоэтические стволовые клетки замораживают для более длительного хранения перед повторной инфузией пациенту. Например, изъятые гемопоэтические

стволовые клетки могут быть заморожены и подвергнуты криоконсервации в течение от примерно 1 недели до примерно 1 года или более до повторной инфузии пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят аллогенный трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки. Например, аллогенные гемопоэтические стволовые клетки могут быть получены от донора, такого как HLA-совместимый с пациентом донор, например, близкий родственник пациента. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки не являются HLA-совместимыми с пациентом. После получения аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от донора клетки можно впоследствии вводить (например, путем инфузии) пациенту для репопуляции одного или более типов клеток гемопоэтической линии. Изъятые гемопоэтические стволовые клетки могут быть заново введены субъекту, например, после поддержания *ex vivo* в течение одного или более часов, дней или недель. Например, изъятые гемопоэтические стволовые клетки могут быть введены пациенту путем инфузии через от 1 часа до 1 недели, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов или от 1 часа до 24 часов после их получения от донора. В некоторых вариантах осуществления извлеченные гемопоэтические стволовые клетки замораживают для более длительного хранения перед повторной инфузией пациенту. Например, изъятые гемопоэтические стволовые клетки могут быть заморожены и подвергнуты криоконсервации в течение от примерно 1 недели до примерно 1 года или более до повторной инфузии пациенту.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация анти-CD2-антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство была практически элиминирована из крови пациента.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через от примерно 1 часа до примерно 7 дней (например, от примерно 6 часов до примерно 3 дней, от примерно 12 часов до примерно 36 часов или примерно 24 часа) после того, как концентрация анти-CD2 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство была практически элиминирована из крови пациента.

В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональную эффективность гемопоэтических стволовых клеток через два или более дней (например, от примерно 2 до примерно 5 дней, от примерно 2 до примерно 7 дней, от примерно 2 до примерно 20 дней, от примерно 2 до примерно 30 дней, например примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 4 дня, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней, примерно 8 дней, примерно 9 дней, примерно 10 дней, примерно 11 дней, примерно 12 дней, примерно 13 дней, примерно 14 дней, примерно 15 дней, примерно 16 дней, примерно 17 дней, примерно 18 дней, примерно 19 дней, примерно 20 дней, примерно 21 день, примерно 22 дня, примерно 23 дня, примерно 24 дня, примерно 25 дней, примерно 26 дней, примерно 27 дней, примерно 28 дней,

примерно 29 дней, примерно 30 дней или более) после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

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

В некоторых вариантах осуществления после трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки стимулируют 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.

В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от рака. Рак может представлять собой рак крови или тип лейкемии, такой как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления клетки CD2<sup>+</sup> содержат раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство истощают раковые клетки у пациента. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут обеспечивать примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% истощение или гибель, по существу, всех раковых клеток пациента.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело, 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 лимфобластного лейкоза, клетки хронического миелоидного лейкоза или клетки хронического лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки крови представляют собой мегакариоциты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглию, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты или В-лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления популяция CD2<sup>+</sup> клеток включает иммунные клетки, такие как CD2<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD2<sup>+</sup> NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов способ используется для лечения одного или более расстройств, например путем истощения популяции иммунных клеток у пациента, например, перед терапией трансплантацией

гемопозитических стволовых клеток для предотвращения или снижения вероятности отторжения трансплантата гемопозитических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, перекрестно реагирующих с трансплантатом гемопозитических стволовых клеток (например, перекрестно реагирующих с несобственными антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантатом гемопозитических стволовых клеток). После трансплантации гемопозитические стволовые клетки могут обеспечивать эффективный гемопоэз, восполняя дефицитный тип клеток у пациента или тип клеток, которые активно погибают или погибли, например, в результате химиотерапевтических методов. Например, пациент может страдать от нарушения, связанного со стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от гемоглобинопатии, такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия и синдром Вискотта-Олдрича. Пациент может страдать от иммунодефицитного состояния, такого как врожденное иммунодефицитное состояние или приобретенное иммунодефицитное состояние (например, вызванное вирусом иммунодефицита человека, или представляющее собой синдром приобретенного иммунодефицита). В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от нарушения обмена веществ, такого как заболевание накопления гликогена, мукополисахаридозы, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозы и метакроматической лейкоцистозии. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от расстройства, выбранного из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы, синдрома гипериммуноглобулина М, синдрома Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней депонирования, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки и ювенильного ревматоидного артрита. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от аутоиммунного заболевания, такого как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона, диабет типа 1. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от рака или миелопролиферативного заболевания, такого как гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфобластного лейкоза, множественной миеломы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы или неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от миелодиспластического расстройства, такого как миелодиспластический синдром.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов способ используется для непосредственного лечения рака, такого как рак, характеризующийся CD2+ клетками (например, лейкемии, характеризующийся CD2+ клетками), путем введения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата, которые истощают популяцию CD2+ раковых клеток у пациента, и/или путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента перед трансплантацией гемопозитических

стволовых клеток для предотвращения или снижения вероятности отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, перекрестно реагирующих с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток (например, перекрестно реагирующих с несобственными антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток). В последнем случае трансплантация, в свою очередь, позволяет восстанавливать, например, популяцию клеток, истощенных в процессе уничтожения раковых клеток. Рак может представлять собой гематологический рак, такой как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, множественную миелому, диффузную В-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов способ используется для лечения аутоиммунного заболевания, например путем введения анти-CD2 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата для истощения популяции CD2<sup>+</sup> аутоиммунных клеток (например, популяции аутореактивных CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или NK-клеток) и/или путем введения анти-CD2-антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток для предотвращения или снижения вероятности отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, которое в противном случае могло бы быть вызвано популяцией иммунных клеток, перекрестно реагирующих с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток (например, перекрестно реагирующих с несобственными антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантатом стволовых гемопоэтических клеток). В последнем случае трансплантация, в свою очередь, позволяет восстановить, например, популяцию клеток, истощенных в процессе уничтожения аутоиммунных клеток. Аутоиммунное заболевание может представлять собой, например, склеродермию, рассеянный склероз (MS), системную волчанку человека (SLE), ревматоидный артрит (RA), воспалительное заболевание кишечника (IBD), псориаз, сахарный диабет типа 1 (диабет типа 1), острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальную алопецию, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидных антител (APS), апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную болезнь внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости с иммунной дисфункцией (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, герпетиформный дерматит, ассоциированный с глютенной энтеропатией, синдром холодной агглютинации, CREST-синдром, болезнь Дегоса, дискоидную волчанку, дизавтономию, эндометриоз, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию-фибромиозит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическую и/или острую

тромбоцитопеническую пурпуру, идиопатический легочный фиброз, IgA-нейропатию, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, красный плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), миастению гравис, нейромиотонию, синдром опсоклонус-миоклонус (OMS), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, пузырчатку обыкновенную, пернициозную анемию, полихондрит, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узловой полиартериит, полиглангулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром неподвижного человека, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный артериит»), язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводинию («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, вызванное вирусом иммунодефицита человека или представляющее собой синдром приобретенного иммунодефицита). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения нарушения обмена веществ, такого как болезни накопления гликогена, мукополисахаридозы, болезнь Гоше, синдром Гурлера, сфинголипидозы и метахроматическая лейкодистрофия. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы, синдрома гипериммуноглобулина М, синдрома Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней депонирования, 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, диабет типа 1. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения рака или миелопролиферативного заболевания, такого как гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфобластного лейкоза, множественной миеломы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы или неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает от миелодиспластического расстройства, такого как миелодиспластический синдром. В этих вариантах осуществления способ может включать введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата,

которые связываются с CD2, такого как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат любого из аспектов или вариантов осуществления изобретения. Способ может дополнительно включать введение пациенту трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, согласно способу по любому из аспектов или вариантов осуществления изобретения.

Аналогично, в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов изобретение относится к способу лечения рака непосредственно, такого как рак, характеризующийся CD2+ клетками (например, лейкоз, характеризующийся CD2+ клетками). В этих вариантах осуществления способ может включать введение пациенту антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата, которые связываются с CD2, например, как раскрыто в настоящем описании. Рак может представлять собой гематологический рак, такой как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, множественную миелому, диффузную В-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому.

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, такого как MS, SLE, RA, IBD, псориаз, сахарный диабет типа 1, 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, герпетиформный дерматит, ассоциированный с глютеновой энтеропатией, синдром холодовой агглютинации, CREST-синдром, болезнь Дегоса, дискоидная волчанка, дизавтономия, эндометриоз, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, фибромиалгия-фибромиозит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, GBS, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическая и/или острая тромбоцитопеническая пурпура, идиопатический легочный фиброз, IgA-нейропатия, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, красный плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, MCTD, миастения гравис, нейромиотония, OMS, неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, пузырчатка обыкновенная, пернициозная анемия, полихондрит, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узловой полиартериит, полигландулярные синдромы, ревматическая полимиалгия, первичная агаммаглобулинемия, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическая лихорадка, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром неподвижного человека, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный 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,

которые связываются с CD2, такие как раскрытые в настоящем описании.

В другом аспекте композиции и способы, раскрытые в настоящем описании, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с токсином. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются линией клеток гибридомы ATCC HB 11423. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, продуцируемым линией клеток гибридомы ATCC HB 11423. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 1);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO:2);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY (SEQ ID NO: 3);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLLHSSGNTYLN (SEQ ID NO:4);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность LVSKLES (SEQ ID NO: 5); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые содержат следующие CDR:

CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 1);

CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO:2);

CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY (SEQ ID NO: 3);

CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLLHSSGNTYLN (SEQ ID NO:4);

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность LVSKLES (SEQ ID NO: 5); и

CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 6).

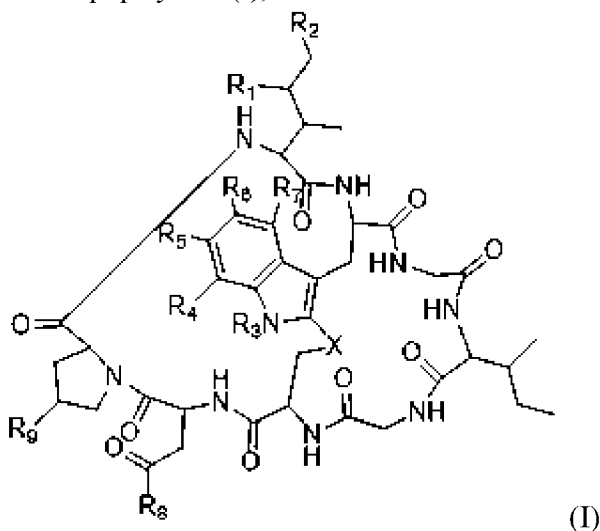
В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с токсином, выбирают из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, двойного вариабельного домена иммуноглобулина,

scFv, диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, фрагмента Fv, фрагмента Fab, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с цитотоксином, представлены формулой Ab-Cy, где Ab представляет собой анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а Cy представляет собой цитотоксин. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин выбирают из группы, состоящей из аматоксина, экзотоксина *A Pseudomonas*, деБуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатина, антрацилина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина или их вариантов.

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. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аматоксин, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с цитотоксином, представлены формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело 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<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>, если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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>;

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

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

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

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

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

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

$R_C$  представляет собой -L-Z;

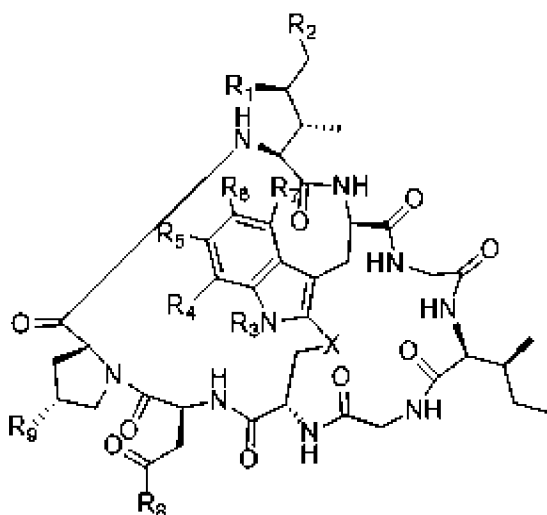
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный 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 на антители или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ T-клетки или CD2+ NK клетки.

В некоторых вариантах осуществления Am содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

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



(IA),

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

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

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

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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,  $C_1$ - $C_6$  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;

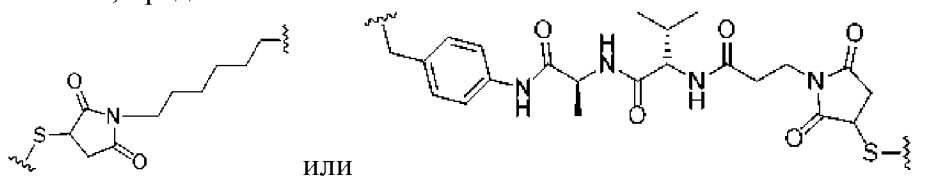
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например,  $C_1$ - $C_6$  алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен ( $C_1$ - $C_6$  гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например,  $C_2$ - $C_6$  алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например,  $C_2$ - $C_6$  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 гетероарил, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинация;

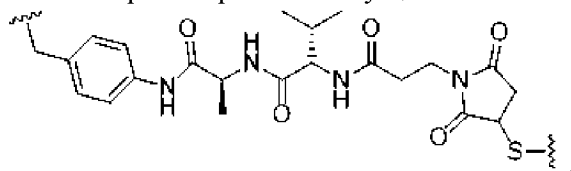
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ T-клетки или CD2+ NK клетки; и

где Am содержит ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

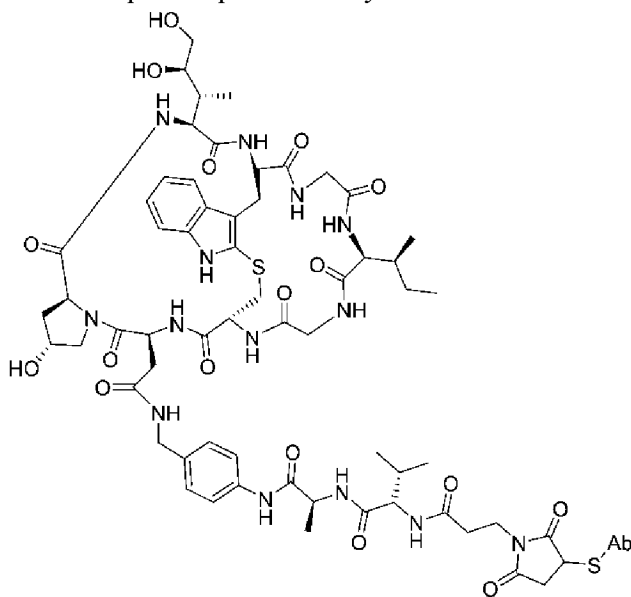
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



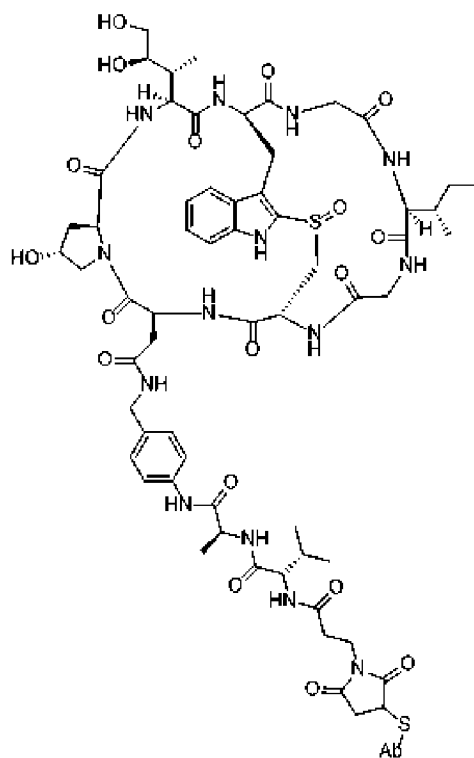
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



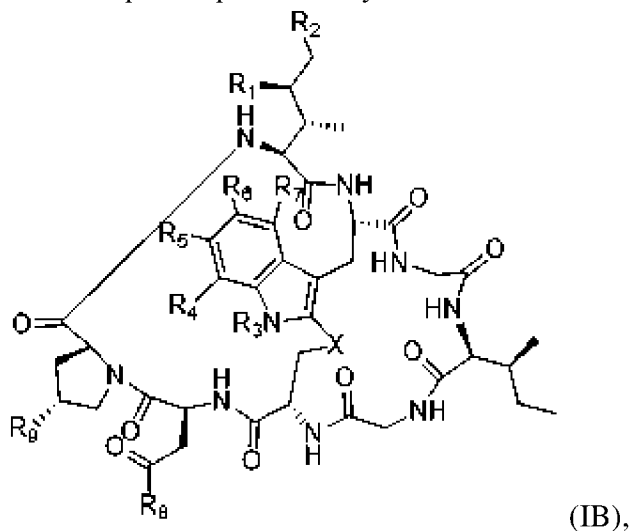
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

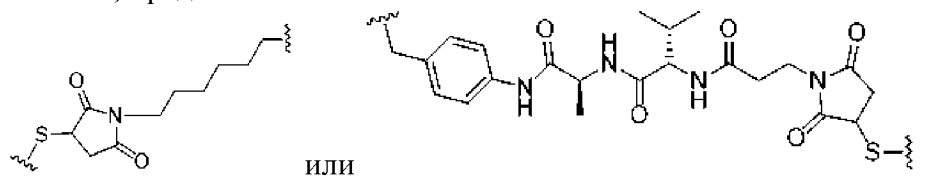
RD представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (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;

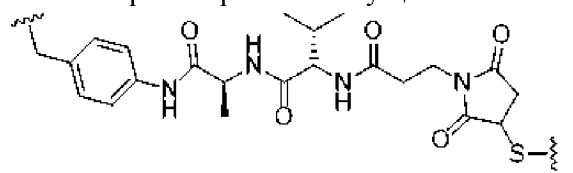
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, например, на поверхности CD2+ T-клетки или CD2+ NK клетки; и

где Am содержит ровно один заместитель  $R_C$ .

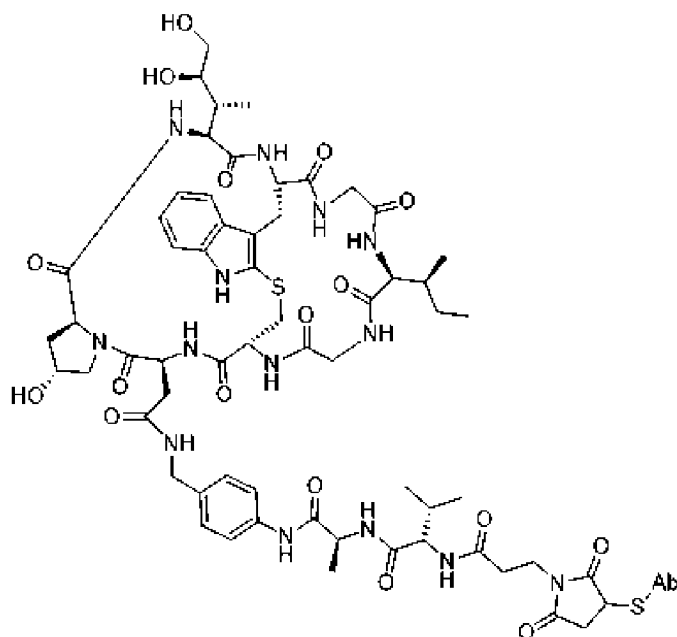
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



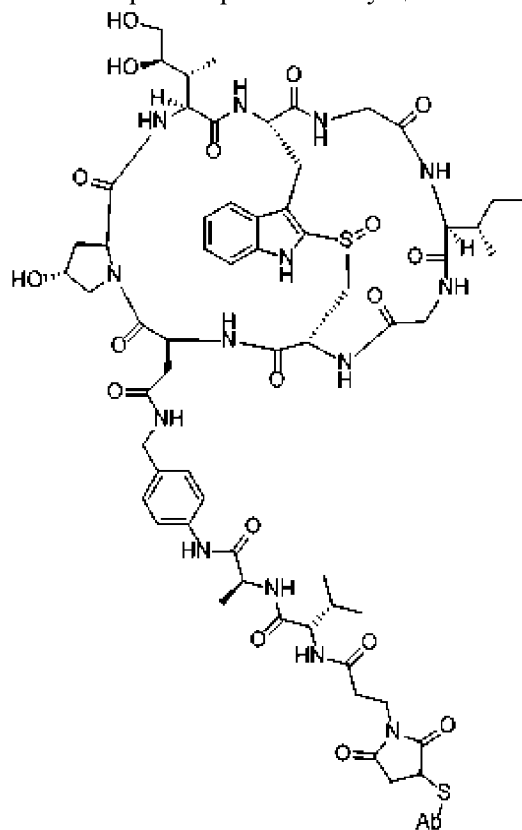
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



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



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



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



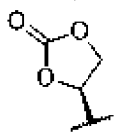
где Y представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; и

каждый из  $R_E$  и  $R_{E'}$  независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_6$  алкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_1$ - $C_6$  гетероалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2$ - $C_6$  алкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2$ - $C_6$  гетероалкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2$ - $C_6$  алкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2$ - $C_6$  гетероалкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный циклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный гетероциклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный арилен- $R_C$  или необязательно замещенный 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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

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

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

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

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

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

$R_9$  представляет собой H или OH; и

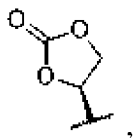
причем каждый из  $X$ ,  $R_C$  и  $R_D$  является таким, как определено выше.

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, объединены с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

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

каждый из  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_9$  представляет собой H или OH; и

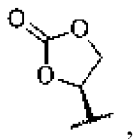
причем  $X$  и  $R_C$  является таким, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления Am представлено 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, объединены с образованием:



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

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

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

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

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

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

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

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

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

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

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

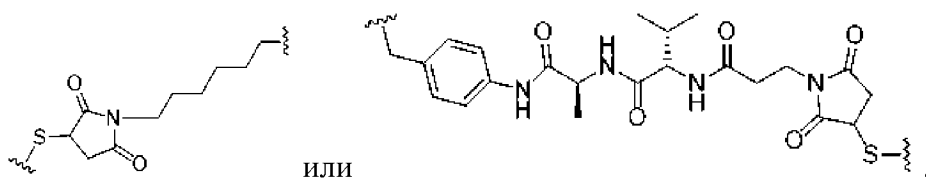
каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;

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

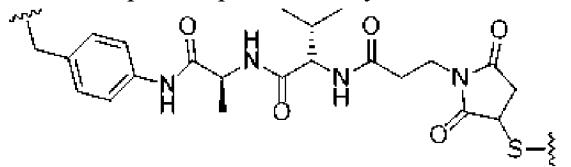
$R_9$  представляет собой H или OH; и

причем X и  $R_C$  являются такими, как определено выше.

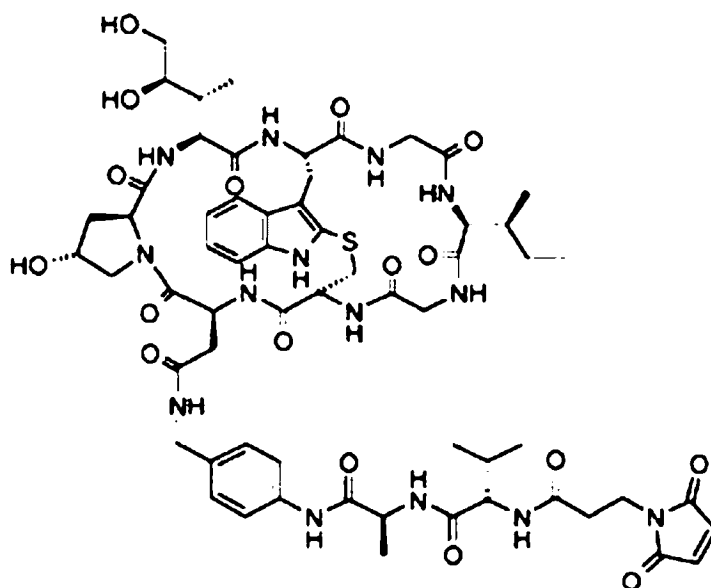
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой

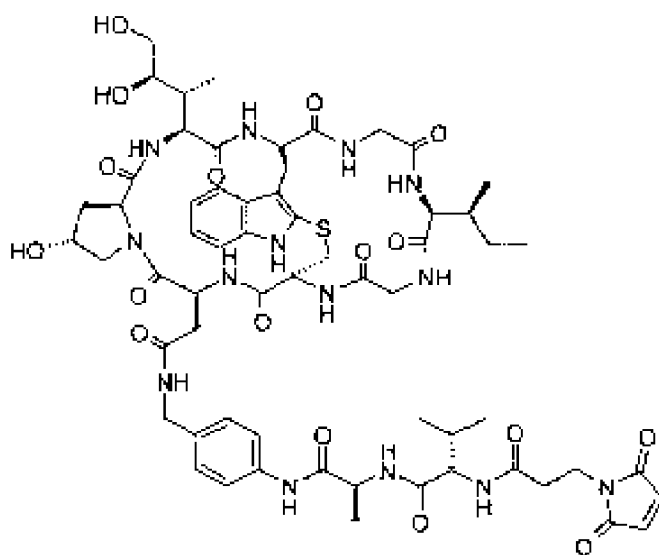


В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



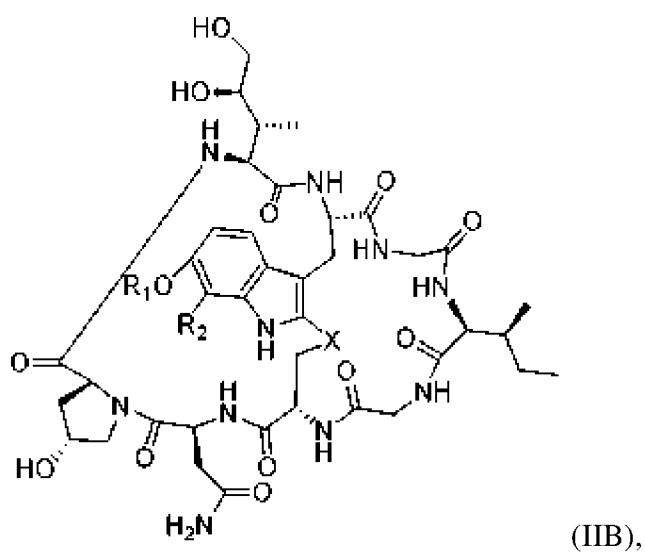
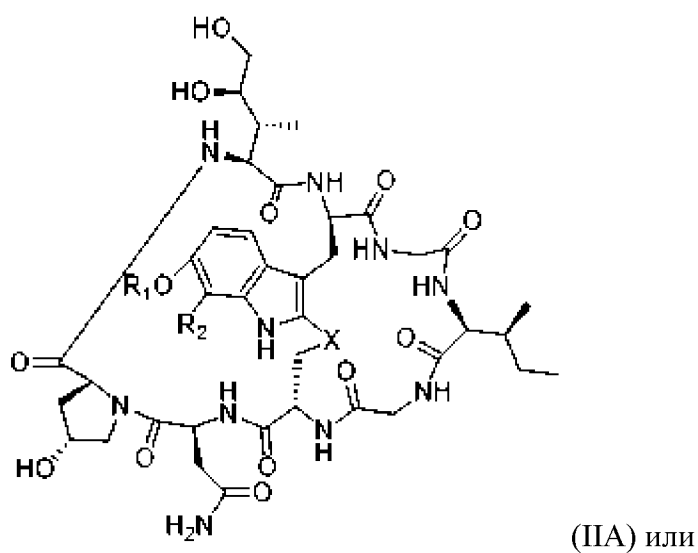
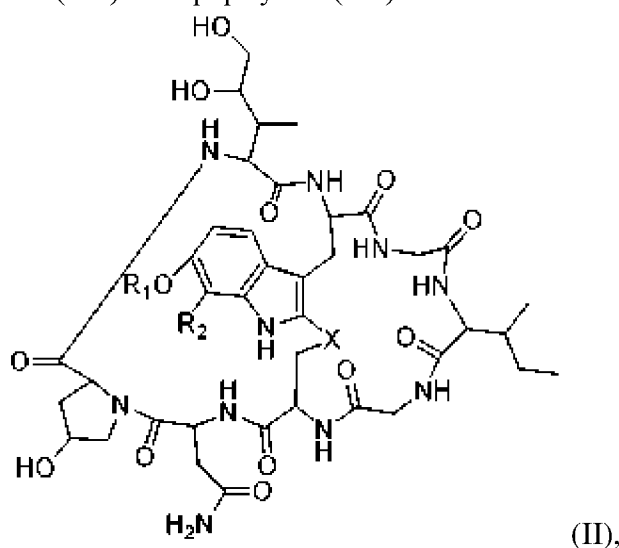
где малеимид реагирует с тиоловой группой цистеина, содержащегося в антителе.

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



где малеимид реагирует с тиоловой группой цистеина, содержащегося в антителе.

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

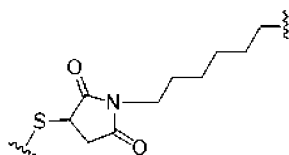


где X представляет собой S, SO или SO<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через

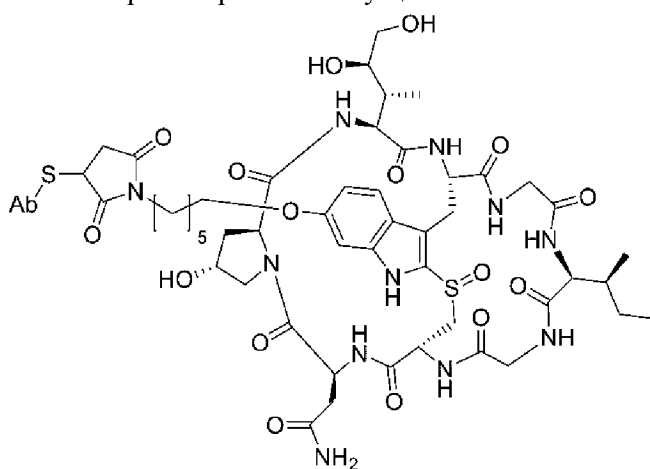
химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и R<sub>2</sub> представляет собой H или линкер, ковалентно связанный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

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

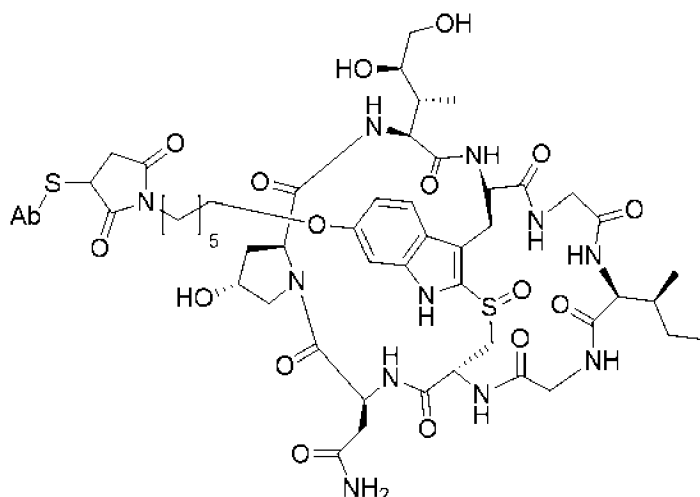
В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой линкер, и R<sub>2</sub> представляет собой H, причем линкер и химический фрагмент, вместе как L-Z, представляет собой



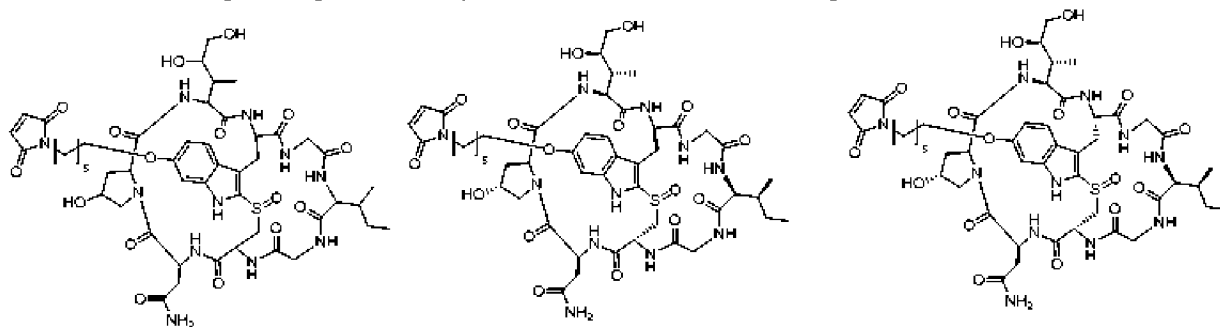
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



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



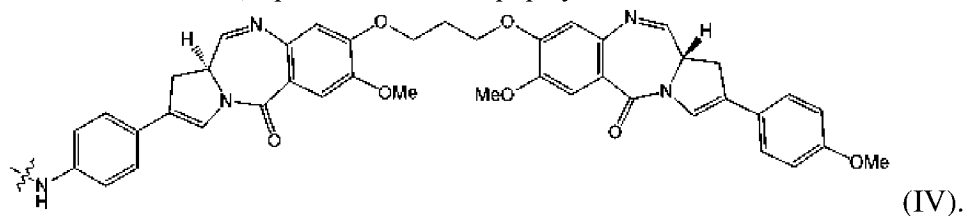
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой одно из:



где малеимид реагирует с тиоловой группой цистеина, содержащегося в антителе.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой мейтансиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристатин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина E и монометилауристатина 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 пирролобензодиазепина, представленный формулой



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через малеимидокапроильный линкер.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ауристатин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина E и монометилауристатина F.

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

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из указанных выше аспектов или вариантов осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для чрескожного, подкожного, интраназального, внутривенного, внутримышечного, интраокулярного, внутриопухолевого, парентерального, местного, интратекального или интрацеребровентрикулярного введения пациенту-человеку.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фиг.1 дано графическое представление результатов анализа связывания *in vitro* с использованием клеточной линии, где каждое из указанных анти-CD2-антител или отрицательный контроль (т.е. mIgG1) инкубировали с клетками MOLT-4 (т.е. человеческой клеточной линией Т-лимфобластов), а затем инкубировали с анти-IgG антителом, конъюгированным с флуорофором. Сигнал детектировали методом проточной цитометрии и представляли в виде средней геометрической интенсивности флуоресценции (ось Y) в зависимости от концентрации анти-CD2 антитела (ось X).

На фиг.2 дано графическое представление результатов анализа связывания *in vitro* с использованием первичных клеток, где указанное анти-CD2 антитело (RPA-2.10) или отрицательный контроль (т.е. mIgG1) инкубировали с первичными человеческими Т-клетками, а затем инкубировали с анти-IgG антителом, конъюгированным с флуорофором. Сигнал детектировали с помощью проточной цитометрии и представляли в виде средней геометрической интенсивности флуоресценции (ось Y) в зависимости от концентрации анти-CD2 антитела (ось X).

На фиг. 3А и 3В дано графическое представление результатов анализа *in vitro* гибели Т-клеток, включающего анти-CD2-аманитин ADC (т.е. RPA-2.10-AM или «CD2 AM»), содержащий аманитин, конъюгированный посредством межцепочечных связей, со средним отношением лекарственное средство-антитело, равным 6 (фиг. 3А), или сайт-специфически конъюгированный аманитин со средним отношением антитело-лекарственное средство, равным 2 (фиг. 3В). На фиг.3А показан анализ гибели Т-клеток с анти-CD2-ADC по сравнению с неконъюгированным анти-CD2 антителом (т.е. «голым CD2»). На фиг. 3В результаты для анти-CD2-антитела показаны по сравнению с анти-CD2 антителом, имеющим мутацию H435A, которая приводит к сокращению периода полураспада антитела. Результаты показывают количество жизнеспособных Т-клеток (ось Y) в виде функции от концентрации ADC (CD2 RPA-2.10 AM, CD2 D265C.H435A AM) или неконъюгированного антитела (CD2 RPA-2.10) (ось X), измеренное с помощью проточной цитометрии.

На фиг.4 дано графическое представление результатов анализа гибели *in vitro* натуральных киллеров (NK), включающего анти-CD2-аманитин ADC (т.е., RPA-2.10-AM или «CD2 AM»), содержащий аманитин, конъюгированный посредством межцепочечных связей с лекарственным средством, в отношении антитело-лекарственное средство,

равном 6. Результаты показывают уровни жизнеспособных NK-клеток (ось Y) в виде функции от концентрации ADC (CD2-AM) или контрольного антитела (т.е. hIgG1, hIgG1-аманитин («hIgG1-AM»)) (ось x), определенные с помощью анализа CellTiter Glo.

На фиг. 5A и 5B дано графическое представление результатов анализа истощения Т-клеток *in vivo*, демонстрирующих абсолютные уровни Т-клеток (CD3<sup>+</sup> клеток; ось Y) в периферической крови (фиг. 5A) и костном мозге (фиг. 5B) гуманизированных NSG мышей через 7 дней после однократного введения 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг анти-CD2-аманитин ADC (т.е. RPA-2.10-AM), имеющего отношение конъюгированного посредством межпочечных связей лекарственного средства к антителу, равное 6. Для сравнения на фиг. 5A и 5B также показан уровень истощения Т-клеток после обработки гуманизированных NSG мышей 25 мг/кг Ab1 (неконъюгированным анти-CD2 антителом) или указанными контролями (т.е. 25 мг/кг анти-CD2 антитела (клон YTH34,5); 3 мг/кг hIgG1-аманитин ADC («hIgG1-AM»), 25 мг/кг hIgG1 или PBS).

На фиг. 6A-6C дано графическое представление результатов анализа истощения Т-клеток *in vivo*, демонстрирующих абсолютные уровни Т-клеток (CD3<sup>+</sup> клеток; ось Y) в периферической крови (фиг. 6A), костном мозге (фиг. 6B), и тимусе (фиг. 6C) гуманизированных NSG мышей через 7 дней после однократного введения 1 мг/кг или 3 мг/кг анти-CD2-аманитин ADC (т.е. RPA-2.10-AM), имеющего отношение сайт-специфически конъюгированного лекарственного средства к антителу, равное примерно 2. Для сравнения на фиг. 6A-6C также показан уровень истощения Т-клеток после обработки гуманизированных NSG мышей 3 мг/кг неконъюгированного анти-CD2 антитела или указанного контроля (т.е. 3 мг/кг hIgG1-аманитин ADC («hIgG1-AMC») или PBS).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение отчасти основано на открытии того, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD2 (также называемым антигеном Т-клеточной поверхности, рецептором LFA-2 и LFA-3), можно использовать в качестве терапевтических агентов для (i) непосредственного лечения раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся CD2<sup>+</sup> клетками, и (ii) улучшения приживления трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у нуждающегося в трансплантационной терапии пациента путем истощения популяций иммунных клеток, перекрестно реагирующих с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток и усиливающих иммунный ответ на этот трансплантат (например, через перекрестные взаимодействия с несобственными антигенами МНС, экспрессируемыми трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток). Эти виды терапевтической активности могут возникать, например, в результате связывания анти-CD2 антител или их антигенсвязывающих фрагментов с CD2, экспрессируемым на поверхности клетки, такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или иммунная клетка, которая перекрестно реагирует с несобственным антигеном гемопоэтических стволовых клеток (например, несобственным антигеном МНС), вызывая тем самым гибель связанной клетки. Применительно к истощению популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток, анти-

CD2-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для непосредственного лечения рака или аутоиммунного заболевания, такого как представленное в настоящем описании злокачественное аутоиммунное заболевание. Применительно к истощению популяции иммунных клеток, перекрестно реагирующих с несобственным антигеном гемопоэтических стволовых клеток, анти-CD2 антитело и его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для предотвращения или снижения вероятности отторжения трансплантата у пациента, страдающего от заболевания стволовых клеток, рака или аутоиммунного заболевания, который получает терапию трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. В таких случаях истощение CD2+ иммунных клеток, перекрестно реагирующих с одним или более несобственными антигенами стволовых клеток (например, с одним или более несобственными антигенами МНС), обеспечивает успешное приживание трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у реципиента трансплантата. По мере приживания трансплантированные клетки могут стать источником кроветворной ткани, которая впоследствии может обеспечить продуктивное кроветворение. Трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут впоследствии привести к восстановлению популяции клеток, которые у реципиента трансплантата являются дефектными или находятся в недостаточном количестве, таких как мегакариоциты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглия, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Таким образом, анти-CD2 антитела или их фрагменты можно использовать для обеспечения успешного приживания гемопоэтических стволовых клеток у пациента, такого как пациент-человек, страдающего от указанного в настоящем описании заболевания стволовых клеток.

### **Определения**

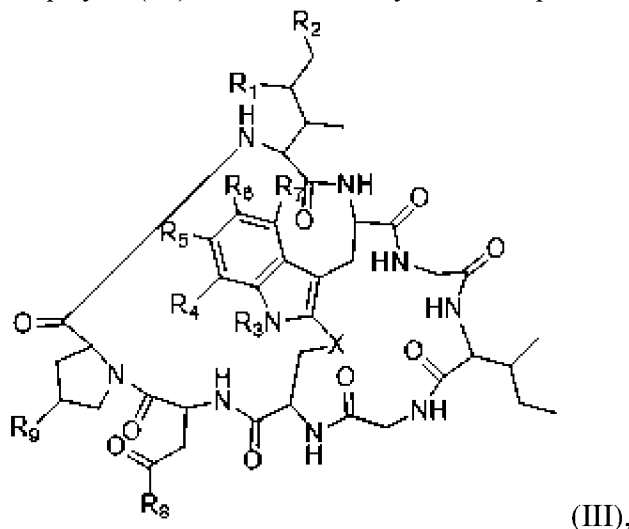
Используемый в настоящем описании термин «примерно» относится к значению, которое находится в пределах 10% выше или ниже описываемого значения. Например, термин «примерно 5 нМ» означает диапазон от 4,5 нМ до 5,5 нМ.

Используемый в настоящем описании термин «аматоксин» относится к члену семейства пептидов аматоксина, продуцируемых грибами *Amanita phalloides*, синтетическому аматоксину, варианту аматоксина или его производному, такому как его вариант или производное, которые способны ингибировать активность РНК-полимеразы II. Также включены синтетические аматоксины (см., например, патент США № 9676702, включенный в настоящее описание в виде ссылки). В контексте настоящего описания, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, через линкерный фрагмент (L) (таким образом, образуя конъюгат (также называемый конъюгатом лекарственное средство-антитело (ADC))). Примеры методов конъюгации аматоксина и линкеров, используемые для таких процессов, описаны ниже. В настоящем описании также приведены примеры содержащих линкер

аматоксинов, полезных для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с композициями и способами.

В некоторых вариантах осуществления аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, представленными в настоящем описании, включают соединения формулы (III),  $\alpha$ -аманитин,  $\beta$ -аманитин,  $\gamma$ -аманитин,  $\varepsilon$ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту или проамануллин.

Формула (III) выглядит следующим образом:



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

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

$R_A$  и  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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  $OR_D$ ;

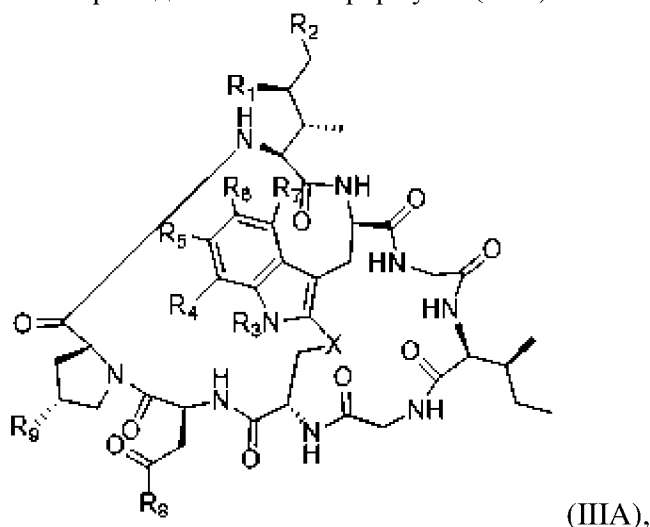
$R_9$  представляет собой H, OH или  $OR_D$ ;

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

$R_D$  представляет собой 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.

Например, в одном из вариантов осуществления аматоксины, полезные в сочетании

с композициями и способами, представленными в настоящем описании, включают соединения приведенной ниже формулы (IIIА):



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

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

$R_A$  и  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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  $R_D$ ;

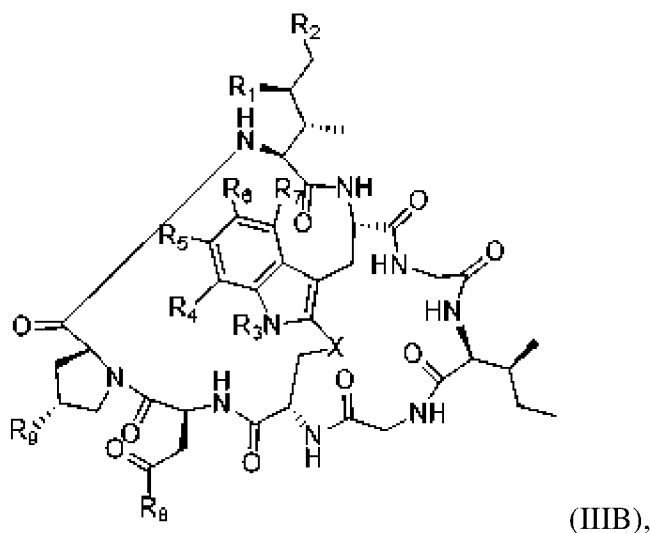
$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$  или  $OR_D$ ;

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

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

$R_D$  представляет собой 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.

В одном из вариантов осуществления аматоксины, полезные в сочетании с композициями и способами, представленными в настоящем описании, также включают соединения приведенной ниже формулы (IIIВ):



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

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

$R_A$  и  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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 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.

Согласно описанию, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, с помощью линкерного фрагмента. Примеры способов конъюгации аматоксина с линкерами, полезными для таких процессов, описаны в разделе, озаглавленном «Линкеры для химической конъюгации», и приведены в таблице 1 ниже. Примеры линкер-содержащих аматоксинов, используемых для конъюгации с анти-CD2 антителом, антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, представленными в настоящем описании, представлены структурными формулами (I), (IA), (IB), (II), (IIA) и (IIIB), приведенными в настоящем

описании.

В контексте настоящего описания термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается или является иммунологически реактивной по отношению к конкретному антигену. Примеры антител включают поликлональные, моноклональные, генетически сконструированные и иным образом модифицированные формы антител, включая, без ограничения, химерные антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгатные антитела (например, би-три- и тетра-специфические антитела, диатела, триатела и тетратела) и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, фрагменты Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG и scFv. Используемые в настоящем описании фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub> относятся к фрагментам антител, в которых отсутствует Fc-фрагмент интактного антитела. Примеры этих фрагментов антител представлены в настоящем описании.

Как правило, антитела содержат тяжелые и легкие цепи, содержащие антигенсвязывающие участки. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержит по три CDR и четыре FR, расположенные в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первого компонента (C1q) классической системы комплемента.

В контексте настоящего описания, термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле, которая отличается от интактного антитела и которая содержит часть интактного антитела и связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Фрагменты антитела могут представлять собой, например, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, диатело, триатело, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv), аффитело, нанотело, аптамер или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают, без ограничения: (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> и C<sub>H</sub>1; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-

фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_H1$ ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела, (v) dAb, включающее домены  $V_H$  и  $V_L$ ; (vi) фрагмент dAb, состоящий из домена  $V_H$  (см., например, Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989); (vii) dAb, состоящее из домена  $V_H$  или  $V_L$ ; (viii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); и (ix) комбинацию двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена  $V_L$  и  $V_H$  Fv-фрагмента кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с помощью рекомбинантных методов посредством линкера, обеспечивающего образование одной белковой цепи, в которой  $V_L$  и  $V_H$  области спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988 и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антител могут быть получены с помощью традиционных методов, известных специалистам в данной области, и подвергнуты скринингу на наличие полезных свойств, аналогичных тем, которые присущи интактным антителам. 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.

В контексте настоящего описания термин «анти-CD2 антитело» или «антитело, которое связывается с CD2» относится к антителу, которое специфически связывается с CD2. Антитело, «которое связывается» с представляющим интерес антигеном, т.е. CD2, представляет собой антитело, способное связывать этот антиген с достаточным сродством, чтобы антитело можно было использовать для нацеливания на клетку, экспрессирующую этот антиген. В предпочтительном варианте осуществления антитело специфически связывается с человеческим CD2 (hCD2). CD2 находится на клеточной поверхности иммунных клеток, таких как Т-клетки. Аминокислотная последовательность человеческого CD2, с которым связывается анти-CD2 антитело (или анти-CD2 конъюгат), приведена ниже в SEQ ID NO: 13.

В контексте настоящего описания термин «биспецифическое антитело» относится к гибриднему антителу, имеющему два разных антигенсвязывающих участка. Биспецифические антитела являются разновидностью полиспецифических антител и могут быть получены различными способами, включая, без ограничения, слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. Два связывающих участка биспецифического антитела будут связываться с двумя разными эпитопами, которые могут находиться на одном или разных целевых белках. Например, одна из специфичностей связывания может быть направлена на антиген на поверхности Т-клеток, такой как CD2, другая может связываться с другим антигеном на поверхности Т-клеток или другим белком клеточной поверхности, таким как рецептор или субъединица рецептора, участвующая в пути сигнальной трансдукции, который, помимо прочего,

стимулирует рост клеток.

В контексте настоящего описания, термин «определяющая комплементарность область» (CDR) относится к гипервариабельной области, присутствующей в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи антитела. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Положения аминокислот, определяющие границы гипервариабельной области антитела, могут меняться в зависимости от контекста и различных методов определения, известных в данной области. Некоторые положения в вариабельной области могут рассматриваться как гибридные положения гипервариабельной области, поскольку, с точки зрения одного набора критериев, эти положения можно рассматривать как находящиеся внутри гипервариабельной области, в то время как с точки зрения другого набора критериев они находятся вне гипервариабельной области. Одно или более из этих положений также можно найти в расширенных гипервариабельных областях. Представленные в настоящем описании антитела могут содержать модификации в этих гибридных положениях гипервариабельной области. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей включает четыре FR области, которые в большинстве случаев имеют конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенного тремя CDR, которые образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях, являются частью структуры  $\beta$ -листа. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью каркасных областей в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и вместе с CDR другой цепи антитела участвуют в образовании антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD., (1987). Используемая в настоящем описании нумерация аминокислотных остатков иммуноглобулина соответствует системе нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулина по Kabat et al., если не указано иное.

В контексте настоящего описания термины «состояние» и «кондиционирование» относятся к процессам подготовки пациента к получению трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (например, как следует из устойчивого увеличения количества жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток в образце крови, полученном от пациента, после процедуры кондиционирования и последующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Согласно приведенным в настоящем описании способам, пациент может быть подвергнут кондиционированию для получения терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток путем введения ему антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с антигеном, экспрессируемым Т-клетками, таким как CD2. Согласно настоящему описанию, анти-CD2 антитело может быть конъюгировано с помощью ковалентных связей с цитокином, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство. Введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство, которые способны связывать один или более вышеуказанных антигенов у пациента,

нуждающегося в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем избирательного истощения эндогенных иммунных клеток, таких как CD2<sup>+</sup> Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки) и/или CD2<sup>+</sup> NK-клетки, которые перекрестно реагируют с одним или более несобственными антигенами, экспрессируемыми гемопоэтическими стволовыми клетками (например, одним или более несобственными антигенами МНС). Такое избирательное истощение иммунных клеток, в свою очередь, предотвращает или уменьшает вероятность отторжения трансплантата после трансплантации экзогенного (например, аутологичного, аллогенного или сингенного) трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

В контексте настоящего описания 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 представленный в настоящем описании цитотоксин. Конъюгаты могут включать линкер между двумя молекулами (например, анти-CD2 антителом и цитотоксином), связанными друг с другом. Примеры линкеров, которые можно использовать для образования конъюгата, включают пептид-содержащие линкеры, например, линкеры, содержащие встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры могут быть получены с использованием различных стратегий, представленных в настоящем описании и известных в данной области. В зависимости от реакционноспособных компонентов линкер может быть расщеплен, например, в результате ферментативного гидролиза, фотолиза, гидролиза в кислых условиях, гидролиза в основных условиях, окисления, восстановления дисульфида, нуклеофильного расщепления или металлоорганического расщепления (см., например, Leriche et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012).

В контексте настоящего описания термин «реакция сочетания» относится к химической реакции, в которой два или более заместителя, подходящих для взаимодействия друг с другом, реагируют с образованием химического фрагмента, который соединяет (например, ковалентно) молекулярные фрагменты, связанные с каждым заместителем. Реакции сочетания включают реакции, в которых реакционноспособный заместитель, связанный с фрагментом, который представляет собой цитотоксин, такой как цитотоксин, известный в данной области техники или представленный в настоящем описании, реагирует с подходящим реакционноспособным заместителем, связанным с фрагментом, который является антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или антителом, таким как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или CD2-специфическое антитело, известные в данной области или представленные в настоящем описании. Примеры подходящих реакционноспособных заместителей включают пару нуклеофил/электрофил (например, в частности, пару тиол/галогеналкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ $\alpha,\beta$ -ненасыщенный

карбонил), пару диен/диенофил (например, в частности, пару азид/алкин) и т.п. Реакции сочетания включают, без ограничения, алкилирование тиола, алкилирование гидроксила, алкилирование амина, конденсацию амина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, в частности, [4+2]-циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2]-циклоприсоединение Хьюсена), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционноспособные формы, известные в данной области техники или представленные в настоящем описании.

В контексте настоящего описания термин «CRU (конкурентная репопуляционная единица)» относится к единице измерения долгосрочного приживления стволовых клеток, которые можно обнаружить после трансплантации *in vivo*.

В контексте настоящего описания термин «отношение лекарственное средство-антитело» или «DAR» относится к количеству цитотоксинов, например аматоксина, присоединенного к антителу ADC. Значение DAR ADC может меняться от 1 до 8, хотя также возможна более высокая нагрузка в зависимости от количества участков связывания на антителе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленный в настоящем описании ADC имеет DAR, равный 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

В контексте настоящего описания термин «донор» относится к человеку или животному, из которого выделены одна или более клеток до введения клеток или их потомства реципиенту. Одна или более клеток могут представлять собой, например, популяцию гемопоэтических стволовых клеток.

В контексте настоящего описания термин «диатело» относится к двухвалентному антителу, содержащему две полипептидные цепи, причем каждая полипептидная цепь включает  $V_H$  и  $V_L$  домены, соединенные слишком коротким линкером (например, линкером, состоящим из пяти аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярное соединение  $V_H$  и  $V_L$  доменов на одной пептидной цепи. Эта конфигурация приводит к спариванию каждого домена с комплементарным доменом другой полипептидной цепи, формируя гомодимерную структуру. Соответственно, термин «триатело» относится к трехвалентным антителам, содержащим три пептидные цепи, каждая из которых содержит один  $V_H$ -домен и один  $V_L$ -домен, соединенные линкером, который является слишком коротким (например, линкер, состоящий из 1-2 аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярное соединение  $V_H$  и  $V_L$  доменов в пределах одной пептидной цепи. Для укладки в свои нативные структуры, пептиды, сконфигурированные таким образом, обычно тримеризуются, при этом  $V_H$  и  $V_L$  домены соседних пептидных цепей располагаются в пространстве проксимально относительно друг друга (см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993).

В контексте настоящего описания термин «иммуноглобулин с двойными переменными доменами» («DVD-Ig») относится к антигенсвязывающему белку, который объединяет мишень-связывающие переменные домены двух антител посредством линкеров с образованием одного четырехвалентного агента, нацеленного на две мишени (см., например, Gu et al., Meth. Enzymol., 502:25-41, 2012).

В контексте настоящего описания термин «эндогенный» описывает вещество, такое как молекула, клетка, ткань или орган (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка гемопоэтической линии, такая как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, натуральная клетка-киллер, Т-лимфоцит (например, CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцит) или В-лимфоцит), которые в естественных условиях присутствуют в конкретном организме, таком как пациент-человек, например пациент-человек, получающий представленную в настоящем описании терапию трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

В контексте настоящего описания термин «эффективность приживления» означает способность гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников к репопуляции ткани, независимо от того, циркулируют ли эти клетки в естественных условиях или обеспечены трансплантацией. Термин охватывает все события, имеющие отношение или приводящие к приживлению, такие как хоминг клеток и колонизация клеток в представляющей интерес ткани. Эффективность приживления или степень приживления могут быть оценены или количественно оценены с помощью любого клинически приемлемого параметра, известного специалистам в данной области техники, и могут включать, например, оценку конкурентной репопуляционной единицы (CRU); включение или экспрессию маркера в ткани(тканях), в которую стволовые клетки были заселены, образовали колонии или прижились; или путем оценки прогресса у субъекта через прогрессирование заболевания, выживание гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников или выживание реципиента. Приживление также может быть определено путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в течение некоторого периода времени после трансплантации. Приживление также можно оценить путем измерения восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного мозга.

В контексте настоящего описания термин «наполнитель» относится к веществу, находящемуся в составе вместе с активным ингредиентом лекарственного препарата. Такие вещества могут быть включены, например, с целью длительной стабилизации или для усиления терапевтического эффекта активного ингредиента в конечной лекарственной форме.

В контексте настоящего описания термин «экзогенный» описывает вещество, такое как молекула, клетка, ткань или орган (например, Т-клетка, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка гемопоэтической линии, такая как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, натуральная клетка-киллер, Т-лимфоцит или В-лимфоцит), которые не встречаются в природе в конкретном организме, таком как пациент-человек. Экзогенные вещества включают вещества, которые поступают из

внешнего источника в организм, или к культивируемому веществу, извлеченному из организма.

В контексте настоящего описания термин «каркасная область» или «FW область» включает аминокислотные остатки, которые расположены рядом с CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Остатки FW области могут присутствовать среди прочего, например, в человеческих антителах, гуманизированных антителах, моноклональных антителах, фрагментах антител, Fab-фрагментах, фрагментах одноцепочечных антител, scFv-фрагментах, доменах антител и биспецифических антителах.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения антитела, обычно содержащего по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях антитело может включать меньшее количество цепей, такое как антитело, встречающееся в природе у верблюда, которое может содержать только тяжелые цепи.

В контексте настоящего описания термин «гемопоэтические стволовые клетки» («HSC») относится к незрелым клеткам крови, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки крови, включая различные линии, в том числе гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглию, лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Кроме того, HSC также относятся к длительно репопулирующим HSC (LT-HSC) и быстро репопулирующим HSC (ST-HSC). LT-HSC и ST-HSC различаются по своему функциональному потенциалу и экспрессии маркера клеточной поверхности. Например, человеческие HSC представляют собой CD34+, CD38-, CD45RA-, CD90+, CD49F+ и lin- (отрицательные по маркерам зрелых линий, включая CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11 B, CD19, CD20, CD56 и CD235A). У мышей LT-HSC костного мозга представляют собой CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+, CD48- и lin- (отрицательные по маркерам зрелых линий, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220 и IL7ra), тогда как ST-HSC представляют собой CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+ и lin- (отрицательные по маркерам зрелых линий, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220 и IL7ra). Кроме того, в гомеостатических условиях ST-HSC реже находятся в покое (фазе G) и обладают более высокой пролиферативной способностью, чем LT-HSC. Однако LT-HSC обладают большим потенциалом самообновления (т.е. они остаются жизнеспособными в зрелом возрасте и могут быть последовательно трансплантированы следующим друг за другом реципиентам), тогда как ST-HSC имеют ограниченный период самообновления (т.е. они выживают только в течение ограниченного периода времени и не обладают потенциалом серийной трансплантации). В приведенных в настоящем описании способах можно

использовать любую из этих HSC. ST-HSC особенно полезны, так как обладают высоким пролиферативным потенциалом и, таким образом, могут быстрее давать начало дифференцированному потомству.

В контексте настоящего описания термин «функциональный потенциал гемопоэтических стволовых клеток» относится к функциональным свойствам гемопоэтических стволовых клеток, которые включают 1) мультипотентность (которая относится к способности дифференцироваться во множество различных линий клеток крови, включая, без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглия, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновление (что относится к способности гемопоэтических стволовых клеток давать начало дочерним клеткам, которые обладают таким же потенциалом, что и материнская клетка, и, кроме того, эта способность может сохраняться в течение всей жизни человека без истощения) и 3) способность гемопоэтических стволовых клеток или их потомства быть вновь введенными реципиенту трансплантата, после чего они заселяют нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивное и устойчивое кроветворение.

В контексте настоящего описания термины «антигены главного комплекса гистосовместимости» («МНС», также называемые «человеческими лейкоцитарными антигенами» («HLA») применительно к человеку) относятся к белкам, экспрессируемым на поверхности клетки, которые наделяют клетку уникальной антигенной идентичностью. Антигены МНС/HLA представляют собой целевые молекулы, распознаваемые Т-клетками и NK-клетками как происходящие из того же источника гемопоэтических стволовых клеток, что и иммунные эффекторные клетки («собственные»), или как происходящие из другого источника гемопоэтических восстанавливающих клеток («несобственные»). Различают два основных класса HLA антигенов: HLA класса I и HLA класса II. Антигены HLA класса I (A, B и C у людей) делают каждую клетку узнаваемой как «собственная», тогда как антигены HLA класса II (DR, DP и DQ у людей) участвуют в реакциях между лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками. Оба типа участвуют в отторжении трансплантированных органов. Важным аспектом системы HLA генов является ее полиморфизм. Каждый ген, МНС класса I (A, B и C) и МНС класса II (DP, DQ и DR) существует в разных аллелях. Аллели HLA обозначены номерами и индексами. Например, два неродственных человека могут нести HLA-B класса I, гены B5 и Bw41 соответственно. Аллельные генные продукты различаются одной или более аминокислотами в домене(ах)  $\alpha$  и/или  $\beta$ . Для гаплотипов HLA типа у индивидуумов используются большие панели специфических антител или реагентов нуклеиновых кислот путем использования лейкоцитов, которые экспрессируют молекулы класса I и класса II. Гены, обычно используемые для типирования HLA, представляют собой шесть белков МНС класса I и класса II, по два аллеля для каждого из HLA-A, HLA-B и HLA-DR. Гены

HLA кластеризованы в «суперлокус», присутствующий в хромосоме в положении bр21, который кодирует шесть классических генов HLA, влияющих на трансплантацию, и по меньшей мере 132 гена, кодирующих белки, которые играют важную роль в регуляции иммунной системы, а также некоторых других фундаментальных молекулярных и клеточных процессах. Полный локус имеет размер, составляющий примерно 3,6 Мб, с по меньшей мере 224 локусами генов. Одним из эффектов этой кластеризации является то, что «гаплотипы», т.е. 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 в предсказании вероятности нахождения подходящих доноров, а также в разработке стратегии поиска, поскольку некоторые аллели и гаплотипы встречаются чаще, чем другие, и распределены с различной частотой в разных расовых и этнических группах.

В контексте настоящего описания термин «HLA-совместимые» относится к паре донор-реципиент, в которой нет ни одного HLA антигена, по которому бы не совпадали донор и реципиент, например донор, предоставляющий трансплантат гемопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. HLA-совместимые (т.е., когда совпадают все 6 аллелей) пары донор-реципиент имеют пониженный риск отторжения трансплантата, поскольку эндогенные Т-клетки и NK-клетки с меньшей вероятностью будут распознавать вводимый трансплантат как чужеродный и, следовательно, индуцирование иммунного ответа против трансплантата является менее вероятным.

В контексте настоящего описания термин «HLA-несовместимые» относится к паре донор-реципиент, в которой имеется по меньшей мере один HLA антиген, в частности в контексте HLA-A, HLA-B и HLA-DR, который не совпадает у донора и реципиента, например донора, предоставляющего трансплантат гемопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических 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 в случае HLA-несовместимой пары донор-реципиент эндогенные Т-клетки и NK-клетки с большей вероятностью будут распознавать вводимый трансплантат как чужеродный, и такие Т-клетки и NK-клетки, таким образом, с большей вероятностью будут вызывать иммунный ответ против трансплантата.

В контексте настоящего описания термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором, по существу, каждая часть белка (например, все CDR, каркасные области, C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> домены (например, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3), шарнирные и V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> домены) является по существу неиммуногенной для людей с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Человеческое антитело может быть продуцировано in

*vitro* в человеческой клетке (например, путем рекомбинантной экспрессии) или клетке животного, не являющегося человеком, или прокариотической или эукариотической клетке, которая способна экспрессировать функционально перегруппированные человеческие гены иммуноглобулина (такие как тяжелая цепь и/или легкая цепь). Когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может включать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, например от двух до восьми глициновых или других аминокислотных остатков, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области, включая способы фагового дисплея, использующие библиотеки 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 РСТ № WO1998/24893; WO1992/01047; WO1996/34096; WO1996/33735; патенты США №№ 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; и 5,939,598). В одном из вариантов осуществления человеческое антитело получают с помощью рекомбинантных способов таким образом, чтобы паттерн гликозилирования антитела отличался от такового у антитела, имеющего такую же последовательность, если оно существует в природе.

В контексте настоящего описания термин «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, обычно содержащему аминокислотные последовательности из нечеловеческих CDR и человеческих каркасных областей. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело представляет собой человеческое антитело (антитело-реципиент), в котором остатки CDR реципиента заменены остатками CDR не относящегося к человеку вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, с требуемой специфичностью, сродством и/или способностью. В общем случае, 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 доменам нечеловеческого иммуноглобулина. Все или, по существу, все FW области также могут быть областями последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно часть человеческого иммуноглобулина. Способы гуманизации антител известны в данной области и описаны, например, в Riechmann et al., Nature 332: 323-327, 1988; патенты США №№ 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; и 6 180 370.

В контексте настоящего описания термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, которая участвует в генерации и поддержании врожденного или

адаптивного иммунного ответа. Иммунные клетки включают лимфоциты, содержащие рецептор, который специфически связывается и усиливает иммунный ответ против представляющего интерес антигена, такого как собственный антиген, в случае аутоиммунной клетки. Примеры иммунных клеток включают тучные клетки, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглию, гранулоциты, моноциты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты.

В настоящем описании пациенты, которые «нуждаются» в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включают пациентов, у которых обнаружен дефект или дефицит одного или более типов клеток крови, а также пациентов, имеющих нарушение стволовых клеток. Гемопоэтические стволовые клетки, как правило, 1) являются мультипотентными и, таким образом, могут дифференцироваться в несколько различных линий клеток крови, включая, без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглию, остеокласты и лимфоциты (например, НК-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновляются и, таким образом, могут производить дочерние клетки, обладающие потенциалом, эквивалентным материнской клетке, и 3) могут быть повторно введены в трансплантант реципиента, после чего они занимают нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз. Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту, у которого один или более типов клеток гемопоэтической линии являются дефектными или присутствуют в недостаточном количестве, для восстановления *in vivo* дефектной или дефицитной популяции клеток. Например, пациент может страдать от рака, и дефицит может быть вызван введением химиотерапевтического агента или другого лекарственного средства, которое селективно или неспецифическим образом приводит к истощению популяции раковых клеток. Дополнительно или альтернативно, пациент может страдать от незлокачественной гемоглобинопатии, которая может приводить к дефекту или дефициту одного или более типов кровяных клеток, такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони и синдром Вискотта-Олдрича. Субъект может страдать от тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы (ADA SCID), HIV/AIDS, метахроматической лейкодистрофии, анемии Даймонда-Блекфена и синдрома Швахмана-Даймонда. Субъект может страдать от наследственного заболевания крови (например, серповидноклеточной анемией) или аутоиммунного расстройства. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или страдать от злокачественной опухоли, такой как злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из гематологических раковых заболеваний (например, лейкемии, лимфомы, множественной миеломы или миелодиспластического синдрома) и нейробластомы. В некоторых вариантах субъект имеет или иным образом страдает от

нарушения обмена веществ. Например, субъект может страдать или быть подвержен иным образом нарушению обмена веществ, выбранному из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метахроматической лейкодистрофии, или любым другим заболеваниями или расстройствам, в отношении которых лечение и способы лечения, раскрытые в настоящем описании, являются эффективными и которые включают, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с дефицитом аденозиндезаминазы, синдром Вискотта-Олдрича, синдрома гипериммуноглобулина М, синдром Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни депонирования, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и другие заболевания или расстройства, описанные в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), раскрытие которого включено в настоящее описание во всей полноте в виде ссылки, поскольку этот документ относится к патологиям, которые можно лечить путем введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительно или альтернативно, пациент, «нуждающийся» в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, может быть пациентом, который страдает или не страдает от одной из вышеуказанных патологий, но тем не менее у которого наблюдается пониженный уровень (например, по сравнению с таковым у здорового субъекта) одного или более типов эндогенных клеток гемопоэтической линии, таких как мегакарициты, тромбоциты, кровяные пластинки, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглия, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Специалист в данной области может легко определить, снижен ли уровень одного или более из указанных выше типов клеток или другого типа клеток крови по сравнению с любым здоровым субъектом, например, с помощью известных в данной области методов, в частности, проточной цитометрии и сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS),.

Термин «выделенный», используемый в контексте белка, например антитела, относится к белку, который в силу своего происхождения или источника получения не связан с компонентами, с которыми он ассоциирован в естественных условиях и которые сопровождают его в нативном состоянии; практически не содержит других белков того же вида; экспрессируется клеткой другого вида; или не встречается в природе. Таким образом, белок, который синтезирован химическим способом или синтезирован в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит в естественных условиях, будет «выделен» из компонентов, связанных с ними в естественных условиях. Белок также может быть получен практически свободным от компонентов, связанных с ними в естественных условиях, с помощью методов 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 продуцирования препарата моноклонального антитела, причем такие варианты могут присутствовать в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое mAb направлено против одного детерминанта на антигене. Модификатор «моноклональный» не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом.

В контексте настоящего описания термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые подходят для контактирования с тканями субъекта, такого как млекопитающее (например, человек), не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и других осложнений, с допустимым соотношением польза/риск.

В контексте настоящего описания термин «фармацевтическая композиция» означает смесь, содержащую терапевтическое соединение, которое вводят субъекту, такому как млекопитающее, например человек, для профилактики, лечения или контроля конкретного заболевания или состояния, поражающего млекопитающего, такого как, в частности, аутоиммунное расстройство, рак или заболевание крови, например, раскрытые в настоящем описании.

В контексте настоящего описания термин «реципиент» относится к пациенту, который получает трансплантат, такой как трансплантат, содержащий популяцию гемопоэтических стволовых клеток. Трансплантированные клетки, вводимые реципиенту, могут представлять собой, например, аутологичные, сингенные или аллогенные клетки.

Используемый в настоящем описании термин «отторжение» в контексте трансплантата, такого как трансплантат гемопоэтических стволовых клеток, относится к процессу, посредством которого у реципиента возникает иммунный ответ против введенного трансплантата, тем самым снижая способность трансплантированного вещества (например, гемопоэтических стволовых клеток) персистировать в организме реципиента. Можно выполнить количественную оценку отторжения введенного трансплантата, такого как трансплантат гемопоэтических стволовых клеток, например, путем измерения количества или концентрации трансплантированных клеток в различных образцах, выделенных у пациента в различные моменты времени после трансплантации. Результаты, свидетельствующие о том, что количество или концентрация трансплантированных клеток в образцах, выделенных от пациента, со временем уменьшается, например, на примерно 20%, на примерно 25%, на примерно 30%, на примерно 35%, на примерно 40%, на примерно 56%, на примерно 50%, на примерно 55%, на примерно 60%, на примерно 65%, на примерно 70%, на примерно 75%, на примерно

80%, на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 95% или более, указывают на то, что у пациента происходит отторжение трансплантата. И наоборот, результаты, свидетельствующие о том, что количество или концентрация трансплантированных клеток в образцах, выделенных от пациента, остается стабильной с течением времени, например, уменьшается менее чем на примерно 20%, на примерно 15%, на примерно 10%, на примерно 5% или менее указывают на то, что у пациента не происходит отторжение трансплантата. Альтернативно, отторжение трансплантата можно оценить количественно путем измерения количества или концентрации иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с МНС антигенами, экспрессируемыми трансплантированными клетками, в различных образцах, выделенных от пациента в различные моменты времени после трансплантации. Результаты, свидетельствующие о том, что количество или концентрация иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с МНС антигенами, экспрессируемыми трансплантированными клетками, в выделенных от пациента образцах увеличивается с течением времени, например, на примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 56%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 100%, примерно 200%, примерно 300% или более указывают на то, что у пациента происходит отторжение трансплантата. И наоборот, результаты, свидетельствующие о том, что количество или концентрация иммунных клеток, таких как Т-клетки и/или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с МНС антигенами, экспрессируемыми трансплантированными клетками, в выделенных от пациента образцах со временем уменьшается, например, на примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 56%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% или более указывают на то, что у пациента не происходит отторжение трансплантата.

В контексте настоящего описания термин «образец» относится к образцу (например, крови, компоненту крови (например, сыворотке или плазме), моче, слюне, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, ткани (например, плацентарной или дермальной), жидкости поджелудочной железы, образца ворсинок хориона и клеток), взятому у субъекта.

В контексте настоящего описания термин «scFv» относится к одноцепочечному антителу Fv, в котором переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи антитела соединены с образованием одной цепи. Фрагменты scFv содержат одну полипептидную цепь, которая включает переменную область легкой цепи антитела ( $V_L$ ) (например, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3) и переменную область тяжелой цепи антитела ( $V_H$ ) (например, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), разделенные линкером. Линкер, который соединяет  $V_L$  и  $V_H$  области фрагмента scFv и может представлять собой пептидный линкер, состоящий из протеиногенных аминокислот. Альтернативные линкеры могут

быть использованы для повышения устойчивости фрагмента scFv к протеолитической деградации (например, линкеры, содержащие D-аминокислоты), для повышения растворимости 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 (например, линкеры, содержащие сайты гликозилирования). Специалисту в данной области также будет понятно, что переменные области молекул scFv, представленных в настоящем описании, могут быть модифицированы так, что их аминокислотная последовательность будет отличаться 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) с сохранением или усилением способности scFv связываться с антигеном, распознаваемым соответствующим антителом.

Термины «специфическое связывание» или «специфически связывается» применительно к взаимодействию антитела или фрагмента антитела со вторым химическим веществом означают, что взаимодействие зависит от присутствия в этом химическом веществе конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа); например, антитело распознает и связывается с определенной структурой белка, а не с белками в целом. Если антитело является специфическим к эпитопу «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный немеченый А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, приведет к уменьшению количества меченого А, связанного с антителом. В одном из вариантов осуществления антитело специфически связывается с мишенью, например CD2, если антитело имеет  $K_D$  в отношении мишени, равное по меньшей мере примерно  $10^{-4}$  М, примерно  $10^{-5}$  М, примерно  $10^{-6}$  М, примерно  $10^{-7}$  М, примерно  $10^{-8}$  М, примерно  $10^{-9}$  М, примерно  $10^{-10}$  М, примерно  $10^{-11}$  М, примерно  $10^{-12}$  М или менее (менее означает число, которое составляет менее чем  $10^{-12}$ , например,  $10^{-13}$ ). В одном из вариантов осуществления используемый в настоящем описании термин «специфическое связывание с CD2» или «специфически связывается с CD2» относится к антителу или связывается с CD2 и имеет константу диссоциации ( $K_D$ ), равную  $1,0 \times 10^{-7}$  М или менее, согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса. В одном из вариантов осуществления  $K_D$  определяют методом стандартной биослойной интерферометрии (BLI). Однако следует понимать, что антитело может специфически связываться с двумя или более антигенами, которые связаны в последовательности. Например, в одном из вариантов осуществления антитело может специфически связываться как с человеческими, так и с нечеловеческими (например, мышинными или относящимися к не являющемуся человеком примату) ортологами CD2.

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

млекопитающему, такому как человек, получающему лечение от конкретного заболевания или состояния, раскрытого в настоящем описании. Например, пациент, такой как пациент-человек, может быть пациентом, страдающим от аутоиммунного заболевания, раскрытого в настоящем описании, и может получать анти-CD2 антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство, представленное в настоящем описании, для (i) истощения популяции аутоиммунных клеток (например, популяции аутоиммунных CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или NK-клеток) и/или (ii) истощения до терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток популяции CD2<sup>+</sup> иммунных клеток (например, CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или NK-клеток, которые перекрестно реагируют с несобственным антигеном, экспрессируемым гемопоэтическими стволовыми клетками (например, несобственным антигеном МНС), тем самым предотвращая или уменьшая вероятность отторжения трансплантата.

Используемое в настоящем описании выражение «практически элиминирована из крови» относится к моменту времени после введения терапевтического агента (такого как анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) пациенту, когда концентрация терапевтического агента в образце полученной от пациента крови является такой, что терапевтический агент не обнаруживается обычными средствами (например, такой, что терапевтический агент не обнаруживается выше пороговой чувствительности устройства или анализа, используемого для детектирования терапевтического агента). Для детектирования антител или фрагментов антител можно использовать различные методы, известные в данной области, такие как анализы на основе ELISA, известные в данной области или раскрытые в настоящем описании. Дополнительные анализы, которые можно использовать для детектирования антител и фрагментов антител, включают, помимо прочего, методы иммунопреципитации и иммуноблот-анализы, известные в данной области.

Используемое в настоящем описании выражение «нарушение стволовых клеток» в широком смысле относится к любому заболеванию, расстройству или состоянию, которое можно лечить или излечить путем кондиционирования целевой ткани субъекта, например, путем удаления из целевой ткани популяции эндогенных Т-клеток) и/или путем приживления или трансплантации стволовых клеток в целевые ткани субъекта. Например, было показано, что пациенты с диабетом I типа излечиваются путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и могут получить пользу от кондиционирования в соответствии с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании. Дополнительные расстройства, которые можно лечить с помощью композиций и способов, раскрытых в настоящем описании, включают, без ограничения, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, ADA SCID, HIV/AIDS, метахроматическую лейкодистрофию, анемию Даймонда-Блекфена и синдром Швахмана-Даймонда. Субъект может страдать от наследственного заболевания крови (например, серповидноклеточной анемией) или аутоиммунного расстройства. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или страдать от злокачественной

опухоли, такой как злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из гематологических раковых образований (например, лейкемии, лимфомы, множественной миеломы или миелодиспластического синдрома) и нейробластомы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или иным образом страдает от нарушения обмена веществ. Например, субъект может страдать или иным образом быть подвержен нарушению обмена веществ, выбранному из группы, состоящей из болезни накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метакроматической лейкодистрофии, или любым другим заболеваниями или расстройствам, в отношении которых лечение и способы лечения, раскрытые в настоящем описании, являются эффективными и которые включают, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с дефицитом аденозиндезаминазы, синдром Вискотта-Олдрича, синдрома гипериммуноглобулина М, синдром Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни депонирования, большую талассемию, серповидно-клеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и другие заболевания или расстройства, описанные в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), раскрытие которого включено в настоящее описание во всей полноте в виде ссылки, поскольку этот документ относится к патологиям, которые можно лечить путем введения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

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

В контексте настоящего описания термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, целью которого является профилактика или замедление (уменьшение) нежелательных физиологических изменений или нарушений или обеспечение благоприятного фенотипа у пациента, принимающего лечение. Полезные или желательные клинические результаты включают, без ограничения, уменьшение количества аутоиммунных клеток, присутствующих в образце, выделенном от пациента, таком как популяция CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или NK-клеток, которые перекрестно реагируют с собственным антигеном в случае непосредственного лечения аутоиммунного расстройства, или несобственным антигеном, экспрессируемым гемопоэтическими стволовыми клетками (например, несобственным МНС антигеном), до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в случае лечения аутоиммунного заболевания путем введения анти-CD2 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента и трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительные полезные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, после кондиционирующей терапии и последующего введения пациенту

трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Полезные результаты после терапии по настоящему изобретению могут также включать увеличение количества клеток или относительной концентрации одной или более клеток гемопоэтической линии, таких как мегакариоцит, тромбоцит, клеточная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, натуральная клетка-киллер, Т-лимфоцит или В-лимфоцит, после кондиционирующей терапии и последующей терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Используемые в настоящем описании термины «вариант» и «производное» используются взаимозаменяемо и относятся к встречающимся в природе, синтетическим и полусинтетическим аналогам соединения, пептида, белка или другого вещества, представленного в настоящем описании. Раскрытый в настоящем описании вариант или производное соединения, пептида, белка или другого вещества может сохранять или улучшать биологическую активность исходного материала.

В контексте настоящего описания термин «вектор» включает вектор нуклеиновой кислоты, такой как плазида, ДНК-вектор, плазида, РНК-вектор, вирус или другой подходящий репликон. Векторы экспрессии, раскрытые в настоящем описании, 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 увеличивают скорость трансляции этих генов или улучшают стабильность или экспорт возникающую в результате транскрипции генов мРНК в ядро. Эти элементы последовательности могут включать, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области и сайт сигнала полиаденилирования, который направляет эффективную транскрипцию гена, переносимого вектором экспрессии. Представленные в настоящем описании векторы экспрессии также могут содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для отбора клеток, которые содержат такой вектор. Примеры подходящего маркера включают гены, которые кодируют устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин и нурсеотрицин.

Используемый в настоящем описании 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 т.п.

Используемый в настоящем описании термин «алкилен» относится к

двухвалентной алкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в алкильной цепи. Примеры алкилена включают метилен, этилен, пропилен, изопропилен и т.п.

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

Используемый в настоящем описании термин «гетероалкилен» относится к двухвалентной гетероалкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или более гетероатомами.

Используемый в настоящем описании 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-бутиленил, гексенил и т.п.

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

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

Используемый в настоящем описании термин «гетероалкенилен» относится к двухвалентной гетероалкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкенильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или более гетероатомами.

Используемый в настоящем описании 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 т.п.

Используемый в настоящем описании термин «алкинилен» относится к двухвалентной алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в алкинильной цепи.

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

Используемый в настоящем описании термин «гетероалкинилен» относится к двухвалентной гетероалкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах в гетероалкинильной цепи. Двухвалентные положения могут быть одним или более гетероатомами.

Используемый в настоящем описании 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, цикlopентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, бицикло[3.1.0]гексан и т.п.

Используемый в настоящем описании термин «циклоалкилен» относится к двухвалентной циклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах внутри кольцевой структуры. Примеры циклоалкилена включают циклопропилен, циклобутилен, цикlopентилен, циклогексилен и т.п.

Используемый в настоящем описании 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, выбранную из атомов углерода и гетероатомов, выбранных, например, помимо прочего, из азота, кислорода и серы. Кольцевая структура может содержать, например, одну или более оксогрупп на атомах углерода, азота или серы. Примеры гетероциклоалкилов включают, в качестве иллюстрации, 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 описании термин «гетероциклоалкилен» относится к двухвалентной гетероциклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах внутри кольцевой структуры.

Используемый в настоящем описании термин «арил» относится к моноциклической или полициклической ароматической кольцевой системе, содержащей, например, от 6 до 19 атомов углерода. Арильные группы включают, без ограничения, фенил, фторенил, нафтил и т.п. Двухвалентные положения могут быть одним или более гетероатомами.

Используемый в настоящем описании термин «арилен» относится к двухвалентной арильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах.

Используемый в настоящем описании термин «гетероарил» относится к моноциклической гетероароматической или бициклической или трициклической гетероароматической группе с конденсированным кольцом, в котором один или более

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-триазилил, 1,2,3-триазилил, бензофурил, [2,3-дигидро]бензофурил, изобензофурил, бензотиенил, бензотриазолил, изобензотиенил, индолил, изоиндолил, 3Н-индолил, бензимидазолил, имидазо[1,2-а]пиридил, бензотиазолил, бензоксазолил, хинолизинил, хиназолинил, фталазинил, хиноксалинил, циннолинил, нафтиридилил, пиридо[3,4-б]пиридил, пиридо[3,2-б]пиридил, пиридо[4,3-б]пиридил, хинолил, изохинолил, тетразолил, 5,6,7,8-тетрагидрохинолил, 5,6,7,8-тетрагидроизохинолил, пуринил, птеридинил, карбазолил, ксантил, бензохинолил и т.п.

Используемый в настоящем описании термин «гетероарилен» относится к двухвалентной гетероарильной группе. Двухвалентные положения могут находиться на одном или разных атомах. Двухвалентные положения могут быть одним или более гетероатомами.

Если иное не ограничено определением отдельного заместителя, вышеуказанные химические фрагменты, такие как группы «алкила», «алкилена», «гетероалкила», «гетероалкилена», «алкенила», «алкенилена», «гетероалкенила», «гетероалкенилена», «алкинила», «алкинилена», «гетероалкинила», «гетероалкинилена», «циклоалкила», «циклоалкилена», «гетероциклоалкила», «гетероциклоалкилена», «арила», «арилена», «гетероарила» и «гетероарилена», необязательно могут быть замещены, например, 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклоалкила, алкиларила, алкилгетероарила, алкилциклоалкила, алкилгетероциклоалкила, amino, аммония, ацила, ацилокси, ациламино, аминокарбонила, алкоксикарбонила, уреидо, карбамата, арила, гетероарила, сульфонила, сульфонила, алкокси, сульфанила, галогена, карбокси, тригалогенметила, циано, гидроксид, меркапто, нитро и т.п. Типичные заместители включают, без ограничения,  $-X$ ,  $-R$ ,  $-OH$ ,  $-OR$ ,  $-SH$ ,  $-SR$ ,  $NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-N(R)_2$ ,  $-N^+(R)_3$ ,  $-CX_3$ ,  $-CN$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NCO$ ,  $-NCS$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-NC(=O)H$ ,  $-NC(=O)R$ ,  $-C(=O)H$ ,  $-C(=O)R$ ,  $-C(=O)NH_2$ ,  $-C(=O)N(R)_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-SO_3H$ ,  $-S(=O)_2R$ ,  $-OS(=O)_2OR$ ,  $-S(=O)_2NH_2$ ,  $-S(=O)_2N(R)_2$ ,  $-S(=O)R$ ,  $-OP(=O)(OH)_2$ ,  $-OP(=O)(OR)_2$ ,  $-P(=O)(OR)_2$ ,  $-PO_3$ ,  $-PO_3H_2$ ,  $-C(=O)X$ ,  $-C(=S)R$ ,  $-CO_2H$ ,  $-CO_2R$ ,  $-CO_2^-$ ,  $-C(=S)OR$ ,  $-C(=O)SR$ ,  $-C(=S)SR$ ,  $-C(=O)NH_2$ ,  $-C(=O)N(R)_2$ ,  $-C(=S)NH_2$ ,  $-C(=S)N(R)_2$ ,  $-C(=NH)NH_2$ , and  $-C(=NR)N(R)_2$ ; где каждый  $X$  независимо выбирают, в каждом случае, из  $F$ ,  $Cl$ ,  $Br$  и  $I$ ; и каждый  $R$  независимо выбирают, в каждом случае, из алкила, арила, гетероциклоалкила или гетероарила, защитной группы и фрагмента пролекарства. В тех случаях, когда группа описана как «необязательно замещенная», эта группа может быть замещена одним или более из указанных выше заместителей независимо для каждого случая. Замещение может включать ситуации, в которых соседние заместители замыкаются в кольцо, например, при замыкании кольца в случае заместителей с вицинально расположенными функциональными заместителями с образованием, например, лактамов, лактонов,

циклических ангидридов, ацеталей, полуацеталей, тиоацеталей, аминалов и полуаминалов, образованных в результате замыкания кольца, например, для создания защитной группы.

Следует понимать, что согласно определенным соглашениям относительно названия радикалов, они могут включать либо монадикал, либо дирадикал, в зависимости от контекста. Например, когда заместителю требуются две точки присоединения к остальной части молекулы, подразумевается, что заместитель представляет собой дирадикал. Например, заместитель, идентифицированный как алкил, которому требуются две точки 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 т.п. Согласно другим соглашениям относительно названия радикалов четко указывается на то, что радикал представляет собой дирадикал, например «алкилен», «алкенилен», «арилен», «гетероциклоалкилен» и т.п.

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 произвольно направленной конфигурации, если не указано иное.

#### **Анти-CD2 антитела**

Настоящее изобретение отчасти основано на открытии того, что анти-CD2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для непосредственного лечения раковых заболеваний и аутоиммунных заболеваний, например, благодаря способности таких агентов убивать CD2<sup>+</sup> раковые клетки (например, CD2<sup>+</sup> лейкозные клетки) и CD2<sup>+</sup> аутоиммунные клетки (например, аутоиммунные CD2<sup>+</sup> Т-клетки и/или NK-клетки). В частности, представленное в настоящем описании анти-CD2 антитело, конъюгировано с цитотоксином через линкер. Таким образом, если описаны анти-CD2 антитела, также рассматриваются их конъюгаты, если не указано иное.

Кроме того изобретение отчасти основано на открытии того, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD2, можно использовать в качестве терапевтических агентов для обеспечения приживания трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантационной терапии, путем предотвращения или уменьшения вероятности отторжения трансплантата, опосредованного иммунными клетками. Например, анти-CD2 антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связывать CD2 клеточной поверхности, экспрессируемый иммунными клетками, такими как Т-клетки или NK-клетки, которые перекрестно реагируют с одним или более несобственными МНС антигенами, экспрессируемыми гемопоэтическими стволовыми клетками, и индуцируют против них иммунный ответ. Связывание таких антител и антигенсвязывающих фрагментов с CD2<sup>+</sup> иммунными клетками, специфическими к гемопоэтическим стволовым клеткам, может вызывать гибель связанной иммунной клетки, например, благодаря опосредованной антителами клеточной цитотоксичности или благодаря действию цитотоксического агента, конъюгированного с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Таким

образом, истощение популяции CD2<sup>+</sup> иммунных клеток, которые перекрестно реагируют с несобственными гемопоэтическими стволовыми клетками, может облегчить приживление трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток у нуждающегося в этом пациента, ослабляя способность иммунной системы реципиента генерировать иммунный ответ против введенного трансплантата. Таким образом, можно лечить пациента, страдающего от нарушения стволовых клеток, рака, аутоиммунного заболевания или других заболеваний крови, раскрытых в настоящем описании, поскольку пациенту может быть предоставлен трансплантат гемопоэтических стволовых клеток для репопуляции линии клеток, дефектной и/или дефицитной у субъекта. У субъекта может возникнуть дефицит популяции клеток, например, из-за химиотерапии, которую получал субъект для уничтожения раковых клеток, но в результате которой также произошло истощение здоровых кроветворных клеток.

Например, изобретение, таким образом, предоставляет композиции и способы, способствующие приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый Т-клетками. Это введение может вызывать избирательное истощение популяции эндогенных Т-клеток, таких как CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Такое избирательное истощение Т-клеток может, в свою очередь, предотвратить отторжение трансплантата после трансплантации экзогенного (например, аутологичного, аллогенного или сингенного) трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Например, селективное истощение CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток с помощью анти-CD2 антитела, антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитело-лекарственное средство или представленного в настоящем описании конъюгата антитело-лекарственное средство может ослаблять опосредованный Т-клетками иммунный ответ, который может возникать против введенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Изобретение отчасти основано на открытии того, что антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD2, можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, для обеспечения выживания и эффективного приживления трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток.

Приживление трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток благодаря введению анти-CD2 антител или их антигенсвязывающих фрагментов можно наблюдать с помощью различных эмпирических методов измерения. Например, приживление трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток можно оценить с помощью количественного анализа конкурентных репопулирующих единиц (CRU), присутствующих в костном мозге пациента, после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать CD2, и последующего введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, можно наблюдать приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток путем введения в вектор, которым трансфицированы донорские гемопоэтические стволовые клетки, репортерного гена, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию, в результате

которой образуется флуоресцентный, хромофорный или люминесцентный продукт, и последующего мониторинга соответствующего сигнала в ткани, в которую были введены гемопоэтические стволовые клетки, такой как костный мозг. Приживление гемопоэтических стволовых клеток также можно наблюдать путем оценки количества и степени выживаемости гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, например, выполненной с помощью аналитических методов сортирования флуоресцентно-активированных клеток (FACS), известных в данной области. Приживление также может быть определено путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в течение некоторого периода после трансплантации и/или путем измерения восстановления клеток костного мозга благодаря донорским клеткам в образце аспирата костного мозга.

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

### **Примеры антител**

Композиции и способы, представленные в настоящем описании, включают антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с человеческим CD2. Человеческий CD2 также называют Т-клеточным поверхностным антигеном T11/Leu-5, T11, антигеном CD2 (p50) и рецептором овечьих эритроцитов (SRBC). CD2 экспрессируется на Т-клетках. Были идентифицированы две изоформы человеческого CD2. Изоформа 1 содержит 351 аминокислоту, описанную в Seed, B. et al. (1987) 84:3365-69 (см. также Sewell et al. (1986) 83:8718-22) и ниже (эталонная последовательность NCBI: NP\_001758.2):

```
msfpckfvas flifnvssk gavskeitna letwgalgqd inldipsfqm sddiddikwe
ktsdkkkiaq frkeketfke kdtlylfkng tlkikhktd dqdiykvsy dtkgknvlek
ifdlkiqerv skpkiswtci nttltcevmn gtdpelnyq dgkhlksqr vithkwttsl
sakfkctagn kvskessvep vscpekgldi yliigicggg sllmvfvall vfyitrkkq
rsrrndeele trahrvatee rgrkphqipa stpqnpatsq hpppppghrs qapshrpppp
ghrvqhqpqk rppapsgtqv hqqkgpplpr prvpqkpphg aaenslpss n (SEQ ID NO: 13)
```

Вторая изоформа CD2 состоит из 377 аминокислот и обозначена в настоящем описании как эталонная последовательность NCBI: NP\_001315538.1.

Было показано, что Т-клетки и NK-клетки экспрессируют CD2, который является молекулой клеточной адгезии и специфическим маркером для таких лимфоцитов. Например, CD2 взаимодействует с другими молекулами адгезии, такими как антиген-3, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-3/CD58), усиливая активацию Т-клеток. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD2, могут подавлять активацию Т-клеток и опосредованные Т-клетками иммунные ответы против трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, например, путем ингибирования

взаимодействия между CD2 и LFA-3. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с этим антигеном клеточной поверхности, могут быть идентифицированы методами, известными в данной области техники и представленными в настоящем описании, включая иммунизацию, методы компьютерного моделирования и методы отбора *in vitro*, такие как фаговый дисплей и платформы на основе клеток, описанные ниже.

Настоящее изобретение охватывает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с полипептидом CD2, например человеческим полипептидом CD2, и их применение. В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом CD2, содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи включает CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит одну или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит две или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 3.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит одну или более CDR VL, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит две или более CDR VL, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 VL, содержащую SEQ

ID NO: 4, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 6.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления одна или более CDR (т.е. одна или более CDR тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 1-3, и/или одна или более CDR легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 4-6) могут содержать консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) с сохранением CD2-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной таковой у антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1-3, и CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 4-6).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7. В другом из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 7, например по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO: 7 или вариант SEQ ID NO: 7, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 7 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 7 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 7 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 7, причем в любом из случаев (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная переменная область тяжелой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, сохраняя при этом CD2-специфичность связывания антитела, т.е. обладая специфичностью связывания, аналогичной таковой у антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего SEQ ID NO: 7. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая отличается от аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотами. Например, антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент может содержать переменную область тяжелой цепи, которая отличается от аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, в одном, двух, трех или четырех положениях 12, 13, 28 и/или 48. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи отличается от аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, в положениях 12, 13, 28 и 48. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит одну, две, три или четыре из следующих замен, относительно последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7: K12Q; K13R; T28I; и M48V. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит замены K12Q; K13R; T28I; и M48V, относительно SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO: 8 или вариант SEQ ID NO: 8, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 8 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 8 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 8 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 8, причем в любом из случаев (i)-(iv), аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная переменная область легкой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, сохраняя при этом CD2-специфичность связывания антитела, т.е. обладая специфичностью связывания, аналогичной таковой у антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего SEQ ID NO: 8.

В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или

100% идентичности с SEQ ID NO: 8. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело Ab1, которое содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 9. В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 9, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 10. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело Ab1, которое содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит одну или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит две или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и

SEQ ID NO: 16. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 14, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 16.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит одну или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит две или более CDR VH, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 14, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 17.

В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит одну или более CDR VL, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит два или более CDR VL, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20. В одном из вариантов осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 20.

В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 14, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 20.

В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH, содержащую SEQ ID NO: 14, CDR2 VH, содержащую SEQ ID NO: 15, и CDR3 VH, содержащую SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL, содержащую SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, содержащую SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, содержащую SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления одна или более CDR (т.е. одна или более CDR тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 14-17, и/или одна или более CDR легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 18-19) могут содержать консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) с сохранением CD20-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной таковой у антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 14-16, и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 18-20; или содержащего CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 14, 15, 17, и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 18-20).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 21, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO: 21 или вариант SEQ ID NO: 21, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 21 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 21 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 21 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентична SEQ ID NO: 21, причем в любом из случаев (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная переменная область тяжелой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 21, сохраняя при этом CD2-специфичность связывания антитела, т.е. обладая специфичностью связывания, аналогичной таковой у антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего SEQ ID NO: 21.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22. В другом варианте

осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 22, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO: 21 или вариант SEQ ID NO: 22, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 22 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 22 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 21 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентична SEQ ID NO: 22, причем в любом из случаев (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная переменная область тяжелой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 22, сохраняя при этом CD2-специфичность связывания антитела, т.е. обладая специфичностью связывания, аналогичной таковой у антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего SEQ ID NO: 22.

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 23, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO: 23 или вариант SEQ ID NO: 23, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 23 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 23 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 23 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентична SEQ ID NO: 23, причем в любом из случаев (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную

замену; и причем модифицированная переменная область легкой цепи может обладать повышенной биологической активностью относительно переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 23, сохраняя при этом CD2-специфичность связывания антитела, т.е. обладая специфичностью связывания, аналогичной таковой у антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего SEQ ID NO: 23.

В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 21, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 23 например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 23. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 23.

В типичном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 22, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 23, например, по меньшей мере примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 23. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 23.

Анти-CD2 антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают антитела, которые имеют одну или более или все из следующих CDR:

- a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 1);
- b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO: 2);
- c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY (SEQ ID NO: 3);
- d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLHSSGNTYLN (SEQ ID NO: 4);

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

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 6).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые последовательности CDR, описаны, например, в патенте США № 6,849,258, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку он относится к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Антитела и их фрагменты раскрыты в патентах США № 5,730,979; 5,817,311; 5,951,983; и 7,592,006; такие как LO-CD2a, BTI-322, и антитела, продуцируемые линией клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 11423 (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более или все последовательности CDR антитела LO-CD2a, выделенного из линии клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 11423), можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании. Типичные антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают гуманизированные антитела, содержащие одну или более или все последовательности CDR антитела, выделенного из линии клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 11423, например MEDI-507. MEDI-507 представляет собой гуманизированное моноклональное анти-CD2 антитело, которое содержит последовательности CDR-H и CDR-L приведенные выше в (a)-(f), и которое описано в Branco et al., Transplantation 68:1588-1596 (1999). MEDI-507 дополнительно описано в WO99/03502A1 и WO1994/020619A1; патентах США №№ 7,592,006, 6,849,258, 5,951,983, 5,817,311 и 5,730,979; и публикации патентов США №№ US2011/0280868, US2004/0265315 и 2011/0091453, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание во всей полноте в виде ссылки, поскольку они относятся к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, таким как анти-CD2 антитело MEDI-507. В одном из вариантов осуществления анти-CD2 антитело представляет собой сиплизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

Раскрытия вышеупомянутой статьи в научном журнале и патентов США включены в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD2-антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают, например, анти-CD2 антитела, которые описаны в патентах США №№ 6,541,611 и 7,250,167, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, таким как анти-CD2 антитело LO-CD2b и антитела, продуцируемые линией клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № PTA-802. Примеры антител, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем

описании, включают гуманизированные антитела, содержащие одну или более или все последовательности CDR антитела, выделенного из линии клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № PTA-802.

Другие анти-CD2 антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают, например, анти-CD2 антитела, которые описаны в патентах США №№ 5,795,572 и 5,807,734, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, таким как анти-CD2 антитело, продуцированное линией клеток гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 69277. Например, анти-CD2-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут быть использованы в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают те, которые содержат шарнирный участок, имеющий аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTSPPSP (SEQ ID NO: 17), такие как фрагменты scFv, содержащие шарнирный участок, имеющий аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTSPPSP (SEQ ID NO: 17). Включение шарнирной области, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, может быть полезным, так как этот шарнирный мотив мутирован относительно последовательностей шарнирной области дикого типа для исключения потенциально реакционноспособных остатков цистеина, которые могут способствовать нежелательной окислительной димеризации фрагмента одноцепочечного антитела, такого как фрагмент scFv.

Другие анти-CD2 антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают, например, анти-CD2 антитела, которые описаны в патенте США № 6,764,688, такие как анти-CD2 антитело TS2/18 и антитела, продуцируемые клеточной линией гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB-195. Раскрытие патента США № 6,764,688 включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку он относится к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Другие анти-CD2 антитела, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают, например, анти-CD2 антитела, которые описаны в патентах США №№ 6,162,432, 6,558,662, 7,408,039, 7,332,157, 7,638,121, 7,939,062, and 7,115,259, публикациях заявок на патент США № 2006/0084107, 2014/0369974, 2002/0051784 и 2013/0183322 и публикации PCT № WO1992/016563, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Антитела и их фрагменты для применения в сочетании со способами, раскрытыми в настоящем описании, включают описанные выше варианты антител, такие как фрагменты антител, содержащие или не содержащие Fc-домен, а также гуманизированные варианты нечеловеческих антител, представленные в настоящем описании, и каркасы антителоподобных белков (например, 10Fn3 доменов), содержащие один или более или

все CDR представленного в настоящем описании антитела или фрагмента антитела или их эквивалентные области. Примеры антигенсвязывающих фрагментов вышеупомянутых антител включают, помимо прочего, двойной вариабельный домен иммуноглобулина, молекулу одноцепочечного Fv (scFv), диатело, триатело, нанотело, каркас антителоподобного белка, Fv-фрагмент, Fab-фрагмент, молекулу F(ab')<sub>2</sub> и тандем ди-scFv.

В одном из вариантов осуществления анти-CD2 антитело или его связывающий фрагмент содержит модифицированную Fc-область, где указанная модифицированная Fc-область содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно Fc-области дикого типа, такую что указанная молекула имеет измененное сродство или связывание с Fc-гаммаR (FcγR). Некоторые положения аминокислот в Fc-области, как известно из результатов кристаллографических исследований, обеспечивают прямой контакт с FcγR, в частности, аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (петля B/C), аминокислоты 297-299 (петля C'/E) и аминокислоты 327-332 (петля F/G) (см. Sondermann et al. 2000, *Nature*, 406:267-273). Антитела, представленные в настоящем описании, могут содержать варианты Fc-областей, содержащие модификацию по меньшей мере одного остатка, который осуществляет прямой контакт с FcγR, согласно результатам структурного и кристаллографического анализа. В одном из вариантов осуществления Fc-область анти-CD2 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 265 согласно EU индексу по Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991) (документ специально включен в настоящее описание в виде ссылки). «EU индекс по Kabat» относится к EU нумерации человеческого антитела IgG1. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию D265A. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию D265C. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 234 в соответствии с EU индексом по Kabat. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию L234A. В некоторых вариантах осуществления Fc-область анти-CD2 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 235 в соответствии с EU индексом по Kabat. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию L235A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутации L234A и L235A. В дополнительном варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C, L234A и L235A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C, L234A, L235A и H435A. В дополнительном варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C и H435A.

Антитела по изобретению могут быть также сконструированы с возможностью дополнительной модуляции периода полураспада антитела путем введения дополнительных мутаций Fc, например, как описано, 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. Примеры мутаций, которые могут быть выполнены по отдельности или в комбинации, представляют собой мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A and H435R.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином (например, аматоксином) через остаток цистеина в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина вводят путем мутации в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, остаток цистеина может быть выбран из группы, состоящей из Cys118, Cys239 и Cys265. В одном из вариантов осуществления Fc-область анти-CD2 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 265 в соответствии с EU индексом по Kabat. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию D265C. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутации D265C и H435A.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию, приводящую к уменьшению периода полураспада. Антитело с коротким периодом полураспада может иметь преимущество в некоторых случаях, когда ожидается, что антитело будет функционировать как короткоживущее терапевтическое средство, например, на этапе кондиционирования, как раскрыто в настоящем описании, причем после введения антитела следуют HSC. В идеале, перед введением HSC, которые как правило также могут экспрессировать CD2, но не являются мишенью для анти-CD2 антитела, в отличие от эндогенных стволовых клеток, антитело должно быть практически элиминировано из организма. В одном из вариантов осуществления Fc-область содержит мутацию в положении 435 (EU индекс по Кабату). В одном из вариантов осуществления мутация представляет собой мутацию H435A.

Вышеуказанные анти-CD2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в различных аспектах изобретения, изложенных в настоящем описании, в том числе, например, в способах истощения клеток CD2<sup>+</sup> у человека. Вышеуказанные анти-CD2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с агентом, например цитотоксином, например аматоксином, как раскрыто в настоящем описании.

### **Методы идентификации анти-CD2 антител**

Для идентификации и определения 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 раскрыто в настоящем описании, можно использовать методы высокопроизводительного скрининга библиотек антител или фрагментов антител,

которые связываются с CD2. Такие методы включают *in vitro* дисплейные методы, известные в данной области, такие как, например, в частности, фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, рибосомный дисплей, мРНК-дисплей и кДНК-дисплей. Использование фагового дисплея для выделения антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают биологически значимые молекулы, 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, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к *in vitro* дисплейным методам. Созданы рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки для отбора полипептидов, которые связываются с антигенами клеточной поверхности, описанные Kay, *Perspect. Drug Discovery Des.* 2:251-268, 1995 и Kay et al., *Mol. Divers.* 1:139-140, 1996, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к обнаружению антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно отображены с помощью фагового дисплея в виде функциональных молекул (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, и Chiswell and McCafferty, *Trends Biotechnol.* 10:80-84, 1992, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к применению *in vitro* дисплейных методов для обнаружения антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и scFv, были экспрессированы в формате *in vitro* дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554, 1990; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, 1991; and Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к платформам *in vitro* дисплея для обнаружения антигенсвязывающих молекул). Эти методы, среди прочего, могут использоваться для идентификации и улучшения сродства антител или фрагментов антител, которые связываются с CD2, которые, в свою очередь, могут использоваться для истощения CD2<sup>+</sup> Т-клеток и/или NK-клеток у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и/или страдающего от рака или аутоиммунного заболевания, раскрытого в настоящем описании.

Дополнительные методы могут быть использованы для идентификации антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD2 на поверхности клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) и которые интернализуются в клетке, например, посредством опосредованного рецептором эндоцитоза. Например, описанные выше *in vitro* дисплейные методы можно адаптировать для скрининга антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD2 на поверхности Т-клетки или NK-клетки и которые впоследствии интернализуются. Фаговый дисплей представляет собой один из таких методов, который можно использовать вместе с этой парадигмой скрининга. Для идентификации анти-CD2 антитела и их фрагментов, которые

связываются с CD2 и впоследствии интернализуются в Т-клетках и/или NK-клетках, специалист в данной области может использовать методы фагового дисплея, описанные Williams et al., *Leukemia* 19:1432-1438, 2005, раскрытие которого включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. Например, используя методы мутагенеза, известные в данной области, могут быть получены библиотеки рекомбинантных фагов, кодирующих, помимо прочего, антитела, фрагменты антител, такие как фрагменты scFv, фрагменты Fab, диатела, триатела и <sup>10</sup>Fn3 домены, или антитела, которые содержат рандомизированные аминокислотные кассеты (например, в одной или более или во всех CDR или их эквивалентных областях или антителе или фрагменте антитела). Каркасные области, шарнирная область, Fc-домен и другие области антител или фрагменты антител могут быть сконструированы таким образом, чтобы они не были иммуногенными для человека, например, благодаря наличию последовательностей антител человеческой зародышевой линии или последовательностей, которые демонстрируют лишь незначительные вариации относительно антител человеческих зародышевых линий.

Используя методы фагового дисплея, раскрытые в настоящем описании или известные в данной области, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела или фрагменты антител, ковалентно связанные с фаговыми частицами, можно инкубировать с CD2 антигеном, например, сначала инкубируя фаговую библиотеку с блокирующими агентами (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 фага, кодирующего антитела или их фрагменты, которые связываются с Fc-доменами, и затем инкубируя библиотеку фагов с популяцией Т-клеток или NK-клеток, которые представляют собой CD2+. Фаговую библиотеку можно инкубировать с Т-клетками или NK-клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы CD2-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могли связываться с CD2 клеточной поверхностью и впоследствии интернализоваться в Т-клетках или NK-клетках (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C; например, 1 час при 4°C). Фаг, содержащий антитела или их фрагменты, которые не проявляют достаточного сродства к CD2, обеспечивающего связывание и интернализацию в Т-клетках или NK-клетках, впоследствии можно удалить, промывая клетки, например, холодным (4°C) 0,1М глициновым буфером при pH 2,8. Фаг, связанный с антителами или их фрагментами, которые были интернализованы в Т-клетках и/или NK-клетках, можно идентифицировать, например, путем лизиса клеток и выделения интернализованного фага из среды для культивирования клеток. Затем фаг можно амплифицировать в бактериальных клетках, например, путем инкубации бактериальных клеток с извлеченным фагом в среде 2xYT способами, известными в данной области. Фаг, извлеченный из этой среды, затем может быть охарактеризован, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты гена(ов), кодирующего антитела или их фрагменты, встроенные в фаговый геном. Кодированные антитела, их фрагменты, впоследствии могут быть получены de novo химическим синтезом (например, фрагментов

антител, таких как фрагменты scFv) или рекомбинантной экспрессией (например, полноразмерных антител).

Примером способа эволюции анти-CD2 антител *in vitro* для применения с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, является фаговый дисплей. Библиотеки фагового дисплея могут быть созданы путем создания разработанной серии мутаций или вариантов в кодирующей последовательности для CDR антитела или аналогичных областей антителоподобного каркаса (например, петли BC, CD и DE доменов <sup>10</sup>Fn3). Последовательность, кодирующая матричное антитело, в которое вводят эти мутации, может представлять собой, например, наивную последовательность человеческой зародышевой линии. Эти мутации могут быть выполнены стандартными методами мутагенеза, известными в данной области. Таким образом, каждая мутантная последовательность кодирует антитело, соответствующее матрице, за исключением одного или более аминокислотных вариантов. Векторы ретровирусного и фагового дисплея могут быть сконструированы стандартными методами конструирования векторов, известными в данной области. Векторы фагового дисплея РЗ вместе с векторами экспрессии совместимых белков 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 экран фагового дисплея, изменят связывающие свойства связывающего пептида или домена, не изменяя существенным образом его общую молекулярную структуру.

При типичном скрининге фаговая библиотека может контактировать и обеспечивает связывание с CD2 или его эпитопом. Чтобы облегчить разделение связывающихся и несвязывающихся фрагментов, удобно иммобилизовать мишень на твердой подложке. Фаг, несущий CD2-связывающий фрагмент, может образовывать комплекс с мишенью на твердой подложке, тогда как несвязывающийся фаг остается в растворе и может быть смыт избытком буфера. Затем связанный фаг можно освободить от мишени путем замены буфера до экстремального значения pH (pH 2 или pH 10), изменения ионной силы буфера, добавления денатурирующих агентов или других известных средств.

Извлеченный фаг затем может быть амплифицирован через инфицирование бактериальных клеток, и процесс скрининга может быть повторен с новым пулом, который теперь истощен по несвязывающимся антителам и обогащен антителами, которые связываются с CD2. Извлечение даже нескольких связывающихся фагов достаточно для амплификации фага для последующей итерации скрининга. После

нескольких раундов отбора последовательности генов, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из отобранных клонов фагов в связывающемся пуле, определяют обычными методами, таким образом выявляя пептидную последовательность, которая обеспечивает сродство связывания фага с мишенью. Во время процесса пэннинга разнообразие последовательностей популяции уменьшается с каждым раундом отбора до тех пор, пока не останутся желательные пептидсвязывающие антитела. Последовательности могут совпадать у небольшого количества родственных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Увеличение количества фагов, извлеченных в каждом раунде отбора, является признаком того, что при скрининге произошла конвергенция библиотеки.

Другой способ идентификации анти-CD2 антител включает использование гуманизированных нечеловеческих антител, которые связываются с CD2, например, согласно следующей процедуре. Нечеловеческие антитела, которые связываются с CD2, могут быть гуманизированы, например, согласно следующей процедуре. Консенсусные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человеческих антител известны в данной области (см., например, базу данных последовательностей человеческой зародышевой линии «VBASE»; 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, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку они относятся к консенсусным последовательностям тяжелой цепи и легкой цепи человеческих антител. Используя установленные процедуры, специалист в данной области может идентифицировать каркасные остатки варибельного домена и CDR консенсусной последовательности антитела (например, путем выравнивания последовательности). Можно заменить одну или более CDR варибельных доменов тяжелой цепи и/или легкой цепи консенсусного человеческого антитела одной или более соответствующими CDR нечеловеческого антитела, которое связывается с CD2, для получения гуманизированного антитела. Этот обмен CDR может быть выполнен методами редактирования генов, раскрытыми в настоящем описании или известными в данной области техники.

Один из примеров варибельного домена человеческого консенсусного антитела содержит варибельный домен тяжелой цепи:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVAVISE  
NGSDTTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGAVSYFDV  
WGQGTLLTVSS** (SEQ ID NO: 18), и варибельный домен легкой цепи:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLE  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNLPPYTFGQGTKVEIKRT** (SEQ ID NO: 19), идентифицированные в патенте США № 6,054,297, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку он относится к консенсусным последовательностям человеческого антитела. CDR в вышеуказанных

последовательностях выделены жирным шрифтом.

Для получения гуманизированных антител можно выполнить рекомбинантную экспрессию полинуклеотида, кодирующего вышеуказанную консенсусную последовательность, в которой одна или более CDR вариабельной области заменены одной или более последовательностями CDR вариабельной области нечеловеческого антитела, которое связывается с CD2. Поскольку сродство антитела к CD2 определяется, главным образом, последовательностями CDR, ожидается, что полученное гуманизированное антитело будет проявлять сродство к CD2, которое будет примерно таким же, как и у нечеловеческого антитела, из которого было получено гуманизированное антитело. Способы определения сродства антитела к целевому антигену включают, помимо прочего, например, методы на основе ELISA, раскрытые в настоящем описании и известные в данной области, а также поверхностный плазмонный резонанс, флуоресцентную анизотропию и изотермическую титрационную калориметрию.

Способность полученных антител или их фрагментов к интернализации может быть оценена, например, с помощью анализов интернализации радионуклидов, известных в данной области. Например, анти-CD2 антитела или их фрагменты, идентифицированные *in vitro* дисплейными методами, раскрытыми в настоящем описании или известные в данной области, могут быть функционализированы путем включения радиоактивного изотопа, такого как  $^{18}\text{F}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{122}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{129}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ , or  $^{225}\text{Ac}$ . Например, радиоактивные галогены, такие как  $^{18}\text{F}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{122}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{129}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{211}\text{At}$ , могут быть включены в антитела или их фрагменты с помощью сфер, таких как полистирольные сферы, содержащие электрофильные галогеновые реагенты (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Антитела с радиоактивной меткой или их фрагменты можно инкубировать с Т-клетками и/или НК-клетками в течение времени, достаточного для обеспечения 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, используя холодный (4°C) 0,1М глициновый буфер при pH 2,8). Интернализированные антитела или их фрагменты могут быть идентифицированы путем детектирования излучения (например,  $\gamma$ -излучения), испускаемого полученными Т-клетками и/или НК-клетками, относительно излучения (например,  $\gamma$ -излучением), испускаемого восстановленным промывочным буфером.

Для рекомбинантного продуцирования анти-CD2 антитела выделяют нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, и вводят в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с помощью обычных процедур (например, путем использования 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,

представленные в настоящем описании. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда отсутствует необходимость в гликозилировании и эффекторной функции Fc. Что касается экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, патент США №№ 5,648,237, 5,789,199 и 5,840,523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, где описана экспрессия 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 полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьян, трансформированная SV40 (COS-7); клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); 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 буйвола (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, 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 клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, у 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 из вариантов осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетки Y0, NS0, Sp20).

### **Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)**

#### *Цитотоксины*

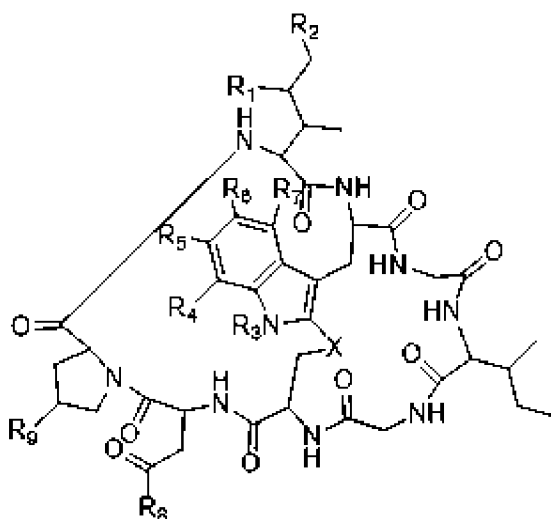
Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании (например, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD2), могут быть конъюгированы с цитотоксином, таким как экзотоксин *A Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин, сапорин, майтансин, майтансиноид, ауристин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, пиролибензодиазепиновый димер, индолинобензодиазепин и димер индолинобензодиазепаина или их варианты, или другое цитотоксическое соединение, раскрытое в настоящем описании или известное в данной области техники, для (i) непосредственного лечения рака или аутоиммунного заболевания, раскрытого в настоящем описании, или (ii) истощения эндогенных иммунных клеток для

предотвращения или снижения вероятности отторжения гемопоэтических стволовых клеток при трансплантации пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с интернализирующимся антителом или его антигенсвязывающим фрагментом таким образом, чтобы после клеточного поглощения антитела или антигенсвязывающего фрагмента цитотоксин мог получить доступ к своей внутриклеточной мишени и уничтожить эндогенные Т-клетки и/или NK клетки. Подходящие цитотоксины, подходящие для использования с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, включают, среди прочего, ДНК-интеркалирующие агенты (например, антрациклины), агенты, способные разрушать аппарат митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтансин, майтансиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аманитин и его производные), агенты, способные нарушать биосинтез белка (например, агенты, которые проявляют N- рРНК-N-гликозидазную активность, такие как сапорин и А-цепь рибина), известные 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, в Zanolini et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 1987, 450-459.

В одном из вариантов осуществления цитотоксин представляет собой аманитин. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании, могут быть связаны с аматоксином, образуя 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. На аматоксинах или их производных имеется несколько положений, которые могут служить в качестве положения для ковалентного связывания связывающего фрагмента L и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (I):



(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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

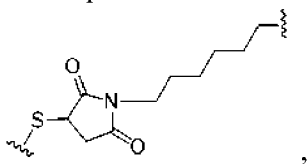
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил), необязательно замещенный 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 гетероарил, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

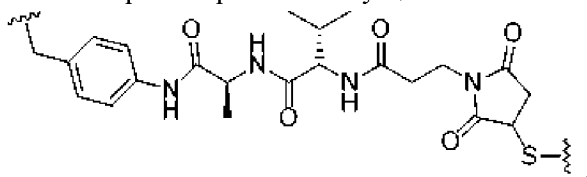
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2.

В некоторых вариантах осуществления Am содержит ровно один R<sub>C</sub> заместитель. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит звено -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где n представляет собой целое число от 2 до 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:

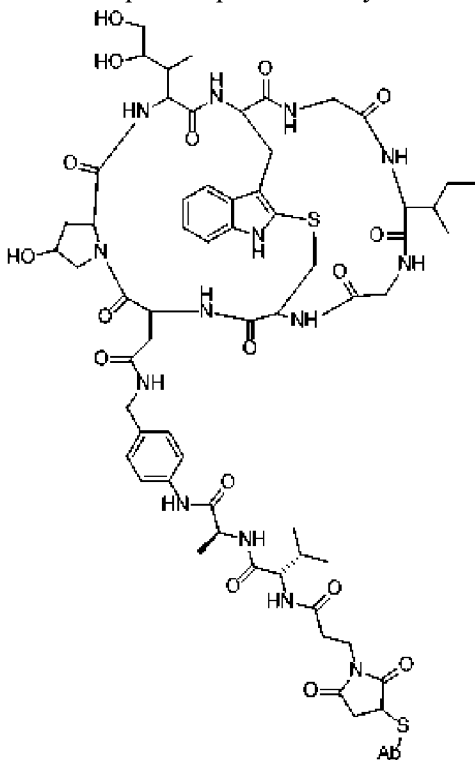


где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD117 (например, из группы -SH остатка цистеина).

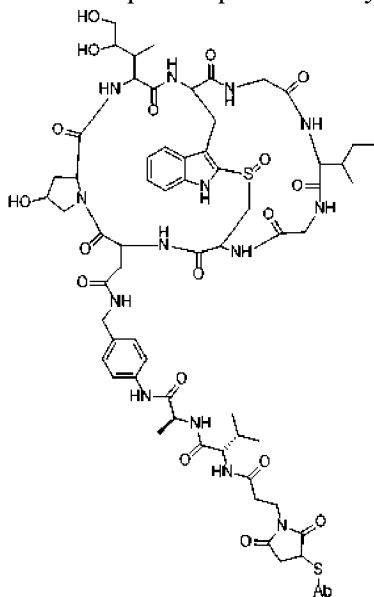
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой:



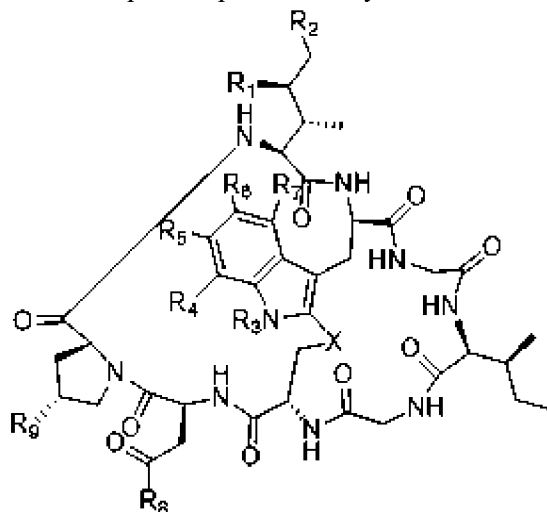
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой:



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



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



(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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

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

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

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

$R_C$  представляет собой -L-Z;

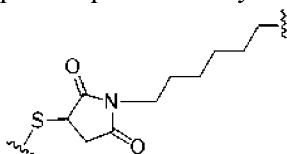
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный алкил (например,  $C_1$ - $C_6$  алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например,  $C_1$ - $C_6$  гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например,  $C_2$ - $C_6$  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 комбинацию; и

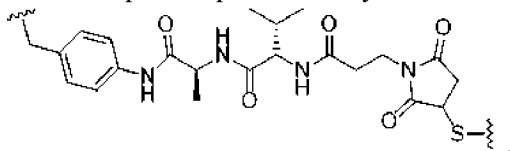
$Z$  представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на  $L$ , и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2; и

где  $Am$  содержит ровно один заместитель  $R_C$ .

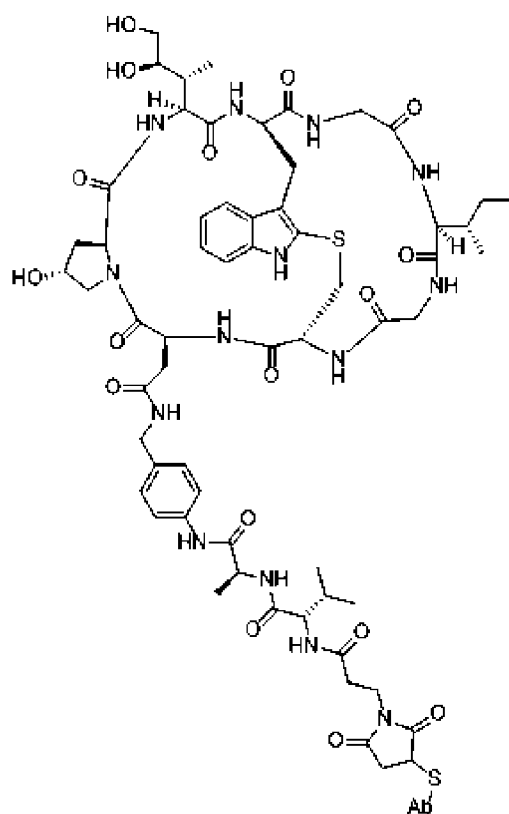
В некоторых вариантах осуществления линкер включает  $-(CH_2)_n$ , где  $n$  равно 6. В некоторых вариантах осуществления  $L-Z$  представляет собой:



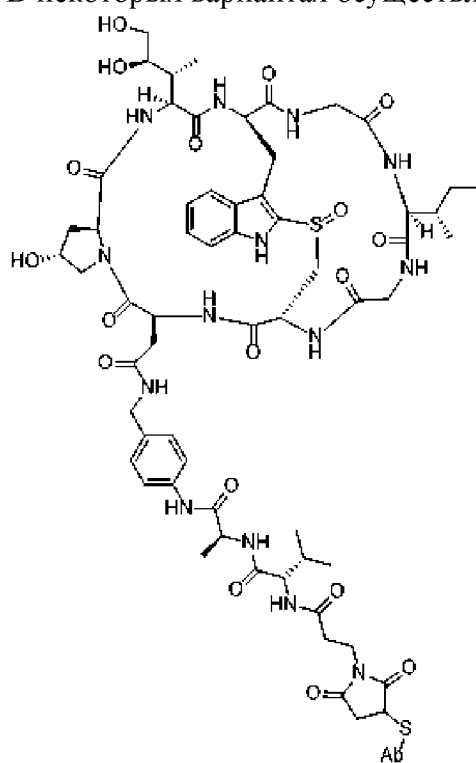
В некоторых вариантах осуществления  $L-Z$  представляет собой:



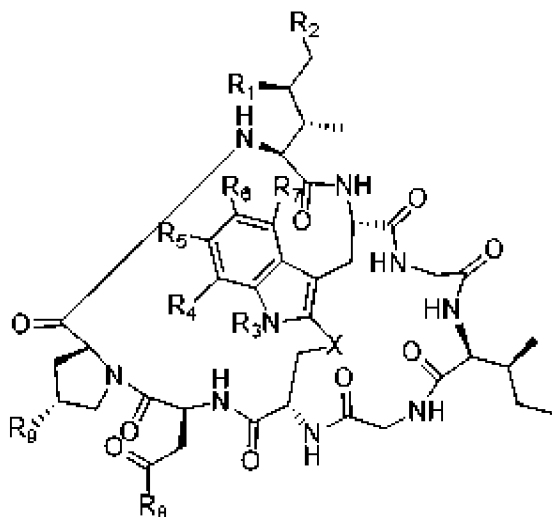
В некоторых вариантах осуществления  $Am-L-Z-Ab$  представляет собой:



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



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



(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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

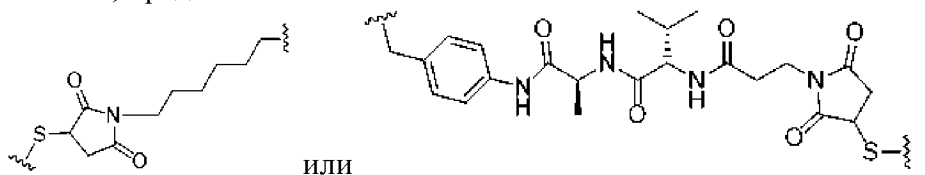
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенилен), необязательно 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 гетероарил, дипептид, -C(=O)-, пептид или их комбинацию; и

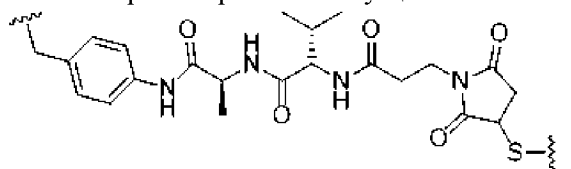
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2; и

где Am содержит ровно один заместитель R<sub>C</sub>.

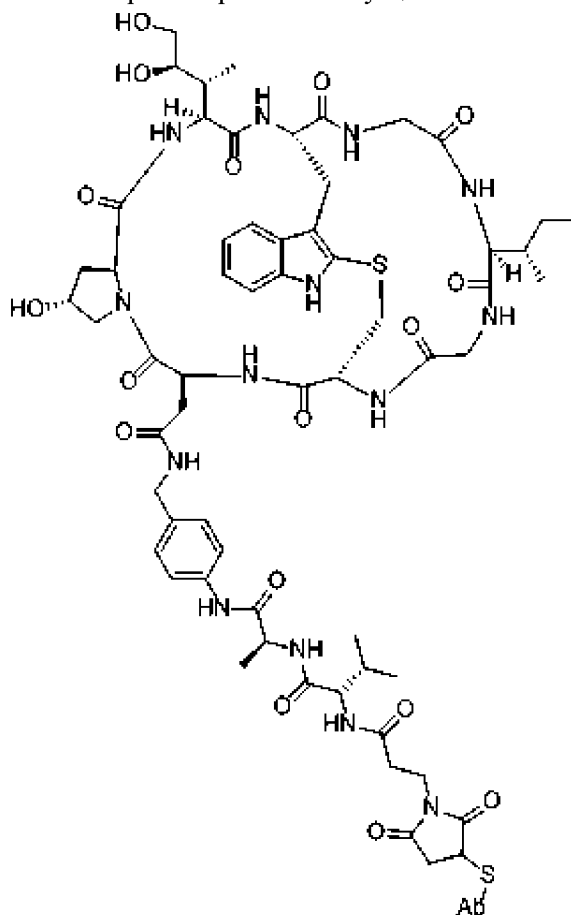
В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



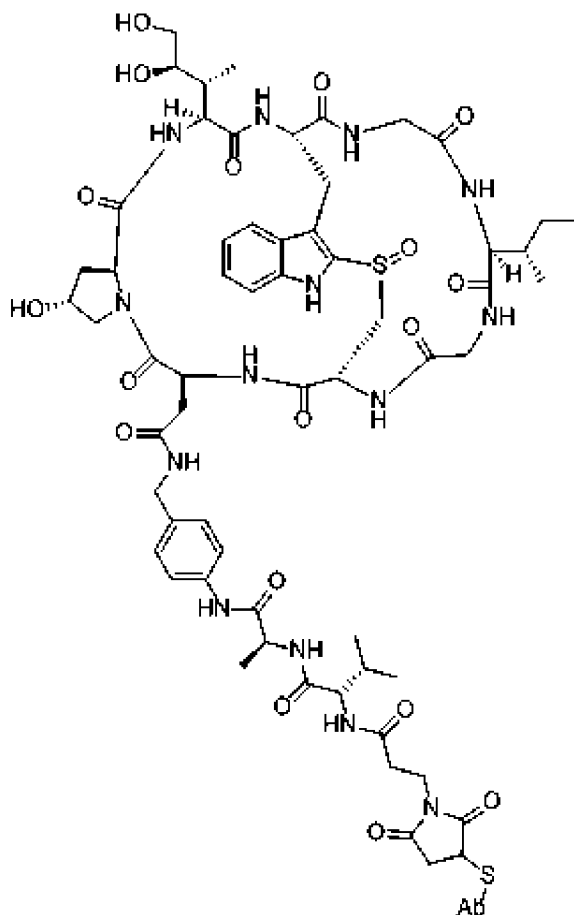
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой:



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



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



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



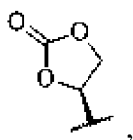
где  $Y$  представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_E R_{E'})-$ ; каждый из  $R_E$  и  $R_{E'}$  независимо представляет собой optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен- $R_C$ , optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен- $R_C$ , 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 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  $R_B$  объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

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

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

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

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

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

$R_9$  представляет собой H или OH; и

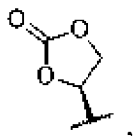
где X,  $R_C$  и  $R_D$  являются такими, как определено выше.

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



$R_3$  представляет собой H или  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H, OH,  $OR_C$  или  $OR_D$ ;

каждый из  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_9$  представляет собой H или OH; и

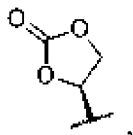
где X,  $R_C$  являются такими, как определено выше.

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



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

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где  $R_C$  определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2016/0002298, раскрытие которой полностью включено в настоящее описание в виде ссылки.

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

Г

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

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

$R_5$  представляет собой H, OH или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X и  $R_C$  являются такими, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0294865, раскрытие которой полностью включено в настоящее описание в виде ссылки.

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

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

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где X и  $R_C$  являются такими, как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, раскрытие которой включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

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

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

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;

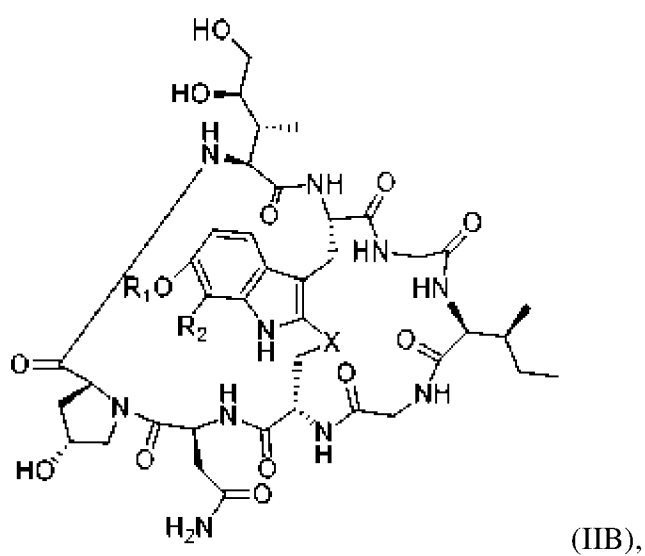
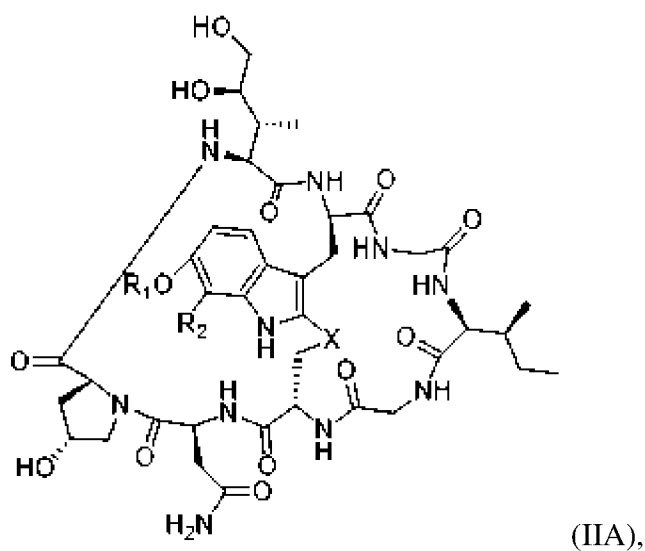
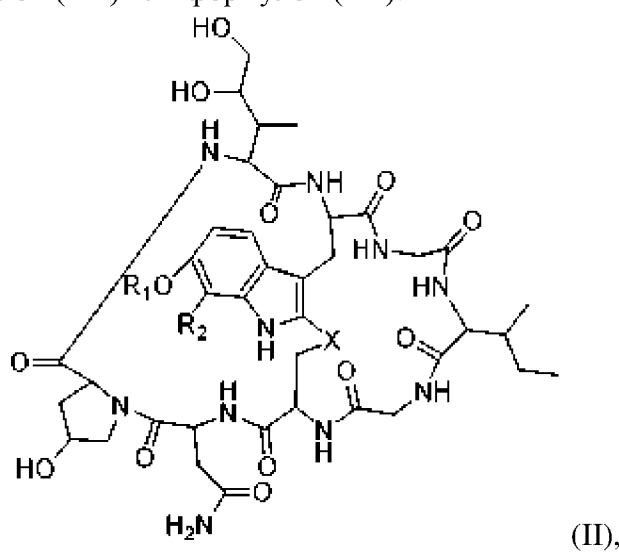
$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$  или  $NHR_C$ ;

$R_9$  представляет собой H или OH; и

где  $R_C$  определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в патентах США №№ 9,233,173 и 9,399,681, а также в US 2016/0089450, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

Дополнительные аматоксины, которые можно использовать для конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, описаны, например, в WO 2016/142049; WO 2016/071856; и WO2017/046658, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

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

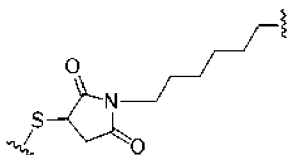


где  $X$  представляет собой S, SO или  $\text{SO}_2$ ;  $R_1$  представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между

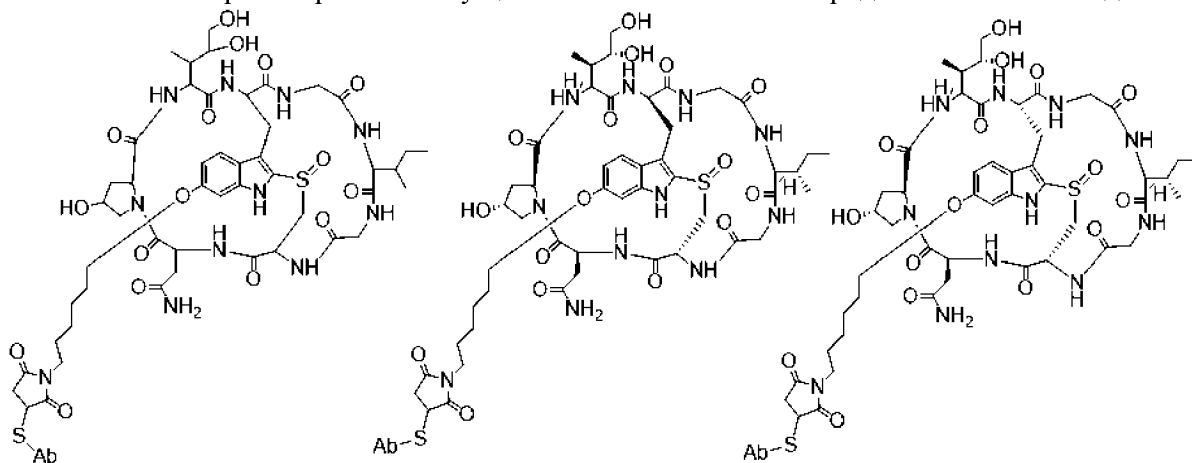
реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и  $R_2$  представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; причем, если  $R_1$  представляет собой H, то  $R_2$  представляет собой H, и, если  $R_2$  представляет собой H, то  $R_1$  представляет собой линкер.

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

В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  представляет собой линкер, и  $R_2$  представляет собой H, а линкер и химический фрагмент, взятые вместе как L-Z, представляют собой:



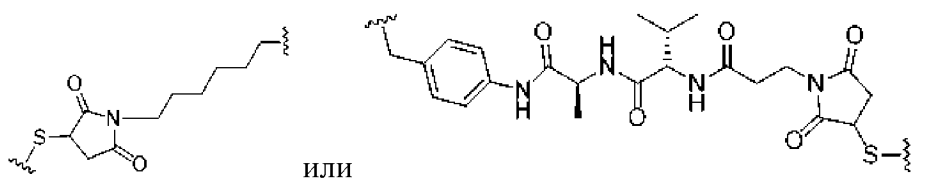
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой один из:



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 присоединен к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD2, через линкер L. Линкер L может быть присоединен к  $\alpha$ -аманитину формулы III в любом из несколько возможных положений (например, любым из  $R_1$ - $R_9$ ) для получения конъюгата  $\alpha$ -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, ПА или ПБ. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении  $R_1$ . В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении  $R_2$ . В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении  $R_3$ . В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении  $R_4$ . В некоторых вариантах

осуществления линкер присоединен в положении R<sub>5</sub>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sub>6</sub>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sub>7</sub>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sub>8</sub>. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен в положении R<sub>9</sub>. 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 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено  $-(C=O)(CH_2)_n-$ , где n представляет собой целое число от 1 до 6.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено  $-(CH_2)_n-$ , где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой:



Антитела и антигенсвязывающие фрагменты для использования с композициями и способами, представленными в настоящем описании, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, с помощью методов конъюгации, известных в данной области техники или раскрытых в настоящем описании. Например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD2, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, как описано в US 2015/0218220, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку этот документ относится, например, к аматоксинам, таким как  $\alpha$ -аманитин и его варианты, а также ковалентным линкерам, которые можно использовать для ковалентной конъюгации. Синтетические способы получения аматоксинов описаны, например, в патенте США № 9,676,702, который включен в настоящее описание в виде ссылки, как относящийся к способам синтеза.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты для использования с композициями и способами, представленными в настоящем описании, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант, с помощью методов конъюгации, известных в данной области техники или раскрытых в настоящем описании. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связываются с CD2, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как  $\alpha$ -аманитин или его вариант,

как описано в US 2015/0218220, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку этот документ 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, раскрытыми в настоящем описании, могут быть образованы в результате реакции 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 раскрытом в настоящем описании антителе или его антигенсвязывающем фрагменте включают, без ограничения 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-карбоксипропанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(2-бромацетомидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(4-(малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-

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

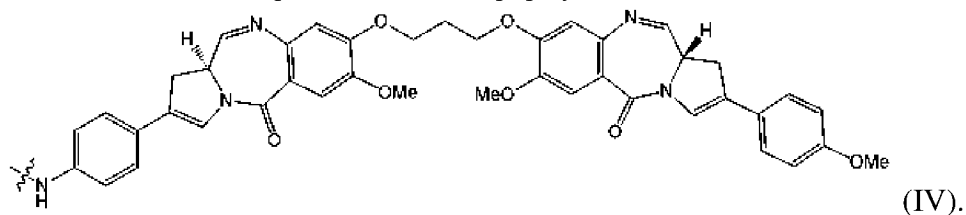
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)азиридин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(6-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(1-(аминоокси)-2-оксо-6,9,12,15-тетраоксо-3-азагептадекан-17-оил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-(аминоокси)ацетамидо)ацетил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(3-(2-(аминоокси)ацетамидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-(2-(аминоокси)ацетамидо)ацетамидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(20-(аминоокси)-4,19-диоксо-6,9,12,15-тетраоксо-3,18-диазаикозил)пиперидинил-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-бромацетомидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетомидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(3-(пиридине-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидинил-1-ил)метил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'O-(5-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)-аматоксин; 6'O-(2-((6-(малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)-аматоксин; 6'O-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; 6'O-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; 6'O-(6-(2-бромацетомидо)гексил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(азидо)гексанамидо)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(гекс-5-иноиламино)пиперидинил-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-добенз[b, f]азоцин-5-ил)-6-оксогексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'O-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)-аматоксин; 6'O-(6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)-аматоксин; 6'O-((6-аминоокси)гексил)-аматоксин; и 6'O-(6-(2-иодоацетамидо)гексил)-аматоксин. Вышеупомянутые линкеры, полезные, помимо прочего, в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящем описании, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, раскрытие которой включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

Дополнительные цитотоксины, которые могут быть конъюгированы с антителами и их антигенсвязывающими фрагментами, распознающими и связывающимися с CD2, для использования при непосредственном лечении рака, аутоиммунного состояния или для кондиционирования пациента (например, пациента-человека) при подготовке к терапии

трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, включают, без ограничения, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен, адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, алтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминоклевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антарелекс, антидорсализирующий морфогенетический белок-1, антиандроген, карциному предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколина глицинат, модуляторы генов апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновую кислоту, азулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатиридин, производные баккатина III, баланол, батимастат, BCR/ABL антагонисты, бензохлорины, бензоилстауроспорин, производные бета-лактама, бета-алетин, бета-кламицин В, бетулиновую кислоту, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрен, бисазиридирилспермин, биснафид, бистратен А, бизелезин, брефлат, блеомицин А2, блеомицин В2, бропиримин, будотитан, бутионина сульфоксимин, кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина (например, 10-гидроксикамптотецин), капецитабин, карбоксамид-амино-триазол, карбоксиамидотриазол, карзелезин, ингибиторы казеинкиназы, кастаноспермин, цекропин В, цетрореликс, хлорины, хлорохиноксалина сульфонамид, цикапрост, цис-порфирина, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллисмидин А, коллисмидин В, комбретастатин А4, аналоги комбретастатиона, конагенин, крамбесцидин 816, кризантол, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентатрахиноны, циклоплатам, ципермицин, цитарабин оксифосфат, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, 2'-диоксикоформицин (DCF), деслорелин, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацитидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенилспиромустин, дискодермолит, докозанол, долазетрон, доксифлуридин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселев, экомустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпителины, эпистерид, эстрамустин и его аналоги, этопозид, этопозид 4'-фосфат (также называемый этопофос), эксеместан, фадрозол, фазарабин, фенретирид, филграстин, финастерид, флавопиридол, флизелагин, фластерон, флударабин, фтородауноруницина гидрохлорид, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, гадолиния тексафин, галлия нитрат, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомогаррингтонин (ННТ), гиперин, ибандроновую кислоту, идоксифен, идрамантон, ильмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, йобенгуан, иододоксорибицин, ипомеанол, иринотекан, ироплакт, ирсогладин, избенгазол, джасплакинолид, кахалаид F, ламелларин-N триацетат, ланреотид, лейнамицин, ленограстин, лентинана сульфат, лептолстатин, летрозол, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобоплатин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, локсорибин, луртотекан, лутеция тексафин, лизофиллин, масопротек, маспин, ингибиторы матричной металлопротеиназы, меногарил, мербарон, метерелин,

метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, ифепристон, милтефозин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол, митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротин, молграмостим, микапероксид В, мириапорон, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновую кислоту, нилутамид, нисамицин, нитруллин, октреотид, окиценон, онапристон, ондансетрон, орацин, ормаплатин, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел и его аналоги, пала'уамин, палмитоилризоксин, памидроновую кислоту, панакцитриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргазу, пелдезин, полисульфат пентозана натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритрексим, подофиллотоксин, порфирамицин, ингибиторы пуриновой нуклеозидфосфорилазы, ралтитрексед, ризоксин, роглетимид, рохитукин, рубигинон В1, рубоксил, сафингол, сайнтопин, саркофитол А, сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфосиновую кислоту, спикамицин D, спиромустин, стипиамид, сульфинозин, талимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин, триметрексат, верамин, винорелбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и зиласкорб и другие.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер пирролобензодиазепина, представленный формулой:



Для конъюгации с цитотоксической молекулой представленных в настоящем описании антител и антигенсвязывающих фрагментов, распознающих и связывающихся с CD2, можно использовать различные линкеры.

В контексте настоящего описания термин «линкер» означает двухвалентный химический фрагмент, включающий ковалентную связь или цепь атомов, которые ковалентно связывают антитело или его фрагмент (Ab) с лекарственным фрагментом (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 и другой - для конъюгации с цитотоксином. Реакционноспособный конец линкера для конъюгации антитела (реакционноспособный фрагмент, Z) обычно представляет собой сайт, который способен конъюгировать с антителом через тиоловую группу цистеина или аминогруппу лизина на антителе, и, таким образом, обычно является тиол-реактивной группой, например группой с двойной связью (как в малеимиде) или уходящей группой, такой как хлор-, бром-, йод-содержащая или R-сульфанильная группа, или amino-реактивной группой, такой как карбоксильная группа, тогда как реакционноспособный конец линкера,

на котором происходит конъюгация с антителом, обычно представляет собой участок, который способен конъюгировать с цитотоксином через образование амидной связи с основной аминогруппой или карбоксильной группой на цитотоксине и, таким образом как правило представляет собой карбоксильную или основную аминогруппу. Когда термин «линкер» используется при описании линкера в конъюгированной форме, один или оба реакционноспособных конца отсутствуют (например, реакционноспособный фрагмент Z, превращенный в химический фрагмент Z) или являются 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 в настоящем описании ниже.

В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется во внутриклеточных условиях, и при расщеплении линкера от антитела во внутриклеточную среду высвобождается звено лекарственного вещества. В других вариантах осуществления звено линкера не расщепляется, и лекарственное вещество высвобождается, например, в результате разложения антитела. Линкеры, используемые для ADC по настоящему изобретению, вне клетки предпочтительно являются стабильными, предотвращают агрегацию молекул ADC и сохраняют способность ADC быстро растворяться в водной среде и находиться в мономерном состоянии. Перед транспортировкой или доставкой в клетку ADC предпочтительно является стабильным и остается интактным, т.е. антитело остается связанным с фрагментом лекарственного вещества. Линкеры стабильны вне клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер способен: (i) поддерживать специфические связывающие свойства антитела; (ii) обеспечивать внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного вещества; (iii) оставаться стабильным и интактным, т.е. не расщепленным до тех пор, пока конъюгат не будет доставлен или транспортирован к месту назначения; 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-спектропия, ВЭЖХ и методы разделения/анализа ЖХ/МС. Для ковалентного присоединения антитела и фрагмента лекарственного вещества требуется, чтобы линкер имел две реакционноспособные функциональные группы, т.е. он должен быть реакционно бивалентным. Известны бивалентные линкеры-реагенты, которые полезны для присоединения двух или более функциональных или биологически активных фрагментов, такие как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, а также описаны способы получения конъюгатов (Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p. 234-242).

Линкеры включают соединения, которые могут быть расщеплены, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в основных условиях, окислением, дисульфидным восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлоорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al.,

Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012, описание которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации).

Линкеры, гидролизуемые в кислых условиях, включают, например, гидразоны, семикарбазоны, тиосемикарбазоны, цис-аконитовые амиды, ортоэфиры, ацетали, кетали или т.п. (см., например, патенты США № 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки, поскольку они относятся к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, например в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительный pH лизосомы.

Линкеры, расщепляемые в восстанавливающих условиях, включают, например, дисульфид. Из уровня техники известны различные дисульфидные линкеры, включая, например, вещества, которые могут быть образованы с помощью 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 Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987; также см. патент США № 4,880,935, раскрытие каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки, поскольку относятся к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации).

Примеры линкеров, полезных для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают вещества, которые содержат электрофилы, такие как, частности, акцепторы Михаэля (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, подходящие для реакции с присутствующими в антителах или антигенсвязывающих фрагментах нуклеофильными заместителями, такими как амин и тиоловые фрагменты. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают, помимо прочего, без ограничения, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-иодоацетат (SIA), сульфо-SMCC, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидил-йодацетат, описанные, например, Liu et al., 18:690-697, 1979, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно полезны для конъюгации разрушающих микротрубочки агентов, таких как ауристатины, описанные Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку относится к линкерам для химической конъюгации.

Дополнительные линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, представленные в настоящем описании, включают линкеры, способные высвобождать цитотоксин результате процесса 1,6-элиминации («саморасщепляющаяся» группа), такие как *p*-аминобензиловый спирт (PABC), 6-малеимидогексановая кислота, pH-чувствительные карбонаты и другие реагенты, описанные Jain et al., *Pharm. Res.* 32:3526-3540, 2015, раскрытие которого включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. В некоторых вариантах осуществления линкер включает саморасщепляющуюся группу, такую как вышеупомянутый PAB или PABC (пара-аминобензилоксикарбонил), которые раскрыты, например, в 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; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; WO2004/032828). Другие такие химические фрагменты, способные к такому процессу («саморасщепляющиеся линкеры»), включают метиленкарбаматы и гетероарильные группы, такие как аминотиазолы, аминоимидазолы, аминопиримидины и т.п. Линкеры, содержащие такие гетероциклические саморасщепляющиеся группы, раскрыты, например, в публикациях патентов США №№ 20160303254 и 201500791 14 и в патенте США № 7,754,681; 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 представлять собой, например, пептидсодержащий линкер, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазным ферментом, включая, без ограничения, лизосомальную или эндосомальную протеазу. Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического агента является то, что агент, как правило, является ослабленным в состоянии конъюгации, а сывороточная стабильность конъюгатов обычно является высокой. В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер составляет в длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Типичные аминокислотные линкеры включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры подходящих пептидов включают пептиды, 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 № 6,214,345, раскрытие которого включено в настоящее описание во всей полноте в виде

ссылки, 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 по изобретению, дополнительно могут включать одну или более групп, выбранных из  $C_1$ - $C_6$  алкилена,  $C_1$ - $C_6$  гетероалкилена,  $C_2$ - $C_6$  алкенилена,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкенилена,  $C_2$ - $C_6$  алкинилена,  $C_2$ - $C_6$  гетероалкинилена,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена, гетероарилена и их комбинации, каждый из которых может быть необязательно замещен. Неограничивающие примеры таких групп включают звенья  $(CH_2)_n$ ,  $(CH_2CH_2O)_n$  и  $-(C=O)(CH_2)_n-$ , где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 6, независимо выбираемое в каждом случае.

В некоторых вариантах осуществления линкер может включать одно или более из: гидразина, дисульфида, тиозфира, дипептида, *p*-аминобензильной (PAB) группы, гетероциклической саморасщепляющейся группы, необязательно замещенного  $C_1$ - $C_6$  алкила, необязательно замещенного  $C_1$ - $C_6$  гетероалкила, необязательно замещенного  $C_2$ - $C_6$  алкенила, необязательно замещенного  $C_2$ - $C_6$  гетероалкенила, необязательно замещенного  $C_2$ - $C_6$  алкинила, необязательно замещенного  $C_2$ - $C_6$  гетероалкинила, необязательно замещенного  $C_3$ - $C_6$  циклоалкила, необязательно замещенного гетероциклоалкила, необязательно замещенного арила, гетероарила, ацила,  $-(C=O)-$  или  $-(CH_2CH_2O)_n-$  группы, где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 6. Специалист в данной области поймет, что одна или более из перечисленных групп могут присутствовать в форме бивалентного (дирадикального) вида, например,  $C_2$ - $C_6$  алкилена и т.п.

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

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 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 содержит комбинацию одного или более 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 содержит звено  $-(C=O)(CH_2)_n-$ , где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 6.

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

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

Линкеры, которые можно использовать для конъюгации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксическим агентом, включают линкеры, которые ковалентно связаны с цитотоксическим агентом на одном конце линкера, а на другом конце линкера содержат химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2. Реаакционноспособные заместители, которые могут присутствовать на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связываются с CD2, включают, без ограничения, гидроксильные фрагменты остатков серина, треонина и тирозина; аминогруппы остатков лизина; карбоксильные фрагменты остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиоловые фрагменты остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галоген-арил (например, фторарил), галоген-гетероарил (например, фторгетероарил), галоген-алкил и галоген-гетероалкил фрагментов не встречающихся в природе аминокислот.

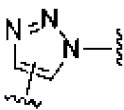
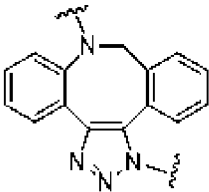
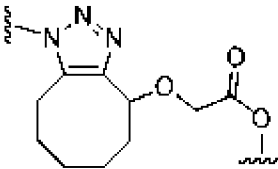
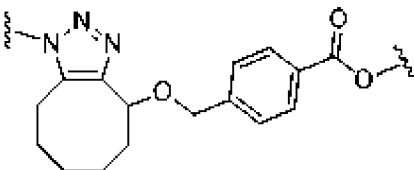
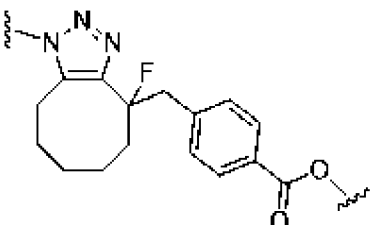
Примеры линкеров, полезных для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают линкеры, которые содержат, в частности, электрофилы, такие как акцепторы Михаэля (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, подходящие для реакции с присутствующими на антителе или антигенсвязывающем фрагменте нуклеофильными заместителями, такими как амин и тиоловые фрагменты. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают, помимо прочего, без ограничения, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-иодоацетат (SIA), сульфо-SMCC, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидилийодацетат, описанные, например, Liu et al., 18:690-697, 1979, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку этот документ относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно полезны для конъюгации разрушающих микротрубочки агентов, таких как ауристатины, описанные Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, раскрытие которого включено в настоящее описание в виде ссылки, поскольку относится к линкерам для химической конъюгации.

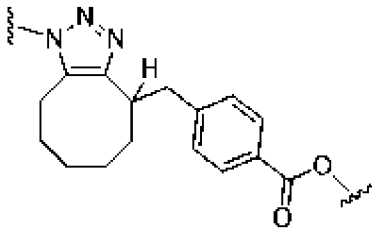
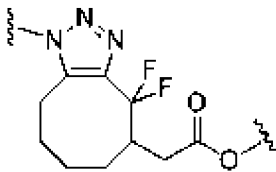
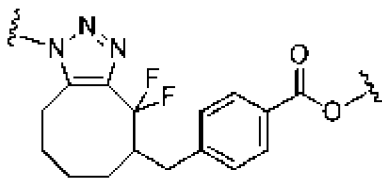
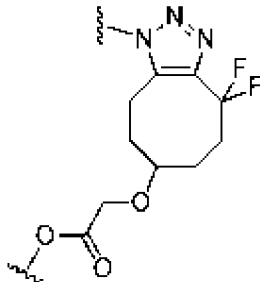
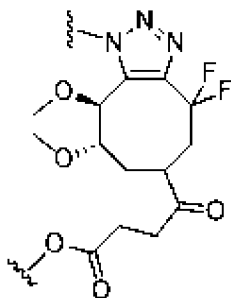
Специалисту в данной области будет понятно, что любая одна или более химических групп, фрагментов и признаков, раскрытых в настоящем описании, могут быть объединены множеством способов с образованием линкеров, полезных для конъюгации антител и цитотоксинов, как раскрыто в настоящем описании. Дополнительные линкеры, полезные в сочетании с композициями и способами, представленными в настоящем описании, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, раскрытие которой включено в настоящее описание во всей

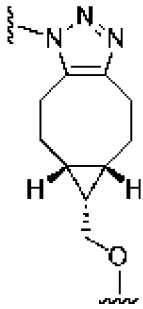
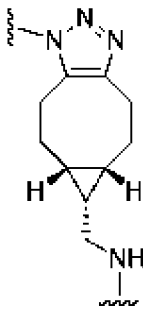
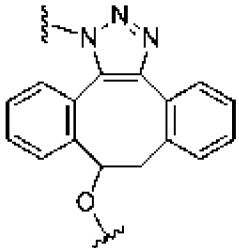
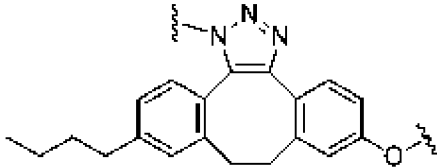
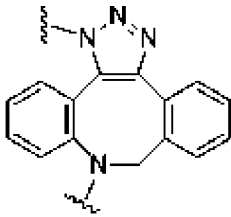
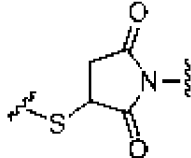
своей полноте в виде ссылки.

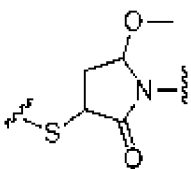
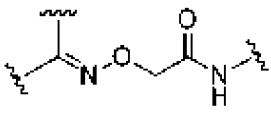
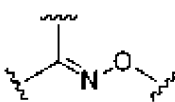
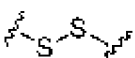
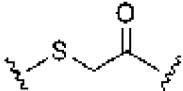
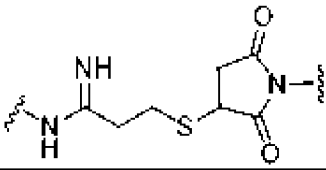
Линкеры, используемые в сочетании с конъюгатами антитело-лекарственное средство, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, линкеры, содержащие химические фрагменты, образованные реакциями сочетания, как показано в таблице 1 ниже. Волнистые линии обозначают точки присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту и цитотоксической молекуле, соответственно.

Таблица 1. Примеры химических фрагментов, образованных реакциями сочетания при образовании конъюгатов антитело-лекарственное средство

| Примеры реакций конъюгации              | Химический фрагмент Z, образованный в результате реакции сочетания                   |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| [3+2] Циклоприсоединение                |     |
| [3+2] Циклоприсоединение                |    |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |   |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |  |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |   |

|                                            |                                                                                     |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| [3+2] Циклоприсоединение,<br>эстерификация |    |
| [3+2] Циклоприсоединение,<br>эстерификация |    |
| [3+2] Циклоприсоединение,<br>эстерификация |    |
| [3+2] Циклоприсоединение,<br>эстерификация |   |
| [3+2] Циклоприсоединение,<br>эстерификация |  |

|                                         |                                                                                      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |     |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |     |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |    |
| [3+2] Циклоприсоединение, эстерификация |  |
| [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, представленными в настоящем описании, могут быть образованы в результате реакции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, как раскрыто в настоящем описании, с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, включающим 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 тиол/ $\alpha$ -ненасыщенная карбонильная пара и т.п.), пара диен/диенофил (например, пара азид/алкин или пара диен/ $\alpha$ -ненасыщенный карбонил и др.) и т.п. Реакции сочетания между реакционноспособными заместителями с образованием химического фрагмента Z включают, без ограничения, алкилирование тиола, алкилирование гидроксила, алкилирование амина, конденсацию амина или гидроксиламина, образование гидразина, амидирование, эстерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например,

помимо прочего, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Альдера, циклоприсоединение [3+2] Гюйсгена), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционные формы, известные в данной области техники или раскрытые в настоящем описании. Предпочтительно, линкер содержит электрофильную функциональную группу для реакции с нуклеофильной функциональной группой на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в представленном в настоящем описании антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, включают, без ограничения, нуклеофильные группы, такие как (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковой цепи, например, лизин, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например, цистеин и (iv) гидроксильные или аминокислоты сахара, где антитело является гликозилированным. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в представленном в настоящем описании антителе или его антигенсвязывающем фрагменте включают, без ограничения, гидроксильные группы остатков серина, треонина и тирозина; аминокислоты остатков лизина; карбоксильные фрагменты остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиоловые фрагменты остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галоарил (например, фторарил), галогетероарил (например, фторгетероарил), галогеналкил и галогетероалкил фрагментов не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные заместители, присутствующие в представленном в настоящем описании антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, включают аминные или тиоловые фрагменты. Некоторые антитела имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстановителем, таким как DTT (дифитиотреитол). Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически образует два реакционноспособных тиоловых нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела посредством реакции лизинов с 2-иминотиолом (реагентом Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Тиол-реактивные группы могут быть введены в антитело (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, получение мутантных антител, содержащих один или более аминокислотных остатков нативного цистеина). Патент США 7521541 описывает сконструированные антитела путем введения реакционноспособных аминокислот цистеина.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный фрагмент Z, присоединенный к линкеру, представляет собой нуклеофильную группу, которая реагирует с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, без ограничения, альдегидные и кетонные карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы может реагировать с электрофильной группой антитела и образовывать ковалентную связь с антителом. Пригодные нуклеофильные группы включают, без ограничения, гидразид, оксим, амина,

гидроксил, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид.

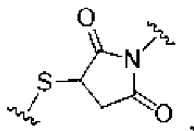
В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой продукт реакции между реакционноспособными нуклеофильными заместителями, присутствующими на антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, такими как аминная и тиоловая группы, и реакционноспособным электрофильным заместителем Z. Например, Z может представлять собой, помимо прочего, акцептор Михаэля (например, малеимид), активированный сложный эфир, электронодефицитное карбонильное соединение или альдегид.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит анти-CD2 антитело, конъюгированное с аматоксином любой из формул I, IA, IB, II, IIА или IIВ, как раскрыто в настоящем описании, 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 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено  $-(C=O)(CH_2)_n-$ , где n представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ .

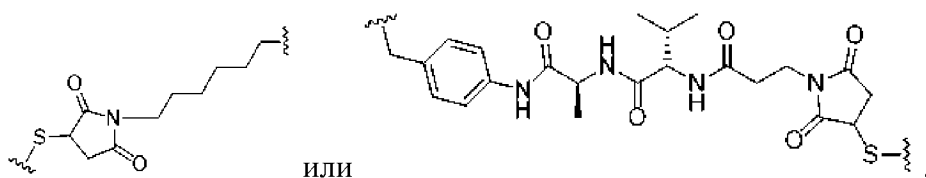
В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено  $-(CH_2)_n-$ , где n представляет собой целое число от 2 до 6.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой -PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-(CH_2)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой  $-(CH_2)_n-$ , где n равно 6.

В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z выбирают из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z представляет собой

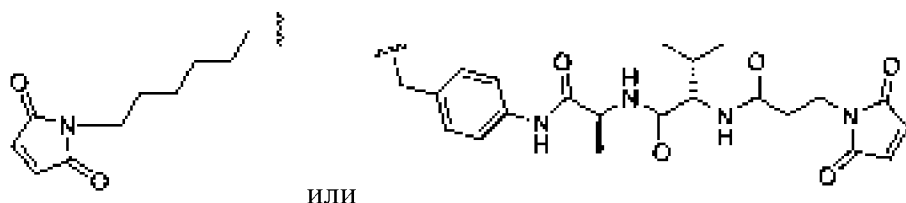


где S представляет собой атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывается с CD2 (например, из группы -SH остатка цистеина). В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



Специалист в данной области поймет, что структура группы, реагирующей с линкер-реактивными заместителями, перед конъюгацией с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом включает малеимид в качестве группы Z. Вышеуказанные линкерные фрагменты и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочих полезных в сочетании с композициями и способами, представленными в настоящем описании, раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220 и публикации заявки на патент № WO2017/149077, раскрытие каждой из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

В некоторых вариантах осуществления структура линкер-реакционная группа заместителей перед конъюгацией с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой:



#### *Приготовление конъюгатов антитело-лекарственное средство*

В представленных в настоящем описании ADC формулы I антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или более фрагментами цитотоксического лекарственного средства (D), например, от примерно 1 до примерно 20 лекарственных фрагментов на антитело через линкер L и химический фрагмент Z, как раскрыто в настоящем описании. ADC по настоящему изобретению могут быть получены несколькими способами 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 реагентом-линкером для образования Ab-Z-L, как раскрыто в настоящем описании выше, с последующей реакцией с лекарственным фрагментом D; или (2) реакцию реакционноспособного заместителя лекарственного остатка с двухвалентным реагентом-линкером с образованием D-L-Z с последующей реакцией с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как раскрыто в настоящем описании выше, с образованием ADC формулы D-L-Z-Ab, такого как Am-Z-L-Ab. В настоящем описании раскрыты дополнительные способы приготовления ADC.

В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет один или более остатков лизина, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или более сульфгидрильных групп. Затем образуют ADC путем конъюгации через

атом серы сульфгидрильной группы, как раскрыто в настоящем описании выше. Реагенты, которые можно использовать для модификации лизина, включают, без ограничения, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолан гидрохлорид (реагент Траута).

В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь одну или более карбогидратных групп, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или более сульфгидрильных групп. Затем образуют ADC путем конъюгации через атом серы сульфгидрильной группы, как раскрыто в настоящем описании выше.

В еще одном аспекте антитело может иметь одну или более углеводных групп, которые могут быть окислены с образованием альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). Затем образуют ADC путем конъюгации через соответствующий альдегид, как раскрыто в настоящем описании 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), включенном в настоящее описание в виде ссылки.

Способы конъюгации фрагментов линкер-лекарственное средство с белками-мишенями, такими как антитела, иммуноглобулины или их фрагменты, можно найти, например, в патентах США № 5,208,020 и 6,441,163; WO2005037992; WO2005081711; и WO2006/034488, все из которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

Альтернативно, слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, можно получить, например, рекомбинантными методами или синтезом пептидов. Длина ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо соседние друг к другу, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не нарушает нужные свойства конъюгата.

### **Способы лечения**

Согласно настоящему описанию, терапия трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток может быть назначена субъекту, нуждающемуся в лечении, для восстановления популяции или репопуляции одного или более типов клеток крови.

Гемопоэтические стволовые клетки обычно демонстрируют мультипотентность и, таким образом, могут дифференцироваться в многочисленные различные линии клеток крови, в том числе, без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглию, лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Гемопоэтические стволовые клетки также способны к самообновлению и, таким образом, могут дать начало дочерним клеткам с таким же потенциалом, что и материнская клетка, а также обладают способностью быть снова введенными реципиенту в виде трансплантата,

после чего они заселяют нишу гемопоэтических стволовых клеток и снова восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или дефицитом по одному или более типам клеток гемопоэтической линии, чтобы восстановить дефектную или дефицитную популяцию клеток *in vivo*, тем самым осуществляя лечение патологии, связанной с дефектом или дефицитом популяции эндогенных клеток крови. Композиции и способы, представленные в настоящем описании, таким образом можно использовать для лечения незлокачественной гемоглобинопатии (например, гемоглобинопатии, выбранной из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии и синдрома Вискотта-Олдрича). Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит.

Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения приобретенного иммунодефицита (например, приобретенного иммунодефицита, выбранного из группы, состоящей из HIV и AIDS). Композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения нарушения обмена веществ (например, нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из заболеваний накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метакроматической лейкодистрофии).

Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения злокачественного или пролиферативного расстройства, такого как гематологический рак, миелопролиферативное заболевание. В случае лечения рака композиции и способы, представленные в настоящем описании, могут быть введены пациенту перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, для истощения популяции иммунных клеток, которые перекрестно реагируют и создают иммунный ответ против собственных гемопоэтических стволовых клеток. Это служит для предотвращения или уменьшения вероятности отторжения введенных трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, что позволяет трансплантированным гемопоэтическим стволовым клеткам заселить нишу стволовых клеток и обеспечить продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, позволяет восстановить популяцию клеток, истощенных во время эрадикации раковых клеток, например, во время системной химиотерапии. Типичные гематологические раковые заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов, представленных в настоящем описании, включают, без ограничения, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, множественную миелому, диффузную крупную В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому, а также другие раковые заболевания, включая нейробластому.

Дополнительные заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов, представленных в настоящем описании, включают, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с дефицитом аденозиндезаминазы, синдром гипериммуноглобулина М, синдром Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни депонирования, большую талассемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз и ювенильный ревматоидный артрит.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты, представленные в настоящем описании, можно использовать для индукции толерантности к трансплантации твердого органа. Например, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для истощения или удаления популяции иммунных клеток перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. После такого истощения клеток из тканей-мишеней популяция стволовых клеток или клеток-предшественников донора органа (например, гемопоэтических стволовых клеток донора органа) может быть введена реципиенту трансплантата и после приживления таких стволовых клеток или клеток-предшественников, может быть достигнут временный или стабильный смешанный химеризм, что обеспечивает долгосрочную переносимость трансплантированного органа без необходимости в дополнительных иммунодепрессантах. Путем введения анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вероятность отторжения введенного трансплантата может быть снижена или же отторжение может быть полностью предотвращено. Таким образом, композиции и способы, представленные в настоящем описании, могут быть использованы для индукции переносимости трансплантата у реципиента твердого органа-реципиента (например, в частности, трансплантат почки, трансплантат легкого, трансплантат печени и трансплантат сердца). Композиции и способы, представленные в настоящем описании, хорошо подходят для применения с целью индукции толерантности к трансплантации твердого органа, например, потому что низкий процент временного или стабильного приживления донора является достаточным для индукции длительной толерантности трансплантированного органа.

Кроме того, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для непосредственного лечения рака, такого как рак, характеризующийся клетками, которые являются CD2<sup>+</sup>. Например, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения лейкемии, особенно у пациентов с лейкозными CD2<sup>+</sup> клетками. Благодаря истощению CD2<sup>+</sup> раковых клеток, такие как лейкозные клетки, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для непосредственного лечения различных видов рака.

Типичные раковые заболевания, которые можно лечить таким образом, включают гематологические раковые заболевания, такие как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, множественную миелому, диффузную В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому.

Кроме того, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения аутоиммунных расстройств. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, такому как пациент-человек, страдающему от аутоиммунного расстройства, чтобы убить CD2<sup>+</sup> иммунные клетки. CD2<sup>+</sup> иммунная клетка может представлять собой аутореактивный лимфоцит, такой как Т-клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор, который специфически связывается и инициирует иммунный ответ против собственного антигена. Путем истощения самореактивных CD2<sup>+</sup> клеток композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения аутоиммунных патологий, таких как описанные ниже патологии. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания путем истощения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут заселить нишу, созданную на стадии истощения эндогенных клеток, и обеспечить продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, позволит восстановить популяцию клеток, истощенных во время аутоиммунной эрадикации клеток.

Аутоиммунные заболевания, которые можно лечить с помощью композиций и способов, раскрытых в настоящем описании, 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, диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальную алопецию, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидных антител (APS), апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную болезнь внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости с иммунной дисфункцией (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, герпетиформный дерматит, ассоциированный с глютеновой энтеропатией, синдром холодовой агглютинации, CREST-синдром, болезнь Дегоса, дискоидную волчанку, дизавтономию, эндометриоз, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию-фибромиозит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, идиопатическую и/или острую тромбоцитопеническую пурпуру, идиопатический легочный фиброз, IgA-нейропатию, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, красный плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), миастению гравис, нейромиотонию, синдром опсоклонус-миоклонус (OMS), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, пузырьчатку обыкновенную, пернициозную анемию, полихондрит,

полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узловой полиартериит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром неподвижного человека, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный артериит»), язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводинию («вульварный вестибулит») и гранулематоз Вегенера.

Например, используя композиции и способы, представленные в настоящем описании, специалист в данной области может ввести субъекту, страдающему от аутоиммунного расстройства, анти-CD2 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 типа 1. Для улучшения одного или более из этих состояний врач в данной области может назначить и ввести субъекту анти-CD2 антитело или его фрагмент, такое как антитело или его фрагмент, которое связано с цитотоксическим агентом. Антитело или его фрагмент может быть конъюгировано с цитотоксическим агентом с помощью методов конъюгации и линкеров, подробно описанных выше. Для истощения популяции эндогенных, аутореактивных CD2<sup>+</sup> Т-клеток или NK-клеток у субъекта анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгировано с различными цитотоксическими агентами. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгировано с фрагментом аматоксина или другого цитотоксина, раскрытого в настоящем описании.

При подготовке к терапии врач может оценить количество или концентрацию аутореактивных Т-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от субъекта. Это может быть сделано, например, методами анализа FACS, известными в данной области техники. Затем для истощения популяции аутореактивных Т-клеток и/или NK-клеток специалист в данной области может ввести субъекту антитело или его фрагмент либо отдельно, либо в виде конъюгата с цитотоксином. Для оценки эффективности терапии врач может определить количество или концентрацию аутореактивных Т-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от пациента после введения анти-CD2 антитела или его фрагмента. Определение того, что количество или концентрация аутореактивных Т-клеток и/или NK-клеток в образце, выделенном от субъекта после терапии, относительно количества или концентрации Т-клеток или NK-клеток до начала терапии, указывает на то, что пациент реагирует на анти-CD2 антитело или его фрагмент.

Конъюгаты антител с лекарственными средствами, содержащие анти-CD2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, также можно использовать в комбинации с CAR Т-терапией. В частности, эффективное количество конъюгата лекарственное средство-анти-CD2 антитело можно вводить нуждающемуся в этом пациенту до CAR Т-терапии для истощения нативных Т-клеток. Истощение нативных Т-клеток, экспрессирующих CD2, с помощью способов и композиций, представленных в настоящем описании, может

обеспечить более эффективный перенос сконструированных Т-клеток, используемых в CAR T-терапии.

### **Пути введения и дозирования**

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании, могут вводиться пациенту (например, пациенту-человеку, нуждающемуся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток) в различных лекарственных формах. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании, можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и/или страдающему от рака или аутоиммунного заболевания, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий один или более фармацевтически приемлемых наполнителей. Типичные фармацевтически приемлемые наполнители для применения с композициями и способами, представленными в настоящем описании, представляют собой модифицирующие вязкость агенты. Водный раствор может быть стерилизован методами, известными в данной области.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем описании, могут вводиться различными путями, такими как пероральный, чрескожный, подкожный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, внутриглазный или парентеральный. 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, рациона пациента и скорости выведения.

Раскрытая в настоящем описании эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может меняться, например, от примерно 0,001 до примерно 100 мг/кг массы тела на одно (например, болюсное) введение, многократное введение или непрерывное введение, или для достижения оптимальной концентрации в сыворотке (например, концентрации в сыворотке от примерно 0,0001 до примерно 5000 пг/мл) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для подготовки к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток доза может вводиться субъекту (например, человеку), получающему кондиционирующую терапию, один или более раз (например, примерно 2-10 раз) в сутки, неделю или месяц. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, во время, которое является оптимальным для истощения CD2+ Т-клеток или NK-клеток, перекрестно реагирующих с несобственным антигеном гемопоэтических стволовых клеток (например, несобственным МНС антигеном, экспрессируемым гемопоэтическими стволовыми клетками) до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Например, анти-CD2 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут вводиться пациенту, подвергающемуся терапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, за от

примерно 1 часа до примерно 1 неделю (например, примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 3 часа, примерно 4 часа, примерно 5 часов, примерно 6 часов, примерно 7 часов, примерно 8 часов, примерно 9 часов, примерно 10 часов, примерно 11 часов, примерно 12 часов, примерно 13 часов, примерно 14 часов, примерно 15 часов, примерно 16 часов, примерно 17 часов, примерно 18 часов, примерно 19 часов, 20 часов, примерно 21 час, примерно 22 часа, примерно 23 часа, примерно 24 часа, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 4 дня, примерно 5 дня, примерно 6 дней или примерно 7 дней, или от примерно 1 до 3 дней, от примерно 1 до 4 дней, от примерно 12 часов до 3 дней) или более до введения экзогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Период полувыведения антитела может составлять от примерно 1 часа до примерно 24 часов (например, примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 3 часа, примерно 4 часа, примерно 5 часов, примерно 6 часов, примерно 7 часов, примерно 8 часов, примерно 9 часов, примерно 10 часов, примерно 11 часов, примерно 12 часов, примерно 13 часов, примерно 14 часов, примерно 15 часов, примерно 16 часов, примерно 17 часов, примерно 18 часов, примерно 19 часов, примерно 20 часов, примерно 21 час, примерно 22 часа, примерно 23 часа или примерно 24 часа).

В одном из вариантов осуществления анти-CD2 антитело (или его фрагмент, содержащий Fc) имеет уменьшенный период полувыведения (по сравнению с Fc-областью дикого типа), где Fc-область антитела содержит мутацию H435A (нумерация согласно EU индексу).

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем описании, перед терапией трансплантации гемопоэтических стволовых клеток специалист в данной области может провести кондиционирование пациента, такого как пациент-человек, для обеспечения приживания экзогенных трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток. С этой целью, специалист в данной области техники может ввести пациенту-человеку антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способное связываться с CD2, такое как анти-CD2 антитело, представленное в настоящем описании. Антитело или его фрагмент может быть ковалентно конъюгировано с токсином, таким как цитотоксическая молекула, раскрытая в настоящем описании или известная в данной области техники, или Fc-доменом. Например, анти-CD2 антитело или его фрагмент может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином, таким как экзотоксин A *Pseudomonas*, деБуганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как  $\alpha$ -аматоксин, сапорин, майтансин, майтансиноид, ауристин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепаина, индолинобензодиазепин димер индолинобензодиазепаина или их варианты. Такая конъюгация может быть выполнена методами образования ковалентных связей, раскрытыми в настоящем описании или известными в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство могут впоследствии быть введены пациенту, например, путем внутривенного введения перед трансплантацией пациенту экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как

аутологичные, сингенные или аллогенные гемопоэтические стволовые клетки).

Анти-CD2 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества эндогенных Т-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%, от примерно 10% до 90%, от примерно 10% до 70%, от примерно 10% до 60% или более перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Уменьшение количества Т-клеток можно контролировать обычными методами, известными в данной области, такими как FACS анализ 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 брать образцы костного мозга у пациента в различные моменты времени во время кондиционирующей терапии и определять степень уменьшения эндогенных Т-клеток, проводя анализ FACS для выяснения относительных концентраций Т-клеток в образце с помощью антител, которые связываются с Т-клеточными антигенными маркерами. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда концентрация Т-клеток достигает минимального значения в ответ на кондиционирующую терапию анти-CD2 антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство, врач может завершить кондиционирующую терапию, и может начать подготовку пациента к терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Анти-CD2 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем один или более фармацевтически приемлемых наполнителей, таких как модифицирующий вязкость агент. Водный раствор может быть стерилизован методами, раскрытыми в настоящем описании или известными в данной области. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту в дозе, например, от примерно 0,001 до примерно 100 мг/кг до введения пациенту трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, за от примерно 1 час до примерно 1 неделю (например, примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 3 часа, примерно 4 часа, примерно 5 часов, примерно 6 часов, примерно 7 часов, примерно 8 часов, примерно 9 часов, примерно 10 часов, примерно 11 часов, примерно 12 часов, примерно 13 часов, примерно 14 часов, примерно 15 часов, примерно 16 часов, примерно 17 часов, примерно 18 часов, примерно 19 часов, примерно 20 часов, примерно 21 час, примерно 22 часа, примерно 23 часа, примерно 24 часа, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 4 дня, примерно 5 дней, примерно 6 дней или примерно 7 дней) или более до введения экзогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

После завершения терапии кондиционирования пациент затем может получить инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, выполненную тем же врачом, который проводил кондиционирующую терапию, или другим врачом. Врач может вводить пациенту инфузию аутологичных, сингенных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от примерно  $1 \times 10^3$  до примерно  $1 \times 10^9$  гемопоэтических стволовых клеток/кг. Врач может контролировать приживание трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем взятия образца крови у пациента и определения увеличения концентрации гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии (таких как мегакариоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглия, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты) после введения трансплантата. Этот анализ можно выполнять, например, через от 1 часа до 6 месяцев или более после терапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (например, через примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 3 часа, примерно 4 часа, примерно 5 часов, примерно 6 часов, примерно 7 часов, примерно 8 часов, примерно 9 часов, примерно 10 часов, примерно 11 часов, примерно 12 часов, примерно 13 часов, примерно 14 часов, примерно 15 часов, примерно 16 часов, примерно 17 часов, примерно 18 часов, примерно 19 часов, примерно 20 часов, примерно 21 час, примерно 22 часа, примерно 23 часа, примерно 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели или более). Наблюдение того, что концентрация кроветворных стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии увеличивается (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, свидетельствует о том, что лечение анти-CD2 антителом, его антигенсвязывающим фрагментом, конъюгатом антитело-лекарственное средство способствует успешному приживлению введенного трансплантата стволовых клеток.

### **Примеры**

Приведенные ниже примеры предоставлены специалистам в данной области техники для описания того, каким образом композиции и способы, раскрытые в настоящем описании, могут быть использованы, изготовлены и оценены, и предназначены для демонстрации изобретения, а не для ограничения его объема.

#### **Пример 1: Анализ *in vitro* связывания анти-CD2 антител.**

Для определения характеристик связывания анти-CD2 антител mIgG1, RPA-2.10, и

Ab1-hIgG1 были выполнены исследования связывания антител при 25 градусах Цельсия в 1 xPBS с добавлением 0,1% мас./об. бычьего сывороточного альбумина с помощью устройства Pall ForteBio Octet Red96 методом бислойной интерферометрии (BLI). Указанное очищенное человеческое (Ab1-hIgG1) или мышинное (mIgG1, RPA-2.10) антитело иммобилизовали на биосенсорах с антителом к человеческому Fc (АНС; Pall ForteBio 18-5063) или биосенсорах с антителом к мышинному Fc (АМQ; Pall ForteBio 18-5090) и инкубировали с 50 нМ очищенного эктодомена человеческого CD2 (Sigma Aldrich и Catalog #5086). Кажущуюся моновалентную аффинность ( $K_D$ ), кажущуюся скорость ассоциации ( $K_{ON}$ ) и кажущуюся скорость диссоциации ( $K_{DIS}$ ) определяли путем локальной полной подгонки  $r$  модели 1:1 связывания каждого IgG с очищенным эктодоменом человеческого CD2, рассчитанной с помощью 10 версии программного обеспечения для анализа данных ForteBio для; данные приведены в таблице 2.

Дальнейшая характеристика анти-CD2-антител представлена в примерах 2-6.

**Таблица 2:** Кинетика связывания указанного IgG с эктодоменом человеческого CD2

| Антитело  | Конц.<br>(нМ) | Ответ (нМ) | $K_D$ (М) | $K_{ON}$<br>(1/Мс) | $K_{DIS}$ (1/с) | Полная $R^2$ |
|-----------|---------------|------------|-----------|--------------------|-----------------|--------------|
| mRPA-2.10 | 50            | 0,1807     | 2,00E-09  | 8,60E+04           | 1,72E-04        | 0,9952       |
| Ab1       | 50            | 0,0615     | 2,12E-09  | 1,36E+05           | 2,89E-04        | 0,9683       |

**Пример 2: Анализ *in vitro* связывания клеточной линии с анти-CD2 антителами**

Клетки MOLT-4 (т.е. иммортализованной клеточной линии человеческих Т-лимфобластов) высевали с плотностью 20000 кл./лунка и окрашивали путем титрования указанных мышинных анти-CD2 антител (т.е. RPA-2.10, TS1/8, BH1, UMCD2, 1 E7E8.G4 или LT2) в течение 2 часов при 4°C. Вторичное окрашивание осуществляли путем добавления при постоянном количестве антимышиного антитела AF488 в течение 30 минут при 4°C. После промывки планшеты обрабатывали на проточном цитометре и определяли связывание указанного антитела (и отрицательный контроль, т.е. mIgG1) относительно средней геометрической интенсивности флуоресценции в канале AF488. Результаты этих анализов представлены на фиг. 1.

Как показано на фиг. 1, мышинные анти-CD2 антитела RPA-2.10, TS1/8, BH1, UMCD2, 1 E7E8.G4 и LT2 связываются с человеческими Т-лимфобластами (т.е. клетками MOLT-4) с  $EC_{50}$ =160 пМ (RPA-2.10), 125 пМ (TS 1/8), 639 пМ (BH1), 151 пМ (UMCD2), 134 пМ (1 E7E8) и 60 пМ (LT2).

**Пример 3: Анализ *in vitro* связывания первичных клеток с анти-CD2 антителами**

Первичные человеческие Т-клетки высевали с плотностью  $8 \times 10^4$  кл./лунка и окрашивали титрованием мышинного анти-CD23 антитела RPA-2.10 в течение 2 часов при 37°C. Окрашивание вторичным антимышиным или античеловеческим AF488 антителом относительно первичного антитела осуществляли путем добавления постоянного

количества в течение 30 минут при 4°C. После промывки планшеты обрабатывали на проточном цитометре и определяли связывание указанного антитела (и отрицательного контроля, т.е. mIgG1 или hIgG1) относительно средней геометрической интенсивности флуоресценции в канале AF488. Результаты этих анализов представлены на фиг. 2.

Как показано на фиг.2, мышиное анти-CD2 антитело RPA-2.10 связывается с первичными человеческими Т-клетками с  $EC_{50}=1,84$  пМ (RPA-2.10).

**Пример 4. In vitro анализ конъюгата лекарственного средства на основе аманитина с анти-CD2 антителом (ADC) с помощью in vitro анализа гибели Т-клеток.**

Анти-CD2 антитело RPA 2.10 конъюгировали с аманитином через расщепляемый линкер с образованием анти-CD2-ADC. Один анти-CD2-ADC получали с использованием мышинного анти-CD2 антитела RPA-2.10, имеющего среднее межцепочечное отношение лекарственное средство-антитело (DAR), равное 6. Второй анти-CD2-ADC, имеющий среднее DAR, равное 2, получали с использованием человеческого химерного варианта RPA-2.10, конъюгированного с аманитином методом сайт-специфической конъюгации. Кроме того, вариант с коротким периодом полувыведения анти-CD2-ADC получали путем введения мутации H435A. Каждый анти-CD2-ADC оценивали с помощью in vitro анализа гибели Т-клеток.

Криоконсервированные отрицательно отобранные первичные человеческие Т-клетки оттаивали и стимулировали анти-CD3 антителами и IL-2. В начале анализа в лунку 384-луночного планшета высевали  $2 \times 10^4$  Т-клеток, и указанные ADC или неконъюгированное анти-CD2 антитело добавляли в лунки в различных концентрациях от 0,003 нМ до 30 нМ до помещения их в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через пять дней культивирования клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Клетки окрашивали маркером жизнеспособности 7-AAD и обрабатывали на объемном проточном цитометре. Количество жизнеспособных Т-клеток (фиг. 3А и 3В) определяли путем FSC окрашивания против SSC и 7-AAD. Неконъюгированное анти-CD2 антитело (RPA 2.10) служило компаратором (рис. 3А).

Как показано на фиг.3А, анти-CD2-ADC, имеющие межцепочечное отношение лекарственное средство-антитело, равное 6, демонстрируют высокую и специфическую гибель Т-клеток ( $IC_{50}=5,0$  пМ), тогда как в присутствии неконъюгированных («голых») анти-CD2 антител Т-клетки остаются жизнеспособными. Как показано на фиг. 3В, человеческие химерные анти-CD2-ADC, имеющие отношение сайт-специфического антитела к лекарственному средству, равное 2, также обеспечивали высокий уровень гибели Т-клеток ( $IC_{50}=1,0$  мкМ), аналогичный уровню DAR ADC, равному 6. Кроме того, вариант с анти-CD2-ADC быстрым периодом полувыведения (H435A) демонстрировал уровень гибели Т-клеток ( $IC_{50}=6,3$  пМ; фиг. 3В), аналогичный таковому у WT анти-CD2-ADC.

**Пример 5. In vitro анализ конъюгата лекарственного средства на основе аманитина с анти-CD2 антителом (ADC) с помощью in vitro анализа гибели Т-клеток.**

Анти-CD2-антитело RPA 2.10 конъюгировали с аманитином через расщепляемый

линкер с образованием межцепочечного анти-CD2-ADC со средним межцепочечным отношением лекарственное средство-антитело (DAR), равным 6.

Анти-CD2-ADC оценивали с помощью *in vitro* анализа гибели натуральных киллеров (NK)-клеток.

Первичные человеческие CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK-клетки культивировали с рекомбинантными IL-2 и IL-15 в течение четырех дней. В начале анализа в каждую лунку 384-луночного планшета высевали 30000 свежесепарированных NK-клеток, полученных от здорового донора-человека, и в лунки добавляли указанный ADC или контроль (т.е. IgG1 или ADC IgG1-аманитин) в различных концентрациях от 0,003 до 30 нм до помещения их в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 4 дня культивирования жизнеспособность NK-клеток анализировали с помощью анализа CellTiter-Glo (фиг. 4).

Как показано на фиг.4, анти-CD2-ADC продемонстрировал высокий уровень гибели NK-клеток с IC<sub>50</sub> 5,2 пМ. Отсутствие полного уничтожения анти-CD2-ADC согласуется с тем фактом, что CD2 экспрессируется только примерно у 75% NK-клеток.

#### **Пример 6. Анализ истощения Т-клеток с помощью мышинной модели hNSG.**

*In vivo* анализ истощения Т-клеток выполняли с использованием гуманизированных мышей NSG (Jackson Laboratories). Анти-CD2 антитело RPA 2.10 конъюгировали с аманитином через расщепляемый линкер с образованием анти-CD2-ADC. Один анти-CD2-ADC получали с мышинным RPA 2.10, имеющим среднее отношение межцепочечное лекарственное средство-антитело (DAR), равное 6, в то время как другой анти-CD2-ADC получали с химерным RPA 2.10, имеющим среднее сайт-специфическое DAR, равное 2. Каждый анти-CD2-ADC (DAR6 и DAR2) вводили в виде однократной внутривенной инъекции (0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг для ADC DAR6 и 1 мг/кг или 3 мг/кг для DAR2 ADC) модели гуманизированной мыши. Образцы периферической крови, костного мозга или тимуса собирали на 7-й день, и с помощью проточной цитометрии определяли абсолютное количество CD3<sup>+</sup> Т-клеток (см. Фиг. 5А и 5В для ADC DAR2 и 6А-6С для ADC DAR6).

Как показано на фиг. 5А-5В, гуманизированные мыши NSG, обработанные 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг межцепочечным анти-CD2-ADC с DAR=6, показали высокий уровень истощения Т-клеток в периферической крови или костном мозге, в то время как Т-клетки тимуса истощались после введения 3 мг/кг анти-CD2-ADC с DAR=6. Для сравнения на фиг.5А и 5В также показан уровень истощения Т-клеток после обработки гуманизированных мышей NSG 25 мг/кг Ab1 (неконъюгированным анти-CD2 антителом) или указанными контролями (т.е., 25 мг/кг анти-CD2 антитела (клон YTH34,5); 3 мг/кг ADC hIgG1-аманитин («hIgG1-AM»), 25 мг/кг hIgG1 или PBS).

Как показано на фиг. 6А-6С, гуманизированные мыши NSG, получавшие анти-CD2-ADC с сайт-специфическим DAR=2 в дозе 1 мг/кг или 3 мг/кг, показали сильное истощение Т-клеток в периферической крови или костном мозге, тогда как тимусные Т-клетки вызвали примерно 59% истощение после введения 3 мг/кг анти-CD2-ADC с DAR=2. Для сравнения на фиг.6А-6С также показан уровень истощения Т-клеток после

обработки гуманизированных мышей NSG 3 мг/кг неконъюгированного анти-CD2 антитела или указанного контроля (т.е. 3 мг/кг ADC hIgG1-аманитин(«hIgG1-AMC») или PBS).

**Таблица 4: Краткое описание последовательностей**

| № последовательности | Описание                                                                           | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1         | Ab1 CDR-H1                                                                         | EYYMY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 2         | Ab1 CDR-H2                                                                         | RIDPEDGSIDYVEKFKK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SEQ ID NO: 3         | Ab1 CDR-H3                                                                         | GKFNYRFAY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 4         | Ab1 CDR-L1                                                                         | RSSQSLLHSSGNTYLN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 5         | Ab1 CDR-L2                                                                         | LVSKLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| SEQ ID NO: 6         | Ab1 CDR-L3                                                                         | MQFTHYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 7         | Ab1, Вариабельная область тяжелой цепи                                             | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTE<br>YYMYWVRQAPGQGLELMGRIDPEDGSIDYVE<br>KFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVY<br>YCARGKFNYRFAYWGQGTLLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SEQ ID NO: 8         | Ab1, Вариабельная область легкой цепи                                              | DVVMQTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSS<br>GNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPD<br>RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFT<br>HYPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 9         | Ab1a, Вариабельная область тяжелой цепи                                            | QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCASGYIFTE<br>YYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVE<br>KFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVY<br>YCARGKFNYRFAYWGQGTLLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SEQ ID NO: 10        | Ab1a, Вариабельная область легкой цепи                                             | DVVMQTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSS<br>GNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPD<br>RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFT<br>HYPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 11        | Консенсусная последовательность вариабельной области тяжелой цепи человеческого Ab | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY<br>AMSWVRQAPGKGLEWVAVISENGSDTYAD<br>SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY<br>YCARDRGGAVSFYFDVWGQGTLLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO: 12        | Консенсусная последовательность вариабельной области легкой цепи человеческого Ab  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFGS<br>GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSLPYTF<br>GQGTKVEIKRT                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 13        | Последовательность человеческого CD2                                               | MSFPCKFVAS FLLIFNVSSK GAVSKEITNA<br>LETWGALGQD INLDIPSFQM SDDIDDIKWE<br>KTSKDKKIAQ FRKEKETFKE KDTYKLFKNG<br>TLKIKHLKTD DQDIYKVSIIY DTKGKNVLEK<br>IFDLKIQERV SKPKISWTCI NTTLTCEVMN<br>GTDPELNLYQ DGKHLKLSQR VITHKWTTSL<br>SAKFKCTAGN KVSKESSVEP VSCPEKGLDI<br>YLIIGICGGG SLLMVFVALL VFYITKRKKQ<br>RSRRNDEELE TRAHRVATEE RGRKPHQIPA<br>STPQNPATSQ HPPPPPGHRS QAPSHRPPPP<br>GHRVQHQPQK RPPAPSGTQV HQQKGPPLPR<br>PRVQPKPPHG AAENSLSPSS N |

| № последовательности | Описание                                               | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 14        | RPA-2.10 CDR-H1                                        | GFTFSSY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 15        | RPA-2.10 CDR-H2                                        | SGGGF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 16        | RPA-2.10 CDR-H3 Variant 1                              | SSYGEIMDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 17        | RPA-2.10 CDR-H3 Variant 2                              | SSYGELMDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 18        | RPA-2.10 CDR-L1                                        | RASQRIGTSIH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO: 19        | RPA-2.10 CDR-L2                                        | YASESIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 20        | RPA-2.10 CDR-L3                                        | QQSHGWPFTF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| SEQ ID NO: 21        | RPA-2.10 Heavy chain variable region Variant 1         | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY<br>DMSWVRQTPEKRLEWVASISGGGFLYYLDSV<br>KGRFTISRDNARNILYLHMTSLRSEDAMYYC<br>ARSSYGEIMDYWGQGTSTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 22        | RPA-2.10, Вариабельная область тяжелой цепи, вариант 2 | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY<br>DMSWVRQTPEKRLEWVASISGGGFLYYLDSV<br>KGRFTISRDNARNILYLHMTSLRSEDAMYYC<br>ARSSYGELMDYWGQGTSTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 23        | RPA-2.10, Вариабельная область легкой цепи             | DILLTQSPAILSVPGERVFSFSCRASQRIGTSIH<br>WYQQRTTGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG<br>TDFTLSINSVESEDVADYYCQQSHGWPFTFGG<br>GTKLEIE                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 24        | RPA-2.10, Константная область тяжелой цепи             | AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG<br>YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT<br>LSSSVTVPSSTWVPSSETVTCNVAPASSTKVDK<br>KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL<br>ITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEV<br>HTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNG<br>KEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVY<br>TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQ<br>WNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQ<br>KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP<br>GK |
| SEQ ID NO: 25        | RPA-2.10 Константная область легкой цепи               | RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY<br>PKDINVVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS<br>TYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTS<br>PIVKSFNRNEC                                                                                                                                                                                                                                                   |

#### Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание в виде ссылки в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения в виде ссылки.

Хотя изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, следует понимать, что возможна его дальнейшая модификация, и настоящая заявка

предназначена для охвата любых вариантов, применений или адаптаций изобретения в соответствии с общими принципами изобретения, включая отступления от изобретения, которые входят в известную или общепринятую практику в области техники, к которой относится изобретение и применимы к существенным признакам, изложенным выше, и следуют из объема формулы изобретения.

Приведенная ниже формула изобретения также охватывает и другие варианты осуществления.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

2. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

3. Способ предотвращения отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом-человеком трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

4. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

5. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

6. Способ, включающий:

i) введение пациенту-человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2 в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином; и

ii) последующее введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется клеточной линией гибридомы ATCC HB 11423.

8. Способ по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор CDR вариабельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR вариабельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела LO-CD2A, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 11423.

9. Способ по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент представляет собой

i) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 3; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 5; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 6;

ii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 14; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 15; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 16 или 17; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 18; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 19; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 20;

iii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8;

iv) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10; или

v) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 21 или 22, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23.

10. Способ по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по п.9.

11. Способ по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают 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 его антигенсвязывающего фрагмента, интактного антитела, двойного переменного домена иммуноглобулина, молекулы одноцепочечного Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv.

12. Способ по любому из пп.1-10, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

14. Способ по п.13, в котором изотип IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

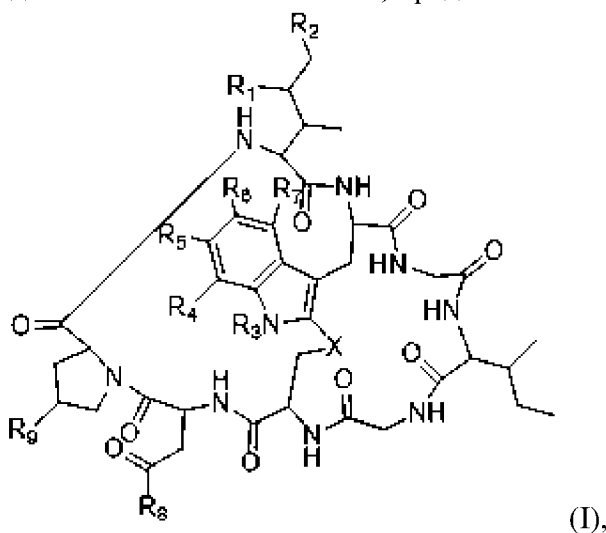
15. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина A *Pseudomonas*, деБуганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина или их вариантов.

16. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

17. Способ по п.16, в котором ингибитор РНК-полимеразы представляет собой ингибитор РНК-полимеразы II.

18. Способ по п.17, в котором ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой аматоксин.

19. Способ по любому из пп.1-14, в котором 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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

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

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

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

$R_C$  представляет собой -L-Z;

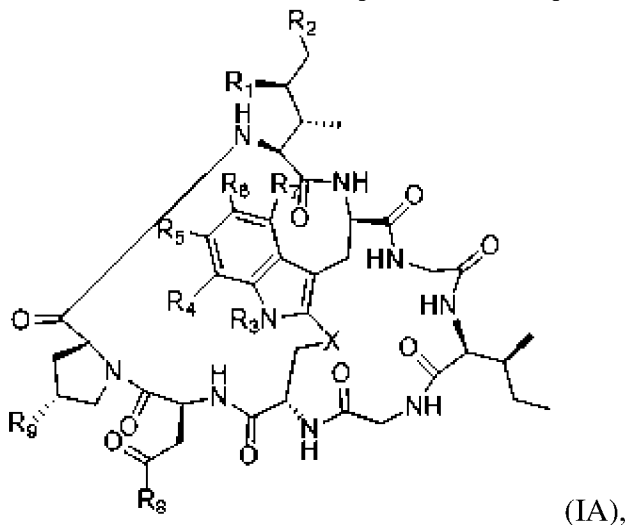
$R_D$  представляет собой optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкил, optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкинил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинил, optionally 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 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем  $Am$  содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

20. Способ по п.19, в котором  $Am-L-Z$  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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием optionally замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой  $H$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_8$  представляет собой  $OH$ ,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

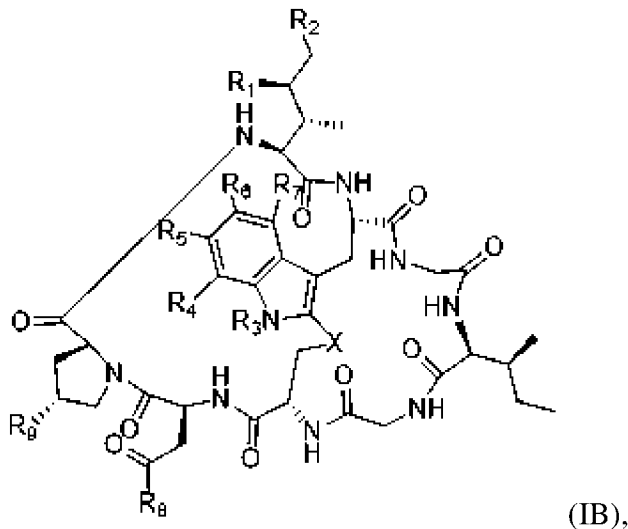
R<sub>D</sub> представляет собой optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, optionally замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, optionally замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкинил, optionally замещенный циклоалкил, optionally замещенный гетероциклоалкил, optionally замещенный арил или optionally 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем Am содержит ровно один R<sub>C</sub> заместитель.

21. Способ по п.19, в котором 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>, если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием optionally замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

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

каждый из R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

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

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

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

$R_C$  представляет собой  $-L-Z$ ;

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

$L$  представляет собой необязательно замещенный  $C_1-C_6$  алкилен, необязательно замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкинилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

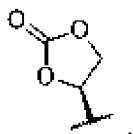
причем  $Am$  содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

22. Способ по п.20 или п.21, в котором  $R_A$  и  $R_B$  объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



где  $Y$  представляет собой  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NR_E)-$  или  $-C(R_ER_{E'})-$ ; и каждый из  $R_E$  и  $R_{E'}$  независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1-C_6$  алкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный циклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный гетероциклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный арилен- $R_C$  или необязательно замещенный гетероарилен- $R_C$ .

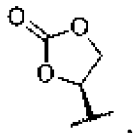
23. Способ по п.22, в котором  $R_A$  и  $R_B$  объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



24. Способ по п.20 или п.21, в котором  $R_1$  представляет собой H, OH или  $OR_A$ ;

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

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



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

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

25. Способ по п.20 или п.21, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

26. Способ по п.20 или п.21, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

27. Способ по п.20 или п.21, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

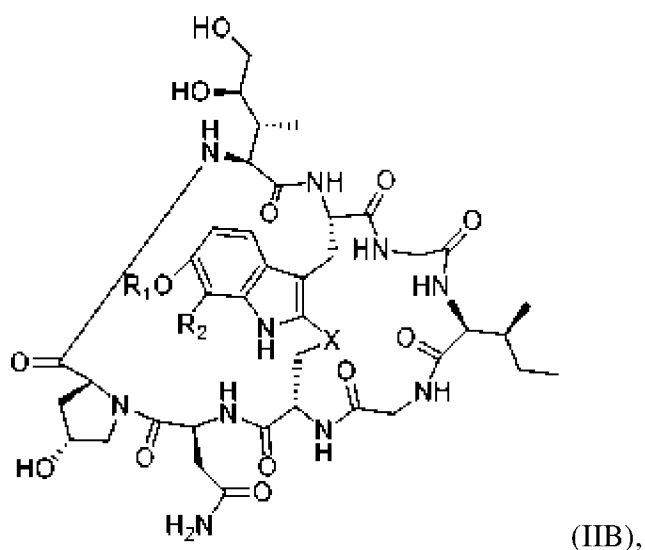
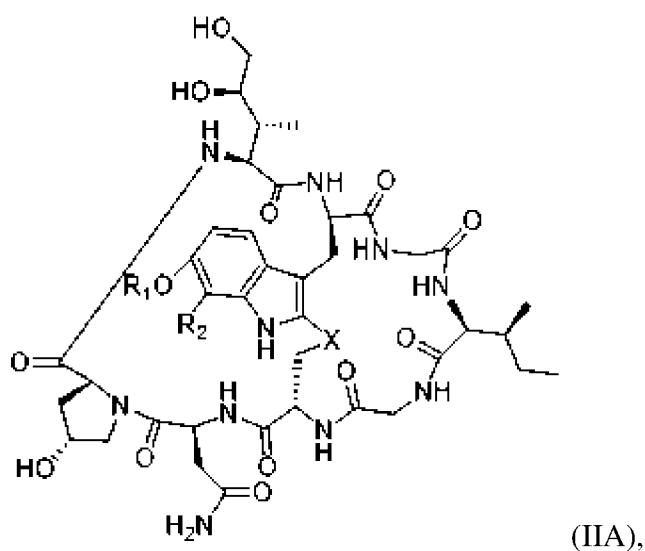
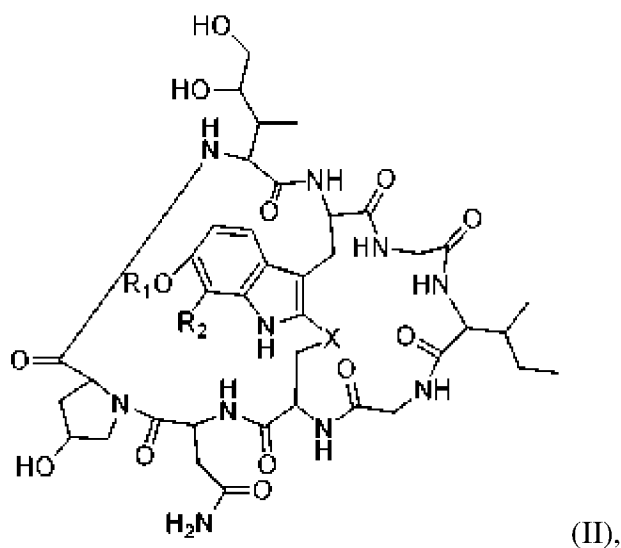
каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;

$R_8$  представляет собой  $OR_C$  или  $NHR_C$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

28. Способ по любому из пп.1-14, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено 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, и конъюгат аматоксин-линкер  $Am-L-Z$  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 на

антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

$R_2$  представляет собой Н 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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте;

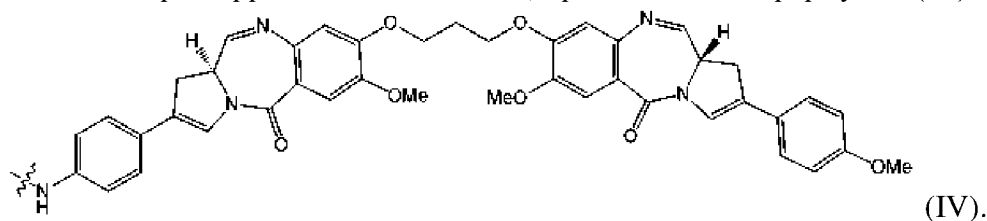
причем если  $R_1$  представляет собой Н, то  $R_2$  представляет собой линкер, и если  $R_2$  представляет собой Н, то  $R_1$  представляет собой линкер.

29. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин представляет собой мейтансиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

30. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин представляет собой ауристатин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина Е и монометилауристатина F.

31. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

32. Способ по любому из пп.1-14, в котором цитотоксин представляет собой производное димера пирролобензодиазепина, представленное формулой (IV)



33. Способ по любому из пп.1-32, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, интернализуется в иммунной клетке после введения пациенту.

34. Способ по любому из пп.1-33, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно стимулировать некроз иммунной клетки.

35. Способ по любому из пп.1-34, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, способно рекрутировать один или более белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

36. Способ по любому из пп.33-35, в котором иммунную клетку выбирают из группы, состоящей из Т-клетки и NK-клетки.

37. Способ по любому из пп.3-35, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированное с цитотоксином, была практически элиминирована из крови пациента.

38. Способ по п.37, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические

стволовые клетки, вводят пациенту через от 1 часа до 7 дней после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированное с цитотоксином, была практически элиминирована из крови пациента.

39. Способ по п.37, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через от 6 часов до 3 дней после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированное с цитотоксином, была практически элиминирована из крови пациента.

40. Способ по п.37, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через от примерно 12 часов до примерно 36 часов после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированное с цитотоксином, была практически элиминирована из крови пациента.

41. Способ по п.37, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту примерно через 24 часа после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированное с цитотоксином, была практически элиминирована из крови пациента.

42. Способ по любому из пп.3-35, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональную эффективность гемопоэтических стволовых клеток примерно через два или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

43. Способ по любому из пп.3-42, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

44. Способ по любому из пп.3-42, где гемопоэтические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

45. Способ по п.44, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются HLA-совместимыми с пациентом.

46. Способ по п.44, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми с пациентом.

47. Способ по любому из пп.1, 2 и 4-36, в котором популяция CD2+ клеток включает Т-клетки.

48. Способ по любому из пп.3-47, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливать кроветворение после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

49. Способ по любому из пп.3-48, в котором после трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки стимулируют 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.

50. Способ по любому из пп.1-49, в котором пациент страдает от нарушения стволовых клеток.

51. Способ по любому из пп.1-49, в котором пациент страдает от гемоглобинопатии.

52. Способ по п.51, в котором гемоглобинопатию выбирают из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии и синдрома Вискотта-Олдрича.

53. Способ по п.51, в котором гемоглобинопатия представляет собой анемию Фанкони.

54. Способ по п.51, в котором гемоглобинопатия представляет собой апластическую анемию.

55. Способ по п.51, в котором гемоглобинопатия представляет собой серповидноклеточную анемию.

56. Способ по п.51, в котором гемоглобинопатия представляет собой талассемию.

57. Способ по любому из пп.1-49, в котором пациент страдает от миелодиспластического расстройства.

58. Способ по любому из пп.1-49, в котором пациент страдает от иммунодефицитного состояния.

59. Способ по п.58, в котором иммунодефицитное состояние является врожденным иммунодефицитом.

60. Способ по п.58, в котором иммунодефицитное состояние является приобретенным иммунодефицитом.

61. Способ по п.60, в котором приобретенный иммунодефицит вызван вирусом иммунодефицита человека или представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита.

62. Способ по любому из пп.1-49, в котором пациент страдает от нарушения обмена веществ.

63. Способ по п.62, в котором нарушение обмена веществ выбирают из группы состоящий из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метахроматической лейкодиетрофии.

64. Способ по любому из пп.1-63, в котором пациент страдает от рака.

65. Способ по п.64, в котором рак выбирают из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

66. Способ по п.64, в котором рак представляет собой гематологический рак.

67. Способ по п.64, в котором рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

68. Способ по п.64, в котором рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

69. Способ по п.64, в котором рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

70. Способ по п.64, в котором рак представляет собой хронический лимфобластный

лейкоз.

71. Способ по п.64, в котором рак представляет собой множественную миелому.

72. Способ по п.64, в котором рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

73. Способ по п.64, в котором рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

74. Способ по любому из пп.1-73, в котором пациент страдает от расстройства, выбранного из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы, синдрома гипериммуноглобулина М, синдрома Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней депонирования, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза и ювенильного ревматоидного артрита.

75. Способ по любому из пп.1-74, в котором пациент страдает от аутоиммунного расстройства.

76. Способ по п.75, в котором аутоиммунного расстройства выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, сахарного диабета типа 1, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунной болезни внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости с иммунной дисфункцией, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, герпетического дерматита, ассоциированного с глютеновой энтеропатией, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, дисавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA-нейропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, синдрома опсоклонус-миоклонус, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, пузырьчатки обыкновенной, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узлового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома неподвижного человека, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго,

вульводинии и гранулематоза Вегенера.

77. Способ по п.75, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

78. Способ по п.75, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

79. Способ по п.75, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

80. Способ по п.75, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.

81. Способ по п.75, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой диабет типа 1.

82. Способ по любому из пп.50-81, где способ лечит расстройство или рак.

83. Способ лечения нарушения стволовых клеток у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

84. Способ лечения гемоглобинопатии у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

85. Способ по п.84, в котором гемоглобинопатию выбирают из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии и синдрома Вискотта-Олдрича.

86. Способ по п.84, в котором гемоглобинопатия представляет собой анемию Фанкони.

87. Способ по п.84, в котором гемоглобинопатия представляет собой апластическую анемию.

88. Способ по п.84, в котором гемоглобинопатия представляет собой серповидноклеточную анемию.

89. Способ по п.84, в котором гемоглобинопатия представляет собой талассемию.

90. Способ лечения миелодиспластического расстройства у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгировано с цитотоксином.

91. Способ лечения иммунодефицитного состояния у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

92. Способ по п.91, в котором иммунодефицитное состояние является врожденным иммунодефицитом.

93. Способ по п.91, в котором иммунодефицитное состояние является приобретенным иммунодефицитом.

94. Способ по п.93, в котором приобретенный иммунодефицит вызван вирусом иммунодефицита человека или представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита.

95. Способ лечения нарушения обмена веществ у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгировано с цитотоксином.

96. Способ по п.95, в котором нарушение обмена веществ выбирают из группы состоящий из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метакроматической лейкодиетрофии.

97. Способ лечения рака у пациента-человека, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгировано с цитотоксином.

98. Способ по п.97, в котором рак выбирают из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

99. Способ по п.97, в котором рак представляет собой гематологический рак.

100. Способ по п.97, в котором рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

101. Способ по п.97, в котором рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

102. Способ по п.97, в котором рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

103. Способ по п.97, в котором рак представляет собой хронический лимфобластный лейкоз.

104. Способ по п.97, в котором рак представляет собой множественную миелому.

105. Способ по п.97, в котором рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

106. Способ по п.97, в котором рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

107. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы, синдрома гипериммуноглобулина М, синдрома Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней депонирования, большой талассемии, рассеянного склероза, системной красной волчанки и ювенильного ревматоидного артрита, причем способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

108. Способ лечения аутоиммунного расстройства у пациента-человека,

включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксином.

109. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, сахарного диабета типа 1, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунной болезни внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости с иммунной дисфункцией, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, герпетического дерматита, ассоциированного с глютенной энтеропатией, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, дисавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA-нейропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромииотонии, синдрома опсоклонус-миоклонус, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, пузырчатки обыкновенной, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узлового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома неподвижного человека, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

110. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

111. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

112. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

113. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.

114. Способ по п.108, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой диабет типа 1.

115. Способ по любому из пп.83-114, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется клеточной линией гибридомы ATCC HB 11423.

116. Способ по любому из пп.83-114, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

i) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 3; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 5; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 6;

ii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 14; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 15; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 16 или 17; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 18; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 19; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 20;

iii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8;

iv) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10; или

v) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 21 или 22, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23.

117. Способ лечения по любому из пп.83-114, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, приведенным в п.116.

118. Способ по пп.83-117, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, гуманизированного антитела, биспецифического антитела, двойного переменного домена иммуноглобулина, молекулы одноцепочечного Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv.

119. Способ по пп.83-117, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

120. Способ по любому из пп.83-119, в котором антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

121. Способ по п.120, в котором изотип IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

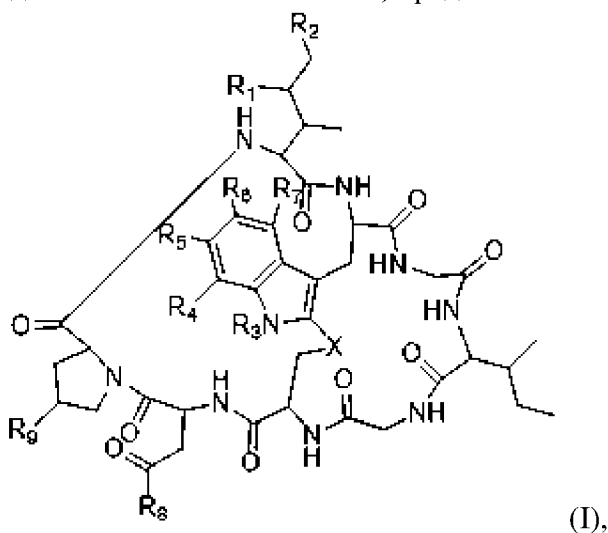
122. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина A *Pseudomonas*, деБуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармцина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина или их вариантов.

123. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

124. Способ по п.123, в котором ингибитор РНК-полимеразы представляет собой ингибитор РНК-полимеразы II.

125. Способ по п.124, в котором ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой аматоксин.

126. Способ по любому из пп.83-117, в котором 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)



(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>, если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

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

каждый из R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо 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;

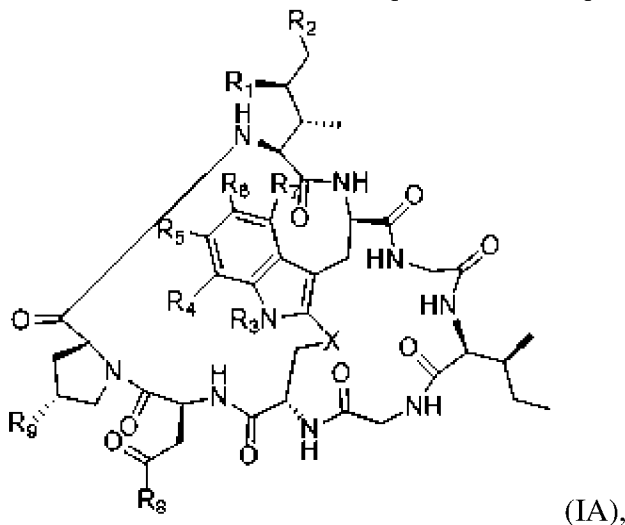
$R_D$  представляет собой optionally замещенный  $C_1-C_6$  алкил, optionally замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  алкинил, optionally замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинил, optionally 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 или 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем  $Am$  содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

127. Способ по п.126, в котором  $Am-Z-L$  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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием optionally замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой  $H$ ,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_8$  представляет собой  $OH$ ,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

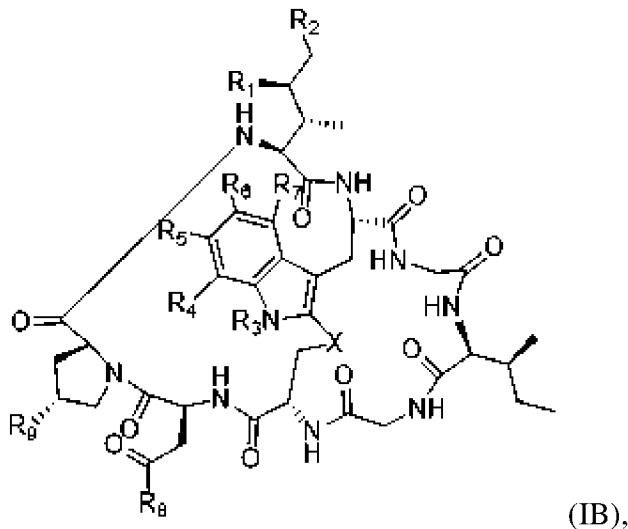
R<sub>D</sub> представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем Am содержит ровно один R<sub>C</sub> заместитель.

128. Способ по п.126, в котором 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>, если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

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

каждый из R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо представляет собой H, OH, OR<sub>C</sub>, OR<sub>D</sub>, R<sub>C</sub> или R<sub>D</sub>;

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

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

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

$R_C$  представляет собой  $-\text{L}-\text{Z}$ ;

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

$L$  представляет собой необязательно замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкилен, необязательно замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_6$  гетероалкилен, необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкенилен, необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  гетероалкенилен, необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкинилен, необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дипептид,  $-\text{C}(=\text{O})-$ , 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

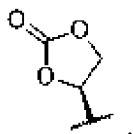
причем  $\text{Am}$  содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

129. Способ по п.127 или п.128, в котором  $R_A$  и  $R_B$  объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием 5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:



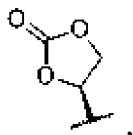
где  $Y$  представляет собой  $-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}_E)-$  или  $-\text{C}(\text{R}_E\text{R}_{E'})-$ ; и каждый из  $R_E$  и  $R_{E'}$  независимо представляет собой необязательно замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_6$  гетероалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  гетероалкенилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_6$  гетероалкинилен- $R_C$ , необязательно замещенный циклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный гетероциклоалкилен- $R_C$ , необязательно замещенный арилен- $R_C$  или необязательно замещенный гетероарилен- $R_C$ .

130. Способ по п.129, в котором  $R_A$  и  $R_B$  объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



131. Способ по п.127 или п.128, в котором  $R_1$  представляет собой H, OH или  $OR_A$ ;  $R_2$  представляет собой H, OH или  $OR_B$ ;

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



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

$R_5$  представляет собой  $OR_C$ ;

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

132. Способ по п.127 или п.128, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

133. Способ по п.127 или п.128, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

134. Способ по п.127 или п.128, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

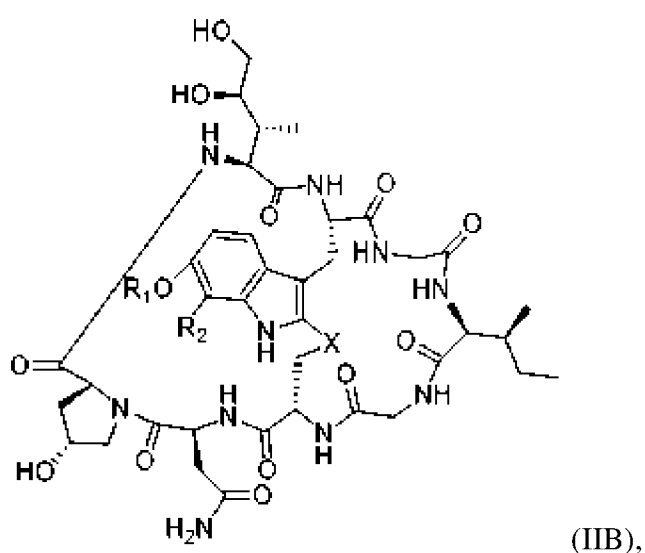
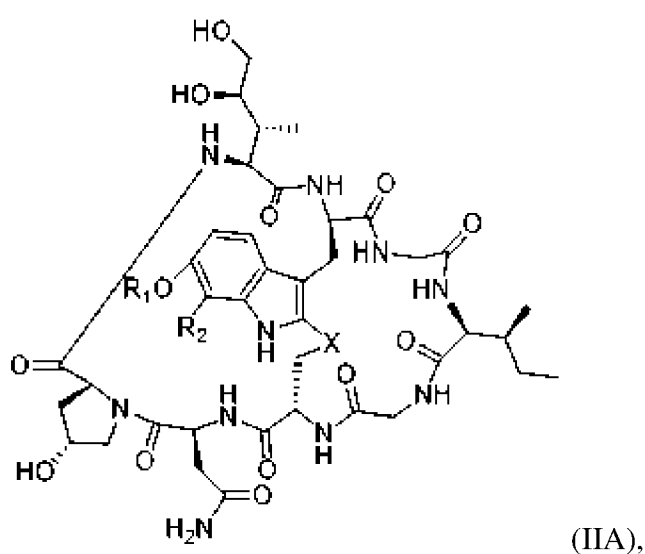
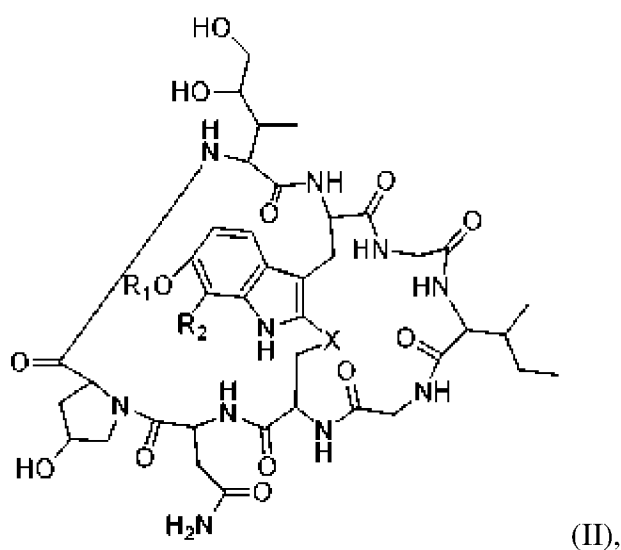
каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;

$R_8$  представляет собой  $OR_C$  или  $NHR_C$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

135. Способ по любому из пп.83-117, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено 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, и конъюгат аматоксин-линкер  $Am-L-Z$  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 на

антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

$R_2$  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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте;

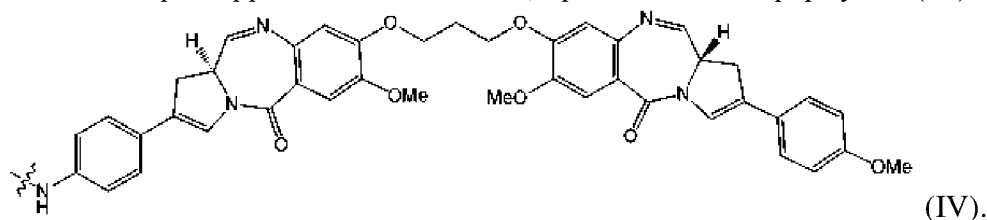
причем если  $R_1$  представляет собой H, то  $R_2$  представляет собой линкер, и если  $R_2$  представляет собой H, то  $R_1$  представляет собой линкер.

136. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин представляет собой мейтансиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

137. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин представляет собой ауристатин - монометиладельтатин E или монометиладельтатин F.

138. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубидина, доксорубидина, эпирубидина и идарубидина.

139. Способ по любому из пп.83-117, в котором цитотоксин представляет собой производное димера пирролобензодиазепина, представленное формулой (IV)



140. Конъюгат, представленный формулой Ab-Z-L-Cy, в котором Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD2, Z представляет собой химический фрагмент, L представляет собой линкер, и Cy представляет собой цитотоксин, где цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина A *Pseudomonas*, деБуганина, дифтерийного токсина, аматоксина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина или их вариантов.

141. Конъюгат по п.140, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется клеточной линией гибридомы ATCC HB 11423.

142. Конъюгат по п.140, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

vi) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 3; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 5; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 6;

vii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 14; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 15; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 16 или 17; и содержащее переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 18; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 19; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 20;

viii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8;

ix) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10; или

x) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 21 или 22, и содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23.

143. Конъюгат по п.140, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по п.142.

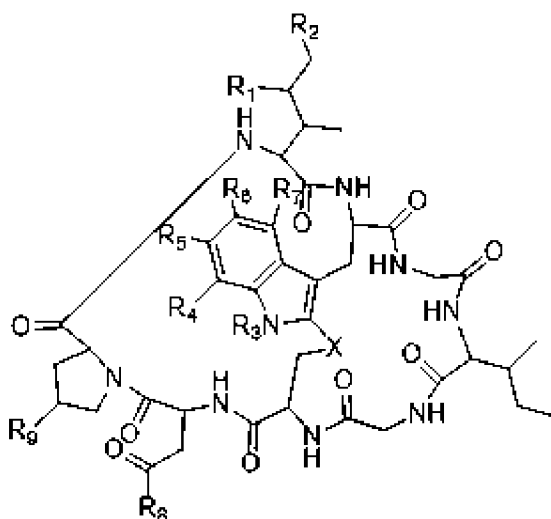
144. Конъюгат по любому из пп.140-143, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, гуманизированного антитела, биспецифического антитела, двойного переменного домена иммуноглобулина, молекулы одноцепочечного Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv.

145. Конъюгат по любому из пп.140-143, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

146. Конъюгат по любому из пп.140-145, в котором антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

147. Конъюгат по п.146, в котором IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

148. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором C<sub>у</sub> представляет собой аматоксин (Am), представленный формулой (I)



(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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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;

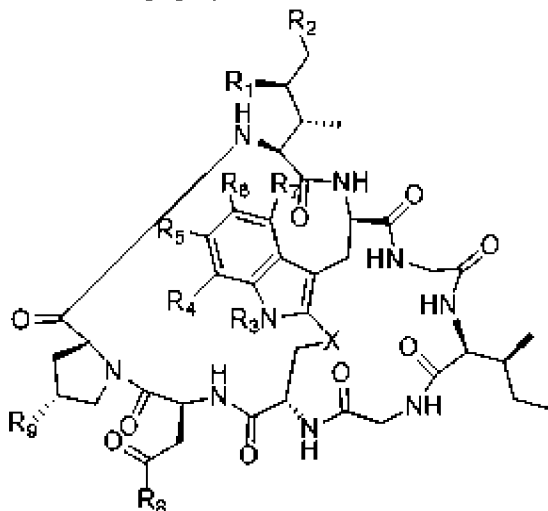
$R_D$  представляет собой необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, необязательно замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкенил, необязательно замещенный 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 на антигене или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем Am содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

149. Конъюгат по п.148, в котором Am представляет собой аматоксин, представленный формулой (IA):



(IA),

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

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

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

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

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

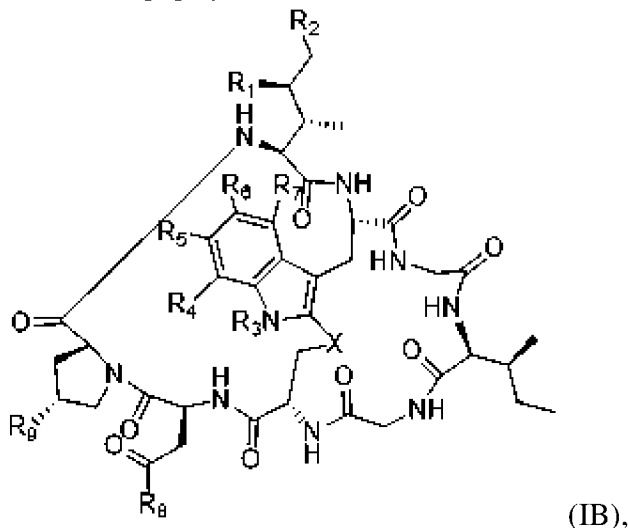
$L$  представляет собой необязательно замещенный  $C_1-C_6$  алкилен, необязательно замещенный  $C_1-C_6$  гетероалкилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкенилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкенилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  алкинилен, необязательно замещенный  $C_2-C_6$  гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, 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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

причем Am содержит ровно один  $R_C$  заместитель.

150. Конъюгат по п.148, в котором Am представляет собой аматоксин, представленный 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  $R_B$ , если присутствуют, объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;

$R_3$  представляет собой H,  $R_C$  или  $R_D$ ;

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

$R_8$  представляет собой OH,  $NH_2$ ,  $OR_C$ ,  $OR_D$ ,  $NHR_C$  или  $NR_C R_D$ ;

$R_9$  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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

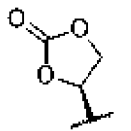
причем Am содержит ровно один R<sub>C</sub> заместитель.

151. Конъюгат по п.149 или п.150, в котором R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub> объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, 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 каждый из R<sub>E</sub> и R<sub>E'</sub> независимо представляет собой 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>.

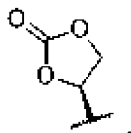
152. Конъюгат по п.151, в котором R<sub>A</sub> и R<sub>B</sub> объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



153. Конъюгат по п.149 или п.150, в котором 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> объединены вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, с образованием:



каждый из R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> представляет собой 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.

154. Конъюгат по п.149 или п.150, в котором каждый из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо

представляет собой H или OH;

$R_3$  представляет собой  $R_C$ ;

каждый из  $R_4$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

155. Конъюгат по п.149 или п.150, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

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

$R_8$  представляет собой OH или  $NH_2$ ; и

$R_9$  представляет собой H или OH.

156. Конъюгат по п.149 или п.150, в котором каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляет собой H или OH;

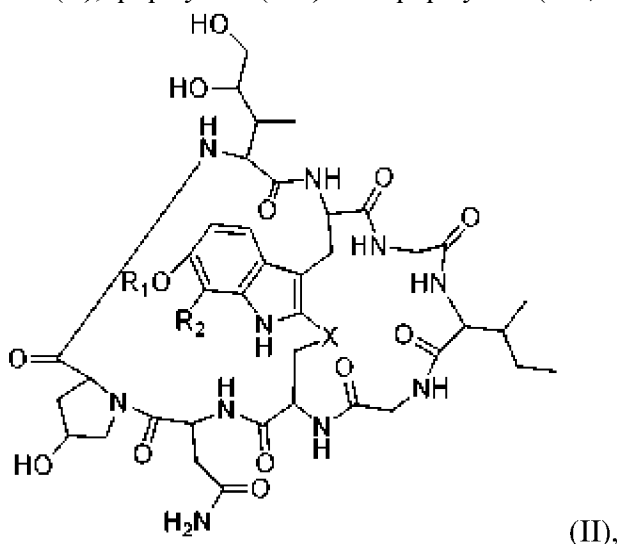
каждый из  $R_3$ ,  $R_6$  и  $R_7$  представляет собой H;

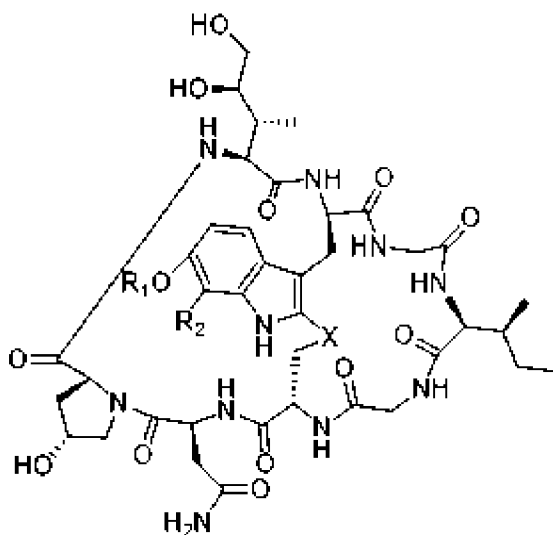
каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или OH;

$R_8$  представляет собой  $OR_C$  или  $NHR_C$ ; и

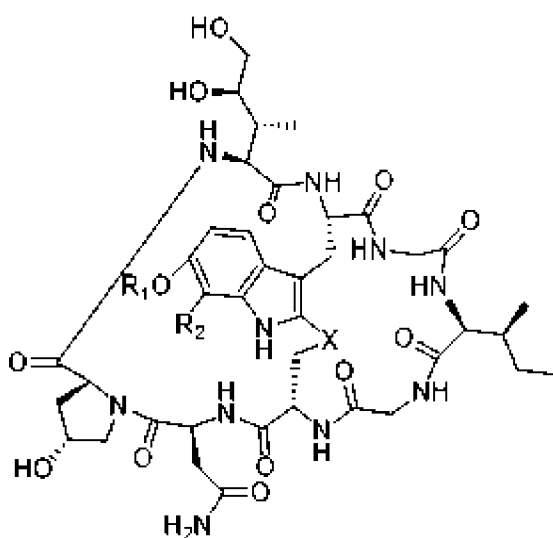
$R_9$  представляет собой H или OH.

157. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с цитотоксином, представлено 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, и конъюгат аматоксин-линкер  $Am-L-Z$  представлен формулой (II), формулой (IIA) или формулой (IIB):





(IIA),



(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 на 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 на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте;

причем если R<sub>1</sub> представляет собой H, то R<sub>2</sub> представляет собой линкер, и если R<sub>2</sub> представляет собой H, то R<sub>1</sub> представляет собой линкер.

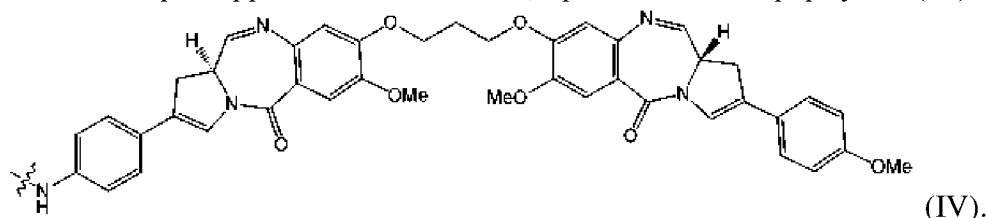
158. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором цитотоксин представляет собой мейтансиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4.

159. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором Су представляет собой ауристатин.

160. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором ауристатин представляет собой монометилауристатин Е или монометилауристатин F.

161. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

162. Конъюгат по любому из пп.140-146, в котором цитотоксин представляет собой производное димера пирролобензодиазепина, представленное формулой (IV)



163. Способ по любому из пп.140-146, в котором Су представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

164. Способ по п.163, в котором ингибитор РНК-полимеразы представляет собой ингибитор РНК-полимеразы II.

165. Способ по п.164, в котором ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой аматоксин.

166. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.140-165 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

167. Фармацевтическая композиция по п.166, где фармацевтическая композиция составлена для трансдермального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутриопухолевого, парентерального, интратекального или интрацеребровентрикулярного введения пациенту-человеку.

168. Фармацевтическая композиция по п.166, где фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения пациенту-человеку.

169. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

170. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

171. Способ предотвращения отторжения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток у человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом-человеком трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

172. Способ истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение

пациенту эффективного количества анти-CD2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до получения пациентом трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

173. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, в котором пациенту ранее вводили анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента.

174. Способ, включающий:

а. введение пациенту-человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD2 в количестве, достаточном для истощения популяции CD2<sup>+</sup> клеток у пациента; и

б. последующее введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

175. Способ по любому из пп.169-174, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется клеточной линией гибридомы ATCC HB 11423.

176. Способ по любому из пп.169-174, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор CDR варибельной области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) и набор CDR варибельной области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела LO-CD2A, продуцируемого клеточной линией гибридомы, депонированной под номером ATCC № HB 11423.

177. Способ по любому из пп.169-174, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой:

i) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 1; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 2; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 3; и содержащее варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 4; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 5; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 6;

ii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, приведенную в SEQ ID NO: 14; CDR-H2, приведенную в SEQ ID NO: 15; CDR-H3, приведенную в SEQ ID NO: 16 или 17; и содержащее варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, приведенную в SEQ ID NO: 18; CDR-L2, приведенную в SEQ ID NO: 19; и CDR-L3, приведенную в SEQ ID NO: 20;

iii) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее варибельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7, и содержащее варибельную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8;

iv) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее варибельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 9, и содержащее

вариабельную область легкой цепи, кприведенную в SEQ ID NO: 10; или

v) анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 21 или 22, и содержащее вариабельную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 23.

178. Способ по любому из пп.169-174, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание CD2 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по п.177.

179. Способ по любому из пп.169-178, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают 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 его антигенсвязывающего фрагмента, интактного антитела, двойного вариабельного домена иммуноглобулина, молекулы одноцепочечного Fv (scFv), диатела, триатела, нанотела, антителоподобного белкового каркаса, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, молекулы F(ab')<sub>2</sub> и тандема ди-scFv.

180. Способ по любому из пп.169-179, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

181. Способ по любому из пп.169-180, в котором антитело имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.

182. Способ по любому из пп.169-181, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент интернализуется в иммунной клетке после введения пациенту.

183. Способ по любому из пп.169-182, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно вызывать некроз иммунной клетки.

184. Способ по любому из пп.169-183, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно рекрутировать один или более белков комплемента в иммунную клетку при введении пациенту.

185. Способ по любому из пп.182-184, в котором иммунную клетку выбирают из группы, состоящей из Т-клетки и NK-клетки.

186. Способ по любому из пп.171-174, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента была практически элиминирована из крови пациента.

187. Способ по п.186, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через от 1 часа до 7 дней после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента была практически элиминирована из крови пациента.

188. Способ по п.186, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические

стволовые клетки, вводят пациенту через от 6 часов до 3 дней после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента была практически элиминирована из крови пациента.

189. Способ по п.186, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через от 12 часов до 36 часов после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента была практически элиминирована из крови пациента.

190. Способ по п.186, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту через 24 часа после того, как концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента была практически элиминирована из крови пациента.

191. Способ по любому из пп.171-174, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняет функциональную эффективность гемопоэтических стволовых клеток через два или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

192. Способ по любому из пп.169-174, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

193. Способ по любому из пп.169-174, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются аллогенными по отношению к пациенту.

194. Способ по п.193, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются HLA-совместимыми с пациентом.

195. Способ по п.193, в котором гемопоэтические стволовые клетки являются HLA-несовместимыми с пациентом.

196. Способ по любому из пп.169-174, в котором популяция CD2<sup>+</sup> клеток включает Т-клетки.

197. Способ по любому из пп.169-174, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливать кроветворение после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

198. Способ по любому из пп.169-174, в котором после трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки стимулируют 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.

199. Способ по любому из пп.169-198, в котором пациент страдает от нарушения стволовых клеток.

200. Способ по любому из пп.169-199, в котором пациент страдает от гемоглобинопатии.

201. Способ по п.200, в котором гемоглобинопатию выбирают из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии и синдрома Вискотта-Олдрича.

202. Способ по п.200, в котором гемоглобинопатию выбирают из группы, состоящей из анемии Фанкони, апластической анемии, серповидноклеточной анемии и талассемии.

203. Способ по любому из пп.169-174, в котором пациент страдает от миелодиспластического расстройства или иммунодефицитного состояния.

204. Способ по п.203, в котором иммунодефицитное состояние является врожденным или приобретенным иммунодефицитом.

205. Способ по п.204, в котором приобретенный иммунодефицит вызван вирусом иммунодефицита человека или представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита.

206. Способ по любому из пп.169-205, в котором пациент страдает от нарушения обмена веществ.

207. Способ по п.206, в котором нарушение обмена веществ выбирают из группы состоящий из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, синдрома Гурлера, сфинголипидозов и метахроматической лейкодиетрофии.

208. Способ по любому из пп.169-207, в котором пациент страдает от рака.

209. Способ по п.208, в котором рак выбирают из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

210. Способ по п.208, в котором рак представляет собой гематологический рак.

211. Способ по п.208, в котором рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

212. Способ по п.208, в котором рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

213. Способ по п.208, в котором рак представляет собой хронический миелоидный лейкоз.

214. Способ по п.208, в котором рак представляет собой хронический лимфобластный лейкоз.

215. Способ по п.208, в котором рак представляет собой множественную миелому.

216. Способ по п.208, в котором рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

217. Способ по п.208, в котором рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

218. Способ по любому из пп.169-174, в котором пациент страдает от расстройства, выбранного из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы, синдрома гипериммуноглобулина М, синдрома Чедиака-Хигаси, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней депонирования, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза и ювенильного

ревматоидного артрита.

219. Способ по любому из пп.169-174, в котором пациент страдает от аутоиммунного расстройства.

220. Способ по любому из п.219, в котором аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, сахарного диабета типа 1, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунной болезни внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости с иммунной дисфункцией, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, герпетиформного дерматита, ассоциированного с глютенной энтеропатией, синдрома холодовой агглютинации, CREST-синдрома, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, дизавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA-нейропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромииотонии, синдрома опсоклонус-миоклонус, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, пузырчатки обыкновенной, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узлового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома неподвижного человека, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

221. Способ по п.219, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой склеродермию.

222. Способ по п.219, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.

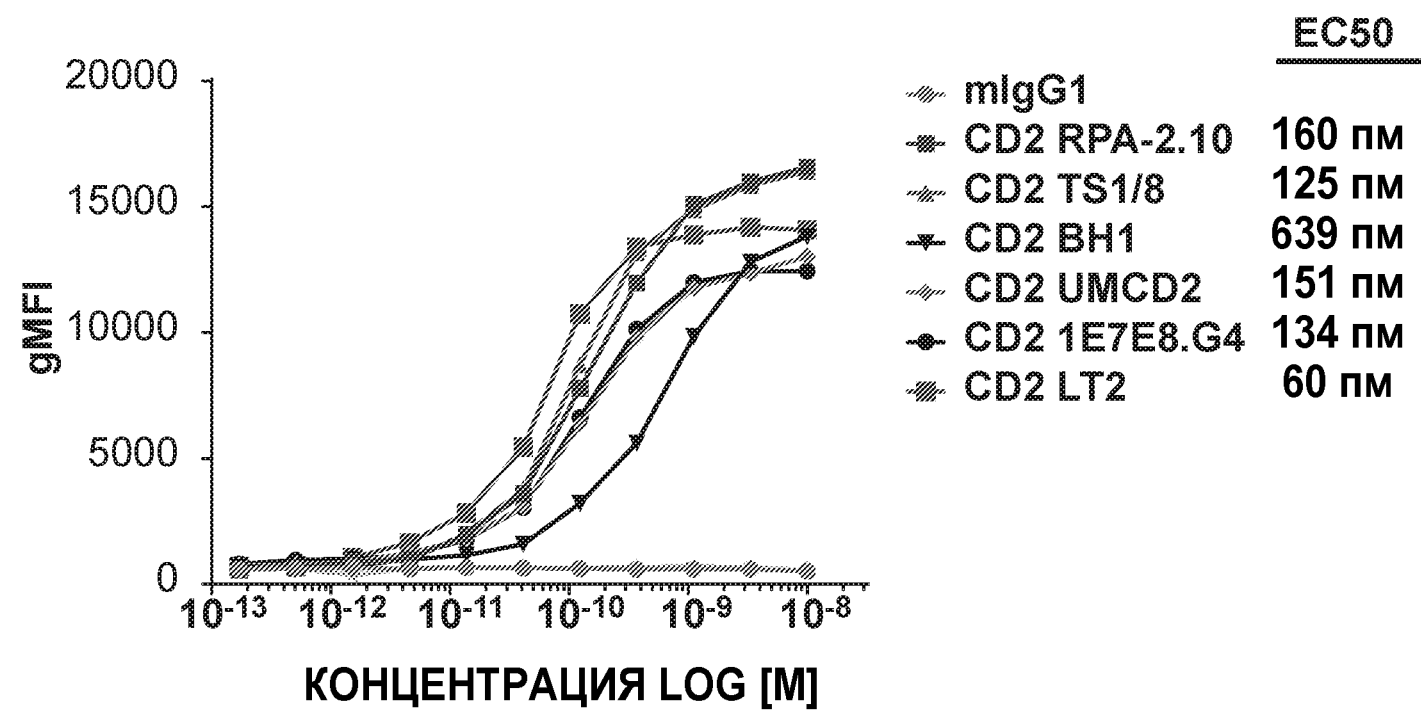
223. Способ по п.219, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой язвенный колит.

224. Способ по п.219, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.

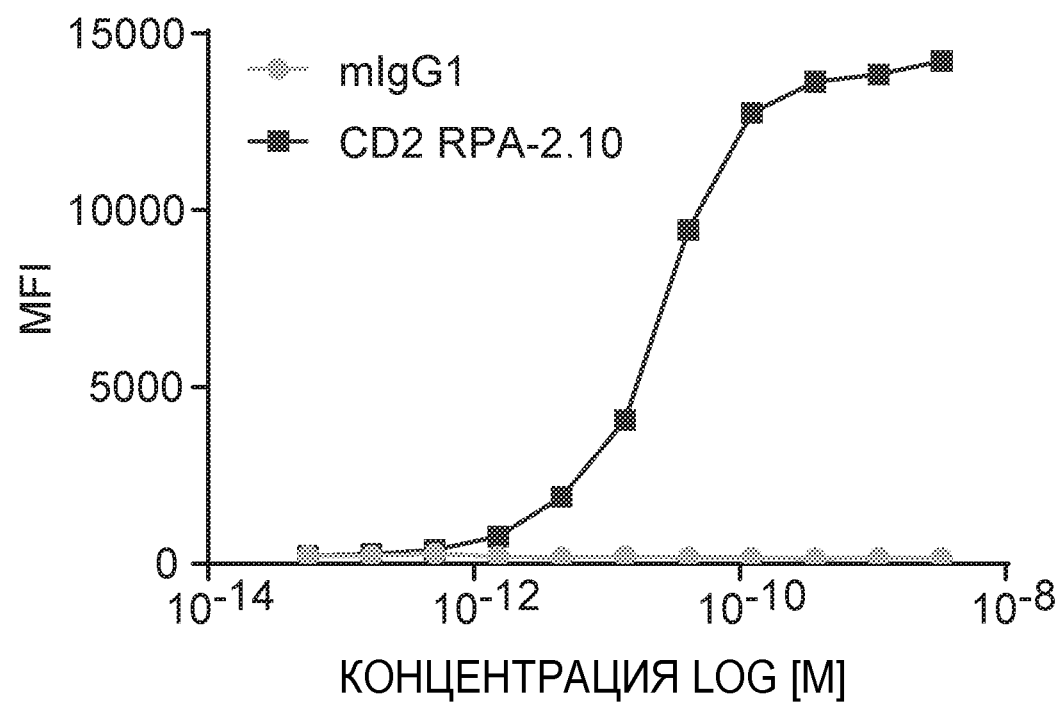
225. Способ по п.219, в котором аутоиммунное расстройство представляет собой диабет типа 1.

226. Способ по любому из пп.169-174, где способ лечит расстройство или рак.

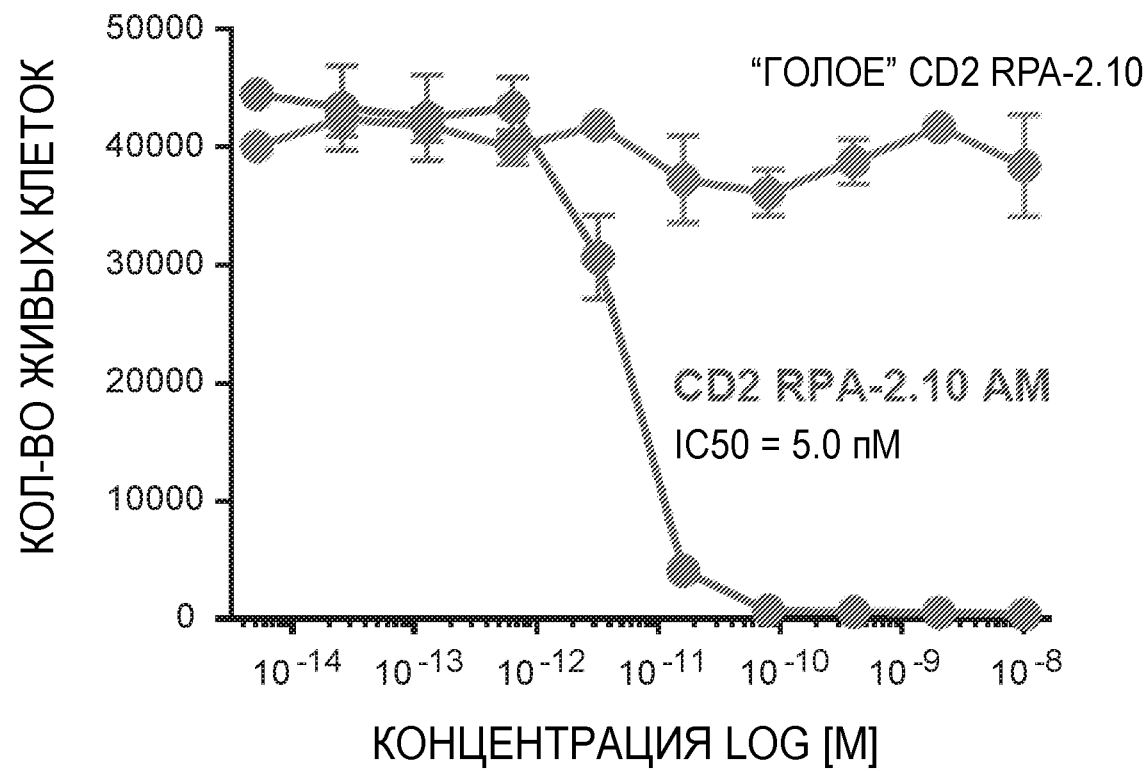
ФИГ.1



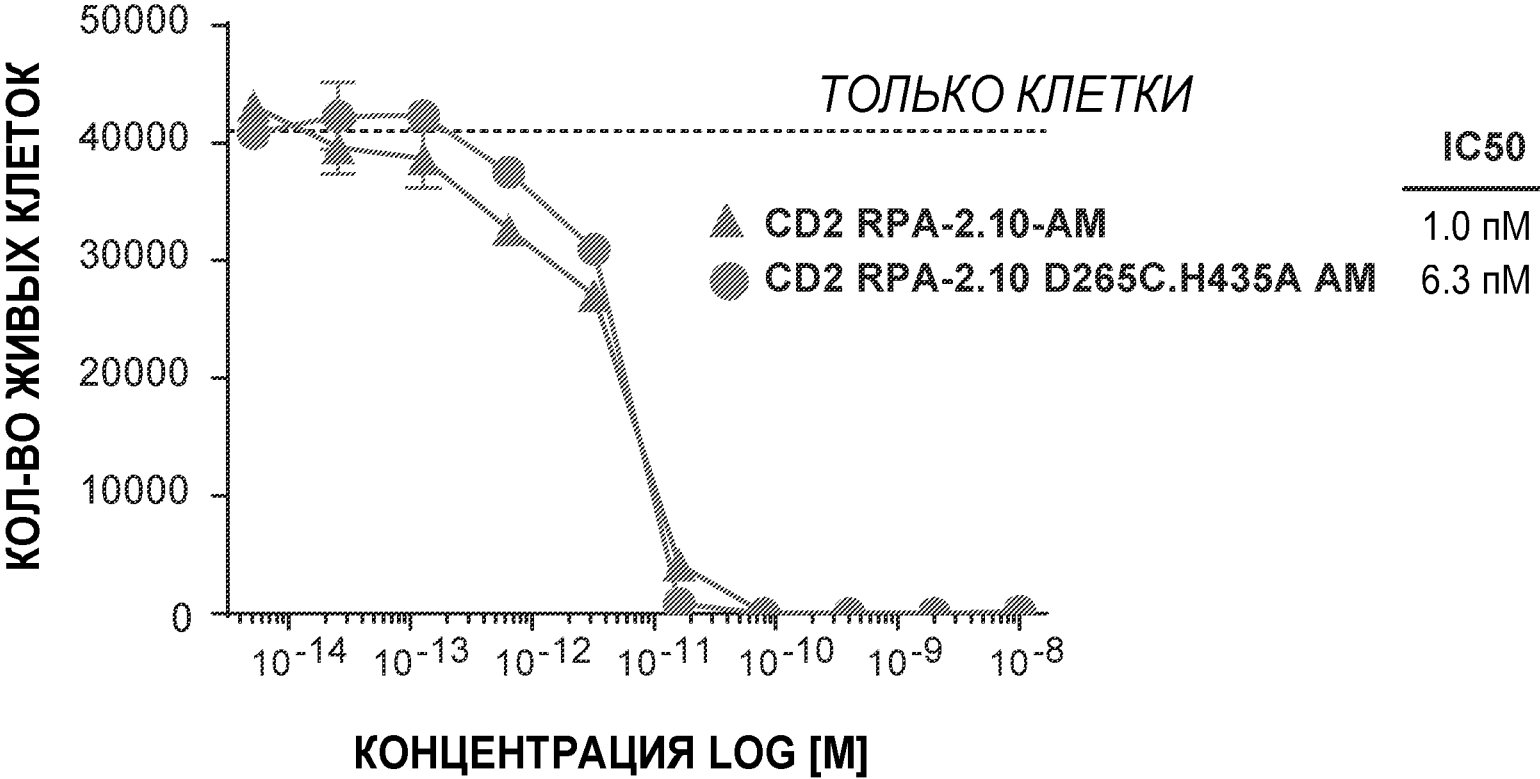
ФИГ.2



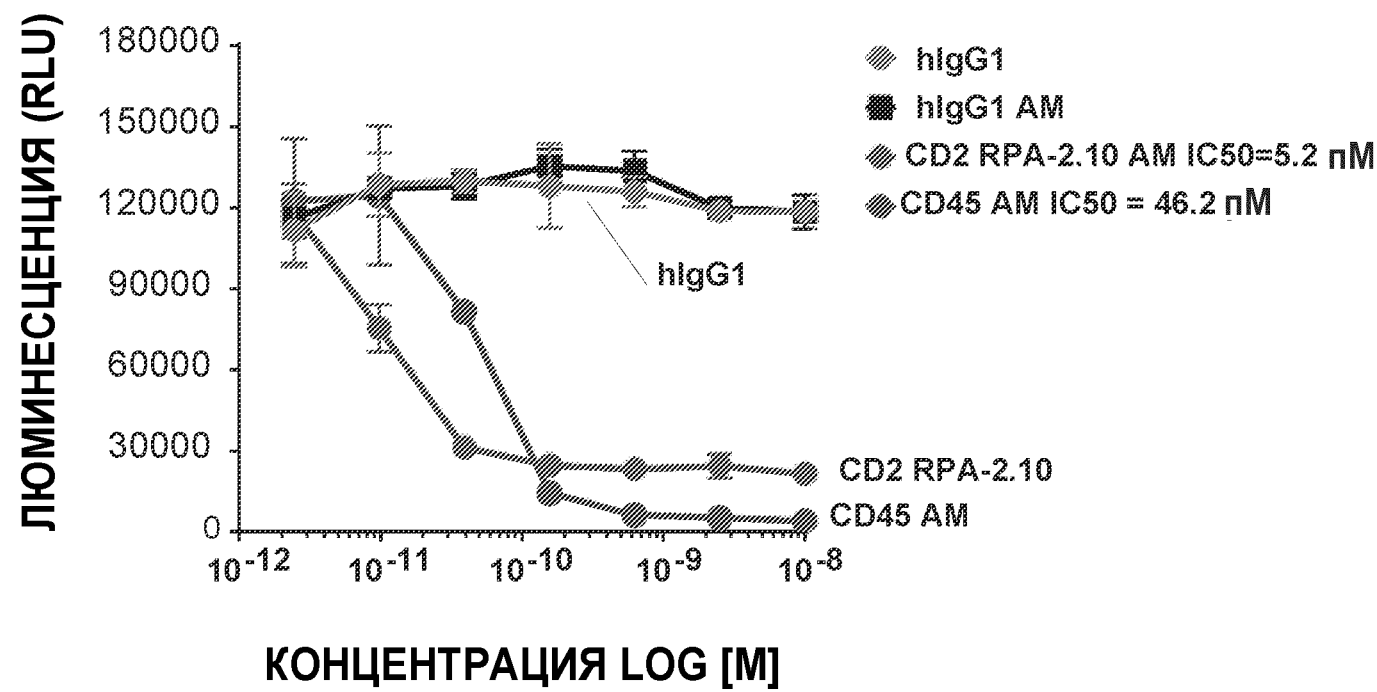
ФИГ.3А



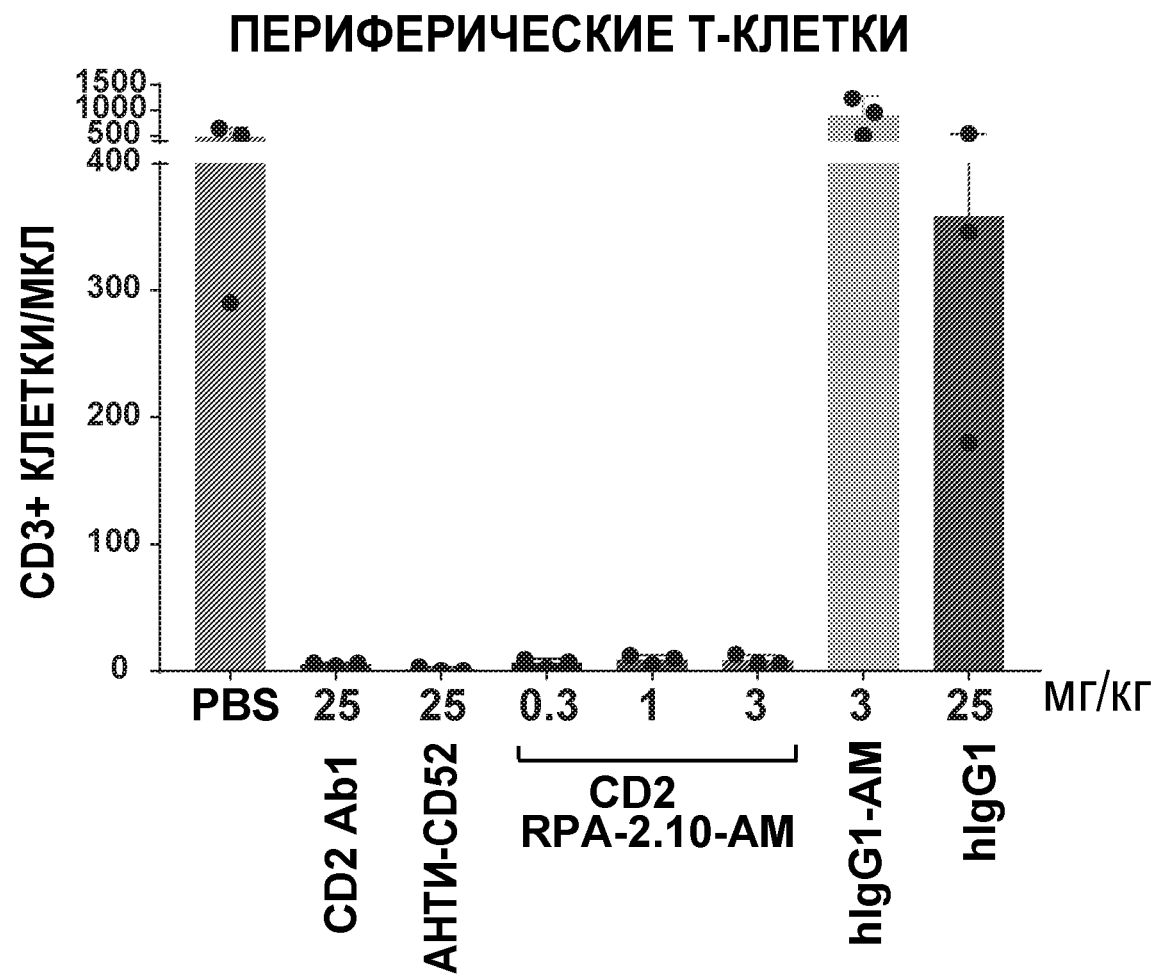
ФИГ.3В



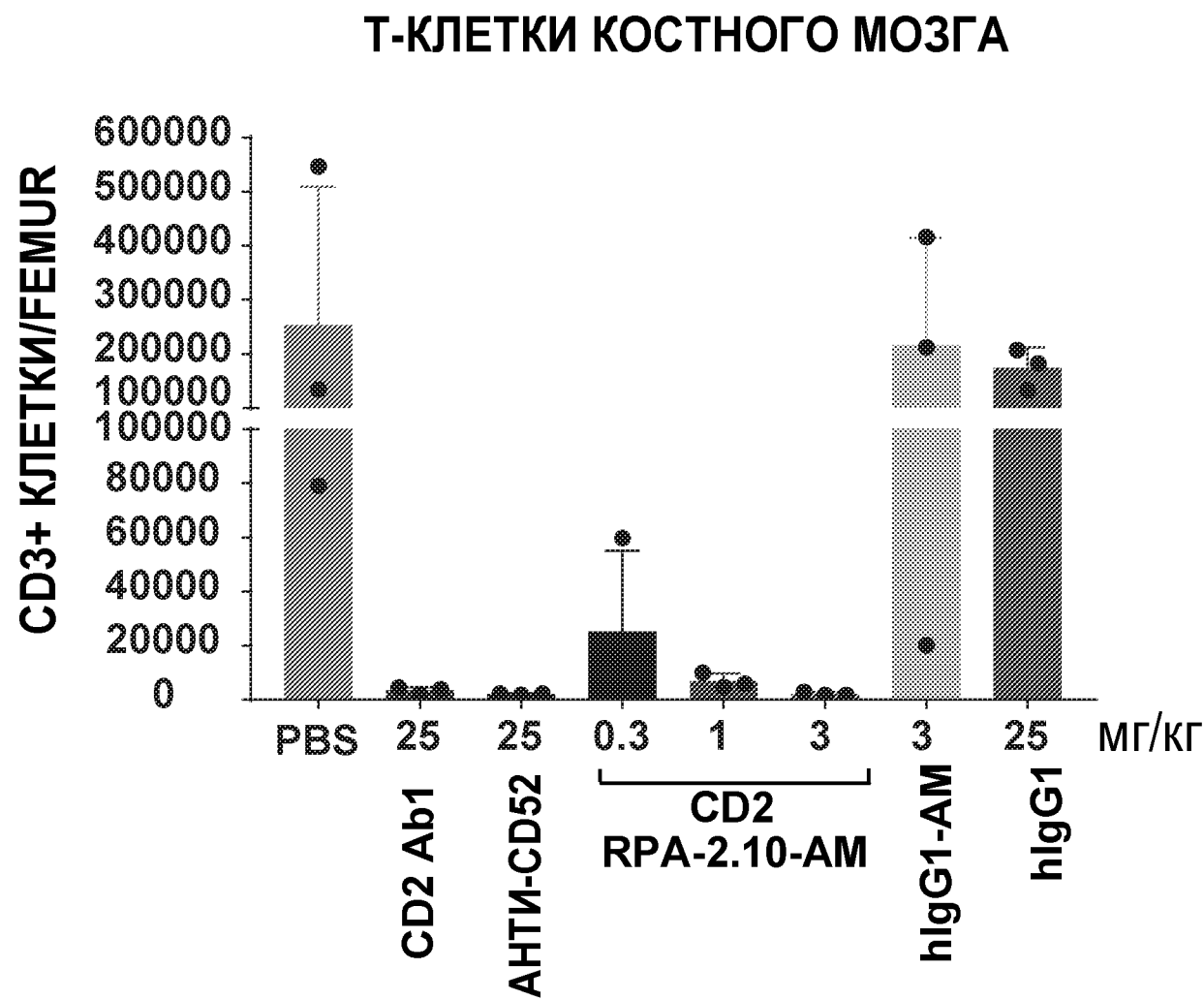
ФИГ.4



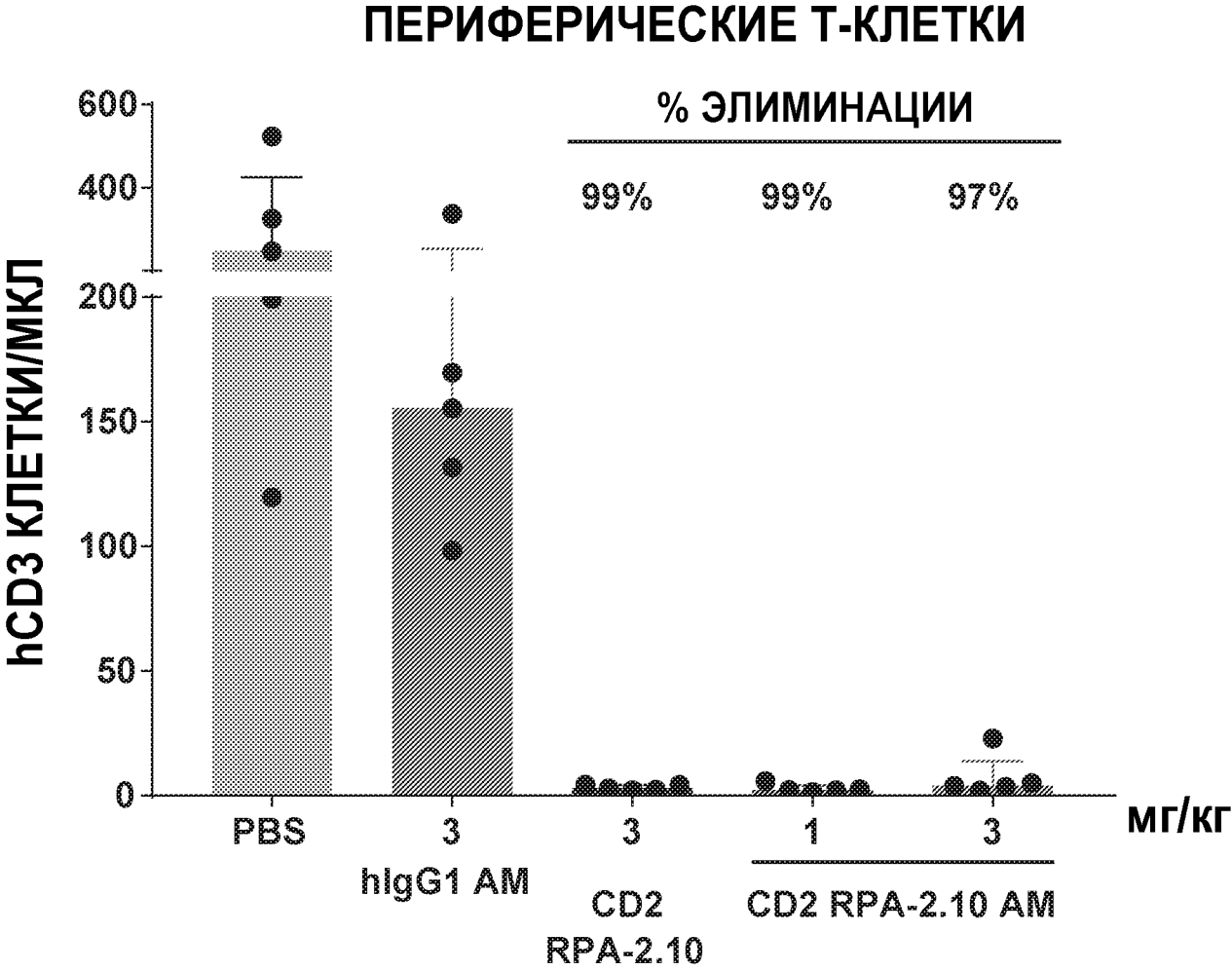
ФИГ.5А



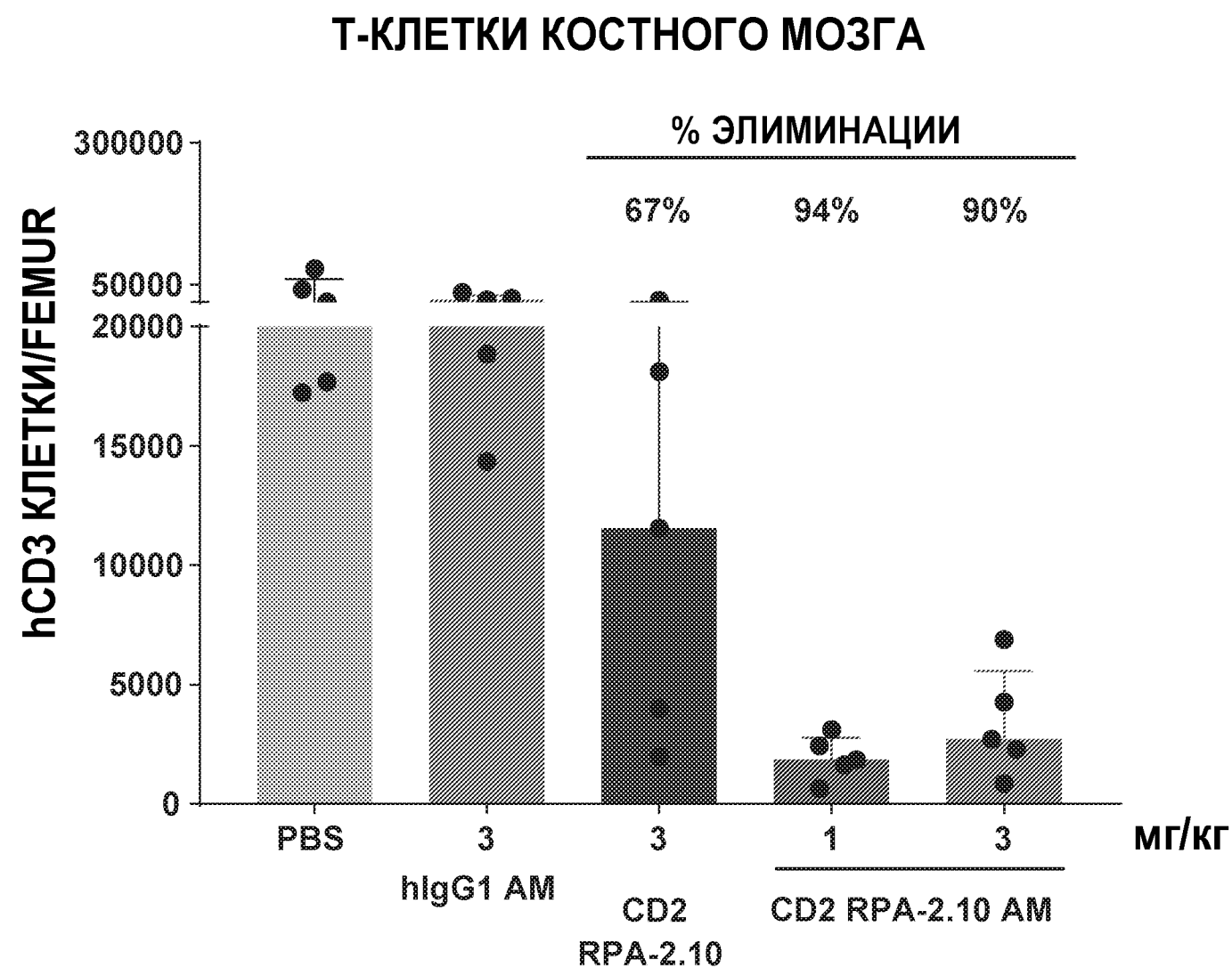
ФИГ.5В



ФИГ.6А



ФИГ.6В



ФИГ.6С

