(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190710 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.15

(22) Дата подачи заявки
2019.10.23

(51) Int. Cl. ***C07K 16/00*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)

(54) Fc ВЫКЛЮЧЕННЫЕ КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (ADC) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

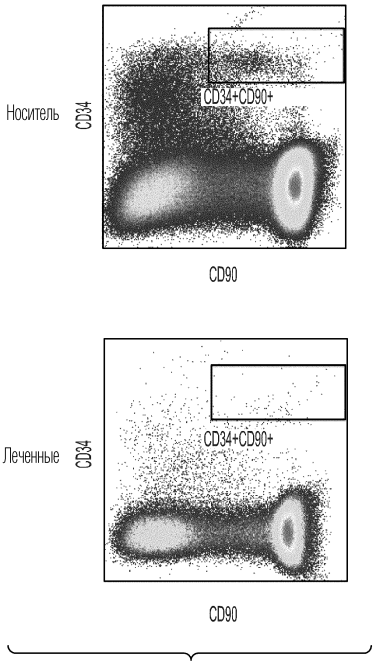
(31) **62/749,662; 62/773,839; 62/807,363**
(32) **2018.10.23; 2018.11.30; 2019.02.19**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/057741**
(87) **WO 2020/086776 2020.04.30**

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

(72) Изобретатель:
Палчаудхури Рахул, Бойтано Энтони, Кук Майкл, Макдона Шарлотт Фентон, Пирс Бредли Р., Сарма Ганапати Н. (US)

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

(57) Описаны антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство, имеющие Fc область с заменами, дающими по существу выключенную Fc область. Антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, применяют для обеднения клеток и для лечения разных гемопоэтических заболеваний, метаболических расстройств, рака, например острого миелоидного лейкоза (AML) и аутоиммунных заболеваний, среди прочих. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения расстройства непосредственно, например, через обеднение, например, популяции CD45+ или CD117+ раковых клеток или CD45+ аутоиммунных клеток. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, также могут применяться для подготовки пациента для терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки и для улучшения энграфтмента трансплантатов гемопоэтической стволовой клетки чрез селективное обеднение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток до процедуры трансплантации.



202190710 A1

202190710 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567501EA/025

FC ВЫКЛЮЧЕННЫЕ КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (ADC) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/749662, поданной 23 октября 2018; предварительной заявке на патент США № 62/773839, поданной 30 ноября 2018; и предварительной заявке на патент США № 62/807363, поданной 9 февраля 2019. Содержание каждой из приоритетных заявок включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Область техники

Настоящее описание относится к области антител или их конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих Fc область, которая имеет измененные эффекторные функции в результате одной или нескольких аминокислотных замен в Fc области. Настоящее описание также относится к лечению пациентов, страдающих различными патологиями, такими как заболевания крови, метаболические нарушения, рак и аутоиммунные заболевания, среди прочего, путем введения антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), имеющего модифицированную область Fc, где антитело или ADC способны связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтической клеткой, такой как гемопоэтическая стволовая клетка или клетками иммунной системы хозяина.

Уровень техники

Fc область антитела контролирует цитотоксическую активность антитела и может влиять на период полужизни антитела в сыворотке. Однако в терапевтическом контексте цитотоксическая эффекторная функция антитела часто нежелательна и может создавать проблемы безопасности и нежелательные побочные эффекты за счет активации иммунной защиты хозяина. Сообщалось, что несколько аминокислотных изменений в области Fc выключают или снижают эффекторную функцию антител. Фактически, предыдущие исследования идентифицировали положения аминокислот в Fc области антител, которые влияют на способность антитела связываться с рецептором Fc (см., например, Wang et al. (2018) Protein Cell. 2018 Jan; 9(1): 63-73). Например, мутации Fc S239D и I332E были описаны в литературе как улучшающие функцию ADCC (см., например, Lazar et al. (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc Natl Acad Sci USA. 103:4005-4010). Другие мутации связаны с пониженным связыванием FcγR и C1q, например, в IgG1, аминокислотные изменения L234A/L235A, или в IgG4, аминокислотные изменения F234A/L235A (Xu et al. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. Cell Immunol. 2000;200:16-26). Однако менее известно, как мутации Fc могут влиять на конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), особенно, когда токсин конъюгирован с антителом или Fc содержащим фрагментом в Fc области.

Несмотря на достижения в области медицины, сохраняется потребность в лечении патологий гемопоэтической системы, таких как, среди прочего, заболевания конкретной клетки крови, метаболические нарушения, рак и аутоиммунные состояния. Хотя гемопоэтические стволовые клетки обладают значительным терапевтическим потенциалом, ограничением, препятствующим их использованию в клинике, является сложность, связанная с обеспечением энграфтмента трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток (HSC) у хозяина. В частности, лечение гемопоэтическими стволовыми клетками с участием антител, целенаправленно воздействующих на поверхностные антигены клеток на эндогенных HSC, может инициировать нежелательные иммуностимулирующие и эффекторные функции, которые препятствуют энграфтменту трансплантата экзогенных HSC. В настоящее время существует потребность в композициях и способах стимулирования энграфтмента трансплантатов экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, так, чтобы мульти-активность и гемопоэтическая функциональность этих клеток сохранялись после трансплантации. Также существует потребность в улучшенных ADC, например, которые могут применяться для подготовки с пониженной эффекторной функцией, чтобы снизить потенциальную секрецию цитокинов и возможные побочные эффекты.

Сущность изобретения

В настоящем документе описаны антитела и их антигенсвязывающие части, содержащие Fc область, которая имеет измененные эффекторные функции в результате одного или нескольких аминокислотных замещений в Fc области, а также конъюгаты антитело-лекарственное средство, композиции и способы применения указанных антител. В частности, в настоящем документе представлены антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), которые имеют модифицированные Fc области, где антитела или ADC способны связывать антиген, экспрессированный гемопоэтической клеткой, такой как гемопоэтическая стволовая клетка или зрелая иммунная клетка (например, Т клетки). Кроме того, в настоящем документе представлены ADC, содержащие Fc мутации, которые дают сайт конъюгации для токсина и снижают эффекторную функцию, а также обеспечивают стабильность. Таким образом, описание представляет уникальные комбинации Fc мутаций для ADC.

В одном аспекте, в настоящем документе представлено антитело, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс), и аминокислотное замещение D265C (EU индекс), и где антителом является интактное IgG антитело. В одном варианте осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс), и аминокислотное замещение D265A (EU индекс), и где антителом является интактное IgG антитело. В одном варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A. В одном варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A.

В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H435 (EU индекс). В одном варианте

осуществления, H435 аминокислотным замещением является H435A. В одном варианте осуществления, антитело, содержащее аминокислотное замещение H435A, имеет пониженный период полужизни относительно идентичного интактного IgG антитела, содержащего немодифицированную Fc область.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, содержащее Fc область, имеющую аминокислотные замещения, состоящие по существу аминокислотные замещения L234A, L235Aи D265C (EU индекс), и где антителом является интактное IgG антитело. В одном варианте осуществления, антитело содержит Fc область, имеющую аминокислотные замещения, состоящие по существу из аминокислотных замещений L234A, L235A и D265A (EU индекс), и где антителом является интактное IgG антитело.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения в положениях L234, L235 (EU индекс) и D265(EU индекс). В одном варианте осуществления, D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс). В другом варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В другом варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении N297 и D265 (EU индекс). В одном варианте

осуществления, аминокислотным замещением в положении D265 является D265C или D265A (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс). В другом варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В другом варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E233, L234, L235 и D265 (EU индекс) и делецию G236 (EU индекс) и аминокислотное замещение в D265 (EU индекс). В одном варианте осуществления, аминокислотным замещением в D265 является D265C или D265A (EU индекс). В другом варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте

осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В другом варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении H435 и D265 (EU индекс). В одном варианте осуществления, аминокислотным замещением в положении D265 является D265C или D265A (EU индекс). В другом варианте осуществления, H435 аминокислотным замещением является H435A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс). В другом варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В другом варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит

аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс) и аминокислотное замещение P329 (EU индекс). В одном варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс). В одном варианте осуществления, D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В одном варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В одном варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В одном варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В одном варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В одном варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В одном варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс) и аминокислотное замещение P331 (EU индекс). В одном варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В одном варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс). В одном варианте осуществления, D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В одном варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В одном варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В

одном варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В одном варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В одном варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В одном варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E233 и L234 и L235 (EU индекс), делецию G236 (EU индекс). В одном варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В одном варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В одном варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H435 (EU индекс). В одном варианте осуществления, H435 аминокислотным замещением является H435A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В одном варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В одном варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В одном варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В одном варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В одном варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В одном варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В одном варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях I253, H310 и H345 (EU индекс). В одном варианте осуществления, I253 аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A. В другом варианте осуществления, H435 аминокислотным замещением является H435A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение

в положении N297 (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс). В другом варианте осуществления, D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс). В одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс). В другом варианте осуществления, L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V. В другом варианте осуществления, L235 аминокислотным замещением является L235A. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс). В другом варианте осуществления, N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс). В другом варианте осуществления, E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P331 аминокислотным замещением является P331G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, P329 аминокислотным замещением является P329G. В другом варианте осуществления, Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс). В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс). В другом варианте осуществления, I253

аминокислотным замещением является I253A. В другом варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс). В другом варианте осуществления, H310 аминокислотным замещением является H310A.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть содержит любую комбинацию замещений в Fc области, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении S239 (EU индекс). В одном варианте осуществления, S239 аминокислотным замещением является S239C.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H435 (EU индекс). В одном варианте осуществления, H435 аминокислотным замещением является H435A. В другом варианте осуществления, антитело содержит аминокислотное замещение H435A и имеет пониженный период полужизни относительно идентичного интактного IgG антитела, содержащего немодифицированную Fc область.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащая Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения L234A, L235A, S239C и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения L234A, L235A, S239C и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A, S239C и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений H435A, L234A, L235A и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его

антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297A и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297G и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297Q и D265C (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297A и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297G и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297Q и D265A (EU индекс).

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело, или его антигенсвязывающая часть, где антитело имеет снижение в эффекторной функции, определенное как снижение в связывании с Fc гамма рецептором (FcγR) относительно связывания с идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область, с FcγR. В некоторых вариантах осуществления, снижением связывания является, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcγR. В другом варианте осуществления, антитело не связывает определяемо FcγR. В другом варианте осуществления, связывание антитела с FcγR оценивают бислойной интерферометрией (BLI). В другом варианте осуществления, связывание антитела с FcγR оценивают с применением анализов, известных специалисту в данной области техники. В другом варианте осуществления, FcγR является FcγR1 рецептором. В другом варианте осуществления, FcγR рецептором является FcγR2 рецептор или FcγR3 рецептор. В другом варианте осуществления, FcγR2 рецептором является FcγR2A, FcγR2B или FcγR2C. В другом варианте осуществления, FcγR3 рецептором является FcγR3A или

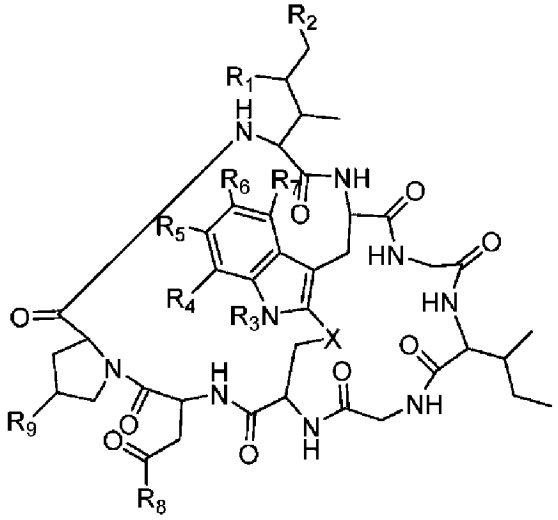
FcγR3B. В другом варианте осуществления, Fc рецептором является Fc рецептор человека. В других вариантах осуществления, FcγR рецептором является FcγR2A 167R рецептор. В других вариантах осуществления, FcγR рецептором является FcγR3A 176V рецептор. В других вариантах осуществления, FcγR рецептором является FcγR3A 176F рецептор.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, где антитело снижает выделение цитокина в in vitro анализе цитокина со снижением выделения цитокина на, по меньшей мере, 50% относительно выделения цитокина идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В одном варианте осуществления, снижение выделения цитокина составляет, по меньшей мере, 60% снижение, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение выделения цитокина относительно выделения цитокина идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В другом варианте осуществления, антитело не демонстрирует определяемое выделение цитокина. В другом варианте осуществления, in vitro анализом выделения цитокина является Meso Scale Discovery (MSD) провоспалительный анализ культуры тканей (ТС). В другом варианте осуществления, in vitro анализ выделения цитокина оценивают с применением анализов, известных специалисту в данной области техники. В другом варианте осуществления, антитело снижает дегрануляцию тучных клеток в in vitro анализе дегрануляции тучных клеток со снижением дегрануляции тучных клеток, по меньшей мере, 50% относительно дегрануляции тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В другом варианте осуществления, снижение дегрануляции тучных клеток составляет, по меньшей мере, 60% снижение, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение дегрануляции тучных клеток относительно дегрануляции тучных клеток идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область. В другом варианте осуществления, антитело не демонстрирует определяемую дегрануляцию тучных клеток. В другом варианте осуществления, in vitro анализом дегрануляции тучных клеток является анализ дегрануляции тучных клеток на основе бета-гексозаминидазы.

В некоторых вариантах осуществления, IgG изотипом является IgG 1 изотип, IgG2 изотип, IgG3 изотип или IgG4 изотип. В другом варианте осуществления, антителом является антитело человека, химерное или гуманизированное антитело. В еще одном варианте осуществления, антителом является биспецифическое антитело. В другом варианте осуществления, антителом является моноклональное антитело. В другом варианте осуществления, антителом является интактное IgG антитело. В другом варианте осуществления, антитело специфически связывает CD117, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252.

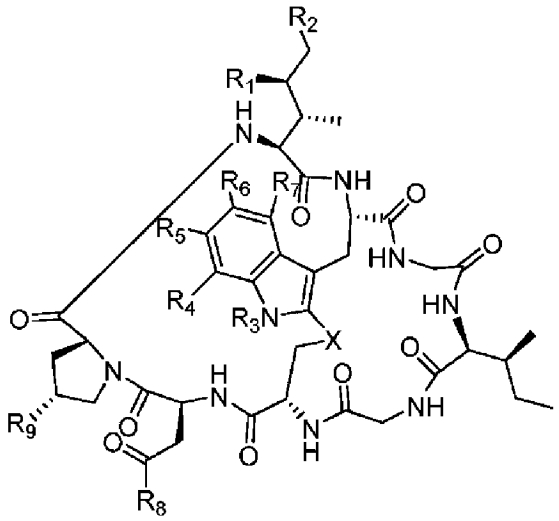
В другом аспекте, в настоящем документе представлен конъюгат антитело-

лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающая часть, как указано в настоящем документе, где антитело, или его антигенсвязывающая часть конъюгировано с цитотоксином через линкер. В одном варианте осуществления, цитотоксином является ингибитор РНК полимеразы. В другом варианте осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аматоксин. В другом варианте осуществления, аматоксин представлен формулой (**III**)



(III)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C; R_2 является H, OH, OR_B или OR_C; R_A и R_B, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединены с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы;R_3 является H, R_C или R_D; R_4, R_5, R_6 и R_7 каждый независимо является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D; R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D; R_9 является H, OH, OR_C или OR_D; X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; R_C является -L-Z; R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом; L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, пептидом, дипептидом, -(C=O)-, дисульфидом, гидразоном или их сочетанием; и Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит только один R_C заместитель. В другом варианте осуществления, аматоксин представлен формулой (**IB**)



(**IB**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C; R_2 является H, OH, OR_B или OR_C; R_A и R_B, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединены с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы; R_3 является H, R_C или R_D;R_4, R_5, R_6 и R_7 каждый независимо является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D; R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D; R_9 является H, OH, OR_C или OR_D; X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; R_C является -L-Z; R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом; L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, пептидом, дипептидом, -(C=O)-, дисульфидом, гидразоном или их комбинацией; Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит только один R_C заместитель. В другом варианте осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аманитин. В другом варианте осуществления, аманитин выбирают из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина. В другом варианте осуществления, цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина синегнойной палочки A, деБуганина, дифтеротоксина, сапорина, майтанзина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера

пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина. В другом варианте осуществления, ауристатином является MMAE или MMAF. В другом варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгировано с цитотоксином через межцепочечную конъюгацию до нативного шарнирного цистеина. В другом варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгировано с цитотоксином путем цистеинового остатка в Fc домене антитела. В другом варианте осуществления, цистеиновый остаток вводят путем аминокислотного замещения в Fc домене антитела. В другом варианте осуществления, аминокислотным замещением является D265C. В другом варианте осуществления, аминокислотным замещением является S239C.

В другом аспекте, в настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или ADC по любому из пп. 1-218 и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток (HSC) у пациента-человека, где способ включает введение пациенту эффективного количества антитела или ADC, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления, способ включает введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. В одном варианте осуществления, трансплантат является аллогенным. В одном варианте осуществления, трансплантат является аутологичным.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ, содержащий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело или ADC, как описано в настоящем документе, в количестве, достаточном для обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента. В одном варианте осуществления, гемопоэтической стволовой клеткой является CD117+ или CD45+ клетка. В другом варианте осуществления, пациент имеет заболевание крови, метаболическое заболевание, рак или аутоиммунное заболевание или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID).

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения лейкоза у пациента-человека, где указанный способ включает введение антитела или ADC, как описано в настоящем документе, пациенту-человеку, имеющему лейкоз.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело или ADC, как описано в настоящем документе, в количестве, достаточном для обеднения популяции иммунных клеток у пациента. В одном варианте осуществления, иммунной клеткой является CD137+, CD2+ или CD5+ клетка. В другом варианте осуществления, иммунной клеткой является Т клетка.

В другом аспекте, в настоящем документе представлена композиция, содержащая антитело или ADC, как описано в настоящем документе, где композиция содержит менее

25% гидрофобного деградаита после термического стресса. В одном варианте осуществления, композиция содержит менее 20% гидрофобного деградаита после термического стресса. В другом варианте осуществления, композиция содержит менее 15% гидрофобного деградаита после термического стресса. В другом варианте осуществления, композиция содержит менее 10% гидрофобного деградаита после термического стресса. В другом варианте осуществления, композиция содержит менее 5% гидрофобного деградаита после термического стресса.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения нарушения, связанного со стволовыми клетками, у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения иммунодефицитного расстройства у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления, имунодефицитным расстройством является врожденный иммунодефицит или приобретенный иммунодефицит.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения метаболического расстройства у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления, метаболическое расстройство выбирают из группы, состоящей из нарушений отложения гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза и метахроматической лейкодистрофии.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения аутоиммунного расстройства у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, болезни холодовых агглютининов, синдрома CREST, болезни Дегоса,

дискоидной волчанки, дизавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпастура, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA невропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, обычной пузырчатки, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узелкового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения рака у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рак выбирают из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антитело имеет снижение эффекторной функции, определенное как снижение связывания с Fc гамма рецептором (FcγR) относительно связывания идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область, с FcγR. В одном варианте осуществления, снижением связывания является, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область, с FcγR. В некоторых вариантах осуществления, антитело не связывается определяемо с FcγR. В некоторых вариантах осуществления, связывание антитела с FcγR оценивают бислойной интерферометрией (BLI). В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR1 рецептор, FcγR2 рецептор или FcγR3 рецептор. В некоторых вариантах осуществления, FcγR1 рецептором является FcγR1A, FcγR1B или FcγR1C. В некоторых вариантах осуществления, FcγR1 рецептором является FcγR2A, FcγR2B или FcγR2C. В некоторых вариантах осуществления, FcγR1 рецептором является FcγR3A или FcγR3B. В некоторых вариантах осуществления, Fc рецептором является Fc рецептор человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, IgG изотипом является IgG1 изотип, IgG2 изотип, IgG3 изотип или IgG4 изотип.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антителом является антитело человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антителом является химерное или гуманизированное антитело.

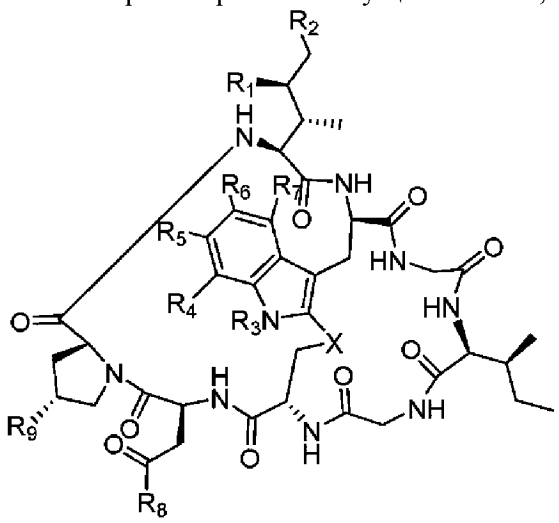
В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антителом является моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, антитело специфически связывает CD117, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий любые из антител в настоящем документе, где антитело конъюгировано с цитотоксином через линкер.

В некоторых вариантах осуществления конъюгатов в настоящем документе, цитотоксином является ингибитор РНК полимеразы. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аматоксин.

В некоторых вариантах осуществления, аматоксин представлен формулой (**IA**)



(**IA**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

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

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C является -L-Z;

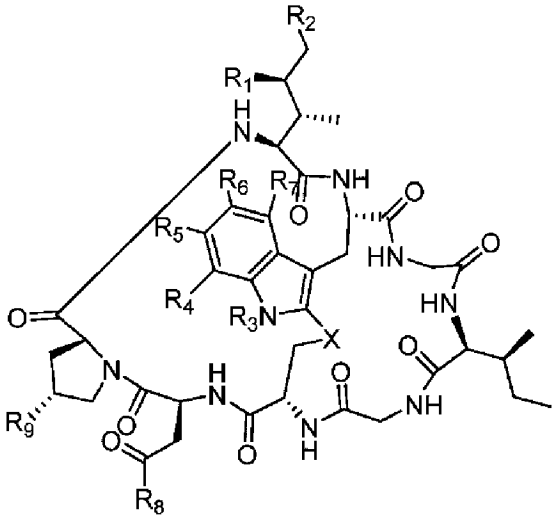
R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом или необязательно замещенным гетероариленом; и

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am содержит только один R_C заместитель.

В некоторых вариантах осуществления, аматоксин представлен формулой (**IB**)



(**IB**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

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

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-;

R_C является -L-Z;

R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом,

необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом или необязательно замещенным гетероариленом; и

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am содержит только один R_C заместитель.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аманитин. В некоторых вариантах осуществления, аманитин выбирают из группы, состоящей из α-аманитина, β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина синегнойной палочки A, деБуганина, дифтеротоксина, сапорина, майтанзина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина. В некоторых вариантах осуществления, ауристатином является MMAE или MMAF.

В некоторых вариантах осуществления конъюгатов в настоящем документе, антитело конъюгируют с токсином путем цистеинового остатка в Fc домене антитела. В некоторых вариантах осуществления, цистеиновый остаток вводят путем аминокислотного замещения в Fc домене антитела. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотным замещением является D265C.

В другом аспекте, в настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или ADC, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте, в настоящем документе представлен способ обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток (HSC) у пациента-человека, где способ включает введение пациенту эффективного количества антитела или ADC, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, способ дополнительно содержит введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления, трансплантат является аллогенным. В некоторых вариантах осуществления, трансплантат является аутологичным.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело или ADC, описанные в настоящем документе, в количестве, достаточном для обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, пациент имеет заболевание крови, метаболическое расстройство, рак или аутоиммунное заболевание или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID).

В дополнительном аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения лейкоза у пациента-человека, где указанный способ включает введение антитела или ADC, описанного в настоящем документе, пациенту-человеку, имеющему лейкоз.

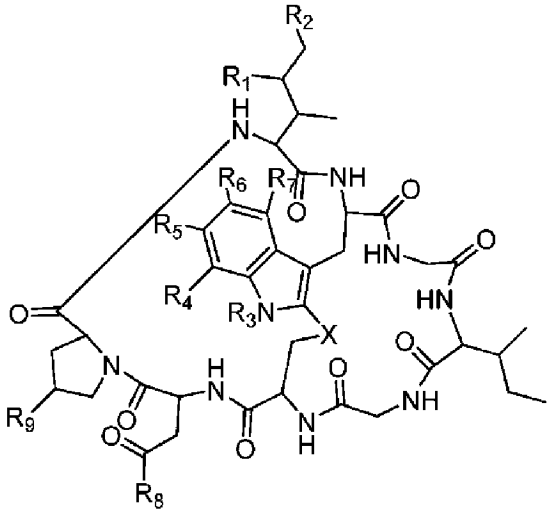
В одном аспекте, в настоящем документе представлен способ обеднения популяции CD117+ клеток у пациента-человека, нуждающегося в этом, где способ включает введение пациенту эффективного количества анти-CD117 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), где конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержит анти-CD117 антитело, конъюгированное с аматоксином через линкер, и представленное формулой Ab-Z-L-Am, где Ab является анти-CD117 антителом, содержащим H435A мутацию (EU индекс) в Fc области антитела, L является линкером, Z является химической группой и Am является аматоксином. В одном варианте осуществления, ADC вводят до получения пациентом трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. В другом варианте осуществления, ADC вводят одновременно с получением пациентом трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ введения пациенту-человеку анти-CD117 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в количестве, достаточном для обеднения популяции CD117+ клеток у пациента, нуждающегося в этом, где конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержит анти-CD117 антитело, конъюгированное с аматоксином через линкер, и представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab является анти-CD117 антитело, содержащее H435A мутацию (EU индекс) в Fc области антитела, L является линкером, Z является химической группой и Am является аматоксином; и последующего введения пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. В одном варианте осуществления, трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация ADC будет по существу выведена из крови пациента. В другом варианте осуществления, гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки через два или более дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту. В еще одном варианте осуществления, гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливают гемопоэз после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту. В дополнительном варианте осуществления, пациент имеет расстройство, выбранное из группы, состоящей из дефицита аденозиндеаминазы и тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома гипериммуноглобулина М, болезни Чедиака-Хигаши, наследственного лимфогистиоцитоза, остеопетроза, несовершенного остеогенеза, болезней накопления, большой талассемии, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного

склероза и ювенильного ревматоидного артрита. В другом варианте осуществления, пациент имеет аутоиммунное расстройство или гематологический рак. В другом варианте осуществления, аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, болезни холодовых агглютининов, синдрома CREST, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, дизавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпастура, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA невропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, обычной пузырчатки, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узелкового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

В другом аспекте, в настоящем документе представлен способ лечения субъекта-человека, имеющего гематологический рак, включающий введение эффективного количества анти-CD117 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) субъекту-человеку, имеющему гематологический рак, где конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержит анти-CD117 антитело, конъюгированное с аматоксин через линкер, и представлено формулой Ab-Z-L-Am, где Ab является анти-CD117 антитело, содержащее H435A мутацию (EU индекс) в Fc области антитела, L является линкером, Z является химической группой и Am является аматоксином. В одном варианте осуществления, гематологическим раком является лейкоз. В другом варианте осуществления, Fc область анти-CD117 антитела содержит D265C мутацию (EU индекс). В еще одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную

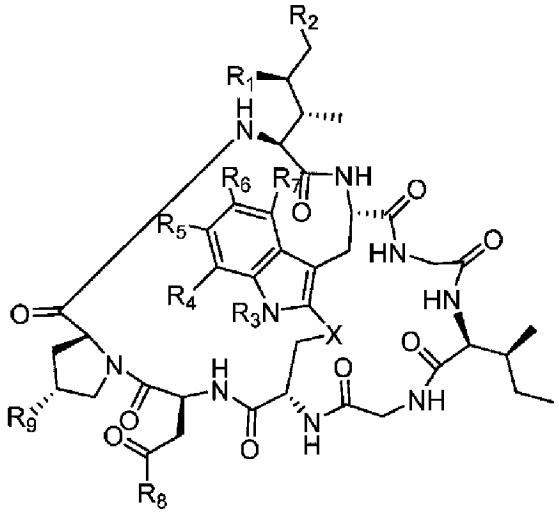
последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9; и содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. В другом варианте осуществления, ADC интернализовано раковой клеткой, аутоиммунной клеткой или гемопоэтической стволовой клеткой после введения пациенту. В другом варианте осуществления, Am-L-Z представлена формулой (**I**)



(**I**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C; R_2 является H, OH, OR_B или OR_C; R_A и R_B, если присутствует, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединены с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы; R_3 является H, R_C или R_D; R_4, R_5, R_6 и R_7 каждый независимо является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D; R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D; R_9является H, OH, OR_C или OR_D; X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; R_C является -L-Z; R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом; L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно

замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, дипептидом, -C(=O)-, пептидом или их комбинацией; и Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит только один R_C заместитель. В другом варианте осуществления, Am-L-Z представлена формулой (**IB**)



(**IB**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C; R_2 является H, OH, OR_B или OR_C; R_A и R_B, если присутствует, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединены с образованием необязательно замещенной 5-членной гетероциклоалкильной группы; R_3 является H, R_C или R_D; R_4, R_5, R_6 и R_7 каждый независимо является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D; R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D; R_9 является H, OH, OR_C или OR_D; X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; R_C является -L-Z; R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом; L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, дипептидом, -C(=O)-, пептидом или их комбинацией; и Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит только один R_C заместитель. В другом варианте осуществления, ADC

вводят пациенту-человеку в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A -1E графически изображают результаты стандартного анализа биослойной интерферометрией (BLI) для оценки связывающего ответа антитела, имеющего указанные аминокислотные замены Fc гамма рецепторов, указанных в условных обозначениях. Нормализованный связывающий ответ каждого варианта анти-CD117 антитела относительно связывания ДТ IgG1 показан на **Фиг. 1A**, и количественная оценка нормализованного связывающего ответа каждого варианта анти-CD117 антитела показана на **Фиг. 1B**. На **Фиг. 1C** изображена количественная оценка нормализованных связывающих ответов вариантов анти-CD45 антитела относительно связывания ДТ WT анти-CD45 антитела (**Фиг. 1C**; "ic" в настоящем документе относится к межцепочечным конъюгатам нативных шарнирных цистеинов). Нормализованный связывающий ответ дополнительных вариантов анти-CD117 антитела относительно связывания ДТ IgG1 (изотипический контроль) показан на **Фиг. 1D,** и количественная оценка нормализованного связывающего ответа каждого варианта анти-CD117 антитела показана на **Фиг. 1E**.

Фиг. 2 графически изображает результаты анализа дегрануляции тучных клеток, в котором Бета-гексозаминидазу измеряют после инкубирования тучных клеток с указанными антителами. Бета-гексозаминидазу, выделенную из тучных клеток, измеряют через отслеживание продуцирования пара-нитрофенола из субстрата 4-Нитрофенила N-ацетил-β-D-глюкозаминида и представляют как абсорбцию пара-нитрофенола при 405 нм на оси y.

Фиг. 3A, 3B, 3C, 3D и **3E** графически изображает результаты in vitro анализа выделения цитокина для измерения выделения IL-6 (**Фиг. 3A**), IL-8 (**Фиг. 3B**), TNFa (**Фиг. 3C**), IL-1B (**Фиг. 3D**) и GM-CSF (**Фиг. 3E**) из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека после инкубирования с указанными антителами. PBMC человека для **Фиг. 3A - 3D** выделяют у одного или нескольких доноров, как разделено в условных обозначениях.

Фиг. 4A и 4B графически изображает результаты in vitro анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), который показывает снижение активности ADCP благодаря выключению Fc эффектора в определенных вариантах Fc по сравнению с контролем. **Фиг. 4A** изображают результаты анализа проточной цитометрией окрашивания соэкспрессии CFSE и CD134. **Фиг. 4B** изображает результаты инкубирования смеси MDM и клеток Kasumi-1 (молярное отношение 1:2) в течение двух часов при 37°C с повышением концентраций указанного антитела.

Фиг. 5A, 5B и **5C** изображает хроматограммы, демонстрирующие результаты анализа термостабильности, в котором оценивают температуру плавления каждого указанного антитела.

Фиг. 6A и **6B** являются таблицами, показывающими температуру плавления Tm 1 (CH2 Развертывание) и Tm2 (fab/CH3 развертывание) каждого указанного антитела по

данным анализа термостабильности, изображенного на Фиг. 5A (см. Фиг. 6A) и Фиг. 5B и 5C (см. Фиг. 6B).

Фиг. 7A и **7B** изображают хроматограммы, демонстрирующие профиль элюирования указанного антитела в момент времени=0 при комнатной температуре (не стрессовые условия) или через 30 минут инкубирования при 60 градусах Цельсия (стрессовые условия) после анализа хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC). **Фиг. 7A** изображает хроматограммы, демонстрирующие профиль элюирования Ab1 антитела и определенных вариантов Ab1 Fc в момент времени=0 при комнатной температуре (не стрессовые условия; **Фиг. 7A** (хроматограмма на нижней панели)) или через 30 минут инкубирования при 60 градусах Цельсия (стрессовые условия; **Фиг. 7A** (хроматограмма на верхней панели)) после анализа хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC). **Фиг. 7B** изображает хроматограмму, демонстрирующую профиль элюироваия Ab2 антитела и определенных вариантов Ab2 Fc в момент времени=0 при комнатной температуре (не стрессовые условия) или через 30 минут инкубирования при 60 градусах Цельсия (стрессовые условия) после анализа хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC).

Фиг. 8A - 8E графически изображают результаты анализов HIC с **Фиг. 7A** и **7B**, показывающие относительную площадь пика мономера антитела (т.е., “Основного”) (**Фиг. 8A и 8D**) или пика гидрофобного деградаита (**Фиг. 8B, 8C и 8E**) для указанных антител после обработки в стрессовых или не стрессовых условиях.

Фиг. 9A -9E графически изображает результаты анализа гель-хроматографии, в котором относительную площадь пика мономера антитела (**Фиг. 9A** и **9D**) или долю пика высокомолекулярного агрегата (**Фиг. 9B, 9C** и **9E**) определяют для указанных антител после обработки в момент времени=0 при комнатной температуре (не стрессовые условия) или через 30 минут инкубирования при 60 градусах Цельсия (стрессовые условия).

Фиг. 10A и 10B графически изображают результаты фармакокинетического анализа примата, не являющегося человеком, выраженные как концентрация (нг/мл) сконструированного ADC анти-CD117-аматоксин с быстрым периодом полужизни в разных дозах (0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг) как функцию от времени (т.е., часы после введения; ось x). **Фиг. 10B** иллюстрирует, что регламентирование по времени ADC-опосредованного обеднения и клиренса дает окно для адаптации трансплантата после введения.

Фиг. 11A-11E графически изображают результаты анализов, определяющих обеднение фенотипичских гемопоэтических стволовых клеток (т.е., CD34+ CD90+ CD45RA- HSC) с применением проточной цитометрии (**Фиг. 11A** и **Фиг. 11C**) или оценки колониеобразующих единиц из пунктата костного мозга (**Фиг. 11B** и **Фиг. 11D**) как функции от разных доз ADC1 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) к контролю (т.е., ФРФБ) (ось x). **Фиг. 11C** и **11D** также показывают данные, соответствующие неконъюгированому анти-CD117 антителу (“анти-CD117”). **Фиг. 11E** показывает фенотипический анализ гемопоэтических стволовых клеток костного мозга

(обработанных к необработанным) с применением проточной цитометрии (на 7 день после введения дозы).

Фиг. 12A-12C графически изображает результаты анализов, определяющих (**Фиг. 12A**) количество нейтрофилов (10^3/мл) и (**Фиг. 12B** и **12C**) количество лимфоцитов (10^3/мл) как функцию от дней после введения дозы разных доз ADC1 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) к контролю (т.е., ФРФБ). **Фиг. 12C** также показывает данные, соответствующие количеству лимфоцитов для яванских макаков, получавших неконъюгированное анти-CD117 антитело ("анти-CD117").

Фиг. 13A-13C графически изображает результаты анализов уровней определения (**Фиг. 13A** и **13C**) аланин аминотрансаминазы в плазме (ALT; в ЕД/мл) и (**Фиг. 13B**) билирубина в плазме (в ЕД/мл) как функции от дней после введения дозы разных доз ADC1 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) к контролю (т.е., ФРФБ). **Фиг. 13C** дополнительно показывает данные, соответствующие уровням ALT в плазме яванских макаков, получавших неконъюгированное анти-CD117 антитело ("анти-CD117").

Фиг. 14 показывает изображения ткани печени и почки, выделенной у яванских макаков через 35 дней после введения ADC1 (0,3 мг/кг) или контроля (ФРФБ).

Фиг. 15 графически изображает результаты анализа, определяющего количество ретикулоцитов (10^9/мл) как функцию от дней после введения дозы разных доз (0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг) ADC1 конъюгата антитело-лекарственное средство к контролю (т.е., ФРФБ) или неконъюгированому анти-CD117 антителу.

Подробное описание

В настоящем документе описаны антитела и их конъюгаты (конъюгаты антитело-лекарственное средство; ADC), имеющие модифицированные Fc области, где модификации снижают или по существу исключают эффекторные функции антитела. Модификации Fc области также могут разрешать конъюгацию антитела-лекарственного средства и/или снижение периода полужизни антитела. Взаимодействие антител и комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы может вызвать множество ответов, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Связывание Fc области антитела с Fc рецепторами на поверхности клетки инициирует множество биологических ответов, включая поглощение и разрушение покрытых антителом частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителом клеток-мишеней киллерными клетками (т.е., ADCC), выделение воспалительных медиаторов, плацентарный перенос и контроль продуцирования иммуноглобулина. При снижении или, по существу, исключении эффекторной функции антитела, описанные в данном случае антитела могут, например, преимущественно избегать инициирования различных реакций иммунной системы (например, избегать выделения цитокина или избегать дегрануляции тучных клеток), которые могут быть вредными в определенных терапиях, например, терапиях гемопоэтическими стволовыми клетками (например, терапии трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток) и обеднять гемопоэтические клетки (например, для

лечения раков крови, заболеваний и расстройств иммунной системы, аутоиммунных заболеваний, заболевания трансплантат против хозяина, и т.д.).

Следовательно, в настоящий документ включены антитела против гемопоэтических клеток (также называемые анти-HC антитела), имеющие модифицированные Fc области, которые полезны в терапиях. Например, антитела или ADC в настоящем документе применяют в процедурах подготовки, в которых пациента подготавливают для получения трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки. Согласно способу, описанному в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, пациент может быть подготовлен (например, для терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки или перезагрузки иммунной системы) через введение пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими клетками (например, гемопоэтическми стволовыми клетками, например, гемопоэтическими стволовыми клетками и/или зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками)), такими как CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137, CD252 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, антитела или ADC, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться для лечения заболеваний или расстройств гемопоэтической системы. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитела или ADC, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться для лечения раков крови. В другом не ограничивающем примере, антитела или ADC, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться для лечения болезни трансплантат против хозяина (“GvHD”). В некоторых вариантах осуществления, антитела или ADC, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться для лечения опосредованного Т клеткой заболевания или расстройства. Как описано в настоящем документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Введение ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать один или несколько из вышеупомянутых антигенов, пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки, может способствовать энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки, например, через селективное обеднение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая вакансию, заполненную трансплантатом экзогенной гемопоэтической стволовой клетки.

В одном конкретном аспекте, в изобретении представлены выделенные анти-CD117 антитела, специфически выделенные анти-CD117 антитела человека, которые связываются с эктодоменом CD117 человека, где выделенные анти-CD117 антитела имеют модифицированные Fc области, где модификации снижают или по существу исключают эффекторные функции антитела. Области связывания выделенных анти-CD117 антител, идентифицированных в настоящем документе, описаны ниже.

В следующих разделах дается описание антител или их конъюгатов, которые могут

быть введены пациенту, например пациенту, страдающему раком или аутоиммунным заболеванием, или пациенту, нуждающемуся в гемопоэтической терапии трансплантатом стволовой клетки для стимулирования энграфтмента трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, а также способы введения таких терапевтических средств пациенту (например, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток).

Определения

В настоящем документе термин «примерно» относится к значению, которое находится в пределах 5% выше или ниже описываемого значения.

В настоящем документе термин «аллогенный», когда он используется в контексте трансплантации, используют для определения клеток (или ткани, или органа), которые трансплантируются от донора к реципиенту того же вида, но который генетически отличается. Таким образом, термин «аллогенные клетки» относится к типам клеток, которые генетически различаются у двух индивидуумов, но принадлежат к одному виду, например, человеку. Обычно термин «аллогенные» используется для определения клеток, таких как стволовые клетки, которые трансплантируются от донора к не родственному реципиенту того же вида.

В настоящем документе термин «аутологичные» относится к клеткам или трансплантатам, в которых донор и реципиент являются одним и тем же субъектом.

В настоящем документе термин «ксеногенные» относится к клеткам, где донор и реципиент являются разными.

В настоящем документе термин «иммунная клетка» предназначен для включения, но не ограничивается ими, клетки, которая имеет гемопоэтическое происхождение и которая играет роль в иммунном ответе. Иммунные клетки включает, но не ограничивается ими, Т клетки и естественные киллеры (NK). Естественные киллеры хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления, естественные киллеры включают клеточные линии, такие как NK-92 клетки. Другие примеры NK клеточных линий включают NKG, YT, NK-YS, HANK-1, YTS клетки и NKL клетки. Иммунная клетка может быть аллогенной или аутологичной.

В настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с или иммунологически взаимодействует с конкретным антигеном. Антитело включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), генетически сконструированные антитела и другим образом модифицированные формы антител, включая, но не ограничиваясь ими, химерные антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгированные антитела (например, би-, три- и квадро-специфические антитела, диатела, триатела и тетратела) и фрагменты антитела (т.е., антигенсвязывающие фрагменты антител), включая, например, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, rlgG и scFv фрагменты, при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность

Антитела настоящего описания обычно являются выделенными или

рекомбинантными. «Выделенные» при применении в настоящем документе, относятся к полипептиду, например, антителу, который был идентифицирован и отделен и/или восстановлен из клетки или клеточной культуры, из которой он экспрессируется. Как обычно, выделенное антитело будет получено, по меньшей мере, за одну стадию очистки. Таким образом, «выделенное антитело» относится к антителу, которое, по существу, не содержит другие антитела, имеющие разную антигенную специфичность. Например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD117, по существу не содержит антитела, которые специфически связывает антигены, отличные от CD117.

Термин «моноклональное антитело» применяемый в настоящем документе, относится к антителу, которое получают из одного клона, включая эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми средствами, доступными или известным в данной области техники, и не ограничивается антителами, полученными гибридомной техникой. Моноклональные антитела, применяемые в настоящем описании, могут быть получены с применением множества методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомной, рекомбинантной и фаговой техники или их комбинации. Если не указано иное, термин «моноклональное антитело» (mAb) включает как интактные молекулы, так и фрагменты антитела (включая, например, фрагменты Fab и $F(ab')_2$), которые способны специфически связываться с белком-мишенью. Как применяется в настоящем документе, фрагменты Fab и $F(ab')_2$ относятся к фрагментам антитела, которые не имеют Fc фрагмент интактного антитела. В одном варианте осуществления, фрагмент антитела содержит Fc область.

В общем, антитела содержат тяжелые и легкие цепи, содержащие антигенсвязывающие области. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенной в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенной в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. VH и VL области могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, названные определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, которые более косервативны, названными каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антитела могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включающими разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», как применяется в настоящем документе, относится к одной или нескольким частям антитела, которые сохраняют

способность специфически связывать антиген-мишень. Антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Фрагментами антитела могут быть, например, Fab, F(ab')2, scFv, диатело, триатело, аффитело, нанотело, аптамер или домен антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают, но не ограничиваются ими: (i) Fab фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')2 фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком на шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; (iv) Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов оного плеча антитела, (v) dAb, включающее VH и VL домены; (vi) dAb фрагмент, который состоит из VH домена (см., например, Ward et al., Nature 341:544-546, 1989); (vii) dAb, которое состоит из VH или VL домена; (viii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); и (ix) комбинацию двух или нескольких (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена Fv фрагмента, VL и VH, кодированы отдельными генами, они могут быть объединены с применением рекомбинантных способов, линкером, который позволяет им существовать в виде одной белковой цепи, в которой VL и VH области спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечная Fv (scFv); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988 and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антитела могут быть получены с применением обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу для применения таким же образом, как интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены методами рекомбинантных ДНК, ферментного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов, или, в определенных случаях, методами химического пептидного синтеза, известными в данной области техники. В одном варианте осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит Fc область.

В настоящем документе термин «анти-CD117 антитело» или «антитело, которое связывается с CD117» относится к антителу, которое способно связывать CD117 с достаточной аффинностью, такой, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента в целенаправленном воздействии на CD117.

В настоящем документе термин «анти-CD45 антитело» или «антитело, которое связывается с CD45» относится к антителу, которое способно связывать CD45 с достаточной аффинностью, такой, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента в целенаправленном воздействии на CD45.

В настоящем документе термин «анти-CD2 антитело» или «антитело, которое связывается с CD2» или «анти-CD2 ADC» или «ADC, которое связывается с CD2»

относится к антителу или ADC, которое специфически связывается с CD2 человека, так как CD2 найден на клеточной поверхности клеток, таких как Т клетки.

В настоящем документе термин «анти-CD5 антитело» или «антитело, которое связывается с CD5» или «анти-CD5 ADC» или «ADC, которое связывается с CD5» относится к антителу или ADC, которое специфически связывается с CD5 человека, так как CD5 найден на клеточной поверхности клеток, таких как Т клетки.

В настоящем документе термин «анти-CD137 антитело» или «антитело, которое связывается с CD137» относится к антителу, которое способно связывать CD137 с достаточной аффинностью, такой, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента в целенаправленном воздействии на CD137.

В настоящем документе термин «анти-CD252 антитело» или «антитело, которое связывается с CD252» относится к антителу, которое способно связывать CD252 с достаточной аффинностью, такой, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента в целенаправленном воздействии на CD252. В предпочтительном варианте осуществления, антитело специфически связывается с CD252 человека (hCD252). CD252 найден на антигенпрезентирующих клетках.

В настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к, например, моноклональному, например, человеческому или гуманизированному антителу, которое способно связывать, по меньшей мере, два разных антигена или два разных эпитопа. Например, одна из специфичностей связывания может быть направлена на эпитоп на поверхностном антигене гемопоэтической стволовой клетки, CD117 (например, GNNK+ CD117), и другая может специфически связывать эпитоп на поверхностном антигене другой гемопоэтической стволовой клетки или поверхностном белке другой клетки, такой как рецептор или подъединица рецептора, вовлеченная в путь трансдукции сигналов, который потенцирует рост клетки, среди прочих. В некоторых вариантах осуществления, специфичности связывания могут быть направлены к уникальным, не перекрывающимся эпитопам на одном и том же антигене-мишени (т.е., бипаратопное антитело).

«Интактное» или «полноразмерное» антитело, как применяется в настоящем документе, относится к антителу, имеющему два полипептида тяжелой цепи (H) и два полипептида легкой (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенной в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенной в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. VH и VL области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, названные определяющими комплементарность областями (CDR),

перемежающиеся с областями, которые более консервативны, названными каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино конца к карбоксильному концу 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 антитела могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

В настоящем документе термин «определяющая комплементарность область» (CDR) относится к гипервариабельной области, найденной в вариабельных доменах и легкой цепи, и тяжелой цепи антитела. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называются каркасные области (FR). Аминокислотные положения, которые очерчивают гипервариабельную область антитела, могут варьироваться в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области техники. Некоторые положения в вариабельном домене могут рассматриваться в качестве гибридных гипервариабельных положений в том, что эти положения могут считаться находящимися в пределах гипервариабельной области при одном множестве критериев, и при этом считаются вне гипервариабельной области при другом множестве критериев. Одно или несколько из этих положений также могут быть найдены в расширенных гипервариабельных областях. Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре каркасных области, которые в первую очередь принимают конфигурацию β-пласта, соединенные тремя CDR, которые образуют петли, которые соединяют и, в некоторых случаях, образуют часть структуры β-пласта. CDR в каждой цепи держатся вместе в непосредственной близости от каркасных областей в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и, с CDR из цепей другого антитела, участвуют в образовании таргетного сайта связывания антитела (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD., 1987). В некоторых вариантах осуществления, нумерацию аминокислотных остатков иммуноглобулина проводят согласно системе нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулина по Kabat et al., если не указано иное (хотя может применяться любая схема нумерации антитела, включая, но не ограничиваясь ими, IMGT и Чотиа).

В настоящем документе термин «термический стресс» относится к стрессу, созданному любым изменением температуры молекулы, антитела, Fc содержащего его антигенсвязывающий фрагмент или ADC. В одном варианте осуществления, термическим стрессом является инкубация антитела, Fc содержащего его антигенсвязывающий фрагмент или ADC при 60 градусах Цельсия в течение 30 минут.

Термин «специфически связывается», как применяется в настоящем документе, относится к способности антитела (или ADC) распознавать и связываться со

специфической белковой структурой (эпитопом) скорее, чем с белками в общем. Если антитело является специфическим для эпитопа «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакционной смеси, содержащей меченый «А» и антитело, будет снижать количество меченого А, связанного с антителом. В качестве примера, антитело «связывается специфически» с мишенью, если антитело, будучи меченым, может конкурировать от свое мишени через соответствующее не меченое антитело. В одном варианте осуществления, антитело специфически связывается с мишенью, например, антигеном, экспрессированным гемопоэтическими стволовыми клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45; или антигеном, экспрессированным зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками), такими как CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252, если антитело имеет K_D для мишени, по меньшей мере, примерно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или менее (менее означает число, которое меньше 10^{-12}, например 10^{-13}). В одном варианте осуществления, термин «специфически связывается» относится к способности антитела связываться с антигеном с Kd, по меньшей мере, примерно 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или более и/или связываться с антигеном с аффинностью, которая, по меньшей мере, в два раза больше, беем его аффинность к не специфическому антигену. В одном варианте осуществления, K_D определяют согласно стандартной биослойной интерферометрией (BLI). Должно быть понятно, однако, что антитело может быть способно специфически связываться с двумя или несколькими антигенами, которые являются родственными по последовательности. Например, в одном варианте осуществления, антитело может специфически связываться с обоими, человеческим и не человеческим (например, мыши или примата, не являющегося человеком) ортологами антигена, например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252.

Термин «химерное» антитело, применяемый в настоящем документе, относится к антителу, имеющему вариабельные последовательности, полученные из не человеческого иммуноглобулина, такого как антитело крысы или мыши, и константные области иммуноглобулина человека, обычно выбранные из шаблона иммуноглобулина человека. Способы получения химерного антитела известны в данной области техники. См., например, Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; Патенты США №№ 5,807,715; 4,816,567; и 4,816,397.

Термины «Fc», «Fc область», «Fc домен» и «IgG Fc домен», как применяются в настоящем документе, относятся к части иммуноглобулина, например, молекулы IgG, которая коррелирует с кристаллизуемым фрагментом, полученным папаиновым перевaром IgG молекулы. Fc область содержит С-концевую половину двух тяжелых цепей IgG молекулы, которые связаны дисульфидными связями. Она не имеет антигенсвязывающей активности, но содержит углеводную группу и сайты связывания для комплемента и Fc рецепторов, включая FcRn рецептор (см. ниже). Например, Fc

домен содержит второй константный домен CH2 (например, остатки в EU положениях 231-340 IgG1 человека) и третий константный домен CH3 (например, остатки в EU положениях 341-447 IgG1 человека). Как применяется в настоящем документе, Fc домен включает «нижнюю шарнирную область» (например, остатки в EU положениях 233-239 IgG1).

Fc может относиться к этой области отдельно или этой области в контексте антитела, фрагмента антитело или Fc слитого белка. Полиморфизмы наблюдаются во множестве положений в Fc доменах, включая, но не ограничиваясь ими, EU положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358 и, таким образом, могут существовать незначительные различия между последовательностями, представленными в настоящей заявке, и последовательностями, известными в данной области техники. Таким образом, «IgG Fc домен дикого типа» или «ДТ IgG Fc домен» относится к любой существующей в природе IgG Fc области (т.е., любой аллели). Последовательности тяжелых цепей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека могут быть найдены во множестве баз данных последовательностей, например, в базе данных Uniprot (www.uniprot.org) под номерами доступа P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN) и P01861 (IGHG1_HUMAN), соответственно. Пример «ДТ» Fc области представлен в SEQ ID NO: 15 (которая представляет константную область тяжелой цепи, содержащую Fc область).

Термины «модифицированная Fc область» или «вариантная Fc область», применяемый в настоящем документе, относится к IgG Fc домену, содержащему одно или несколько аминокислотных замещений, делеций, вставок или модификаций, введенных в любое положение в Fc домене. В определенных аспектах, вариантный IgG Fc домен содержит одно или несколько аминокислотных замещений, дающих пониженную или исключенную аффинность связывания для FcгаммаR и/или C1q по сравнению с Fc доменом дикого типа, не содержащим одно или несколько аминокислотных замещений. Кроме того, связывающие взаимодействия Fc являются жизненно важными для множества эффекторных функций и нисходящих сигнальных событий включая, но не ограничиваясь ими,, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Следовательно, в определенных аспектах, антитело, содержащее вариантный Fc домен (например, антитело, слитый белок или конъюгат) может демонстрировать измененную аффинность связывания для, по меньшей мере, одного или нескольких Fc лигандов (например, Fc гамма Rs) относительно соответствующего антитела, в другом имеющего ту же аминокислотную последовательность, но не содержащую одно или несколько аминокислотных замещений, делеций, вставок или модификаций, таких как, например, не модифицированная Fc область, содержащая существующие в природе аминокислотные остатки в соответствующем положении в Fc области.

Вариантные Fc домены, описанные в настоящем документе, определены согласно аминокислотным модификациям, которые составляют их. Для всех аминокислотных замещений, обсуждаемых в настоящем документе, в отношении Fc области, нумерацию

всегда проводят согласно EU индексу как у Кэбота. Таким образом, например, D265C является Fc вариантом с аспарагиновой кислотой (D) в EU положении 265, замещенном цистеином (C) относительно исходного Fc домена. Подобным образом, например, D265C/L234A/L235A определяет вариантный Fc вариант с замещениями в EU положениях 265 (D на C), 234 (L на A) и 235 (L на A) относительно исходного Fc домена. Вариант также может быть обозначен согласно его конечной аминокислотной композиции в мутированных EU аминокислотных положениях. Например, L234A.L235A мутант может быть обозначен как «LALA». В качестве другого примера, E233P.L234V.L235A.delG236 (делеция 236) мутант может быть обозначен как «EPLVLAdelG». В еще одном примере, I253A.H310A.H435A мутант может быть обозначен как «IHH». Необходимо отметить, что порядок, в котором представлены замещения, является произвольным.

Термины «Fc гамма рецептор» или «Fc гамма R», как применяются в настоящем документе, относятся к любому члену семейства белков, которые связываются Fc область IgG антитела и кодированы Fc.гамма.R генами. У людей это семейство включает, но не ограничивается ими, Fc.гамма.RI (CD64), включая изоформы Fc.гамма.RIa, Fc.гамма.RIb и Fc.гамма.RIc; Fc.гамма.RII (CD32), включая изоформы Fc.гамма.RIIa (включая аллотипы H131 и R131), Fc.гамма.RIIb (включая Fc.гамма.RIIb-1 и Fc.гамма.RIIb-2) и Fc.гамма.RIIc; и Fc.гамма.RIII (CD16), включая изоформы Fc.гамма.RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc.гамма.RIIIb (включая аллотипы Fc.гамма.RIIIb-NA1 и Fc.гамма.RIIIb-NA2), а также любые неизвестные Fc.гамма.Rs или Fc.гамма.R изоформы или аллотипы человека. Fc.гамма.R может быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь ими, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc.гамма.Rs мыши включает, но не ограничивается ими Fc.гамма.RI (CD64), Fc.гамма.RII (CD32), Fc.гамма.RIII (CD16) и Fc.гамма.RIII-2 (CD16-2), а также любые неизвестные Fc.гамма.Rs или Fc.гамма.R изоформы или аллотипы мыши.

Термин «эффекторная функция», применяемый в настоящем документе, относится к биохимическому событию, которое возникает при взаимодействии Fc домена с Fc рецептором. Эффекторные функции включают, но не ограничиваются ими, ADCC, ADCP и CDC. Под «эффекторной клеткой», как применяется в настоящем документе, понимают клетку иммунной системы, которая экспрессирует один или несколько Fc рецепторов и медиирует одну или несколько эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, но не ограничивается ими моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, B клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангеранса, естественные киллеры (NK) и.гамма.дельта. T клетки, и могут быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь ими, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

Термин «выключенный», «выключают» или «выключение», применяемый в настоящем документе, относится к антителу, имеющему модифицированную Fc область, описанную в настоящем документе, которая имеет пониженное связывание Fc гамма рецептора (FcγR) относительно связывания идентичного антитела, содержащего

немодифицированную Fc область с FcγR (например, снижение связывания с FcγR на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcγR по данным, например, BLI). В некоторых вариантах осуществления, Fc выключенное антитело не имеет определяемого связывания с FcγR. Связывание антитела, имеющего модифицированную Fc область, с FcγR может быть определено с применением множества методов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, методы равновесия (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализ (RIA)) или анализом поверхностного плазмонного резонанса или другим механизмом анализа на основе кинетики (например, BIACORE.RTM. анализом или Octet.RTM. анализом (forteBIO)) и другими способами, такими как анализы косвенного связывания, анализы конкурентного связывания резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорезом и хроматографией (например, гель-фильтрационной). Эти и другие способы могут применять метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или применять множество способов определения, включая, но не ограничиваясь ими, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетики можно найти в Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), который сфокусирован на взаимодействиях антитело-иммуноген. Одним примером анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубирование меченого антигена с антителом, представляющим интерес, в присутствии увеличивающихся количеств немеченого антигена и определение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность антитела, представляющего интерес, к конкретному антигену и скорость диссоциации связывания могут быть определены из данных анализа распределения Скэтчарда. Конкуренция со вторым антителом также может быть определена с применением радиоиммуноанализов. В этом случае, антиген инкубирован с антителом, представляющим интерес, конъюгированным с меченым соединением в присутствии увеличивающих количеств немеченого второго антитела.

В настоящем документе термин «идентичное антитело, содержащее немодифицированную Fc область» относится к антителу которое не имеет перечисленные аминокислотные замещения (например, D265C, L234A, L235A и/или H435A), но в другом имеет ту же аминокислотную последовательность, как и Fc модифицированное антитело, с которым его сравнивают.

Термины «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой полипептид, содержащий Fc домен, например, антитело, связанное на Fc рецепторах (FcRs), присутствует на определенных цитотоксических клетках (например, первичных NK клетках, нейтрофилах и макрофагах) и позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам связываться

специфически с несущей антиген «клеткой-мишенью» и затем уничтожать клетку-мишень с цитотоксинами. (Hogarth et al., Nature review Drug Discovery 2012, 11:313) Предполагается, что, в дополнение к антителам и их фрагментам, другие полипептиды, содержащие Fc домены, например, Fc слитые белки и Fc конъюгатные белки, имеющие способность специфически связываться с несущей антиген клеткой-мишенью, будут способны вызывать клеточно-опосредованную цитотоксичность.

Для простоты, клеточно-опосредованная цитотоксичность, возникающая при активности полипептида, содержащего Fc домен, также называется в настоящем документе ADCC активность. Может быть проанализирована способность любого конкретного полипептида настоящего описания опосредовать лизис клетки-мишени через ADCC. Для получения ADCC активности, полипептид, представляющий интерес (например, антитело) добавляют к клеткам-мишеням в комбинации с иммунными эффекторными клетками, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз обычно определяют выделением метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллеры (NK). Специфические примеры in vitro ADCC анализов описаны в Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351 (1987); Wilkinson et al., J. Immunol. Methods 258:183 (2001); Patel et al., J. Immunol. Methods 184:29 (1995). Альтернативно или дополнительно, ADCC активность антитела, представляющего интерес, может оцениваться in vivo, например, в животной модели, такой как описана в Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652 (1998).

В настоящем документе термины «подготавливать» и «подготовка» относятся к процессам, которыми пациента подготавливают к получению трансплантата, например, трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. Такие методики способствуют энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки (например, как установлено на основе устойчивого повышения количества жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток в образце крови, взятом у пациента после процедуры подготовки и последующей трансплантации гемопоэтической стволовой клетки. Согласно способам, описанным в настоящем документе, пациент может быть подготовлен для терапии трансплантацией гемопоэтической стволовой клеткой через введение пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками, такой как CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252. Как описано в настоящем документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием ADC. Введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, способного связывать одни или несколько из вышеупомянутых антигенов, пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки, может способствовать энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки, например, через селективное обеднение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток,

тем самым создавая вакансию, заполненную трансплантатом экзогенной гемопоэтической стволовой клетки.

В настоящем документе термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое достаточно для желаемого результата или оказания действия на аутоиммунное заболевание или рак.

В настоящем документе термин «период полужизни» относится к времени, которое требуется для снижения концентрации лекарственного антитела в плазме в теле до половины или 50%. Такое 50% снижение концентрации в сыворотке отражает количество лекарственного средства в кровотоке.

В настоящем документе термин «антитело человека» предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученных последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитело человека может включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или во время перестройки гена или соматические мутации in vivo). Однако, термин «антитело человека», как применяется в настоящем документе, не предназначен для включения антител, в которых CDR последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Антитело человека может быть получено в клетке человека (например, рекомбинантной экспрессией) или животного, не относящегося к человеку, или прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены иммуноглобулина человека (такие как тяжелая цепь и/или легкая цепь). Если антителом человека является одноцепочечное антитело, оно может включать линкерный пептид, который не найден в нативных антителах человека. Например, Fv может содержать линкерный пептид, например, от двух до примерно восьми глициновых или других аминокислотных остатков, которые соединяют вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Считают, что такие линкерные пептиды имеют происхождение от человека. Антитела человека могут быть получены множеством способов, известных в данной области техники, включая способы фагового дисплея с применением библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. Антитела человека также могут быть получены с применением трансгенной мыши, которая не способна экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которая способна экспрессироваться гены иммуноглобулина человека (см., например, Публикации PCT №№ WO 1998/24893; WO 1992/01047; WO 1996/34096; WO 1996/33735; 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).

«Гуманизированные» формы не человеческих (например, мышиных) антител являются химерными иммуноглобулинами, которые содержат минимальные последовательности, полученные из не человеческого иммуноглобулина. В общем,

гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере, одного и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все CDR области соответствуют таковым не человеческого иммуноглобулина, и все или по существу все FR области являются таковыми последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать, по меньшей мере, часть константной области (Fc)иммуноглобулина, обычно консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антитела известны в данной области техники. См., например, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; Патенты США №№ 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; и 6,180,370 от Queen et al.; EP239400; Публикация PCT № 91/09967; Патент США № 5,225,539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; и Патент США № 5,565,332.

В настоящем документе термин «потенциал энграфтмента» применяют для обозначения способности гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников репопулировать ткань, независимо от того, являются ли такие клетки циркулирующими по природе или предоставленными трансплантацией. Термин охватывает все события, окружающие или приводящие к энграфтменту, такие как хоуминг клеток в ткань и колонизацию клеток в ткани, представляющей интерес. Эффективность энграфтмента или скорость энграфтмента может быть оценена или количественно оценена с применением любого клинически приемлемого параметра, известного специалисту в данной области техники, и может включать, например, оценку конкурентных репопулирующих единиц (CRU); включение или экспрессию маркера в ткани, в которую заселили, колонизировали или были пересажены стволовые клетки; или оценкой прогресса у пациента через прогрессирование заболевания, выживание гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников или выживание реципиента. Энграфтмент также может быть определен через измерение количества лейкоцитов в периферической крови во время периода после трансплантации. Энграфтмент также может быть оценен через измерение восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце пунктата костного мозга.

Как применяется настоящем документе, термин «гемопоэтические стволовые клетки» («HSC») относится к незрелым клеткам крови, имеющим способность самообновляться и дифференцировать в зрелые клетки крови, содержащие разные клеточные линии, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK клетки, B клетки и T клетки). Такие клетки могут включать $CD34^+$ клетки. $CD34^+$ клетки являются незрелыми клетками, которые экспрессируют CD34 поверхностноклеточный маркер. У людей, полагают, что CD34+ клетки включают субпопуляцию клеток со свойствами

стволовых клеток, определенными выше, в то время как у мышей, HSC являются CD34-. Кроме того, HSC также относятся к долгосрочным репопулирующим HSC (LT-HSC) и краткосрочным репопулирующим HSC (ST-HSC). LT-HSC и ST-HSC дифференцируются на основе функционального потенциала и на экспрессии поверхностноклеточного маркера. Например, HSC человека являются CD34+, CD38-, CD45RA-, CD90+, CD49F+ и lin- (отрицательные к маркерам зрелых клеточных линий, включая CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11B, CD19, CD20, CD56, CD235A). У мышей, LT-HSC костного мозга являются CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+, CD48- и lin- (отрицательные к маркерам зрелых клеточных линий, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra), в то время как ST-HSC являются CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+ и lin- (отрицательные к маркерам зрелых клеточных линий, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra). Кроме того, ST-HSC являются менее покоящимися и более пролиферативными, чем LT-HSC в условиях гомеостаза. Однако LT-HSC имеют больший потенциал к самообновлению (т.е., они выживают в течение всей взрослой жизни и могут быть серийно трансплантированы нескольким последовательным реципиентам), в то время как ST-HSC имеют ограниченное самообновление (т.е., они выживают только ограниченный период времени и не обладают потенциалом к серийной трансплантации). Любые из этих HSC могут применяться в способах, описанных в настоящем документе. ST-HSC особенно полезны, так как они являются высоко пролиферативными и, таким образом, могут более быстро давать начало дифференцированному потомству.

В настоящем документе термин «антитело против анти-гемопоэтической клетки» или «анти-HC антитело» относится к антителу, которое специфически связывает антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45; или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками), таким как CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252.

Как применяется настоящем документе, термин «функциональный потенциал гемопоэтической стволовой клетки» относится к функциональным свойствам гемопоэтических стволовых клеток, которые включают 1) мультипотенциал (который относится к способности дифференцировать во множество разных клеточных линия крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK клетки, Т клетки и В клетки), 2) самообновление (которое относится к способности гемопоэтических стволовых клеток давать начало дочерним клеткам, которые имеют потенциал, эквивалентный материнским клеткам, и кроме того, эта способность может повторно возникать в течение жизни индивидуума без истощения) и 3) способность гемопоэтических стволовых клеток или их потомства к повторному введению в

трансплантат реципиента после чего они размещаются в нише гемопоэтической стволовой клетки и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, например человеку, который получает лечение определенного заболевания или состояния, как описано в настоящем документе. Например, пациент, такой как пациент-человек, может получить лечение до терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки для стимулирования энграфтмента экзогенных гемопоэтических стволовых клеток.

В настоящем документе термин «донор» относится к человеку или животному, у которого берут одну или несколько клеток перед введением этих клеток или их потомства реципиенту. Одна или несколько клеток могут быть, например, популяцией гемопоэтических стволовых клеток.

В настоящем документе термин «диатело» относится к двухвалентному антителу, содержащему две полипептидных цепи, в которых каждая полипептидная цепь включает V_H и V_L домены, соединенные линкером, который слишком короткий (например, линкером, состоящим из пяти аминокислот) чтобы позволить интрамолекулярную ассоциацию V_H и V_L доменов на одной и той же пептидной цепи. Такая конфигурация заставляет каждый домен спариваться с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи так, чтобы получить гомодимерную структуру. Следовательно, 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 исключительно коротким (например, линкером, состоящим из 1-2 аминокислот) чтобы позволить интрамолекулярную ассоциацию V_H и V_L доменов на одной и той же пептидной цепи. Для свертывания в их нативные структуры, пептиды, сконфигурированные таким образом, обычно тримеризуются так, чтобы положение V_H и V_L доменов соседних пептидных цепей были пространственно близки друг к другу (см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993).

В настоящем документе термин «эндогенное» описывает вещество, такое как молекула, клетку, ткань или орган (например, гемопоэтическую стволовую клетку или клетку гемопоэтической линии, такую как мегакариоцит, тромбоцит, тромбоцит, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, естественный киллер, Т-лимфоцит или В-лимфоцит), которое найдено в природе в конкретном организме, таком как пациент-человек.

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

В настоящем документе термин «образец» относится к образцу (например, крови, компонента крови (например, сыворотки или плазмы), мочи, слюны, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, ткани (например, плаценты или кожи),

панкреатического сока, образца ворсин хориона и клеток), взятых у субъекта.

В настоящем документе термин «scFv» относится к одноцепочечному Fv антителу, в котором вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи из антитела соединены с образованием одной цепи. scFv фрагменты содержат одну полипептидную цепь, которая включает вариабельную область легкой цепи антитела (V_L) (например, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (V_H) (например, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3) разделенные линкером. Линкером, который соединяет V_L и V_H области scFv фрагмента, может быть пептидный линкер, состоящий из протеиногенных аминокислот. Альтернативные линкеры могут применяться для повышения резистентности scFv фрагмента к протеолитическому разложению (например, линкеры, содержащие D-аминокислоты), для улучшения растворимости scFv фрагмента (например, гидрофильные линкеры, такие как содержащие полиэтиленгликоль линкеры или полипептиды, содержащие повторяющийся глициновые и сериновые остатки), для улучшения биофизической стабильности молекулы (например, линкеры, содержащие цистеиновые остатки, которые образуют интрамолекулярные или интермолекулярные дисульфидные связи) или для ослабления иммуногенности scFv фрагмента (например, линкеры, содержащие сайты гликозилирования). Также специалисту в данной области техники должно быть понятно, что вариабельные области scFv молекул, описанных в настоящем документе, могут быть модифицированы так, что они отличаться в аминокислотной последовательности от молекулы антитела, из которого они были получены. Например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замещения, приводящие у консервативным замещениям или изменениям на аминокислотных остатках (например, в CDR и/или каркасных остатках) так, чтобы сохранить или улучшить способность scFv связываться с антигеном, распознанным соответствующим антителом.

Как применяется в настоящем документе, фраза «по существу выведенный из крови» относится к моменту времени после введения терапевтического агента (такого как анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) пациенту, когда концентрация терапевтического агента в образце крови, взятом у пациента, такова, что терапевтический агент не определяется обычными средствами (например, такова, что терапевтический агент не определяется выше шумового порога устройства или анализа, применяемого для определения терапевтического агента). Множество методов, известных в данной области техники, может применяться для определения антител, фрагментов антитела и белковых лигандов, такие как анализы определения на основе ELISA, известные в данной области техники или описанные в настоящем документе. Дополнительные анализы, которые могут применяться для определения антител или фрагментов антитела, включают методы иммунопреципитации и иммунобластные анализы, среди прочих, известных в данной области техники.

В настоящем документе термин «трансфекция» относится к любому из широкого множества методов, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, таких как электропорация,

липофекция, преципитация фосфатом кальция, трансфекция DEAE-декстраном и подобные.

Как применяется в настоящем документе «лечить» или «лечение» относится к уменьшению тяжести и/или частоты симптомов заболевания, исключению симптомов заболевания и/или основной причины указанных симптомов, снижению частоты или вероятности симптомов заболевания и/или их первопричины и улучшению или исправлению повреждений, прямо или косвенно вызванных болезнью, любому улучшению любых последствий заболевания, например, увеличению выживаемости, снижению заболеваемости и/или уменьшению побочных эффектов, которые являются побочными продуктами альтернативного терапевтического воздействия; как легко понять в данной области техники, полное искоренение болезни является предпочтительным, но не обязательным требованием для лечебного действия. Положительные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, стимулирование энграфтмента экзогенных гемопоэтических клеток у пациента после подготавливающей терапии антителом, как описано в настоящем документе, и последующей терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Дополнительные положительные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантате гемопоэтической стволовой клетки после подготавливающей терапии и последующего введения пациенту трансплантата экзогенной гемопоэтической стволовой клетки. Положительные результаты терапии, описанной в настоящем документе, могут также включать увеличение количества клеток или относительной концентрации одной или нескольких клеток гемопоэтической линии, таких как мегакариоцит, тромбоцит, тромбоцит, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, естественный киллер, Т лимфоцит или В лимфоцит, после подготавливающей терапии и последующей терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Дополнительные положительные результаты могут включать уменьшение количества вызывающей заболевание популяции клеток, такой как популяция раковых клеток (например, CD117+ лейкозных клеток) или аутоиммунных клеток (например, CD117+ аутоиммунных лимфоцитов, таких как CD117+ Т клетки, которые экспрессируют Т клеточный рецептор, который перекрестно реагирует с собственным антигеном). Поскольку способы настоящего описания направлены на профилактику расстройств, следует понимать, что термин «профилактика» не требует полного предотвращения болезненного состояния. Скорее, в настоящем документе термин «профилактика» относится к способности специалиста в данной области техники идентифицировать популяцию, восприимчивую к расстройствам, так что введение соединений настоящего описания может происходить до начала заболевания. Термин не означает, что можно полностью избежать болезненного состояния.

Как применяется в настоящем документе, пациенты, которые «нуждаются в»

трансплантате гемопоэтической стволовой клетки включают пациентов, которые демонстрируют дефект дефицита одного или нескольких типов клеток, а также пациентов, имеющих расстройство стволовой клетки, аутоиммунное заболевание, рак или другую патологию, описанную в настоящем документе. Гемопоэтические стволовые клетки в общем демонстрируют 1) мультипотенциал, и могут, таким образом дифференцировать во множество разных клеточных линий крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK клетки, B клетки и T клетки), 2) самообновление, и могут, таким образом, давать начало дочерним клеткам, которые имеют потенциал, эквивалентный материнским клеткам, и 3) способность к повторному введению в трансплантат реципиента после чего они размещаются в нише гемопоэтической стволовой клетки и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз. Гемопоэтические стволовые клетки, таким образом, могут вводиться пациенту с дефектом или дефицитом одного или нескольких типов клеток гемапоэтической линии для воссоздания дефектной или недостаточной популяции клеток in vivo. Например, пациент может страдать от рака, и дефицит может быть вызван введением химиотерапевтического агента или другого лекарственного средства, которое истощает, либо селективно, либо неспецифически, популяцию раковых клеток. Дополнительно или альтернативно, пациент может страдать от гемоглобинопатии (например, незлокачественной гемоглобинопатии), такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия и синдром Вискотта-Олдрича. Субъектом может быть тот, кто страдает аденозиндезаминазным тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ADA SCID), ВИЧ/СПИД, метахроматической лейкодистрофией, анемией Даймонда-Блэкфана и синдромом Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или быть пораженным наследственным расстройством крови (например, серповидноклеточной анемией) или аутоиммунным расстройством. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или быть пораженным злокачественным новообразованием, таким как нейробластома или гематологический рак. Например, субъект может иметь лейкоз, лимфому или миелому. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную B-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет аутоиммунное заболевание, такое как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона, диабет 1 типа или другую аутоиммунную патологию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект нуждается в терапии T-клеточным химерным антигенным рецептором (CART). В некоторых вариантах

осуществления, субъект имеет или иным образом поражен расстройством обмена веществ. Субъект может страдать или иным образом быть пораженным метаболическим расстройством, выбранным из группы, состоящей из нарушений отложения гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или расстройств, которым могут помочь методы лечения и терапии, описанных в настоящем документе и включающих, без ограничений, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипер иммуноглобулина М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаши, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и те заболевания или расстройства, которые описаны в «Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease» ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которое включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью, в том, что касается патологий, которые могут быть лечены введением терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Дополнительно или альтернативно, пациентом, «нуждающийся» в трансплантате гемопоэтической стволовой клетки, может быть такой, который не страдает одной из вышеупомянутых патологий, но тем не менее демонстрирует пониженный уровень (например, по сравнению с в другом здоровым субъектом) одной или нескольких типов эндогенных клеток в гемопоэтической линии, таких как мегакариоциты, тромбоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглия, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры, Т лимфоциты и В-лимфоциты. Специалист в данной области техники может легко определить, снижен ли уровень одного или нескольких из вышеупомянутых типов клеток или другого типа клеток крови по сравнению со здоровым субъектом, например, с помощью способов проточной цитометрии и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), среди других процедур, известных в данной области техники.

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

Как применяется в настоящем документе, фраза «расстройство стволовых клеток» в широком смысле относится к любому заболеванию, расстройству или состоянию, которое можно лечить или вылечить путем подготовки тканей-мишеней субъекта и/или путем абляции популяции эндогенных стволовых клеток в ткани-мишени (например, абляции популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-

предшественников из ткани костного мозга субъекта) и/или путем энграфтмента или трансплантации стволовых клеток в тканях-мишенях субъекта. Например, было показано, что диабет типа I излечивается с помощью трансплантата гемопоэтических стволовых клеток и может получать пользу от подготовки в соответствии с композицией и способами, описанными в настоящем документе. Дополнительные расстройства, которые можно лечить с использованием композицией и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, серповидноклеточную анемию, талассемии, анемию Фанкони, апластическую анемию, синдром Вискотта-Олдрича, ADA SCID, ВИЧ/СПИД, метахроматическую лейкодистрофию, анемию Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-Даймонда. Дополнительные заболевания, которые можно лечить с использованием способов подготовки пациента и/или трансплантата гемопоэтической стволовой клетки, описанных в настоящем документе, включают наследственные заболевания крови (например, серповидноклеточную анемию) и аутоиммунные нарушения, такие как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит и болезнь Крона. Дополнительные заболевания, которые можно лечить с использованием способов подготовки и/или трансплантации, описанных в настоящем документе, включают злокачественные новообразования, такие как нейробластома, или гематологический рак, такой как лейкоз, лимфома и миелома. Например, раком может быть острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома или неходжкинская лимфома. Дополнительные заболевания, поддающиеся лечению с использованием способов подготовки и/или трансплантации, описанных в настоящем документе, включают миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или иным образом поражен метаболическим расстройством накопления. Например, субъект может страдать или иным образом быть пораженным метаболическим расстройством, выбранным из группы, состоящей из нарушений отложения гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или расстройств, которым может помочь лечение и терапия, описанные в настоящем документе, и включая, без ограничений, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулина М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаши, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и те заболевания или расстройства, которые описаны в «Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease» ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которое включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью, в том, что касается патологий, которые могут быть лечены введением терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки.

В настоящем документе термин «вектор» включает вектор нуклеиновой кислоты,

такой как плазмида, ДНК вектор, плазмида, РНК вектор, вирус или другой подходящий репликон. Векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, могут содержать полинуклеотидную последовательность, а также, например, дополнительные элементы последовательности, применяемые для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клетки млекопитающего. Определенные векторы, которые могут применяться для экспрессии антител и фрагментов антитела по изобретению включает плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как области промотора и энхансера, которые направляют транскрипцию гена. Другие полезные векторы для экспрессии антител и фрагментов антитела содержат полинуклеотидные последовательности которые улучшают скорость трансляции этих генов или улучшают стабильность или ядерный экспорт иРНК, которые являются результатом транскрипции гена. Эти последовательности элементов могут включать, например, 5' и 3' нетранслированные области и сайт сигнала полиаденилирования для направления эффективной транскрипции гена, переносимого вектором экспрессии. Векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, также могут содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для выбора клеток, которые содержат такой вектор. Примеры подходящего маркера включают гены, которые кодируют резистентность к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин и нурсеотрицин.

В настоящем документе термин «конъюгат» или «конъюгат антитело-лекарственное средство» или «ADC» относится к антителу, которое связано с цитотоксином. ADC образуют химическим связыванием реакционноспособной функциональной группы одной молекулы, такой как антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, с подходящей реакционноспособной функциональной группой другой молекулы, такой как цитотоксин, описанный в настоящем документе. Конъюгаты могут включать линкер между двумя молекулами, связанными друг с другом, *например,* между антителом и цитотоксином. Примеры линкеров, которые могут применяться для образования конъюгата, включают пептидсодержащие линкеры, такие, которые содержат существующие в природе или не существующие в природе аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры могут быть получены с применением множества стратегий, описанных в настоящем документе, и известны в данной области техники. В зависимости от реакционноспособных компонентов в настоящем документе, линкер может быть расщеплен, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в основных условиях, окислением, восстановлением дисульфида, нуклеофильным расщеплением или металлорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012).

В настоящем документе термин «агент, связывающий микротрубочки» относится к соединению, которое действует через разрывание сети микротрубочек, которая жизненно важна для митотической и межфазной клеточной функции в клетке. Примеры агентов, связывающих микротрубочки, включают, но не ограничивается ими, майтазин, майтанзиноиды и их производные, такие как описаны в настоящем документе или

известны в данной области техники, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винбластин сульфат, винкристин, сульфат винкристина, виндезин и винорелбин, таксаны, такие как доцетаксел и паклитаксел, макролиды, такие как дискодермолиды, кохицин и эпотилоны, и их производные, такие как эпотилон B или его производное.

В настоящем документе термин «аматоксин» относится к члену семейства аматоксинов пептидов, продуцированных грибами Amanita phalloides или его варианту или производному, такому как его вариант или производное, способное ингибировать активность РНК полимеразы II. Аматоксины, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения, такие как, но не ограничиваясь ими, соединения формул (III), (IIIA), (IIIB) и (IIIC), каждое как описано в настоящем документе ниже (*например,* α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновой кислоты или проамануллин). Как описано в настоящем документе, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, путем линкерной группы (L) (таким образом образуя ADC). Типовые способы конъюгации аматоксина и линкеры, применяемые для таких процессов, описаны ниже. Типовые линкерсодержащие аматоксины, применяемые для конъюгации антитела или антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с композициями и способами, также описаны в настоящем документе.

Термин «ацил», применяемый в настоящем документе, относится к -C(=O)R, где R является водородом («альдегидом»), C_1-C_{12} алкилом, C_2-C_{12} алкенилом, C_2-C_{12} алкинилом, C_3-C_7 карбоциклилом, C_6-C_{20} арилом, 5-10-членным гетероарилом или 5-10-членным гетероциклилом, как определено в настоящем документе. Неограничивающие примеры включают формил, ацетил, пропаноил, бензоил и акрилоил.

Термин «C_1-C_{12} алкил», применяемый в настоящем документе, относится к прямой или разветвленной цепи, насыщенному углеводороду, имеющему от 1 до 12 атомов углерода. Типовые C_1-C_{12} алкильные группы включают, но не ограничивается ими, -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил и -н-гексил; а разветвленные C_1-C_{12} алкилы включают, но не ограничиваются ими, -изопропил, -втор-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил и 2-метилбутил. C_1-C_{12} алкильная группа может быть незамещенной или замещенной.

Термин «алкенил», применяемый в настоящем документе, относится к C_2-C_{12} углеводороду, содержащему нормальные, вторичные или третичные атомы углерода с, по меньшей мере, одним центром ненасыщенности, т.е., sp2 двойной связью углерод-углерод. Примеры включают, но не ограничиваются ими: этилен или винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил и подобные. Алкенильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Алкинил», применяемый в настоящем документе, относится к C_2-C_{12} углеводороду, содержащему нормальные, вторичные или третичные атомы углерода с, по

меньшей мере, одним центром ненасыщенности, т.е., sp тройной связью углерод-углерод. Примеры включают, но не ограничиваются ими: ацетиленовый и пропаргил. Алкинильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Арил», применяемый в настоящем документе, относится к C_6-C_{20} карбоциклической ароматической группе. Примеры арильных групп включают, но не ограничивается ими, фенил, нафтил и антраценил. Арильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Арилалкил», применяемый в настоящем документе, относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один или несколько атомов водорода, связанные с атомом углерода, обычно концевым или sp^3 атомом углерода, замещены арильным радикалом. Типовые арилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилethen-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и подобные. Арилалкильная группа содержит 6-20 атомов углерода, например, алкильная группа, включая алканильные, алкенильные или алкинильные группы, арилалкильной группы имеет 1-6 атомов углерода, и арильная группа имеет 5-14 атомов углерода. Алкарильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Циклоалкил», применяемый в настоящем документе, относится к насыщенному карбоциклическому радикалу, который может быть моно- или бициклическим. Циклоалкильные группы включают кольцо, имеющее 3-7 атомов в кольце, такое как моноциклическое, или 7-12 атомов в кольце, такое как бициклическое. Примеры моноциклических циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Циклоалкильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Циклоалкенил», применяемый в настоящем документе, относится к ненасыщенному карбоциклическому радикалу, который может быть моно- или бициклическим. Циклоалкенильные группы включают кольцо, имеющее 3-6 атомов углерода, такое как моноцикл, или 7-12 атомов углерода, такое как бицикл. Примеры моноциклических циклоалкенильных групп включают 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил и 1-циклогекс-3-енил. Циклоалкенильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Гетероаралкил», применяемый в настоящем документе, относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно является концевым или sp^3 атомом углерода, замещен гетероарильным радикалом. Типовые гетероарилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и подобные. Гетероарилалкильная группа содержит 6-20 атомов углерода, например алкильная группа, включая алканильные, алкенильные или алкинильные группы, гетероарилалкильной группы имеет 1-6 атомов углерода, и гетероарильная группа имеет 5-14 атомов углерода и 1-3 гетероатома, выбранных из N, O, P и S. Гетероарильная группа гетероарилалкильной

группы может быть моноциклом, имеющим 3-7 членов кольца (2-6 атомов углерода) или бициклом, имеющим 7-10 членов кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системой.

«Гетероарил» и «гетероциклоалкил», как применяется в настоящем документе, относится к ароматической или не ароматической кольцевой системе, соответственно, в которой одним или несколькими атомами кольца является гетероатом, например азот, кислород и сера. Гетероарильный или гетероциклоалкильный радикал содержит 2-20 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероарилом или гетероциклоалкилом может быть моноцикл, имеющий 3-7 членов кольца (2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатом, выбранных из N, O, P и S) или бициклом, имеющим 7-10 членов кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системой. Гетероарил и гетероциклоалкил может быть незамещенным или замещенным.

Гетероарильные и гетероциклоалкильные группы описаны у Paquette, Leo A.; «Principles of Modern Heterocyclic Chemistry» (W. A. Benjamin, New York, 1968), в частности в главах 1, 3, 4, 6, 7 и 9; «The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs» (John Wiley & Sons, New York, 1950 до настоящего времени), в частности тома 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Примеры гетероарильных групп включают, но не ограничиваются ими, пиридил, тиазолил, тетрагидротиофенил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталенил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3H-индолил, 1H-индазолил, пуринил, 4H-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4aH-карбазолил, карбазолил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, бензотриазолил, бензизоксазолил и изатиноил.

Примеры гетероциклоалкилов включают в качестве примера, а не ограничения, дигидропиридил, тетрагидропиридили (пиперидил), тетрагидротиофенил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, пиперазинил, хинуклидинили и морфолинил.

В качестве примера, но не ограничения, углерод-связанные гетероарилы и гетероциклоалкилы связаны в положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиофурана, тиофена, пиррола или тетрагидропиррода, положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, положении 2 или 3 азиридина, положении 2,

3 или 4 азетидина, положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина. Еще более типично, углерод-связанные гетероциклы включают 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 5-пиридил, 6-пиридил, 3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил, 6-пиридазинил, 2-пирмидинил, 4-пирмидинил, 5-пирмидинил, 6-пирмидинил, 2-пиразинил, 3-пиразинил, 5-пиразинил, 6-пиразинил, 2-тиазолил, 4-тиазолил или 5-тиазолил.

В качестве примера и без ограничений, азот-связанные гетероарилы и гетероциклоалкилы связаны в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола, положении 2 изоиндола или изоиндолина, положении 4 морфолина и положении 9 карбазола или бета-карболина. Еще более типично, азот-связанные гетероциклы включают 1-азиридил, 1-азетедил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиразолил и 1-пиперидинил.

«Замещенный», как применяется в настоящем документе и применительно к любому из вышеуказанных алкила, алкенила, алкинила, арила, арилалкила, циклоалкила, гетероарила, гетероциклила и подобных, означает, что каждый из одного или нескольких атомов водорода независимо замещен заместителем. Если иное не ограничено определением индивидуального заместителя, вышеупомянутые химические группы, такие как «алкил», «гетероалкил», «алкенил», «гетероалкенил», «алкинил», «гетероалкинил», «циклоалкил», «гетероциклоалкил», «арил» и «гетероарил», могут быть необязательно замещены, например, от 1 до 5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкинила, циклоалкила, гетероциклоалкила, алкиларила, алкилгетероарила, алкилциклоалкила, алкилгетероциклоалкила, амино, аммиака, ацила, ацилокси, ациламино, аминокарбонила, алкоксикарбонила, уреидо, карбамата, арила, гетероарила, сульфинила, сульфонила, алкокси, сульфанила, галогена, карбокси, тригалометила, циано, гидрокси, меркапто, нитро и подобных. Типовые заместители включают, но не ограничиваются ими, -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, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(R)_2$, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)N(R)_2$, $-C(=NH)NH_2$ и $-C(=NR)N(R)_2$; где каждый X независимо выбран для каждого случая из F, Cl, Br и I; и каждый R независимо выбран для каждого случая из C_1-C_{12} алкила, C_6-C_{20} арила, C_3-C_{14} гетероциклоалкила или гетероарила, защитной группы и группы пролекарства. Везде, где группа описана как «необязательно замещенная», эта группа может быть замещена одним или несколькими из указанных выше заместителей, независимо для каждого случая. Замещение может включать ситуации, в которых соседние заместители подверглись замыканию кольца, например замыканию кольца вицинальных функциональных заместителей для формирования, например, лактамов,

лактонов, циклических ангидридов, ацеталей, полуацеталей, тиоацеталей, аминалей и полуаминалей, образованных замыканием кольца, например, для обеспечения защитной группы.

Следует понимать, что некоторые соглашения о наименовании радикалов могут включать в себя либо монорадикал, либо дирадикал, в зависимости от контекста. Например, когда для заместителя требуются две точки присоединения к остальной части молекулы, подразумевается, что заместитель является дирадикалом. Например, заместитель, идентифицированный как алкил, который требует две точки присоединения, включает дирадикалы, такие как $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ и подобные. Другие соглашения о наименовании радикалов четко указывают, что радикалом является дирадикал, такой как «алкилен», «алкенилен», «арилен», «гетероциклоалкилен» и подобные.

В настоящем документе термин «реакция сочетания» относится к химической реакции, в которой два или более заместителя, подходящие для взаимодействия друг с другом, реагируют с образованием химической группы, которая соединяет (например, ковалентно) молекулярные фрагменты, связанные с каждым заместителем. Реакции сочетания включают реакции, в которых реакционноспособный заместитель, связанный с фрагментом, которым является цитотоксин, такой как цитотоксин, известный в данной области техники или описанный в настоящем документе, реагирует с соответствующим реакционноспособным заместителем, связанным с фрагментом, которым является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такие как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфический для CD117 (такой как GNNK+ CD117), известный в данной области техники или описанный в настоящем документе. Примеры подходящих реакционноспособных заместителей включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галоалкил, пару амин/карбонил или пару тиол/α,β-ненасыщенный карбонил, среди прочих), пару диен/диенофил (например, пару азид/алкин, среди прочих) и подобные. Реакции сочетания включают, без ограничений, алкилирование тиола, алкилирование гидрокси, алкилирование амина, конденсацию амина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение по Хьюисгену, среди прочих), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционноспособные формы, известные в данной области техники, или описанные в настоящем документе.

Как применяется в настоящем документе, «CRU (конкурентная репопулирующая единица)» относится к единицы меры долговременных прививаемых стволовых клеток, которые могут быть определены после in vivo трансплантации.

Как применяется в настоящем документе, «соотношение лекарственное средство к антителу» или «DAR» относится к количеству цитотоксинов, например, аматоксина, прикрепленных к антителу ADC. DAR ADC может варьироваться от 1 до 8, хотя возможны и более высокие нагрузки в зависимости от количества сайтов связывания на

антителе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, ADC, описанный в настоящем документе, имеет DAR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Везде, где заместитель изображен как дирадикал (т.е. имеет две точки присоединения к остальной части молекулы), следует понимать, что заместитель может быть присоединен в любой направленной конфигурации, если не указано иное.

Fc-модифицированные антитела

Настоящее описание частично основано на открытии, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие Fc модификации, которые позволяют Fc выключение, способные связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими клетками, могут применяться в качестве терапевтических агентов. Например, настоящее описание основана, частично, на открытии, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие Fc модификации, которые позволяют Fc выключение, способные связывать (i) антиген, экспрессированный гемопоэтическими клетками, включая, но не ограничиваясь ими, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45; или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками), включая, но не ограничиваясь ими, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252, могут применяться в качестве терапевтических агентов (например, в виде «оголенных» антител или в виде ADC для (i) лечения раков и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся CD117+ (например, GNNK+ CD117) или CD45+ гемопоэтическими стволовыми клетками; или CD45+, CD2+, CD5+, CD137+ или CD252+ иммунными клетками (например, Т клетками) и (ii) облегчения энграфтмента трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в терапии трансплантатом. Такие терапевтические действия могут быть вызваны, например, связыванием (HC)-антителом против гемопоэтической клетки (например, анти-CD117 антителом, анти-CD45 антителом, анти-CD2 антителом, анти-CD5 антителом, анти-CD137 антителом, анти-CD252 антителом и т.д.) или его антигенсвязывающим фрагментом, которое связывается с антигеном (например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137, CD252 и т.д.), экспрессированным гемопоэтической клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой, лейкоцитом, иммунной клеткой, например, зрелой иммунной клеткой (например, Т клеткой)), такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или гемопоэтическая стволовая клетка и последующей инициацией смерти клетки. Обеднение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может обеспечить нишу, в которой трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут размещаться и затем устанавливать продуктивный гемопоэз. Таким путем, трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут успешно приживляться у пациента, такого как пациент-человек, страдающий расстройством стволовых клеток, описанным в настоящем документе.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также могут включать модификации и/или мутации, которые изменяют свойства антител и/или фрагментов так, что увеличивается период полужизни или увеличивается или снижается ADCC.

В одном варианте осуществления, представлены антитела, содержащие одну или несколько радиомеченных аминокислот. Радиомеченное антитело может применяться для диагностических и терапевтических целей (конъюгация с радиомеченными молекулами является другим возможным признаком). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc и 125I, 131I и 186Re. Способы получения радиомеченых аминокислот и родственных пептидных производных известны в данной области техники (см., например, Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и Патент США № 4,681,581, Патент США № 4,735,210, Патент США № 5,101,827, Патент США № 5,102,990 (U.S. RE35,500), Патент США № 5,648,471 и Патент США № 5,697,902. Например, радиоизотоп может быть конъюгирован способом хлорамин Т.

В одном варианте осуществления, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент содержит модифицированную Fc область, где указанная модифицированная Fc область содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию относительно Fc области дикого типа, так, что указанная молекула имеет измененную аффинность для или связывание с FcgammaR (FcγR). Определенные аминокислотные положения в Fc области известны через кристаллографические исследования с проведением прямого контакта с FcγR. Специфически, аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (B/C петля), аминокислоты 297-299 (C'/E петля) и аминокислоты 327-332 (F/G) петля. (см. Sondermann et al., 2000 Nature, 406: 267-273). В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, может содержать вариантные Fc области, содержащие модификацию, по меньшей мере, одного остатка, который имеет прямой контакт с FcγR на основе структурного и кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления, Fc область анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела, анти-CD252 антитела и т.д.) или его антиген-фрагмент, содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 265 согласно EU индексу как у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), прямо включенном в настоящий документ в качестве ссылки. «EU индекс как у Кэбота» относится к нумерации IgG1 EU антитела человека. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C мутацию. В некоторых вариантах осуществления, Fc область антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 234 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A мутацию. В некоторых вариантах осуществления, Fc область анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела) или его антиген-фрагмента, содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 235 согласно EU индексу как у Кэбота. В

одном варианте осуществления, Fc область содержит L235A мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A и L235A мутацию (также называемую в настоящем документе «L234A.L235A» или «LALA»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит L234A и L235A мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В дополнительном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265C.L234A.L235A»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A, L235A и H435A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265C.L234A.L235A.H435A»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A, L235A и H435A мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В дополнительном варианте осуществления, Fc область содержит D265C и H435A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265C.H435A»). В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит D265A, S239C, L234A и L235A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265A.S239C.L234A.L235A»). В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит D265A, S239C, L234A и L235A мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит D265C, N297G и H435A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265C.N297G.H435A»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит D265C, N297Q и H435A мутацию (также называемую в настоящем документе «D265C.N297Q.H435A»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит E233P, L234V, L235A и delG236 (делецию 236) мутацию (также называемую в настоящем документе «E233P.L234V.L235A.delG236» или «EPLVLAdelG»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит E233P, L234V, L235A и delG236 (делецию 236) мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит E233P, L234V, L235A, delG236 (делецию 236) и H435A мутацию (также называемую в настоящем документе «E233P.L234V.L235A.delG236.H435A» или «EPLVLAdelG.H435A»). В другом варианте осуществления, Fc область содержит E233P, L234V, L235A, delG236 (делецию 236) и H435A мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит L234A, L235A, S239C и D265A мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит L234A, L235A, S239C и D265A мутацию, де Fc область не включает P329G мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит H435A, L234A, L235A и D265C мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит H435A, L234A, L235A и D265C мутацию, где Fc область не включает P329G мутацию.

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет модифицированную Fc область, такую, что антитело снижает эффекторную функцию в in vitro анализе эффекторной функции со снижением связывания с Fc рецептором (Fc R) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcR.

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет такую модифицированную Fc область, что, что антитело снижает эффекторную функцию в in vitro анализе эффекторной функции со снижением связывания с Fc гамма рецептором (FcγR) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcγR. В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR1. В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR2A. В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR2B. В других вариантах осуществления, FcγR является FcγR2C. В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR3A. В некоторых вариантах осуществления, FcγR является FcγR3B. В других вариантах осуществления, снижение связывания составляет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcγR. В других вариантах осуществления, снижение связывания составляет, по меньшей мере, 70% - 100% снижение, по меньшей мере, 80% - 100% снижение, по меньшей мере, 90% - 100% снижение, по меньшей мере, 95% - 100% снижение или, по меньшей мере, 98% - 100% снижение связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область, с FcγR

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет такую модифицированную Fc область, что, антитело снижает выделение цитокина в in vitro анализе выделения цитокина со снижением в выделении цитокина, по меньшей мере, 50% относительно выделения цитокина идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В некоторых вариантах осуществления, снижение выделения цитокина составляет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение в выделении цитокина относительно выделения цитокина идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область. В некоторых вариантах осуществления, снижение в выделении цитокина составляет, по меньшей мере, 70% - 100% снижение, по меньшей мере, 80% - 100% снижение, по меньшей мере, 90% - 100% снижение, по меньшей мере, 95% - 100% снижение в выделении цитокина относительно выделения цитокина идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область. В предпочтительных вариантах осуществления, выделение цитокина осуществляется иммунными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет такую модифицированную Fc область, что антитело снижает дегрануляцию тучных клеток в in vitro анализе дегрануляции тучных клеток со снижением в дегрануляции тучных клеток на, по меньшей мере, 50% относительно дегрануляции тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В некоторых вариантах осуществления,

снижение дегрануляции тучных клеток составляет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение дегрануляции тучных клеток относительно дегрануляции тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В некоторых вариантах осуществления, снижение дегрануляции тучных клеток составляет, по меньшей мере, 70% - 100% снижение, по меньшей мере, 80% - 100% снижение, по меньшей мере, 90% - 100% снижение или, по меньшей мере, 95% - 100% снижение, дегрануляции тучных клеток относительно дегрануляция тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет такую модифицированную Fc область, что антитело снижает или предотвращает антителозависмый клеточный фагоцитоз (ADCP) в in vitro анализе антителозависмого клеточного фагоцитоза, со снижением ADCP, по меньшей мере, 50% относительно ADCP идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область. В некоторых вариантах осуществления, снижение ADCP составляет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение антителозависмого клеточного фагоцитоза к антителозависмому клеточному фагоцитозу идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

В некоторых вариантах осуществления, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), описанное в настоящем документе, содержит Fc область, содержащую одну из следующих модификаций или комбинаций модификаций: D265A, D265C, D265C/H435A, D265C/LALA, D265C/LALA/H435A, D265A/S239C/L234A/L235A/H435A, D265A/S239C/L234A/L235A, D265C/N297G, D265C/N297G/H435A, D265C (EPLVLAdelG*), D265C (EPLVLAdelG)/H435A, D265C/N297Q/H435A, D265C/N297Q, EPLVLAdelG/H435A, EPLVLAdelG/D265C, EPLVLAdelG/D265A, N297A, N297G или N297Q.

Связывание или аффинность между Fc областью или Fc гамма рецептором может быть определена с применением множества методов, известных в данной области техники, например но не ограничиваясь ими, методы равновесия (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализ (RIA)) или анализом поверхностного плазмонного резонанса или другим механизмом анализа на основе кинетики (например, BIACORE.RTM. анализ или Octet.RTM. анализ (forteBIO)) и другие способы, такие как анализы косвенного связывания, анализы конкурентного связывания резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут применять метку на одном или нескольких из изучаемых компонентов и/или применять множество способов определения включая,

но не ограничиваясь ими, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описания аффинностей связывания и кинетики можно найти в Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), который фокусируется на взаимодействиях антитело-иммуноген. Одним из примеров анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого антигена с антителом, представляющим интерес, в присутствии возрастающих количеств не меченого антигена и антитела для обнаружения, связанных с меченым антигеном. Аффинность антитела, представляющего интерес, к конкретному антигену и скорости диссоциации связывания могут быть определены из данных с помощью анализа графика Скэтчарда. Конкуренция со вторым антителом также может быть определена с помощью радиоиммуноанализов. В этом случае антиген инкубируют с антителом, представляющим интерес, конъюгированным с меченым соединением в присутствии возрастающих количеств не меченого второго антитела.

В одном варианте осуществления, антитело, имеющее Fc модификации, описанные в настоящем документе (например, D265C, L234A, L235A и/или H435A) имеет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 75% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 85% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение связывания с Fc гамма рецептором относительно связывания идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область, с Fc гамма рецептором (например, по данным бислойной интерферометрии (BLI), например, как описано в примере 1).

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что связывающие взаимодействия Fc области с Fc гамма рецептором являются жизненно важными для множества эффекторных функций и нисходящих сигнальных событий включая, но не ограничиваясь ими, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Следовательно, в определенных аспектах, антитело, содержащее модифицированную Fc область (например, содержащее L234A, L235A и/или D265C мутацию) имеет по существу пониженные или ликвидированные эффекторные функции. Эффекторные функции могут быть исследованы с применением множества способов, известных в данной области техники, например, через измерение клеточных ответов (например, дегрануляции тучных клеток или выделения цитокина) в ответ на антитело, представляющее интерес. Например, с применением стандартных способов в данной области техники, Fc-модифицированные антитела могут быть проанализированы на их способность инициировать дегрануляцию тучных клеток in vitro (например, как описано в примере 2) или на их способность инициировать выделение цитокина, например мононуклеарными клетками периферической крови человека (например, как описано в примере 3).

Таким образом, в одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию, приводящую к снижению периода полужизни (например, относительно антитела,

имеющего немодифицированную Fc область). Антитело, имеющее короткий период полужизни, может быть предпочтительным в определенных случаях, где ожидается, что антитело будет действовать как кратковременное лекарственное средство, *например,* на стадии подготовки, описанной в настоящем документе, где антитело вводят непосредственно перед HSC. В идеале, антитело будет по существу выведено до доставки HSC, которые также обычно экспрессируют антиген-мишень (например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252) но не являются мишенью для анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию в положении 435 (EU индекс согласно Кэботу). В одном варианте осуществления, мутацией является H435A мутация.

В одном варианте осуществления, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), описанное в настоящем документе, имеет период полужизни (например, у человека), равный или менее чем примерно 24 часа, равный или меньше примерно 23 часа, равный или меньше примерно 22 часа, равный или меньше примерно 21 час, равный или меньше примерно 20 часов, равный или меньше примерно 19 часов, равный или меньше примерно 18 часов, равный или меньше примерно 17 часов, равный или меньше примерно 16 часов, равный или меньше примерно 15 часов, равный или меньше примерно 14 часов, равный или меньше примерно 13 часов, равный или меньше примерно 12 часов или равный или меньше примерно 11 часов.

В одном варианте осуществления, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), описанное в настоящем документе, имеет период полужизни (например, у человека) примерно 1-5 часов, примерно 5-10 часов, примерно 10-15 часов, примерно 15-20 часов или примерно 20-25 часов.

В некоторых аспектах, Fc область содержит две или несколько мутаций, которые придают пониженный период полужизни и снижают эффекторную функцию антитела. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит мутацию, дающую снижение периода полужизни, и мутацию, по меньшей мере, одного остатка который может направлять контакт с FcγR (например, как основано на структурном и кристаллографическом анализе). В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию и L235A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию и D265C мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию, L235A мутацию и D265C мутацию.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, конъюгировано с цитотоксином (например, аматоксином) путем цистеинового остатка в Fc домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых

вариантах осуществления, цистеиновый остаток вводят путем мутации в Fc домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента Например, цистеиновый остаток может быть выбран из группы, состоящей из Cys118, Cys239 и Cys265. В одном варианте осуществления, Fc область анти-НС антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела) или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 265 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C и H435A мутации. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A, L235A и H435A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область анти-НС антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела) или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 239 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит S239C мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A мутацию, L235A мутацию, S239C мутацию и D265A мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит S239C и H435A мутацию. В другом варианте осуществления, Fc область содержит L234A мутацию, L235A мутацию и S239C мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию, L235A мутацию и S239C мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию, L235A мутацию, S239C мутацию и D265A мутацию.

То есть, Fc аминокислотные положения даны со ссылкой на EU индекс нумерации, если не указано иное.

Способы конструирования антитела для включения любых Fc модификаций в настоящем документе хорошо известны в данной области техники. Эти способы включают, но не ограничивается ими, подготовку путем сайт-направленного (или олигонуклеотид-опосредованного) мутагенеза, ПЦР мутагенеза и кассетного мутагенеза полученной молекулы ДНК, кодирующей антитело или, по меньшей мере, константную область антитела. Сайт-направленный мутагенез хорошо известен в данной области техники (см., например, Carter et al., Nucleic Acids Res., 13:4431-4443 (1985) and Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1987)). ПЦ мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотной последовательности исходного полипептида. См. Higuchi, in PCR Protocols, pp. 177-183 (Academic Press, 1990); и Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989). Другой способ получения вариантов последовательности, кассетного мутагенеза, основаны на методике, описанной у Wells et al., Gene, 34:315-323 (1985).

Анти-CD117 Антитела

Настоящее описание также частично основано на открытии, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD117, такой как GNNK+ CD117,

могут применяться в качестве терапевтических агентов отдельно или как ADC для (i) лечения рака (например, острого миелогенного лейкоза или миелодиспластического синдрома) и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся CD117+ клетками, и (ii) стимулирования энграфтмента трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в терапии трансплантатом. Эти терапевтические действия могут быть вызваны, например, связыванием анти-CD117 антитела или его антигенсвязывающих фрагментов с CD117 (например, GNNK+ CD117), экспрессируемым на поверхности клетки, такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или гемопоэтическая стволовая клетка, и последующей гибелью клеток. Обеднение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может обеспечить нишу, в которой трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут разместиться и впоследствии установить продуктивный гемопоэз. Таким образом, трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут успешно приживаться у пациента, такого как пациент-человек, страдающий расстройством стволовых клеток, описанным в настоящем документе.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD117 человека (также называемые c-Kit, иРНК NCBI эталонная последовательность: NM_000222.2, белок NCBI эталонная последовательность: NP_000213,1), включая те, которые способны связывать GNNK+ CD117, могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, для подготовки пациента для терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Полиморфизмы, поражающие кодирующую область или внеклеточный домен CD117 у значительной доли популяции, в настоящее время не очень хорошо известны в показаниях, отличных от онкологии. Существует, по меньшей мере, четыре изоформы CD117, которые были идентифицированы, с потенциалом дополнительных изоформ, экспрессированных в опухолевых клетках. Две из CD117 изоформ расположены на внутриклеточном домене белка, и две присутствуют во внешней околомембранной области. Две внеклеточные изоформы, GNNK+ и GNNK-, отличаются присутствием (GNNK+) или отсутствием (GNNK-) 4 аминокислотной последовательности. Эти изоформы описаны как имеющие одинаковую аффинность для лиганда (SCF), но было описано, что лигандное связывание с GNNK- изоформой повышает интернализацию и деградацию. GNNK+ изоформа может применяться в качестве иммуногена для создания антител, способных связывать CD117, так как антитела, созданные против этой изоформы, будут включительными GNNK+ и GNNK- белков.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, такую как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, такую как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит три CDR последовательности аминокислотной

последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и три CDR последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LH) из Ab85.

В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LH) из Ab85 (также названного в настоящем документе взаимозаменяемо как Ab2).

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) представлена ниже как SEQ ID NO: 13. Аминокислотные последовательности VH CDR Ab85 подчеркнуты ниже и являются следующими: NYWIG (VH CDR1; SEQ ID NO: 7); IINPRDSDTRYRPSFQG (VH CDR2; SEQ ID NO: 8); и HGRGYEGYEGAFDI (VH CDR3; SEQ ID NO: 9).

Ab85 VH последовательность

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab85 представлена ниже как SEQ ID NO 14. Аминокислотные последовательности VL CDR Ab85 подвергнуты ниже и являются следующими: RSSQGIRSDLG (VL CDR1; SEQ ID NO: 10); DASNLET (VL CDR2; SEQ ID NO: 11; и QQANGFPLT (VL CDR3; SEQ ID NO: 12).

Ab85 VL последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIRSDLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LH) Ab249 (также названного в настоящем документе взаимозаменяемо как Ab3).

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab249 представлена ниже как SEQ ID NO: 346. Аминокислотные последовательности VH CDR Ab249 подчеркнуты ниже и являются следующими: TSWIG (VH CDR1; SEQ ID NO: 340); IIYPGDSDTRYSPSFQG (VH CDR2; SEQ ID NO: 341); и HGLGYNGYEGAFDI (VH CDR3; SEQ ID NO: 342).

Ab249 VH последовательность

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTTSWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 346)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab249 представлена ниже как SEQ ID NO: 347. Аминокислотные последовательности VL CDR Ab249 подчеркнуты ниже и являются следующими: RASQGIGSALA (VL CDR1; SEQ ID NO: 343); DASNLET (VL CDR2; SEQ ID NO: 344); и QQLNGYPLT (VL CDR3; SEQ ID NO: 345).

Ab249 VL последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGYPLTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 347)

Антитела человека Ab85 и Ab249 получают из антитела CK6, которое является антагонистом анти-CD117 антитела. Ab85 и Ab249 имеют улучшенные свойства, *например,* улучшенные характеристики связывания, более CK6.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, анти-CD117 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую множество CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) как указано в SEQ ID Nos: 7, 8 и 9, и легкую цепь, содержащую множество CDR, как указано в SEQ ID Nos: 10, 11 и 12. В других вариантах осуществления, анти-CD117 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую множество CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) как указана в SEQ ID Nos: 340, 341 и 342 и легкую цепь, содержащую множество CDR, как указано в SEQ ID Nos: 343, 344 и 345.

В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VH) Ab67 (нейтральное антитело; также названное в настоящем документе взаимозаменяемо как Ab1).

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab67 представлена ниже как SEQ ID NO: 354. Аминокислотные последовательности VH CDR Ab67 подчеркнуты ниже и являются следующими: FTFSDADMD (VH CDR1; SEQ ID NO: 348); RTRNKAGSYTTEYAASVKG (VH CDR2; SEQ ID NO: 349); и AREPKYWIDFDL (VH CDR3; SEQ ID NO: 350).

Ab67 VH последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDADMDWVRQAPGKGLEWVGRTR NKAGSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREPKYWIDFDL WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 354)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab67 представлена ниже как SEQ ID NO: 355. Аминокислотные последовательности VL CDR Ab67 подчеркнуты ниже и являются следующими: RASQSISSYLN (VL CDR1; SEQ ID NO: 351); AASSLQS (VL CDR2; SEQ ID NO: 352); и QQSYIAPYT (VL CDR3; SEQ ID NO: 353).

Ab67 VL последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYIAPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 355)

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, анти-CD117 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую множество CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) как указана в SEQ ID Nos: 348, 349 и 350 и легкую цепь, содержащую множество CDR, как указано в SEQ ID Nos: 351, 352 и 353.

Дополнительные последовательности для анти-CD117 антитела или связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, представлены в таблице 5.

Анти-CD117 антитела ли связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также могут включать модификации и/или мутации, которые изменяют свойства антител и/или фрагментов, таких, которые повышают период полужизни, повышают или снижают ADCC, и т.д., как известно в данной области техники.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его связывающий фрагмент, содержит вариантную Fc область, где указанная вариантная Fc область содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию относительно дикого типа Fc области, так, что указанная молекула имеет измененную аффинность для FcгаммаR. Определенные аминокислотные положения в Fc области известны через исследования кристаллографии с получением прямого контакта с FcγR. Специфически, аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (B/C петля), аминокислоты 297-299 (C'/E петля) и аминокислоты 327-332 (F/G) петля. (см. Sondermann et al., 2000 Nature, 406: 267-273). Например, аминокислотные замещения на аминокислотных положениях 234 и 235 Fc области были идентифицированы как снижающие аффинность IgG антитела к связыванию Fc рецептора, в частности, Fc гамма рецептора (FcγR). В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело, описанное в настоящем документе, содержит Fc область, содержащую аминокислотное замещение на L234 и/или L235, *например,* L234A и L235A (EU индекс). Таким образом, анти-CD117 антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать вариантные Fc области, содержащие модификацию, по меньшей мере, одного остатка, который имеет прямой контакт с FcγR на основе структурного и кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления, Fc область анти-CD117 антитела (или его Fc содержащего фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 265 согласно EU индексу как у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), прямо включенном в настоящий документ в качестве ссылки. «EU индекс как у Кэбота» или «EU индекс» относится к нумерации IgG1 EU антитела человека и применяется в настоящем документе со ссылкой на Fc аминокислотные положения, если не указано иное.

В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C мутацию.

В некоторых вариантах осуществления, Fc область анти-CD117 антитела (или ее фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 234 согласно EU

индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A мутацию. В некоторых вариантах осуществления, Fc область анти-CD117 антитела (или ее фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 235 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L235A мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A и L235A мутацию. В дополнительном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию.

В определенных аспектах, вариантный IgG Fc домен содержит одно или несколько аминокислотных замещений, дающих снижение или ликвидацию аффинности связывания для FcгаммаR и/или C1q по сравнению с диким типом Fc домена, не содержащим одно или несколько аминокислотных замещений. Fc связывающие взаимодействия являются жизненно важными для множества эффекторных функций и нисходящих сигнальных событий, включая, но не ограничиваясь ими, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Следовательно, в определенных аспектах, антитело, содержащее модифицированную Fc область (например, содержащую L234A, L235A и D265C мутацию) имеет по существу пониженные или ликвидированные эффекторные функции.

Аффинность к Fc области может быть определена с применением множества методов, известных в данной области техники, например но не ограничиваясь ими, методы равновесия (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализ (RIA)) или анализа поверхностного плазмонного резонанса или других механизмов анализов на основе кинетики (например, BIACORE™ анализ или Octet™ анализ (forteBIO)) и другие способы, такие как анализы косвенного связывания, анализы конкурентного связывания резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматографию (например, гель-фильтрацию). Эти и другие способы могут применять метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или применять множество способов определения, включая, но не ограничиваясь ими, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетики можно найти в Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), который сфокусирован на взаимодействиях антитело-иммуноген. Одним примером анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубирование меченого антигена с антителом, представляющим интерес, в присутствии увеличивающихся количеств немеченого антигена и определение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность антитела, представляющего интерес, к конкретному антигену и скорость диссоциации связывания могут быть определены из данных анализа распределения Скэтчарда. Конкуренция со вторым антителом также может быть определена с применением радиоиммуноанализов. В этом случае, антиген инкубирован с антителом, представляющим интерес, конъюгированным с меченым соединением в присутствии

увеличивающих количеств немеченого второго антитела.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело, описанное в настоящем документе, содержит Fc область, содержащую L235A, L235A и D265C (EU индекс). Антитела по изобретению могут быть дополнительно сконструированы для дальнейшего модулирования периода полужизни антитела через введение дополнительных Fc мутаций, таких, которые описаны, 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. Типовые мутации, которые могут быть проведены отдельно или в комбинации, включают T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P2571, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R мутации.

Таким образом, в одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию, дающую снижение периода полужизни. Антитело, имеющее короткий период полужизни (также называемый в настоящем документе «быстрый» период полужизни) может быть предпочтительным в определенных случаях, где ожидается, что антитело будет функционировать как краткосрочный терапевтический агент, *например,* на стадии подготовки, описанной в настоящем документе, где антитело вводят непосредственно перед введением HSC. В идеале, антитело будет по существу выведено до доставки HSC, которые также в общем экспрессируют CD117, но не являются мишенью анти-CD117 антитела, в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию в положении 435 (EU индекс согласно Кэботу). В одном варианте осуществления, мутацией является H435A мутация. В другом варианте осуществления, мутацией является D265C мутация. В еще одном варианте осуществления, мутациями являются H435A мутация и D265C мутация.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело, описанное в настоящем документе, имеет период полужизни, равный или меньше 24 часа, равный или меньше 22 часа, равный или меньше 20 часов, равный или меньше 18 часов, равный или меньше 16 часов, равный или меньше 14 часов, равный или меньше 13 часов, равный или меньше 12 часов, равный или меньше 11 часов, равный или меньше 10 часов, равный или меньше 9 часов, равный или меньше 8 часов, равный или меньше 7 часов, равный или меньше 6 часов или равный или меньше 5 часов. В одном варианте осуществления, период полужизни антитела составляет от 5 часов до 7 часов; составляет 5 часов до 9 часов; составляет 15 часов до 11 часов; составляет 5 часов до 13 часов; составляет 5 часов до 15 часов; составляет 5 часов до 20 часов; составляет 5 часов до 24 часов; составляет 7 часов до 24 часов; составляет 9 часов до 24 часов; составляет 11 часов до 24 часов; 12 часов до 22 часов; 10 часов до 20 часов; 8 часов до 18 часов; или 14 часов до 24 часов.

Анти-CD117 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают, например, антитела, полученные и высвобожденные из ATCC № доступа 10716 (депонированного как BA7,3C.9), такие как SR-1 антитело, которое описано, например, в Патенте США № 5,489,516, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD117 антителу.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело, описанное в настоящем документе, содержит Fc область, содержащую L235A, L235A, D265C и H435A (EU индекс).

Дополнительные анти-CD117 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают такие, которые описаны в Патенте США № 7,915,391, который описывает, например, гуманизированные SR-1 антитела; Патенте США № 5,808,002, который описывает, например, анти-CD117 A3C6E2 антитело, а также такие, которые описаны в, например, WO 2015/050959, который описывает анти-CD117 антитела, которые связывают эпитопы, содержащие Pro317, Asn320, Glu329, Val331, Asp332, Lus358, Glue360, Glue376, His378, и/или Thr380 CD117 человека; и US 2012/0288506 (также опубликованной как Патент США № 8,552,157), которая описывает, например, анти-CD117 антитело CK6 (также названное в настоящем документе взаимозаменяемо как Ab4), имеющее CDR последовательности:

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

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

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

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

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

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

Вариабельная область тяжелой цепи аминокислотной последовательности CK6 представлена в SEQ ID NO: 27):

QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFT**SYWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPGDSDTRYSPSFQG**QVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**HGRGYNGYEGAFDI**WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 27; CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом).

Легкая цепь вариабельной аминокислотной последовательности CK6 представлена в SEQ ID NO: 28:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGISSALA**WYQQKPGKAPKLLIY**DASSLES**GVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYY**CQQFNSYPLT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:

28; CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом).

Дополнительные анти-CD117 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают такие, которые описаны в US 2015/0320880, такие как слоны 9P3, NEG024, NEG027, NEG085, NEG086 и 20376.

Описания каждой из вышеупомянутых публикаций включены в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к анти-CD117 антителам. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают вышеописанные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также гуманизированные варианты вышеописанные не человеческих антител и антигенсвязывающих фрагментов, и антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают тот же эпитоп, который описан выше, по данным, например, конкурентного анализа связывания CD117.

Типовые антигенсвязывающие фрагменты вышеупомянутого антитела включают двойной вариабельный иммуноглобулиновый домен, одноцепочечную молекулу Fv (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, Fv фрагмент, Fab фрагмент, $F(ab')_2$ молекулу и тандемную ди-scFv, среди прочих.

Антитела могут быть получены с применением рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в Патенте США № 4,816,567. В одном варианте осуществления, представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CD117 антитело, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В дополнительном варианте осуществления, представлен один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления, представлена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном таком варианте осуществления, клетка-хозяин содержит (например, трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например клеткой яичников китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой). В одном варианте осуществления, представлен способ получения анти-CLL-1 антитела, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как представлено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и

необязательное восстановление антитела из клетки-хозяина (или среды культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного продуцирования анти-CD117 антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в одни или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с применением обычных методов (например, с применением олигонуклеотидных проб, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антитело-кодирующих векторов включают прокариотические и эукариотические клетки, описанные настоящем документе. Например, антитела могут быть получены в бактериях, в частности, если гликозилирование и Fc эффекторные функции не нужны. Для экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях, см., например, Патенты 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), стр. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антитела в E. coli.) После экспрессии, антитело может быть выделено из бактериальной клеточной суспензии в растворимой фракции, и может быть далее очищено.

Клетки позвоночных также могут применяться в качестве хозяев. Например, могут применяться клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы для выращивания в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток-хозяев млекопитающих включают CV1 клеточную линию почек обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клеточную линию почек эмбриона человека (293 или 293 клетки, как описано, например, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4 клетки, как описано, например, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетка карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK; клетки почек серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); TRI клетки, как описано, например, у Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); MRC 5 клетки; и FS4 клетки. Другие полезные линии клеток-хозяев включают клетки яичников китайского хомяка (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 определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антитела, представлен, например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или

99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе. Альтернативно, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включает CDR, содержащие SEQ ID Nos, описанные в настоящем документе, с каркасными областями вариабельных областей, описанных в настоящем документе, имеющими аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе.

В одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая описана в настоящем документе. В другом варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая описана в настоящем документе. В еще одном варианте осуществления, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи, константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая описана в настоящем документе.

Дополнительные анти-CD117 антитела описаны в US 2019/0153114 A1 и US 2019/0144558 A1, содержание обеих заявок включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Анти-CD117 антитела и ADC, описанные в настоящем документе могут применяться в способах лечения множества расстройств, таких как заболевания типов клеток в гемопоэтической линии, раки, аутоиммунные заболевания, метаболические расстройства и расстройства стволовых клеток, среди прочих. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут (i) непосредственно обеднять популяцию клеток, которые дают начало патологии, такую как популяция раковых клеток (например, лейкозных клеток) и аутоиммунных клеток (например, аутореактивных Т клеток) и/или (ii) обеднять популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток так, чтобы способствовать энграфтменту трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток через обеспечивание ниши, в которой могут разместиться трансплантированные клетки. Вышеупомянутые активности могут быть достигнуты введением ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный эндогенной клеткой, вызывающей болезнь, аутоиммунной клеткой или гемопоэтической стволовой клеткой. В случае прямого лечения заболевания, такое введение может вызвать уменьшение количества клеток, дающих начало патологии, представляющей интерес. В случае подготовки пациента к терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки, такое введение может вызвать селективное обеднение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая вакансию в гемопоэтической ткани, такой как костный мозг, которая впоследствии может быть заполнена трансплантированными экзогенными гемопоэтическими стволовыми клетками.

Изобретение частично основано на открытии того, что ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD117 (такие как GNNK+ CD117), могут быть введены пациенту для воздействия на обе указанные выше активности. ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD117, могут быть введены пациенту, страдающему раком или аутоиммунным заболеванием, для прямого обеднения популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток, а также могут быть введены пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, для повышения выживаемости и потенциала энграфтмента трансплантатированных гемопоэтических стволовых клеток.

Энграфтмент трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток благодаря введению анти-CD117 ADC, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, может проявляться во множестве эмпирических измерений. Например, энграфтмент трансплантатированных гемопоэтических стволовых клеток может быть оценен через оценку количества конкурентных репопулирующих единиц (CRU), присутствующих в костном мозге пациента после введения ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать CD117, и последующего введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительно, можно наблюдать энграфтмент трансплантата гемопоэтических стволовых клеток через введение гена-репортера, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию, дающую флуоресцентный, хромофорный или люминесцентный продукт, в вектор, с которым донор гемопоэтических стволовых клеток был трансфицирован, и последующее отслеживание соответствующего сигнала в ткани, в которой разместились гемопоэтические стволовые клетки, такой как костный мозг. Также можно наблюдать энграфтмент гемопоэтической стволовой клетки через оценку количества и выживания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, например, по данным способов анализа сортировкой флуоресцентно-активированных клеток (FACS), известных в данной области техники. Энграфтмент также может быть определен через измерение количества лейкоцитов в периферической крови во время периода после трансплантации, и/или через измерение восстановления клеток костного мозга донорными клетками в образце пунктата костного мозга.

Анти-CD2 антитела

CD2 человека также называют Т-клеточным поверхностным антигеном T11/Leu-5, T11, CD2 антигеном (p50) и рецептором бараньих эритроцитов (SRBC). CD2 экспрессируется на Т клетках. Были идентифицированы две изоформы CD2 человека. Изоформа 1 содержит 351 аминокислоту, как описано в Seed, B. et al. (1987) 84: 3365-69 (см. также Sewell et al. (1986) 83: 8718-22) и ниже (NCBI Эталонная последовательность: NP_001758.2):

msfpckfvas fllifnvssk gavskeitna letwgalgqd inldipsfqm sddiddikwe
ktsdkkkiaq frkeketfke kdtyklfkng tlkikhlktd dqdiykvsiy dtkgknvlek
ifdlkiqerv skpkiswtci nttltcevmn gtdpelnlyq dgkhlklsqr vithkwttsl
sakfkctagn kvskessvep vscpekgldi yliigicggg sllmvfvall vfyitkrkkq

rsrrndeele trahrvatee rgrkphqipa stpqnpatsq hpppppghrs qapshrpppp

ghrvqhqpqk rppapsgtqv hqqkgpplpr prvqpkpphg aaenslspss n

(SEQ ID NO: 29)

Вторая изоформа CD2 имеет 377 аминокислот и идентифицирована в настоящем документе как NCBI Эталонная последовательность: NP_001315538,1.

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело, которое может применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включает такое, которое имеет одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность EYYMY (SEQ ID NO: 30);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность RIDPEDGSIDYVEKFKK (SEQ ID NO: 31);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность GKFNYRFAY(SEQ ID NO: 32);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RSSQSLLHSSGNTYLN (SEQ ID NO: 33);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность LVSKLES(SEQ ID NO: 34); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность MQFTHYPYT (SEQ ID NO: 35).

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело, которое может применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включает такое, которое имеет одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GFTFSSY(SEQ ID NO: 38);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SGGGF (SEQ ID NO: 39);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SSYGEIMDY(SEQ ID NO: 40);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQRIGTSIH (SEQ ID NO: 42);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность YASESIS(SEQ ID NO: 43); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQSHGWPFTF (SEQ ID NO: 44).

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающая

часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

В другом варианте осуществления, анти-CD2 антитело, которое может применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включает такое, которое имеет одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность GFTFSSY (SEQ ID NO: 38);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SGGGF (SEQ ID NO: 39);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SSYGELMDY (SEQ ID NO: 41);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность RASQRIGTSIH (SEQ ID NO: 42);

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность YASESIS (SEQ ID NO: 43); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QQSHGWPFTF (SEQ ID NO: 44).

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вышеупомянутые CDR последовательности, описаны, например, в Патенте США № 6,849,258, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD2 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам.

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления, анти-CD2 ADC имеет период полужизни в сыворотке у субъекта-человека 3 дня или менее.

Дополнительные последовательности для анти-CD2 антитела или связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, представлены в таблице 5.

Дополнительные анти-CD2 антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, которые могут быть использованы в композиции и способах, описанных в настоящем документе, могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в данной области техники, таких как получение гибридом. Гибридомы могут быть получены с использованием мышиной системы. Протоколы для иммунизации и последующего выделения спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры по слиянию и процедуры создания гибридомы. Альтернативно, анти-CD2-антитела могут быть созданы с использованием HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. При создании дополнительных анти-CD2-антител, CD2 антиген выделяют

и/или очищают. CD2 антигеном может быть фрагмент CD2 из внеклеточного домена CD2. Иммунизация животных может быть проведена любым способом, известным в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Способы иммунизации животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, выше и Патент США № 5,994,619. CD2 антиген может быть введен с адъювантом для стимуляции иммунного ответа. Адъюванты, известные в данной области, включают полный или неполный адъювант Фрейнда, RIBI (мурамилдипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). После иммунизации животного CD2 антигеном, антитело-продуцирующие иммортализованные клеточные линии получают из клеток, полученных от иммунизированного животного. После иммунизации животное умерщвляют и лимфатические узлы и/или В-клетки селезенки иммортализуют способами, известными в данной области техники (например, переносом онкогена, трансдукцией онкогенного вируса, воздействием канцерогенных или мутирующих соединений, слиянием с иммортализованной клеткой, например, миеломной клеткой, и инактивацией гена-супрессора опухоли. См., например, Harlow and Lane, выше. Гибридомы могут быть выбраны, клонированы и подвергнуты скринингу на предмет желаемых характеристик, включая устойчивый рост, высокое продуцирование антитела и желательные характеристики антитела.

Анти-CD2 антитела для использования в анти-CD2 ADC, описанных в настоящем документе, также могут быть идентифицированы с применением высокопроизводительного скрининга библиотек антител или фрагментов антител на молекулы, способные связывать CD2. Такие способы включают способы in vitro дисплея, известные в данной области техники, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, рибосомный дисплей, иРНК дисплей и кДНК дисплей, среди прочего. Использование фагового дисплея для выделения антител, антигенсвязывающих фрагментов или лигандов, которые связывают биологически релевантные молекулы, было рассмотрено, например, в Felici et al., Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995; Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997; и Hoogenboom et al., Immunotechnology 4:1-20, 1998, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к методам in vitro дисплея. Рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки были сконструированы для выбора полипептидов, которые связывают поверхностноклеточные антигены, как описано у Kay, Perspect. Drug Discovery Des. 2:251-268, 1995 и Kay et al., Mol. Divers. 1:139-140, 1996, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к открытию антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно фаг-экспонированы как функциональные молекулы (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-84 1992, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в

той части, в которой они относятся к применению методов in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, таких как фрагменты Fab и scFv, были экспрессированы в форматах 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; и Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к платформам in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул).

Кроме методов in vitro дисплея, методы компьютерного моделирования могут применяться для конструирования и идентификации анти-CD2 антител или фрагментов антител in silico, например, с применением методов, описанных в US 2013/0288373, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к способам молекулярного моделирования для идентификации анти-CD2 антитела. Например, с применением методов компьютерного моделирования, специалист в данной области техники может провести скрининг библиотек антител или фрагментов антитела in silico на молекулы, способные связывать специфические эпитопы на CD2, такие как внеклеточные эпитопы CD2.

В одном варианте осуществления, анти-CD2 антитело, применяемое в ADC, описанных в настоящем документе, способно интернализоватья в клетку. При идентификации анти-CD2 антитела (или его фрагмента), дополнительные методы могут применяться для идентификации антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD2 на поверхности клетки (например, Т клетки) и, дополнительно, способны быть интернализованы клеткой, например, рецептор-опосредованным эндоцитозом. Например, методы in vitro дисплея, описанные выше, могут быть адаптированы для скрининга антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD2 на поверхности гемопоэтической стволовой клетки, и которые затем интернализуются. Фаговый дисплей представляет один из таких методов, которые могут применяться в сочетании с данной парадигмой скрининга. Для идентификации анти-CD2 антител или их фрагментов, которые связывают CD2 и затем интернализуются CD2+ клеткой, специалист в данной области техники может применять методы фагового дисплея, описанные у Williams et al., Leukemia 19:1432-1438, 2005, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Потенциал интернализации анти-CD2 антитела или его фрагмента может оцениваться, например, с применением анализов радионуклидной интернализации, известных в данной области техники. Например, анти-CD2 антитело или его фрагмент, идентифицированное с применением методов in vitro дисплея, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники, может быть функционализировано введением радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{169}Yb, ^{186}Re, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{177}Lu, ^{77}As, ^{72}As, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{89}Zr, ^{212}Bi, ^{213}Bi или ^{225}Ac. Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, могут быть введены в антитела, их фрагменты или лиганды с применением

гранул, таких как полистирольные гранулы, содержащих электрофильные реагенты, (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Радиомеченные антитела или их фрагменты могут быть инкубированы с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы позволить интернализацию. Интернализованные антитела или их фрагменты могут быть идентифицированы через определение испускаемой радиации (например, γ-радиации) полученными гемопоэтическими стволовыми клетками по сравнению с испускаемой радиацией (например, γ-радиацией) восстановленного промывочного буфера. Вышеупомянутые анализы интернализации также могут применяться для характеризации ADC.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD2 антитело (или его фрагмент) имеет определенный период полужизни в сыворотке. Например, анти-CD2 антитело (или его фрагмент) может иметь период полужизни в сыворотке примерно 1-24 часов у пациента-человека. ADC, содержащие такие анти-CD2 антитела, также могут иметь, например, период полужизни в сыворотке примерно 1-24 часов у пациента-человека. Фармакокинетический анализ через измерение уровней в сыворотке может быть проведен с применением анализов, известных в данной области техники.

Для рекомбинантного продуцирования анти-CD2 антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессирования в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антитело-кодирующих векторов, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc эффекторная функция не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, Патенты 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), стр. 245-254, описывающие экспрессию фрагментов антител в E. coli.). После экспрессии, антитело может быть выделено из бактериальной клеточной суспензии в растворимой фракции, и может быть далее очищено.

Клетки позвоночных также могут применяться в качестве хозяев. Например, могут применяться клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы для выращивания в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток-хозяев млекопитающих включают CV1 клеточную линию почек обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клеточную линию почек эмбриона человека (293 или 293 клетки, как описано, например, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4 клетки, как описано, например, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251

(1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK; клетки почек серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); TRI клетки, как описано, например, у Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); MRC 5 клетки; и FS4 клетки. Другие полезные линии клеток-хозяев включают клетки яичников китайского хомяка (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 определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антитела, представлен, например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

Анти-CD5 антитела

CD5 человека также называют лимфоцитарный антиген T1, T1, Leu-1 и LEU1. CD5 экспрессируется на Т клетках человека. Были идентифицированы две изоформы CD5 человека. Изоформа 1 содержит 495 аминокислот и описана у Gladkikh et al (2017) Cancer Med.6(12):2984 и Jones et al. (1986) Nature 323 (6086): 346). Аминокислотная последовательность CD5 (изоформа 1) представлена ниже (NCBI Эталонная последовательность: NP_055022.2):

mpmgslqpla tlyllgmlva sclgrlswyd pdfqarltrs nskcqgqlev ylkdgwhmvc sqswgrsskq wedpsqaskv cqrlncgvpl slgpflvtyt pqssiicygq lgsfsncshs rndmchslgl tclepqkttp pttrpppttt peptapprlq lvaqsgggqhc agvvefysgs lggtisyeaq dktqdlenfl cnnlqcgsfl khlpeteagr aqdpgepreh qplpiqwkiq nssctslehc frkikpqksg rvlallcsgf qpkvqsrlvg gssicegtve vrqgaqwaal cdsssarssl rweevcreqq cgsvnsyrvl dagdptsrgl fcphqklsqc helwernsyc kkvfvtcqdp npaglaagtv asiilalvll vvllvvcgpl aykklvkkfr qkkqrqwigp tgmnqnmsfh rnhtatvrsh aenptashvd neysqpprns hlsaypaleg alhrssmqpd nssdsdydlh gaqrl (SEQ ID NO: 48)

Вторая изоформа (SEQ ID NO: 339) CD5 человека имеет 438 аминокислот (см. подчеркнутую часть выше) и идентифицирована как NCBI Эталонная последовательность: NP_001333385,1. В отличие от изоформы 1, CD5 изоформа 2 является внутриклеточным белком. Изоформа 2 содержит отдельный 5' UTR и не имеет часть внутри рамки 5' кодирующей области, по сравнению с изоформой 1. Полученная изоформа 2 имеет более короткий N-конец, по сравнению с изоформой 1. CD5 изоформа 2 не содержит ливерный пептид, по сравнению с изоформой 1, и представляет внутриклеточную изоформу, найденную в подмножестве В лимфоцитов. ADC, описанные в настоящем документе, являются специфическими к CD5 изоформе 1 человека, представляющей внеклеточную версию CD5 человека.

В одном варианте осуществления, анти-CD5 антителом, которое может применяться в способах и композициях, описанных в настоящем документе, является антитело 5D7v (Ab5D7v). Аминокислотная последовательность вариабельной области

тяжелой цепи (VH) Ab5D7v представлена ниже как SEQ ID NO: 49.

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQAPGKGLEWVAHIW WDDDVYYNPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRRRATGTGFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)

Аминокислотные последовательности VH CDR Ab5D7v подчеркнуты выше и являются следующими: FSLSTSGMG (VH CDR1; SEQ ID NO: 51); WWDDD (VH CDR2; SEQ ID NO: 52); и RRATGTGFDY (VH CDR3; SEQ ID NO: 53).

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab5D7v представлена ниже как SEQ ID NO 50.

NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVGTAVAWYQQKPDQSPKLLIYWTSTR HTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQYNSYNTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 50)

Аминокислотные последовательности VL CDR Ab5D7v подчеркнуты выше и являются следующими: QDVGTA (VL CDR1; SEQ ID NO: 54); WTSTRHT (VL CDR2; SEQ ID NO: 55); и YNSYNT (VL CDR3; SEQ ID NO: 56).

В одном варианте осуществления, анти-CD5 ADC содержит анти-CD5 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1 домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51, CDR2 домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, и CDR3 домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 53, и содержит легкую цепь, содержащую CDR1 домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 54, CDR2 домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, и CDR3 домен, содержащий аминокислотную последовательность указанную в SEQ ID NO: 56, где антитело конъюгировано с цитотоксином через линкер.

В одном варианте осуществления, анти-CD5 ADC содержит анти-CD5 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую аминокислотную последовательность, как указана в SEQ ID NO:49, и легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую аминокислотную последовательность, как указана в SEQ ID NO: 50, где антитело конъюгировано с цитотоксином через линкер.

В другом варианте осуществления, анти-CD5 антителом, применяемым в ADC, описанных в настоящем документе, является 5D7 антитело (см., например, US 20080254027, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки). В другом варианте осуществления, анти-CD5 антитело, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является вариантом 5D7 антитела (см., например, US 20080254027, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления, анти-CD5 ADC имеет период полужизни в сыворотке у субъекта-человека 3 дня или менее.

Дополнительные последовательности для анти-CD5 антитела или связывающих

фрагментов, описанных в настоящем документе, представлены в таблице 5.

Дополнительные анти-CD5 антитела, которые могут применяться в ADC, описанных в настоящем документе, могут быть идентифицированы с применением методов, известных в данной области техники, таких как получение гибридомы. Гибридомы могут быть получены с использованием мышиной системы. Протоколы для иммунизации и последующего выделения спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры по слиянию и процедуры создания гибридомы. Альтернативно, анти-CD5-антитела могут быть созданы с использованием HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. При создании дополнительных анти-CD5-антител, CD5 антиген выделяют и/или очищают. CD5 антигеном может быть фрагмент CD5 из внеклеточного домена CD5. Иммунизация животных может быть проведена любым способом, известным в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Способы иммунизации животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, выше и Патент США № 5,994,619. CD5 антиген может быть введен с адъювантом для стимуляции иммунного ответа. Адъюванты, известные в данной области, включают полный или неполный адъювант Фрейнда, RIBI (мурамилдипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). После иммунизации животного CD5 антигеном, антитело-продуцирующие иммортализованные клеточные линии получают из клеток, полученных от иммунизированного животного. После иммунизации животное умерщвляют и лимфатические узлы и/или В-клетки селезенки иммортализуют способами, известными в данной области техники (например, переносом онкогена, трансдукцией онкогенного вируса, воздействием канцерогенных или мутирующих соединений, слиянием с иммортализованной клеткой, например, миеломной клеткой, и инактивацией гена-супрессора опухоли. См., например, Harlow and Lane, выше. Гибридомы могут быть выбраны, клонированы и подвергнуты скринингу на предмет желаемых характеристик, включая устойчивый рост, высокое продуцирование антитела и желательные характеристики антитела.

Анти-CD5 антитела для использования в анти-CD5 ADC, описанных в настоящем документе, также могут быть идентифицированы с применением высокопроизводительного скрининга библиотек антител или фрагментов антител на молекулы, способные связывать CD5. Такие способы включают способы in vitro дисплея, известные в данной области техники, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, рибосомный дисплей, иРНК дисплей и кДНК дисплей, среди прочего. Использование фагового дисплея для выделения антител, антигенсвязывающих фрагментов или лигандов, которые связывают биологически релевантные молекулы, было рассмотрено, например, в Felici et al., Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995; Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997; и Hoogenboom et al., Immunotechnology 4:1-20, 1998, описания каждого из

которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к методам in vitro дисплея. Рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки были сконструированы для выбора полипептидов, которые связывают поверхностноклеточные антигены, как описано у Kay, Perspect. Drug Discovery Des. 2:251-268, 1995 и Kay et al., Mol. Divers. 1:139-140, 1996, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к открытию антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно фаг-экспонированы как функциональные молекулы (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-84 1992, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к применению методов in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, таких как фрагменты Fab и scFv, были экспрессированы в форматах 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; и Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к платформам in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул).

Кроме методов in vitro дисплея, методы компьютерного моделирования могут применяться для конструирования и идентификации анти-CD5 антител или фрагментов антител in silico, например, с применением методов, описанных в US 2013/0288373, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к способам молекулярного моделирования для идентификации анти-CD5 антитела. Например, с применением методов компьютерного моделирования, специалист в данной области техники может провести скрининг библиотек антител или фрагментов антитела in silico на молекулы, способные связывать специфические эпитопы на CD5, такие как внеклеточные эпитопы CD5.

В одном варианте осуществления, анти-CD5 антитело, применяемое в ADC, описанных в настоящем документе, способно интернализоватья в клетку. При идентификации анти-CD5 антитела (или его фрагмента), дополнительные методы могут применяться для идентификации антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD5 на поверхности клетки (например, Т клетки) и, дополнительно, способны быть интернализованы клеткой, например, рецептор-опосредованным эндоцитозом. Например, методы in vitro дисплея, описанные выше, могут быть адаптированы для скрининга антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD5 на поверхности гемопоэтической стволовой клетки, и которые затем интернализуются. Фаговый дисплей представляет один из таких методов, которые могут применяться в сочетании с данной парадигмой скрининга. Для идентификации анти-CD5 антител или их фрагментов, которые связывают CD5 и затем интернализуются CD5+ клеткой, специалист в данной области техники может применять методы фагового дисплея, описанные у Williams et al., Leukemia 19:1432-1438, 2005, описание которого включено в настоящий

документ в качестве ссылки полностью.

Потенциал интернализации анти-CD5 антитела или его фрагмента может оцениваться, например, с применением анализов радионуклидной интернализации, известных в данной области техники. Например, анти-CD5 антитело или его фрагмент, идентифицированное с применением методов in vitro дисплея, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники, может быть функционализировано введением радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{169}Yb, ^{186}Re, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{177}Lu, ^{77}As, ^{72}As, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{89}Zr, ^{212}Bi, ^{213}Bi или ^{225}Ac. Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, могут быть введены в антитела, их фрагменты или лиганды с применением гранул, таких как полистирольные гранулы, содержащих электрофильные реагенты, (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Радиомеченные антитела или их фрагменты могут быть инкубированы с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы позволить интернализацию. Интернализованные антитела или их фрагменты могут быть идентифицированы через определение испускаемой радиации (например, γ-радиации) полученными гемопоэтическими стволовыми клетками по сравнению с испускаемой радиацией (например, γ-радиацией) восстановленного промывочного буфера. Вышеупомянутые анализы интернализации также могут применяться для характеризации ADC.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD5 антитело (или его фрагмент) имеет определенный период полужизни в сыворотке. Например, анти-CD5 антитело (или его фрагмент) может иметь период полужизни в сыворотке примерно 1-24 часов у пациента-человека. ADC, содержащие такие анти-CD5 антитела, также могут иметь, например, период полужизни в сыворотке примерно 1-24 часов у пациента-человека. Фармакокинетический анализ через измерение уровней в сыворотке может быть проведен с применением анализов, известных в данной области техники.

Для рекомбинантного продуцирования анти-CD5 антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессирования в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антитело-кодирующих векторов, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc эффекторная функция не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, Патенты 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), стр. 245-254,

описывающие экспрессию фрагментов антител в E. coli.). После экспрессии, антитело может быть выделено из бактериальной клеточной суспензии в растворимой фракции, и может быть далее очищено.

Клетки позвоночных также могут применяться в качестве хозяев. Например, могут применяться клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы для выращивания в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток-хозяев млекопитающих включают CV1 клеточную линию почек обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клеточную линию почек эмбриона человека (293 или 293 клетки, как описано, например, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4 клетки, как описано, например, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK; клетки почек серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); TRI клетки, как описано, например, у Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); MRC 5 клетки; и FS4 клетки. Другие полезные линии клеток-хозяев включают клетки яичников китайского хомяка (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 определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антитела, представлен, например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003). В одном варианте осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичников китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой).

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD5 антитела, которые могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают такие, которые содержат комбинацию CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 областей, указанных в таблицах 1 и 2, ниже.

Таблица 1.

№ АТ	**Наименование**	**CDRH1**	**SEQ ID NO:**	**CDRH2**	**SEQ ID NO:**	**CDRH3**	**SEQ ID NO:**
1	1D8	SGYSFTGYTM	57	LINPYNGGTT	94	CARDYYGSSPDFDYW	131
2	3I21	SGYSFTDYTM	58	LINPYNGGTM	95	CARDNYGSSPDFDYW	132
3	4H10	SGYSFTGYTM	59	LINPYNGGTM	96	CARDNYGSSPYFDYW	133
4	8J23	SGYSFTGY	60	LINPYNGG	97	CARDNYGSSPYFDY	134

		TM		TM		W	
5	5O4	SGYSFTGYTM	61	LINPYNGGTT	98	CARDYYGSSPDFDYW	135
6	4H2	SGFTFSNYAM	62	SISSGGNTF	99	CVRYYYGVTYWYFDVW	136
7	5G2	SGFTFSSYAM	63	SISSGGSTY	100	CVRYYYGIRYWYFDVW	137
8	8G8	SGYSFTAYNI	64	SIDPYYGDTK	101	CARRMITMGDWYFDVW	138
9	6M4	SGYSFTAYSM	65	SIDPYYGDTK	102	CARRMITTGDWYFDVW	139
10	2E3	SGYTFTNFAI	66	LISSNSGDVS	103	CARHYGAHNYFDYW	140
11	4E24	SGYTFTNFAI	67	LISTSSGDVS	104	CARHYGANNYFDYW	141
12	4F10	SGYTFTNFAI	68	LISSNSGDVS	105	CARHYGAHNYFDYW	142
13	7J9	SGYTFTNFAI	69	LISSNSGDVS	106	CARHYGAHNYFDYW	143
14	7P9	SGFNIKDTYM	70	RIDPANGNTK	107	CAREENYYGTYYFDYW	144
15	8E24	SGYSFTSYWM	71	MIHPSDSETR	108	CARWGDHDDAMDFW	145
16	6L18	SGFSLTNYDV	72	VIWSGGNTD	109	CARNHGDGYFNWYFDVW	146
17	7H7	SGFSLTNYDV	73	VIWSGGNTD	110	CARNHGDGYYNWYFDVW	147
18	1E7	SGFTFSNYGM	74	AINSNGDITY	111	CARGTAWFTYW	148
19	8J21	SGYSFTGYTM	75	LINPYNGGTR	112	CARDGDDGWDIDVW	149
20	7I11	SGYIFANYGM	76	WINTYTGEPT	113	CARRGTYWHFDVW	150
21	8M9	SGYNFTNY	77	WINTYTGE	114	CARRGSYWHFDVW	151

		GM		PT			
22	1P21	SGYTFTNYGM	78	WINTYTGEPT	115	CARRSTLVFDYW	152
23	2H11	SGYTFTDYYI	79	WIYPGGGNTR	116	CARNGYWYFDVW	153
24	3M22	SGYTFTDYYI	80	WIYPGGGNTR	117	CARNGYWYFDVW	154
25	5M6	SGNTFTNFYL	81	CIYPGNVKTK	118	CAKEGDYDGTAYFDYW	155
26	5H8	SGYTFTNYGM	82	WINTYTGEPT	119	CARRRDGNFDYW	156
27	7I19	SEFTFSNYAM	83	TISSGGSYTY	120	CVRHGYFDVW	157
28	1A20	SGYTFTSYRM	84	RIDPYDSGTH	121	CAFYDGAYW	158
29	8E15	SGFNIKDTYM	85	RIDPANGNTK	122	CASYDPDYW	159
30	8C10	SGYSFTDYTM	86	LINPYNGGTR	123	CARDTTATYYFDYW	160
31	3P16	SGYMFTNHGM	87	WINTYTGEPT	124	CARRVATYFDVW	161
32	4F3	SGYMFTNYGM	88	WINTYTGEPT	125	CTRRSHITLDYW	162
33	5M24	SGYIFTNYGM	89	WINTYTGEPT	126	CARRRTTAFDYW	163
34	5O24	SGFNIKDYYI	90	WIDPENGRTE	127	CNNGNYVRHYYFDYW	168
35	7B16	SGYTFINYGM	91	WINTYTGEPT	128	CTRRREITFDYW	164
36	1E8	SGYTFTDYFI	92	EIYPGSSNTY	129	CARSGISPFTYW	165
37	2H16	SGYIFTGYNI	93	AVYPGNGDTS	130	CAKYDRFFASW	166

Таблица 2.

№ AT	Наименование	CDRH1	SEQ ID NO:	CDRH2	SEQ ID NO:	CDRH3	SEQ ID NO:
1	1D8	SQGISNHL	167	YFTSS	204	CQQYSNLPYTF	241
2	3I21	SQGIRNYL	185	YFTSS	205	CQQYSNLPYTF	242
3	4H10	SQGISNHL	169	YFTSS	206	CQQYSNLPYTF	243
4	8J23	SQGINNYL	170	YYTSS	207	CQQYSKIPYTC	244
5	5O4	SQGISNHL	171	YFTSS	208	CQQYSNLPYTF	245
6	4H2	SQSVDHDGDSYM	172	YAASN	209	CQQNYEDPTF	246
7	5G2	SQSVDYDGDSYM	173	YAASN	210	CQQSNEDPTF	247
8	8G8	SQDISNYL	174	YYTSR	211	CQQGDALPWTF	248
9	6M4	SQDISTYL	175	FYTSR	212	CQQGNSLPFTF	249
10	2E3	TSSISSSYL	176	YGTSN	213	CQQWSSRPPTF	250
11	4E24	NSSVSSSYL	177	YGTSN	214	CQQYSGYPLTF	251
12	4F10	TSSISSSYL	178	YGTSN	215	CQQYSDYPLTF	252
13	7J9	TSSISSSYL	179	YGTSN	216	CQQRSYFPFTF	253
14	7P9	SENIYYNL	180	YNANS	217	CKQVYDVPFTF	254
15	8E24	SENIYGYF	181	YNAKT	218	CQHHYGTPFTF	255
16	6L18	SQDINNYI	182	HYTST	219	CLQYDNLWTF	256
17	7H7	SQDINKYI	183	HYTST	220	CLQYDNLWTF	257
18	1E7	SENIYSYL	184	YNAKT	221	CQHHYGYPYTF	258
19	8J21	SQGIRNYL	185	YHTST	222	CQQYSNLPLTF	259
20	7I11	SQDVRTDV	186	YSASF	223	CQQHYTSPWTF	260
21	8M9	SQDVITAV	187	YSASY	224	CQQHYSTPWTF	261
22	1P21	SQSIGTSI	188	KSASE	225	CQQSNRWPLTF	262
23	2H11	SSQSLLNQKNYL	189	YWAST	226	CQNDYDYPYTF	263
24	3M22	SSSVSSSYL	190	YSTSN	227	CHQYHRSPLTF	264
25	5M6	SENIYYNL	191	YNANS	228	CQQTFDVPWTF	265
26	5H8	SQTIGTSI	192	KNASE	229	CQQSNSWPLTY	266

27	7I19	SQSLLYSSDQKNYL	193	YWAST	230	CQQYYNYPLTF	267
28	1A20	NSSVSYM	194	YDTSK	231	CQQWSSNPFTF	268
29	8E15	SENIYYNL	195	YNANS	232	CKQAYDVPWTF	269
30	8C10	SSSLSYM	196	YDTSN	233	CQQWSSFPPTF	270
31	3P16	SQRIGTSM	197	KSASE	234	CQQSNSWPLTF	271
32	4F3	SQSIGTSI	198	KSASE	235	CQQSNSWPLTF	272
33	5M24	SQNIGTSI	199	KDASE	236	CQQSDSWPLTF	273
34	5O24	ISSVSYM	200	YATSN	237	CQQWSSNPRTF	274
35	7B16	SQTIATSI	201	KNASE	238	CQQSNSWPLTF	275
36	1E8	SQSLVHSNGNTYL	202	YKVSN	239	CWQNTHFPQTF	276
37	2H16	NESVEYSGTSLM	203	SAASN	240	CQQSRQVPLTF	277

Анти-CD137 антитела

CD137 также называют CDw137, TNFRSF9, 4-1BB и ILA. Анти-CD137 антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и их ADC могут применяться в качестве терапевтических агентов для профилактики и лечения GVHD из гемопоэтических стволовых клеток у пациента, страдающего или подверженного риску GVHD или аутоиммунного заболевания. Дополнительно, было обнаружено, что лиганды, которые связывают CD137, такие как CD137L человека, могут применяться в качестве терапевтического агента для профилактики или лечения пациента, страдающего или подверженного риску GVHD. Эти лиганды, такие как растворимый CD137 человека, могут быть ковалентно связаны с эффекторным доменом, таким как Fc домен, например, для того, чтобы способствовать антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Было показано, что Т клетки экспрессируют CD137, так как этот антиген относится к суперсемейству трансмембранных TNF рецепторов костимулирующих молекул, и экспрессируется во множестве гемопоэтических клеток и способствует активации Т клетки и регулирует пролиферацию и выживание Т клеток (см., например, Cannons et al., J. Immunol. 167:1313-1324, 2001, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к экспрессии CD137 Т клетками). Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы с применением методов, известных в данной области техники, и описанных в настоящем документе, например, иммунизации, методов компьютерного моделирования и способов выбора in vitro, таких как фаговый дисплей и платформы дисплея на клеточной основе, описанные ниже.

Анти-CD137 антитела, которые могут применяться для профилактики и лечения

GVHD или аутоиммунного заболевания способами, описанными в настоящем документе, включают одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность STYWIS (SEQ ID NO: 278);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность KIYPGDSYTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 279);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYGIFDY (SEQ ID NO: 280);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SGDNIGDQYAH (SEQ ID NO: 281)

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность QDKNRPS (SEQ ID NO: 282); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность ATYTGFGSLAV (SEQ ID NO: 283)

Дополнительные анти-CD137 антитела, которые могут применяться для профилактики или лечения GVHD и аутоиммунного заболевания способами, описанными в настоящем документе, включают одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность STYWIS (SEQ ID NO: 278);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность KIYPGDSYTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 279);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RGYGIFDY (SEQ ID NO: 280);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SGDNIGDQYAH (SEQ ID NO: 281)

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность QDKNRPS (SEQ ID NO: 282); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность STYTFVGFTTV (SEQ ID NO: 284)

Дополнительные анти-CD137 антитела включают такие, которые имеют одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность NSYAIS (SEQ ID NO: 285);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность GIIPGFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 286);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RKNEEDGGFDH (SEQ ID NO: 287);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SGDNLGDYYAS (SEQ ID NO: 288)

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность DDSNRPS (SEQ ID

NO: 289); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QTWDGTLHFV (SEQ ID NO: 290)

Дополнительные анти-CD137 антитела или ADC включают такие, которые имеют одну или несколько или все из следующих CDR:

a. CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SDYYMH (SEQ ID NO: 291);

b. CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность VISGSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 292);

c. CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность RLYAQFEGDF (SEQ ID NO: 293);

d. CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SGDNIGSKYVS (SEQ ID NO: 294)

e. CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SDSERPS (SEQ ID NO: 295); и

f. CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность QSWDGSISRV (SEQ ID NO: 296)

Вышеупомянутые антитела описаны, например, в Патенте США № 9,468,678, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD137 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам. Антитела и их фрагменты, описанные в Патенте США № 9,468,678, могут применяться в сочетании со способами, описанными в настоящем документе.

В другом варианте осуществления, анти-CD137 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является анти-CD137 антитело мыши BBK2 (Thermo Fisher; MS621PABX) или анти-CD137 антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие BBK2 антителу. BBK2 антителом (которое также может называться BBK-2 антителом или анти-4-1BB антителом), является моноклональное антитело мыши (IgG1, каппа), которое связывается с эктодоменом 4-1BB рекомбинантного белка человека (4-1BB, также известного как CD137). В некоторых вариантах осуществления, способы и композиции по описанию включают анти-CD137 антитело, содержащее связывающие области (например, CDR) BBK2 антитела. В другом варианте осуществления, способы и композиции по описанию включают антитело, которое конкурентно ингибирует связывание BBK2 антитела с его эпитопом на CD137. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD137 антителом является гуманизированное BBK2 или химерное BBK2.

В одном варианте осуществления, способы и композиции, описанные в настоящем документе, включают химерное анти-CD137 (ch-BBK2) антитело, содержащее вариабельные области тяжелой и легкой цепи BBK2. В некоторых вариантах осуществления, химерным BBK2 антителом является IgG1 антитело, содержащее константные области человека. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи ch-

BBK2 описана в SEQ ID NO: 297, и аминокислотная последовательность легкой цепи ch-BBK2 описана в SEQ ID NO: 298. CDR области (CDR1, CDR2 и CDR3) каждой из последовательностей тяжелой и легкой цепи описаны жирным шрифтом ниже. Вариабельные области указаны курсивом.

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA**SGYTFTSYW**INWVKQRPGQGLEWIG**NIYP SDSYT**NYNQKFKDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYC**TRNGVEGYPHYYA ME**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 297)

DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRA**SQDLSNH**LYWYQQKPDGTVKLLI**YYTS**RL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYF**CQQGYTLPY**TFGGGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 298)

Вышеупомянутые CDR области (и BBK2 антитело) описаны у Lee et al. (2002) European J of Immunogenetics 29(5):449-452. Таким образом, в одном варианте осуществления, аминокислотные последовательности VH CDR анти-CD137 антитела BBK2 (включая ch-BBK2) следующие: SGYTFTSYW (VH CDR1; SEQ ID NO: 299); NIYPSDSYT (VH CDR2; SEQ ID NO: 300) и TRNGVEGYPHYYAME (VH CDR3; SEQ ID NO: 301). Аминокислотные последовательности VL CDR анти-CD137 антитела BBK2 (включая ch-BBK2) следующие: SQDLSNH (VL CDR1; SEQ ID NO: 302); YYTS (VL CDR2; SEQ ID NO: 303) и CQQGYTLPY (VL CDR3; SEQ ID NO: 304).

Альтернативно, CDR области BBK2 могут быть определены согласно нумерации по Кэботу. CDR, определенные согласно нумерации по Кэботу, описаны ниже для каждой из последовательностей тяжелой и легкой цепи (описаны ниже жирным шрифтом). Вариабельные области BBK2 выделены курсивом.

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT**SYWIN**WVKQRPGQGLEWIG**NIYPSDSY TNYNQKFKD**KATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYCTR**NGVEGYPHYYAMEY**WGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ch-BBK2 тяжелая цепь; SEQ ID NO: 297)

DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGC**RASQDLSNHLY**WYQQKPDGTVKLLIY**YTSRLHS**G VPSRFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYFC**QQGYTLPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS

DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ch-BBK2 легкая цепь; SEQ ID NO: 298)

Таким образом, в одном варианте осуществления, аминокислотные последовательности VH CDR анти-CD137 антитела BBK2 (включая ch-BBK2) следующие: SYWIN (VH CDR1; SEQ ID NO: 305); NIYPSDSYTNYNQKFKD (VH CDR2; SEQ ID NO: 306) и NGVEGYPHYYAMEY (VH CDR3; SEQ ID NO: 307), и аминокислотные последовательности VL CDR анти-CD137 антитела BBK2 (включая ch-BBK2) следующие: RASQDLSNHLY (VL CDR1; SEQ ID NO: 308); YTSRLHS (VL CDR2; SEQ ID NO: 309) и QQGYTLPYT (VL CDR3; SEQ ID NO: 310).

Вариабельная область тяжелой цепи BBK2 указана в SEQ ID NO: 311 как QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDS YTNYNQKFKDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYCTRNGVEGYPHYYAMEY WGQGTSVTVSS. Вариабельная область легкой цепи BBK2 указана в SEQ ID NO: 312 как DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRASQDLSNHLYWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYFCQQGYTLPYTFGGGTKLEIK. Анти-CD137 антитела (включая анти-CD137 ADC) могут содержать аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, как указано в SEQ ID Nos: 311 и 312, соответственно.

В одном варианте осуществления, анти-CD137 антитело, *например,* химерное (ch-BBK2) антитело или гуманизированное BBK2 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, и CDR3 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307; и содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310.

В одном варианте осуществления, анти-CD137 антитело, *например,* химерное (ch-BBK2) антитело или гуманизированное BBK2 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 299, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 300, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301; и содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 303, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304.

Таким образом, BBK2, гуманизированное BBK2 или химерное BBK2 антитела могут применяться в анти-CD137 ADC и способах, описанных в настоящем документе. Каждое из этих антител может быть конъюгировано с любым цитотоксином, описанным

ниже с применением способов, известных в данной области техники, и описанных в настоящем документе.

Дополнительные последовательности для анти-CD137 антител или связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, представлены в таблице 5.

Дополнительные анти-CD137 антитела, которые могут быть использованы в сочетании с цитотоксином, описанным в настоящем документе, могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в данной области техники (например, получение гибридомы). Гибридомы могут быть получены с использованием мышиной системы. Протоколы для иммунизации и последующего выделения спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры по слиянию и процедуры создания гибридомы. Альтернативно, анти-CD137-антитела могут быть созданы с использованием HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. При создании дополнительных анти-CD137-антител, CD137 антиген выделяют и/или очищают. CD137 антигеном может быть фрагмент CD137 из внеклеточного домена CD137. Иммунизация животных может быть проведена любым способом, известным в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Способы иммунизации животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, выше и Патент США № 5,994,619. CD137 антиген может быть введен с адъювантом для стимуляции иммунного ответа. Адъюванты, известные в данной области, включают полный или неполный адъювант Фрейнда, RIBI (мурамилдипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). После иммунизации животного CD137 антигеном, антитело-продуцирующие иммортализованные клеточные линии получают из клеток, полученных от иммунизированного животного. После иммунизации животное умерщвляют и лимфатические узлы и/или В-клетки селезенки иммортализуют способами, известными в данной области техники (например, переносом онкогена, трансдукцией онкогенного вируса, воздействием канцерогенных или мутирующих соединений, слиянием с иммортализованной клеткой, например, миеломной клеткой, и инактивацией гена-супрессора опухоли. См., например, Harlow and Lane, выше. Гибридомы могут быть выбраны, клонированы и подвергнуты скринингу на предмет желаемых характеристик, включая устойчивый рост, высокое продуцирование антитела и желательные характеристики антитела.

Анти-CD137 антитела могут быть созданы из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность CD137 связывающей молекулы, представленной настоящим описанием. Аминокислотной последовательностью, кодированной нуклеотидной последовательностью, может быть любая часть антитела, такая как CDR, последовательность, содержащая одну, две или три CDR, вариабельная область тяжелой цепи, вариабельная область легкой цепи, или может быть полноразмерной тяжелой цепью

или полноразмерной легкой цепью. Нуклеиновой кислотой по описанию может быть, например, ДНК или РНК, и может содержать или не содержать интронные последовательности. Обычно, нуклеиновой кислотой является молекула кДНК.

В дополнение к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, растворимые CD137 лиганды, такие как CD137 лиганд человека, могут быть введены пациенту согласно способам, описанным в настоящем документе, для подготовки пациента до терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Например, CD137 лиганды, такие как CD137 лиганд человека, могут быть конъюгированы с цитотоксином (например, согласно способам, описанным ниже или известным в данной области техники) или другой эффекторной молекулой, такой как Fc домен. Майтанзиновые цитотоксины для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают, например, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgG1, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgG2, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgG3, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgG4, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgA, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgE, Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgM и Fc конъюгаты CD137 лиганд человека-IgD.

Антитела и лиганды для применения в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают варианты таких антител, описанных выше, таких как фрагменты антител, которые содержат или не содержат Fc домен, а также гуманизированные варианты не человеческих антител, описанных в настоящем документе, и антителоподобных белковых каркасов (например, ^{10}Fn3 доменов), содержащих одну или несколько или все CDR или их эквивалентны области антитела, фрагмент антитела или растворимый лиганд, описанный в настоящем документе.

Анти-CD252 антитела

В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD252 (также называемые OX40 лиганд (OX40L), белок NCBI Эталонная последовательность: NP_003317,1; Uniprot № доступа: P23510; SEQ ID NOs: 313 или 314), которые могут применяться в качестве терапевтического агента для профилактики или лечения GVHD. Такие антитела могут применяться отдельно или конъюгированы с цитотоксином в виде конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

В одном варианте осуществления, способы и композиции (например, ADC), описанные в настоящем документе, включают анти-CD252 антитело, аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи которого указаны в SEQ ID NOs. 315 и 316, соответственно. В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 315, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 316. В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 315, и вариабельную область легкой

цепи, содержащую CDR, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 316. Аминокислотные последовательности SEQ ID NOs: 315 и 316 представлены ниже.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NOs: 317-319, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 320-322. Аминокислотные последовательности SEQ ID NOs: 3-8 представлены ниже.

Анти-CD252 VH аминокислотная последовательность (следующие CDR последовательности определены через IMGT)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGS GGATRYADSVKGRFTISRDNSRNTVYLQMNSLRVEDTAVFYCTKDRLIMATVRGPYYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 315)

CDR-H1: GFTFSNYA (SEQ ID NO: 317)

CDR-H2: ISGSGGAT (SEQ ID NO: 318)

CDR-H3: TKDRLIMATVRGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 319)

Анти-CD252 VL аминокислотная последовательность (следующие CDR последовательности определены через IMGT)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSVSFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 316)

CDR-L1: QSISSY (SEQ ID NO: 320)

CDR-L2: AAS (SEQ ID NO: 321)

CDR-L3: QQSHSVSFT (SEQ ID NO: 322)

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, применяемым в способах и композициях, описанных в настоящем документе, является интактное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 315, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 316. В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело сконструировано так, чтобы иметь короткий период полужизни.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанным в настоящем документе, является антитело, выбранное из 11C3.1 (Biolegend, каталожный №326302), 159403 (R&D Systems, каталожный №MAB10541), 159408 (R&D Systems, каталожный №MAB1054), MM0505-8S23 (Novus, каталожный №NBP2-11969) или окселумаб (Novus, каталожный №NBP2-52687-0,1).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является моноклональное анти-CD252 антитело мыши 11C3.1 или анти-CD252

антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие 11C3.1 антителу. 11C3.1 (продаваемое Biolegend кат. № 326302 (дата 27 февраля 2019)).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 11C3.1 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 11C3.1. В другом варианте осуществления, анти-CD252 антитело, применяемое в композициях и способах, описанных в настоящем документе, является гуманизированным 11C3.1 антителом.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является моноклональное анти-CD252 антитело мыши 159403 или анти-CD252 антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие 159403 антителу. 159403 (продаваемое R&D Systems, каталожный №MAB10541 (дата 27 февраля 2019)).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 159403, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 159403. В другом варианте осуществления, анти-CD252 антителом, применяемым в композициях и способах, описанных в настоящем документе, является гуманизированное 159403 антитело.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является моноклональное анти-CD252 антитело мыши 159408 или анти-CD252 антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие 159408 антителу. 159408 (продаваемое R&D Systems, каталожный №MAB1054 (дата 27 февраля 2019)).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 159408, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела 159408. В другом варианте осуществления, анти-CD252 антителом, применяемым в композициях и способах, описанных в настоящем документе, является гуманизированное 159408 антитело.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является моноклональное анти-CD252 антитело мыши MM0505-8S23 или анти-CD252 антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие MM0505-8S23 антителу. MM0505-8S23 (продаваемое Novus, каталожный №NBP2-11969 (дата 27 февраля 2019)). Это антитело, получаемое из гибридомы, (миеломы мыши, конденсированной с клетками селезенки от мыши с TNFSF4 человека, также называется OX40 лиганд.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела MM0505-8S23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела MM0505-

8S23. В другом варианте осуществления, анти-CD252 антителом, применяемым в композициях и способах, описанных в настоящем документе, является гуманизированное MM0505-8S23 антитело.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антителом, которое может применяться в способах и композициях (включая ADC), описанных в настоящем документе, является моноклональное анти-CD252 антитело кролика окселумаб, или анти-CD252 антитело, содержащее антигенсвязывающие области, соответствующие антителу окселумаб. Окселумаб (продаваемое Novus, каталожный №NBP2-52687-0,1 (дата 27 февраля 2019)).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела окселумаб, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD252 антитела окселумаб. В другом варианте осуществления, анти-CD252 антителом, применяемым в композициях и способах, описанных в настоящем документе, является гуманизированное антитело окселумаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть, содержит тяжелую цепь, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 323, и легкую цепь, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 324. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 332. В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR, как указаны в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 325-327, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR, как указаны в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 328-330. В одном варианте осуществления, антителом является интактное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331, и вариабельную область легкой цепи, как указана в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 332. Аминокислотные последовательности SEQ ID NOs: 323-330 представлены ниже.

последовательности полноразмерной тяжелой цепи окселумаба (следующие CDR последовательности определены IMGT; вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 331) подчеркнута):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSGGFTY
YADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLVAPGTFDYWGQGALV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL

TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 323)

CDR-H1: GFTFNSYA (SEQ ID NO: 325)

CDR-H2: ISGSGGFT (SEQ ID NO: 326)

CDR-H3: AKDRLVAPGTFDY (SEQ ID NO: 327)

последовательности полноразмерной легкой цепи окселумаба (следующие CDR последовательности определены IMGT; вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 332) подчеркнута):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 324)

CDR-L1: QGISSW (SEQ ID NO: 328)

CDR-L2: AAS (SEQ ID NO: 329)

CDR-L3: QQYNSYPYT (SEQ ID NO: 330)

Анти-CD252 антитела или связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также может включать модификации и/или мутации, которые изменяют свойства антител и/или фрагментов, таких, которые повышают период полужизни, повышают или снижают ADCC и т.д., как известно в данной области техники.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его связывающий фрагмент, применяемое в способах и композициях, описанных в настоящем документе, содержит вариантную Fc область, где указанная вариантная Fc область содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию относительно дикого типа Fc области, такую, что указанная молекула имеет измененную аффинность для FcгаммаR. Определенные аминокислотные положения в Fc области известны из исследований кристаллографии как имеющие прямой контакт с FcγR. Более конкретно, аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (B/C петля), аминокислоты 297-299 (C'/E петля) и аминокислоты 327-332 (F/G) петля. (см. Sondermann et al., 2000 Nature, 406: 267-273). Таким образом, анти-CD252 антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать вариантные Fc области, содержащие модификацию, по меньшей мере, одного остатка, который имеет прямой контакт с Fc.γ.R по данным структурного и кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления, Fc область анти-CD252 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 265 согласно EU индексу как у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), прямо включенном в настоящий документ в качестве ссылки. «EU индекс как у Кэбота» относится к нумерации IgG1 EU антитела человека. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C мутацию. В некоторых вариантах осуществления, Fc область анти-CD252 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 234 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A

мутацию. В некоторых вариантах осуществления, Fc область анти-CD252 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 235 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит L235A мутацию. В еще одном варианте осуществления, Fc область содержит L234A и L235A мутацию. В дополнительном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию.

В определенных аспектах вариантный IgG Fc домен содержит одно или несколько аминокислотных замещений, вызывающих пониженную или снижение или удаление аффинности связывания для Fc.гамма.R и/или C1q по сравнению с диким типом Fc домена, не содержащим одно или несколько аминокислотных замещений. Fc связывающие взаимодействия являются жизненно важными для множества эффекторных функций и нисходящих сигнальных событий включая, но не ограничиваясь ими,, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Следовательно, в определенных аспектах, анти-CD252 антитело, содержащее модифицированную Fc область (например, содержащее L234A, L235A и D265C мутацию) имеет по существу сниженные или ликвидированные эффекторные функции.

Аффинность к Fc области может быть определена с применением множества методов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, методы равновесия (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализ (RIA)) или анализ поверхностного плазмонного резонанса или другой механизм анализа на основе кинетики (например, BIACORE™ анализ или Octet™ анализ (forteBIO)) и другие способы, такие как косвенные анализы связывания, другие способы, такие как анализы косвенного связывания, анализы конкурентного связывания резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматографии (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут применять метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или применять множество способов определения, включая, но не ограничиваясь ими, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетики можно найти в Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), который сфокусирован на взаимодействиях антитело-иммуноген. Одним примером анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубирование меченого антигена с антителом, представляющим интерес, в присутствии увеличивающихся количеств немеченого антигена и определение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность антитела, представляющего интерес, к конкретному антигену и скорость диссоциации связывания могут быть определены из данных анализа распределения Скэтчарда. Конкуренция со вторым антителом также может быть определена с применением радиоиммуноанализов. В этом случае, антиген инкубирован с антителом, представляющим интерес, конъюгированным с меченым соединением в

присутствии увеличивающих количеств немеченого второго антитела.

Антитела по изобретению могут быть дополнительно сконструированы так, чтобы дополнительно модулировать период полужизни антитела через введение дополнительных Fc мутаций, таких как описаны, 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. Типовые мутации, которые могут быть проведены отдельно или в комбинации, включают T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P2571, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R мутации.

Таким образом, в одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию, дающую снижение периода полужизни. Антитело, имеющее короткий период полужизни может быть предпочтительным в определенных случаях, где ожидается, что антитело будет функционировать как краткосрочный терапевтический агент, *например,* на стадии подготовки, описанной в настоящем документе, где антитело вводят непосредственно перед введением HSC. В идеале, антитело будет по существу выведено до доставки HSC, которые также в общем экспрессируют CD252, но не являются мишенью анти-CD252 антитела, в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления, Fc область содержит мутацию в положении 435 (EU индекс согласно Кэботу). В одном варианте осуществления, мутацией является H435A мутация.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело, описанное в настоящем документе, имеет период полужизни равный или меньше примерно 14 часов, равный или меньше примерно 13 часов, равный или меньше примерно 12 часов или равный или меньше примерно 11 часов. В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело, описанное в настоящем документе, имеет период полужизни равный или меньше примерно 24 часа, период полужизни равный или меньше примерно 22 часа, период полужизни равный или меньше примерно 20 часов, период полужизни равный или меньше примерно 18 часов, период полужизни равный или меньше примерно 16 часов, период полужизни равный или меньше примерно 14 часов, равный или меньше примерно 13 часов, равный или меньше примерно 12 часов или равный или меньше примерно 11 часов. В одном варианте осуществления, период полужизни антитела составляет от примерно 1 часа до примерно 20 часов, от примерно 2 часов до примерно 18 часов, от примерно 4 часов до примерно 16 часов, от примерно 6 часов до примерно 14 часов, от примерно 8 часов до примерно 12 часов, от примерно 11 часов до примерно 12 часов, от примерно 11 часов до примерно 24 часов; от примерно 12 часов до примерно 22 часов; от примерно 10 часов до примерно 20 часов; от примерно 8 часов до примерно 18 часов; от примерно 1 часа до примерно 6 часов, от примерно 2 часов до примерно 5 часов, от

примерно 3 часов до примерно 4 часов или от примерно 14 часов до примерно 24 часов.

В некоторых аспектах, Fc область содержит две или несколько мутаций, которые дают пониженный период полужизни и значительно снижают или полностью устраняют эффекторную функцию антитела. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит мутацию, дающую снижение периода полужизни, и мутацию, по меньшей мере, одного остатка, который имеет прямой контакт с FcγR (например, по данным структурного и кристаллографического анализа). В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию и L235A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию и D265C мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит H435A мутацию, L234A мутацию, L235A мутацию и D265C мутацию.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с цитотоксином (например, аматоксином) путем цистеинового остатка в Fc домене антитела или его антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления, цистеиновый остаток вводят путем мутации в Fc домен антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, цистеиновый остаток может быть выбран из группы, состоящей из Cys118, Cys239 и Cys265. В одном варианте осуществления, Fc область анти-CD252 антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотное замещение на аминокислоте 265 согласно EU индексу как у Кэбота. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C и H435A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A и L235A мутацию. В одном варианте осуществления, Fc область содержит D265C, L234A, L235A и H435A мутацию.

В некоторых вариантах осуществления этих аспектов, цистеиновый остаток существует в природе в Fc домене антитела или его антигенсвязывающем фрагменте. Например, Fc доменом может быть IgG Fc домен, такой как IgG1 Fc домен человека, и цистеиновый остаток может быть выбран из группы, состоящей из Cys261, Csy321, Cys367 и Cys425.

Вариантные Fc домены, описанные в настоящем документе, определены согласно аминокислотной модификации, которая составляет их. Для всех аминокислотных замещений, обсуждаемых в настоящем документе в отношении Fc области, нумерацию всегда проводят согласно EU индексу. Таким образом, например, D265C является Fc вариантом с аспарагиновой кислотой (D) в EU положении 265, замещенной цистеином (C) относительно исходного Fc домена. Подобным образом, например, D265C/L234A/L235A определяет вариантный Fc вариант с замещениями в EU положениях 265 (D - C), 234 (L - A) и 235 (L - A) относительно исходного Fc домена. Вариант также может быть обозначен согласно его конечной аминокислотной композиции в мутированном EU аминокислотном положении. Например, L234A/L235A мутант может быть назван LALA. Необходимо отметить, что порядок, в котором проводят замещения, является произвольным.

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе. Альтернативно, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, содержащие SEQ ID Nos, описанные в настоящем документе с каркасными областями вариабельных областей, описанных в настоящем документе, имеющих аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет определенную скорость диссоциации, которая особенно предпочтительна при применении в качестве части конъюгата. Например, анти-CD252 антитело имеет, в некоторых вариантах осуществления, константу диссоциации (Koff) для CD252 человека и/или CD252 резуса от 1×10^{-2} до 1×10^{-3}, от 1×10^{-3} до 1×10^{-4}, от 1×10^{-5} до 1×10^{-6}, от 1×10^{-6} до 1×10^{-7} или от 1×10^{-7} до 1×10^{-8}, по данным биослойной интерферометрии (BLI). В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD252 (например, CD252 человека и/или CD252 резуса) с K_D примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее по данным анализа биослойной интерферометрии (BLI). В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающ фрагмент связывает CD252 (например, CD252 человека и/или CD252 резуса) с K_D примерно 90 нМ - 100 нМ, примерно 80 нМ - 90нМ, примерно 70 нМ - 80 нМ, примерно 60 нМ - 70 нМ, примерно 50 нМ - 60 нМ, примерно 40 нМ - 50 нМ, примерно 30 нМ - 40 нМ, примерно 20 нМ - 30 нМ, примерно 10 нМ - 20 нМ, примерно 8 нМ - 10 нМ, примерно 6 нМ - 8 нМ, примерно 4 нМ - 6 нМ, примерно 2 нМ - 4 нМ, примерно 1 нМ - 2 нМ или примерно 1 нМ или менее под данным анализа биослойной интерферометрии (BLI).

Антитела и их связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут применяться в конъюгатах, как описано более подробно ниже.

Типовые антигенсвязывающие фрагменты вышеупомянутых антител включают двойной-вариабельный иммуноглобулиновый домен, одноцепочечную Fv молекулу (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, Fv фрагмент, Fab фрагмент, $F(ab')_2$ молекулу и тандемный ди-scFv, среди прочих. Анти-CD252 антитела, описанные в настоящем документе, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифических антител, вариабельных двудоменных антител, мультицепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфически связывают CD252 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')2, Fv), scFv (одноцепочечные Fv), сурротела (включая конструкцию

суррогатной легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и подобные. Они также могут иметь или быть получены из любого изотипа, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD252 антителом является IgG (например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В одном варианте осуществления, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе. Альтернативно, анти-CD252 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, содержащие SEQ ID Nos, описанные в настоящем документе, с каркасными областями вариабельных областей, описанных в настоящем документе, имеющем аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID Nos, описанным в настоящем документе.

Анти-CD45 антитела

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD45 человека (иРНК NCBI Эталонная последовательность: NM_080921,3, белок NCBI Эталонная последовательность: NP_563578.2), включая те, которые способны связывать изоформу CD45RO, могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, такими, которые способствуют энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки у пациента, нуждающегося в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. В одном варианте осуществления, композиции и способы, описанные в настоящем документе, включают анти-CD45 антитело или ADC, которое связывается CD45RO человека, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 336. Антитела, которые связывают разные изоформы CD45, описанные в настоящем документе, также рассматриваются для применения в способах и композициях, описанных в настоящем документе. Множество изоформ CD45 возникает при альтернативном сплайсинге 34 экзонов в первичном транскрипте. Сплайсинг экзонов 4, 5, 6 и потенциально 7 дает начало множеству CD45 вариаций. Селективная экспрессия экзона наблюдается в CD45 изоформах, описанных в таблице 3, ниже.

Таблица 3. Экспрессия экзона в разных изоформах CD45

CD45 Изоформа	**Шаблон экспрессии экзона**
CD45RA (SEQ ID NO: 333)	Экспрессирует только 4 экзон
CD45RB (SEQ ID NO: 334)	Экспрессирует только 5 экзон
CD45RC (SEQ ID NO: 335)	Экспрессирует только 6 экзон
CD45RO (SEQ ID NO: 336)	Не экспрессирует экзоны4-6

Альтернативный сплайсинг может привести к получению отдельных экзонов или комбинаций экзонов, экспрессированных в различных изоформах белка CD45 (например,

CD45RA, CD45RAB, CD45RABC). Напротив, CD45RO не обладает экспрессией экзонов 4-6 и образуется из комбинации экзонов 1-3 и 7-34. Есть данные, что экзон 7 также может быть исключен из белка, что приводит к сплайсингу экзонов 1-3 и 8-34. Этот белок, обозначенный E3-8, был обнаружен на уровне мРНК, но в настоящее время не идентифицирован с помощью проточной цитометрии.

CD45RO в настоящее время является единственной известной изоформой CD45, экспрессированной на гемопоэтических стволовых клетках. CD45RA и CD45RABC не были определены или исключены из фенотипа гемопоэтических стволовых клеток. Существует доказательность из исследований, проводимых на мышах, что CD45RB экспрессирована на фетальных гемопоэтических стволовых клетках, но она не присутствует в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга взрослого человека. То есть, CD45RC имеет высокую степень полиморфизма в экзоне 6, найденном в азиатских популяциях (полиморфизм в экзоне 6 в CD45RC найден у приблизительно 25% японской популяции). Этот полиморфизм приводит к высокой экспрессии CD45RO и снижению уровней CD45RA, CD45RB и CD45RC. Дополнительно, CD45RA варианты (такие как CD45RAB и CD45RAC) демонстрируют полиморфизм в экзоне 4, который связан с аутоиммунным заболеванием.

Присутствие CD45RO на гемопоэтических стволовых клетках и его сравнительно ограниченная экспрессия на других иммунных клетках (таких как субпопуляции Т и В лимфоцитов и различные миелоидные клетки) делают CD45RO особенно подходящей мишенью для подготавливающей терапии пациентов, нуждающихся в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток. Поскольку у CD45RO отсутствует экспрессия только экзонов 4, 5 и 6, ее использование в качестве иммуногена позволяет проводить скрининг на общие CD45 Abs и CD45RO-специфические антитела.

Анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают анти-CD45 антитела и их антигенсвязывающие части. Антигенсвязывающие части антител хорошо известны в данной области техники и легко могут быть сконструированы на основе антигенсвязывающей области антитела. В типовых вариантах осуществления, анти-CD45 антителом, применяемым в сочетании со способами подготовки, описанными в настоящем документе, может быть моноклональное антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, поликлональное антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, полное антитело человека или его антигенсвязывающ фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, двойной вариабельный иммуноглобулиновый домен, одноцепочечная Fv молекула (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, Fv фрагмент, Fab фрагмент, F(ab')2 молекула или тандемный ди-scFv. Типовые анти-CD45 антитела, которые могут применяться в целом или частично в ADC или способах, описанных в настоящем документе, представлены ниже.

В одном варианте осуществления, анти-CD45 антителом является или его получают из клона HI30, который коммерчески доступен от BIOLEGEND® (San Diego, CA) или его гуманизированного варианта. Гуманизация антитела может быть проведена замещением остатков и константной области остатков не человеческого антитела остатками зародышевой линии антитела человека согласно методикам, известным в данной области техники (как описано, например, в примере 7, ниже). Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, включают анти-CD45 антитела ab10558, EP322Y, MEM-28, ab10559, 0.N,125, F10-89-4, HIe-1, 2B11, YTH24.5, PD7/26/16, F10-89-4, 1B7, ab154885, B-A11, фосфор S1007, ab170444, EP350, Y321, GA90, D3/9, X1 6/99 и LT45, которые коммерчески доступны от ABCAM® (Cambridge, MA), а также их гуманизированные варианты. Дополнительно, анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают анти-CD45 антитело HPA000440, которое коммерчески доступно от SIGMA-ALDRICH® (St. Louis, MO), и его гуманизированные варианты. Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают моноклональное антитело мыши BC8, которое описано, например, у Matthews et al., Blood 78:1864-1874, 1991, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам. Дополнительно, анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, включают моноклональное антитело YAML568, которое описано, например, у Glatting et al., J. Nucl. Med. 8:1335-1341, 2006, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам. Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают моноклональные антитела YTH54.12 и YTH25.4, которые описаны, например, у Brenner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 996:80-88, 2003, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам. Дополнительные анти-CD45 антитела для применения со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают UCHL1, 2H4, SN130, MD4,3, MBI и MT2, которые описаны, например, у Brown et al., Immunology 64:331-336, 1998, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам. Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, включают полученные и выпущенные из American Type Culture Collection (ATCC) номера доступа RA3-6132, RA3-2C2 и TIB122, а также моноклональные антитела C363,16A и 13/2, которые описаны, например, у Johnson et al., J. Exp. Med. 169:1179-1184, 1989, описание которого включено в настоящий

документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам. Дополнительно анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают моноклональные антитела AHN-12.1, AHN-12, AHN-12.2, AHN-12.3, AHN-12.4, HLe-1 и KC56(T200), которые описаны, например, у Harvath et al., J. Immunol. 146:949-957, 1991, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителам, а также их гуманизированным вариантам.

Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают те, которые описаны, например, в патентах США №№ 7,265,212 (который описывает, *например*, анти-CD45 антитела 39E11, 16C9 и 1G10, среди других клонов); 7,160,987 (который описывает, *например*, анти-CD45 антитела, полученные и выпущенные ATCC № доступа HB-11873, такие как моноклональное антитело 6G3); и 6,099,838 (который описывает, *например*, анти-CD45 антитело MT3, а также антитела, полученные и выпущенные ATCC номера доступа HB220 (также обозначенное MB23G2) и HB223), а также US 2004/0096901 и US 2008/0003224 (который описывает, *например*, анти-CD45 антитела, полученные и выпущенные ATCC № доступа PTA-7339, такие как моноклональное антитело 17.1), описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к анти-CD45 антитела.

Дополнительно анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают антитела, полученные и выделенные из ATCC Номера доступа MB4B4, MB23G2, 14.8, GAP 8.3, 74-9-3, I/24.D6, 9.4, 4B2, M1/9.3.4.HL.2, а также их гуманизированные и/или аффинно-зрелые варианты. Созревание аффинности может быть осуществлено, например, с применением методов in vitro дисплея, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники, таких как фаговый дисплей, как описано в примере 6, ниже.

Дополнительные анти-CD45 антитела, которые могут применяться в сочетании со способами подготовки пациента, описанными в настоящем документе, включают анти-CD45 антитело T29/33, которое описано, например, у Morikawa et al., Int. J. Hematol. 54:495-504, 1991, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к анти-CD45 антителу.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD45 антитело выбирают из апамистаба (также известного как 90Y-BC8, Iomab-B, BC8; как описано в, *например*, US20170326259, WO2017155937 и Orozco et al. Blood. 127,3 (2016): 352-359.) или BC8-B10 (как описано, *например,* у Li et al. PloS one 13,10 (2018): e0205135.), каждый из которых включен в качестве ссылки. Другие анти-CD45 антитела были описаны, например, в WO2003/048327, WO2016/016442, US2017/0226209, US2016/0152733, US9,701,756; US2011/0076270 или US7,825,222, каждый из которых включен в качестве ссылки

полностью.

Например, в одном варианте осуществления, анти-CD45 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее связывающие области, *например,* CDR, вариабельные области, соответствующие таковым апамистамабу. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) апамистамаба указана в SEQ ID NO: 337. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) апамистамаба описана в SEQ ID NO: 338. В других вариантах осуществления, анти-CD45 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные остатки, указанные в SEQ ID NO: 337, и вариабельную область легкой цепи, как указана в SEQ ID NO: 338. В одном варианте осуществления, анти-CD45 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 апамистамаба и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 апамистамаба.

В одном варианте осуществления, анти-CD45 антитело содержит тяжелую цепь анти-CD45 антитела, описанного в настоящем документе, и вариабельную область легкой цепи анти-CD45 антитела, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления, анти-CD45 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD45 антитела, описанного в настоящем документе, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 анти-CD45 антитела, описанного в настоящем документе.

В другом варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с анти-CD45 антителом в настоящем документе, *например*, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с анти-CD45 антителом в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит модифицированную вариабельную область тяжелой цепи (HC), содержащую HC вариабельный домен анти-CD45 антитела в настоящем документе или его вариант, где вариант (i) отличается от анти-CD45 антитела 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными замещениями, добавками или делециями; (ii) отличается от анти-CD45 антитела не более 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными замещениями, добавками или делециями; (iii) отличается от анти-CD45 антитела 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными замещениями, добавками или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична анти-CD45 антителу, где в любом из (i)-(iv), аминокислотным замещением может быть консервативное аминокислотное замещение или не консервативное аминокислотное замещение; и где модифицированная вариабельная область тяжелой цепи может иметь улучшенную биологическую активность относительно вариабельной области тяжелой цепи анти-CD45 антитела, при этом сохраняя специфичность связывания CD45 антитела.

Описания каждой из вышеупомянутых публикаций включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые могут применяться в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают вышеописанные антитела и его антигенсвязывающие фрагменты, а также гуманизированные варианты таких не человеческих антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных выше, и антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают тот же эпитоп, который описан выше, по данным, например, анализа конкурентного связывания CD45.

Способы идентификации антител

Способы высокопроизводительного скрининга библиотек антитела или фрагмента антитело на молекулы, способные связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессированный гемопоэтическми стволовыми клетками, или антиген (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), экспрессированный зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками) могут применяться для идентификации и созревания аффинности антител, применяемых для лечения раков, аутоиммунных заболеваний и подготовки пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии гемопоэтической стволовой клеткой, как описано в настоящем документе. Такие способы включают методы in vitro дисплея, известные в данной области техники, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, рибосомный дисплей, иРНК дисплей и кДНК дисплей, среди прочего. Использование фагового дисплея для выделения антител, антигенсвязывающих фрагментов или лигандов, которые связывают биологически релевантные молекулы, было рассмотрено, например, в Felici et al., Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995; Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997; и Hoogenboom et al., Immunotechnology 4:1-20, 1998, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к методам in vitro дисплея. Рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки были сконструированы для выбора полипептидов, которые связывают поверхностноклеточные антигены, как описано у Kay, Perspect. Drug Discovery Des. 2:251-268, 1995 и Kay et al., Mol. Divers. 1:139-140, 1996, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к открытию антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно фаг-экспонированы как функциональные молекулы (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-84 1992, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к применению методов in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, таких как фрагменты Fab и scFv, были экспрессированы в форматах 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; и Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в

которой они относятся к платформам in vitro дисплея для открытия антигенсвязывающих молекул). Анти-HC антитела человека (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) также могут быть созданы, например, методами HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. Эти методы, среди прочих, могут применяться для идентификации и улучшения аффинности антитела, антитела или фрагментов, способных связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками, или антиген (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), экспрессированный зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками), которые, в свою очередь, могут применяться для обеднения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток у пациента пациент (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки.

В дополнение к методами in vitro дисплея, методы компьютерного моделирования могут применяться для создания и идентификации антител, способных связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками, или антиген (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), экспрессированный зрелыми иммунными клетками (например, Т клетками), или фрагментов антител in silico. Например, с применением методов компьютерного моделирования, специалист в данной области техники сможет провести скрининг библиотек антител или фрагментов антитела, in silico, на молекулы, способные связывать специфические эпитопы на антигене, экспрессированном гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антигене, экспрессированном зрелыми иммунными клетками, такими как Т клетки (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), такие как внеклеточные эпитопы антигена. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, идентифицированные этими компьютерными методами, могут применяться в сочетании с терапевтическими способами, описанными в настоящем документе, такими как методы лечения аутоиммунного заболевания, описанные в настоящем документе, и методами подготовки пациента, описанными в настоящем документе.

Дополнительные методы могут применяться для идентификации антител или фрагментов антитела, способных связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45) или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками, такими как Т клетки (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), и которые интернализованы клеткой, например, рецептор-опосредованным фагоцитозом. Например, методы in vitro дисплея, описанные выше, могут быть адаптированы для скрининга антител или фрагментов антитела, которые связывают антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками, такими как Т клетки (например, CD2, CD5, CD137 или CD252), и которые впоследствии интернализируются. Фаговый дисплей

представляет один из таких методов, которые могут применяться в сочетании с этой парадигмой скрининга. Для идентификации анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела) или фрагмента антитела, и последующей интернализации гемопоэтическими стволовыми клетками (или иммунными клетками), специалист в данной области техники может применять методы фагового дисплея, описанные, например. у Williams et al., Leukemia, 19:1432-1438, 2005, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью. Например, с применением методов мутагенеза, известных в данной области техники, могут быть получены рекомбинантные фаговые библиотеки, которые кодируют антитела, фрагменты антител, такие как scFv фрагменты, Fab фрагменты, диатела, триатела и ^{10}Fn3 домены, среди прочих, или лиганды, которые содержат рандомизированные кассеты аминокислот (например, в одной или нескольких или всех CDR или эквивалентных им областях, или антителе или фрагменте антитела). Каркасные области, шарнир, Fc домен и другие области антител или фрагментов антител могут быть созданы так, чтобы они были не иммуногенными у человека, например, вследствие наличия зародышевых последовательностей антитела человека или последовательностей, которые демонстрируют только незначительные изменения относительно антител зародышевой линии человека.

Используя методы фагового дисплея, описанные в настоящем документе или известные в данной области техники, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела или фрагменты антител, ковалентно связанные с фаговыми частицами, могут быть инкубированы с антигеном (например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252), например, сначала инкубируя фаговую библиотеку с блокирующими агентами (такими как, например, молочный белок, альбумин бычьей сыворотки и/или IgG, чтобы удалить фаг, кодирующий антитела или фрагменты антител, которые проявляют неспецифическое связывание с белками, и фаг, который кодирует антитела или их фрагменты, которые связывают Fc домены, и затем инкубируя фаговую библиотеку с популяцией гемопоэтических стволовых клеток или зрелых иммунных клеток (например, Т клеток), которые экспрессируют, например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252. Фаговая библиотека может быть инкубирована с клетками-мишенями, такими как раковые клетки, аутоиммунные клетки или гемопоэтические стволовые клетки, в течение времени, достаточного для того, чтобы позволить анти-HC антителам (например, анти-CD117-антителу, анти-CD45-антителу, анти-CD2-антителу, анти-CD5-антителу, анти-CD137-антителу или анти-CD252-антителу) или его фрагментам антитела, связать родственный поверхностноклеточный антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252) и для последующей интернализации гемопоэтическими стволовыми клетками (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C). Фаг, содержащий антитела или их фрагменты антител, которые не демонстрируют

достаточной аффинности для антигена (CD117 (например, GNNK+ CD117), CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252), чтобы позволить связывание с клетками-мишенями и интернализацию ими, такими как раковые клетки, аутоиммунные клетки или гемопоэтические стволовые клетки, впоследствии могут быть удалены путем промывания клеток, например, холодным (4°C) 0,1 М глициновым буфером при pH 2.8. Фаг, связанный с антителами или их фрагментами антител, которые были интернализованы клетками-мишенями, такими как раковые клетки, аутоиммунные клетки или гемопоэтические стволовые клетки, может быть идентифицирован, например, путем лизирования клеток и выделения интернализованного фага из среды для культивирования клеток. Затем фаг может быть амплифицирован в бактериальных клетках, например, путем инкубации бактериальных клеток с восстановленным фагом в среде 2xYT с использованием способов, известных в данной области техники. Фаг, восстановленный из этой среды, затем может быть охарактеризован, например, путем определения последовательности нуклеиновых кислот генов, кодирующих антитела или фрагменты антител, встроенных в геном фага. Кодированные антитела или их фрагменты антител могут быть впоследствии получены de novo химическим синтезом (например, их фрагментами антител, такими как scFv-фрагменты) или рекомбинантной экспрессией (например, полноразмерных антител).

Потенциал интернализации полученного антитела или его фрагментов антитела может оцениваться, например, с применением анализов радионуклидной интернализации, известных в данной области техники. Например, анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его фрагменты, идентифицированное с применением методов in vitro дисплея, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники, может быть функционализировано введением радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{169}Yb, ^{186}Re, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{177}Lu, ^{77}As, ^{72}As, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{89}Zr, ^{212}Bi, ^{213}Bi или ^{225}Ac. Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{122}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I, ^{211}At, могут быть введены в антитела, их фрагменты или лиганды с применением гранул, таких как полистирольные гранулы, содержащих электрофильные реагенты (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Радиомеченые антитела, их фрагменты или ADC могут быть инкубированы с клетками-мишенями, такими как раковые клетки, аутоиммунные клетки или гемопоэтические стволовые клетки, в течение времени, достаточного для того, чтобы позволить интернализацию (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 часа при 4°C). Затем клетки промывают для удаления не интернализованных антител или его фрагментов (например, с применением холодного (4°C) 0,1 М глицинового буфера при pH 2.8). Интернализованные антитела или их фрагменты антител могут быть идентифицированы через определение испускаемой радиации (например, γ-радиации) полученными гемопоэтическими клетками-мишенями, такими как раковые клетки, аутоиммунные клетки или гемопоэтические стволовые клетки, по сравнению с испускаемой радиацией (например, γ-радиацией)

восстановленного промывочного буфера. Вышеупомянутые анализы интернализации также могут применяться для характеризации ADC.

Антитела могут быть получены с применением рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в Патенте США № 4,816,567. В одном варианте осуществления, представлены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), описанное в настоящем документе. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В дополнительном варианте осуществления, представлен один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В дополнительном варианте осуществления, представлена клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты. В одном таком варианте осуществления, клетка-хозяин содержит (например, трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность содержащую VH антитела. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой). В одном варианте осуществления, представлен способ получения анти-CLL-1 антитело, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как представлено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела и, необязательно, восстановление антитела из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного продуцирования анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с применением обычных методов (например, с применением олигонуклеотидных проб, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антитело-кодирующих векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела могут быть получены в бактериях, в частности, если гликозилирование и Fc эффекторные функции не нужны. Для

экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях, см., например, Патенты 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), стр. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антитела в E. coli.) После экспрессии, антитело может быть выделено из бактериальной клеточной суспензии в растворимой фракции, и может быть далее очищено.

Клетки позвоночных также могут применяться в качестве хозяев. Например, могут применяться клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы для выращивания в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток-хозяев млекопитающих включают CV1 клеточную линию почек обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клеточную линию почек эмбриона человека (293 или 293 клетки, как описано, например, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4 клетки, как описано, например, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетка карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK; клетки почек серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); TRI клетки, как описано, например, у Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); MRC 5 клетки; и FS4 клетки. Другие полезные линии клеток-хозяев включают клетки яичников китайского хомяка (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 определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антитела, представлен, например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003). В одном варианте осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичников китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

Антитела (включая анти-CD117 антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы (связаны) с цитотоксином через линкер. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая молекула конъюгирована с клеткой, интернализующей антитело или его антигенсвязывающ фрагмент, как описано в настоящем документе, так, что после поглощения клеткой антитела или его фрагмента, цитотоксин может иметь доступ к его внутриклеточной мишени и опосредовать гибель гемопоэтической клетки. Любое количество цитотоксинов может быть конъюгировано с анти-CD117 антителом, *например,* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Цитотоксины, подходящие для применения в композициях и способах, описанных в настоящем документе, включают ДНК-интеркалирующие агенты (например, антрациклины), агенты, способные разрывать аппарат митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтанзин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК полимеразы (например, аматоксин, такой как α-аманитин и их производные) и агенты,

способные разрывать биосинтез белка (например, агенты, которые демонстрируют активность рРНК N-гликозидазы, такие как сапорин и А-цепь рицина) среди прочих, известных в данной области техники.

Цитотоксины

Различные цитотоксины могут быть конъюгированы с анти-HC антителом (например, анти-CD117 антителом, анти-CD45 антителом, анти-CD2 антителом, анти-CD5 антителом, анти-CD137 антителом или анти-CD252 антителом) через линкер для применения в терапиях описанных в настоящем документе. В частности, анти-HC ADC (например, анти-CD117 ADC, анти-CD45 ADC, анти-CD2 ADC, анти-CD5 ADC, анти-CD137 ADC или анти-CD252 ADC) включают антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированное (т.е., ковалентно присоединенное линкером) и цитотоксической группой (или цитотоксином). В различных вариантах осуществления, цитотоксическая группа демонстрирует пониженную или отсутствующую цитотоксичность, будучи связанной в конъюгате, но возобновляет цитотоксичность после отщепления от линкера. В различных вариантах осуществления, цитотоксическая группа сохраняет цитотоксичность без отщепления от линкера. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая молекула конъюгирована с клеткой, интернализующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, так, что после поглощения клеткой антитела или его фрагмента, цитотоксин может получить доступ к его внутриклеточной мишени и, например, опосредовать гибель Т клетки.

ADC по настоящему описанию представляют поэтому могут иметь общую формулу Ab-(Z-L-D)$_n$, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) конъюгирован (ковалентно связан) с линкером (L) через химическую группу (Z) с цитотоксической группой («лекарственное средство», D), каждая описана в настоящем документе.

Следовательно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгирован с множеством лекарственных групп, указанных целым числом n, которое представляет среднее количество цитотоксинов на антитело, которое может варьироваться, например, от примерно 1 до примерно 20. В некоторых вариантах осуществления, n равно от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления, n равно 1. Среднее количество групп лекарственного средства на антитело в препаратах ADC из реакций конъюгации может быть охарактеризовано обычными средствами, такими как масс-спектроскопия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Также может быть определено количественное распределение ADC по n. В некоторых случаях, разделение, очистка и характеризация гомогенного ADC, где n представляет собой определенное значение от ADC с другими загрузками лекарственного средства, могут быть проведены с помощью таких средств, как ВЭЖХ с обращенной фазой или электрофорез.

Для некоторых анти-HC ADC (например, анти-CD117 ADC, анти-CD45 ADC, анти-CD2 ADC, анти-CD5 ADC, анти-CD137 ADC или анти-CD252 ADC) могут быть

ограничены количеством сайтов присоединения на антителе. Например, когда присоединением является тиол цистеина, антитело может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, через которые может быть присоединен линкер. В общем, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с группой лекарственного средства; в первую очередь, остатки тиолов цистеина в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В некоторых вариантах осуществления, антитело может быть восстановлено восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в условиях частичного или полного восстановления для образования реакционноспособных тиольных групп цистеина. В некоторых вариантах осуществления, более высокая лекарственная нагрузка, например, n>5, может вызвать аггрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, меньше чем теоретический максимум лекарственных групп конъюгированы с антителом во время реакции конъюгации. Антитело может содержать, например, лизиновые остатки, которые не взаимодействуют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как описано ниже. Только наиболее реакционноспособные лизиновые группы могут взаимодействовать с амин-реакционноспособным линкерным реагентом. В некоторых вариантах осуществления, антитело помещают в условия денатурации для раскрытия реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузка (соотношение лекарственное средство/антитело) ADC может контролироваться несколькими путями, например: (i) ограничивая молярный избыток промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничивая время или температуру реакции конъюгации, (iii) частичные или ограничивающие восстановительные условия для модификации тиола цистеина, (iv) конструируя рекомбинантными методами аминокислотной последовательности антитела, например, количество и положение цистеиновых остатков модифицируют для контроля количества и/или положения присоединений линкера-лекарственного средства.

Цитотоксины, подходящие для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают ДНК-интеркалирующие агенты (например, антрациклины), агенты, способные разрывать аппарат митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтанзин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК полимеразы (например, аматоксин, такой как α-аманитин и их производные) и агенты, способные разрывать биосинтез белка (например, агенты, которые демонстрируют активность рРНК N-гликозидазы, такие как сапорин и рицин А-цепь), среди прочих, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является агент,

связывающий микротрубочки (например, майтанзин или майтанзиноид), аматоксин, экзотоксин синегнойной палочки А, деБуганин, дифтеротоксин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин, димер индолинобензодиазепина, псевдодимер индолинобензодиазепина или их вариант, или другое цитотоксическое соединение, описанное в настоящем документе или известное в данной области техники.

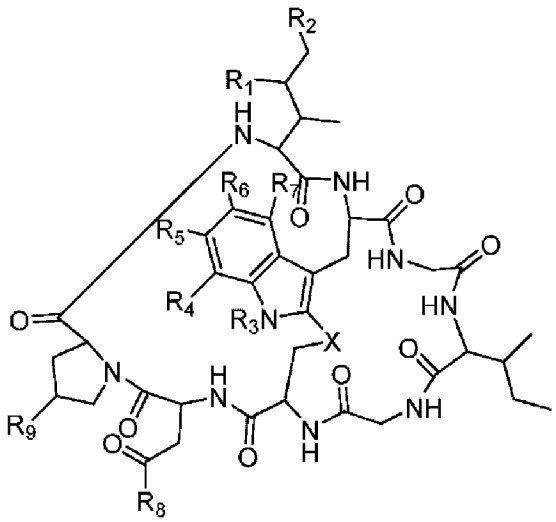
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином конъюгата антитело-лекарственное средство является ингибитор РНК полимеразы. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аматоксин или его производное. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином конъюгата антитело-лекарственное средство, который описан в настоящем документе, является аматоксин или его производное, такое как α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота, проамануллин или их производные.

Дополнительные подробности, касающиеся цитотоксинов, которые могут применяться в анти-НС ADC (например, анти-CD117 ADC, анти-CD45 ADC, анти-CD2 ADC, анти-CD5 ADC, анти-CD137 ADC или анти-CD252 ADC), применяемых в способах по изобретению, описаны ниже.

Аматоксины

Способы и композиции, описанные в настоящем документе, включают ADC, содержащие ингибитор РНК полимеразы, *например,* аматоксин, в качестве цитотоксина, конъюгированного с анти-НС антителом (например, анти-CD117 антителом). В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином конъюгата антитело-лекарственное средство является ингибитор РНК полимеразы. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором РНК полимеразы является аматоксин или его производное. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином конъюгата антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе, является аматоксин или его производное, такое как α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота, проамануллин или его производное. Подходящие аматоксины описаны в, например, Zanotti et al., Int. J. Peptide Protein Res. 30, 1987, 450-459.

Аматоксины, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения, имеющие, но не ограниченные ими, формулу (**III**), включая α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту или проамануллин. Формула (**III**) следующая:



(III)

где R_1 является H, OH или OR_A;

R_2 является H, OH или OR_B;

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

R_3 является H или R_D;

R_4 является H, OH, OR_D или R_D;

R_5 является H, OH, OR_D или R_D;

R_6 является H, OH, OR_D или R_D;

R_7 является H, OH, OR_D или R_D;

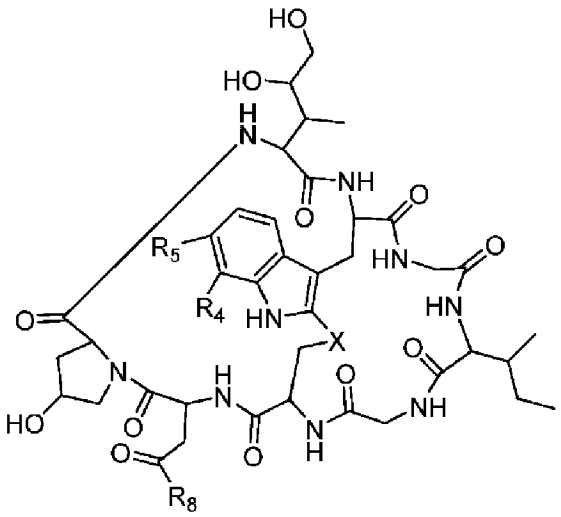
R_8 является OH, NH_2 или OR_D;

R_9 является H, OH или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$; и

R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом), необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом.

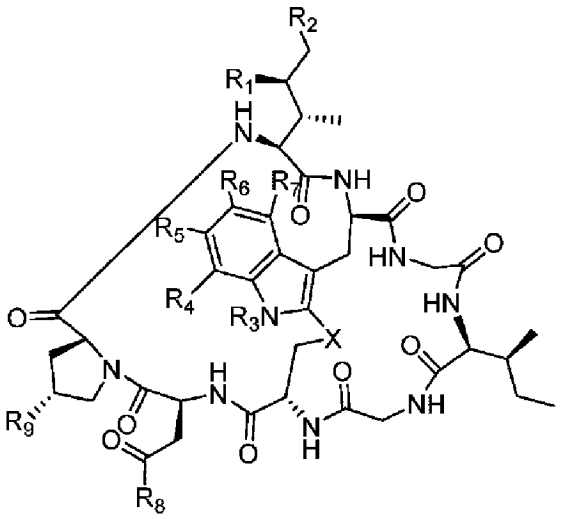
Например, в одном варианте осуществления, аматоксины, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения формулы (**IIIA**)



(IIIA),

где R_4, R_5, X и R_8 такие, как определены выше.

Например, в одном варианте осуществления, аматоксины, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения формулы (**IIIB**), ниже:



(**IIIB**)

где R_1является H, OH или OR_A;

R_2 является H, OH или OR_B;

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

R_3 является H или R_D;

R_4 является H, OH, OR_D или R_D;

R_5 является H, OH, OR_D или R_D;

R_6 является H, OH, OR_D или R_D;

R_7 является H, OH, OR_D или R_D;

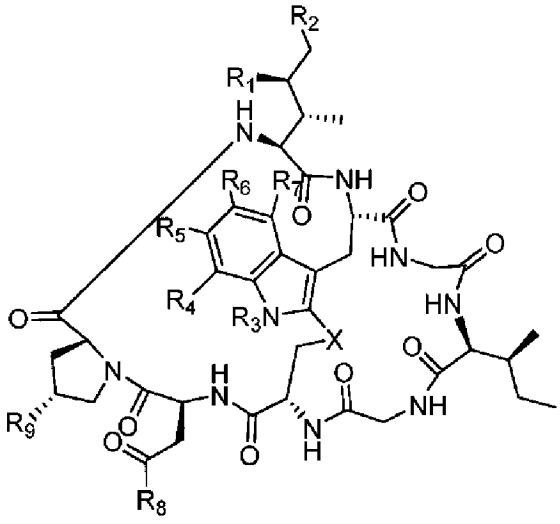
R_8 является OH, NH_2 или OR_D;

R_9 является H, OH или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом), необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом.

В одном варианте осуществления, аматоксины, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, также включают соединения формулы (**IIIC**), ниже:



(**IIIC**)

где R_1является H, OH или OR_A;

R_2 является H, OH или OR_B;

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

R_3 является H или R_D;

R_4 является H, OH, OR_D или R_D;

R_5 является H, OH, OR_D или R_D;

R_6 является H, OH, OR_D или R_D;

R_7 является H, OH, OR_D или R_D;

R_8 является OH, NH_2 или OR_D;

R_9 является H, OH или OR_D;

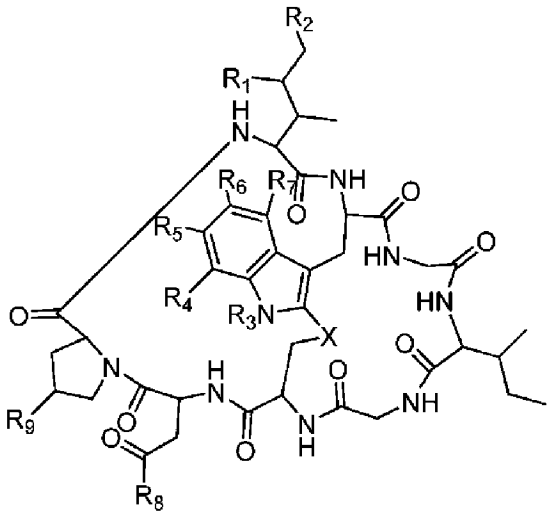
X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом), необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным

гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом.

В одном варианте осуществления, цитотоксином является аманитин. Например, антитела и антигенсвязывающ фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с аматоксином с получением конъюгата, представленного формулой Ab-Z-L-Am, где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, L является линкером, Z является химической группой и Am является аматоксином. Многие положения на аматоксинах или их производных могут служить в качестве положений для ковалентного связывания связывающей группы L, и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Типовые способы конъюгации аматоксина и линкеров, применяемых для таких процессов, описаны ниже. Типовые линкерсодержащие аматоксины, применяемые для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе, показаны в структурных формулах (**I**), (**IA**), (**IB**), (**II**), (**IIA**) и (**IIB**), перечисленных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат аматоксин-линкер Am-L-Z представлен формулой (**I**)



(I)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

R_4 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C является -L-Z;

R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом), необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

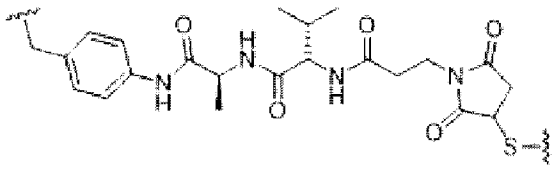
L является линкером, таким как необязательно замещенный алкилен (например, C_1-C_6 алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C_1-C_6 гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C_2-C_6 алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C_2-C_6 гетероалкенилен), 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, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или из комбинация;

и

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которая связывает антиген-мишень (например, CD117).

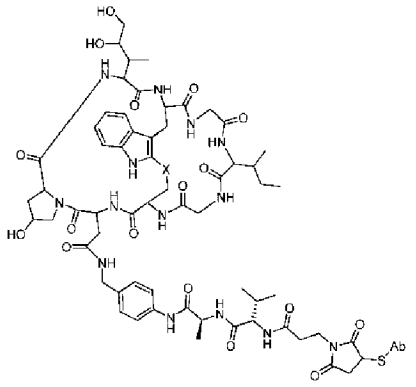
В некоторых вариантах осуществления, Am содержит только один R_C заместитель.

В некоторых вариантах осуществления, L-Z является

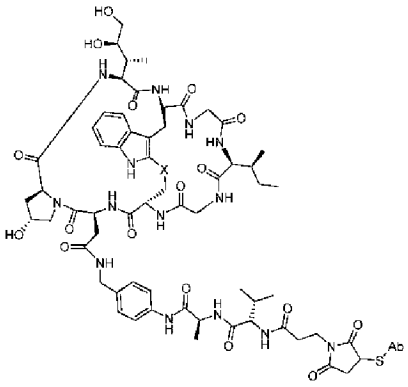


где S является атомом серы, который представляет реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает антиген-мишень (например, от -SH группы цистеинового остатка).

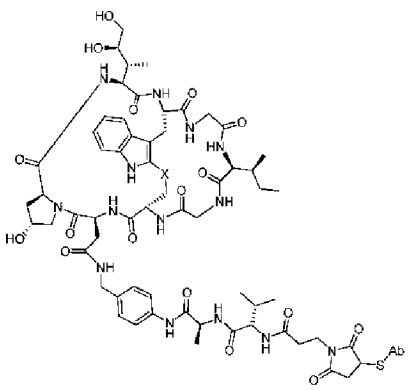
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат Am-L-Z-Ab представлен одной из формул IV, IVA или IVB:



(IV)



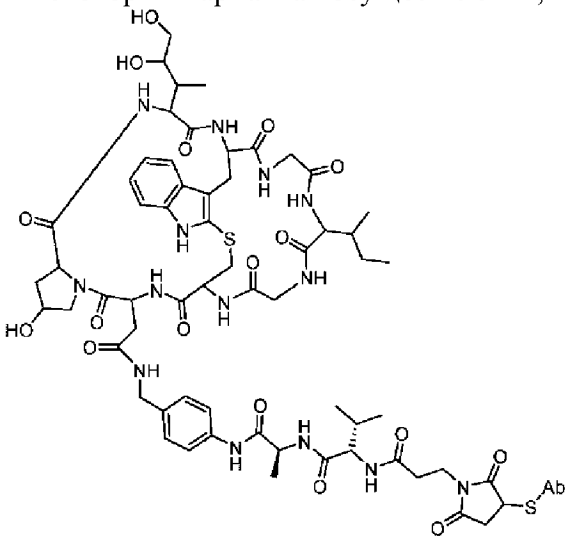
(IVA)



(IVB)

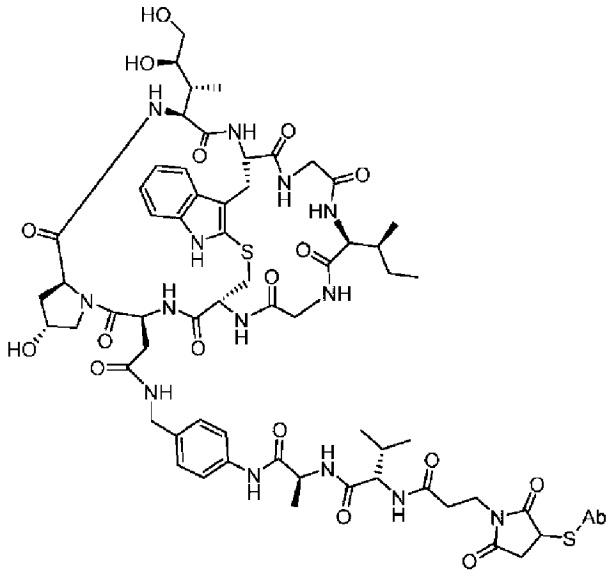
где X является S, SO или SO_2 и Ab показан для обозначения точки присоединения Ab.

В некоторых вариантах осуществления, Am-L-Z-Ab является



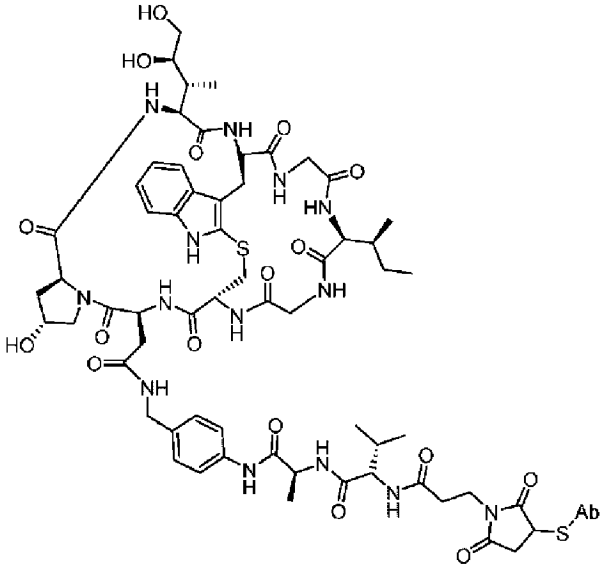
где Ab показан для обозначения точки присоединения Ab.

В некоторых вариантах осуществления, Am-L-Z-Ab является



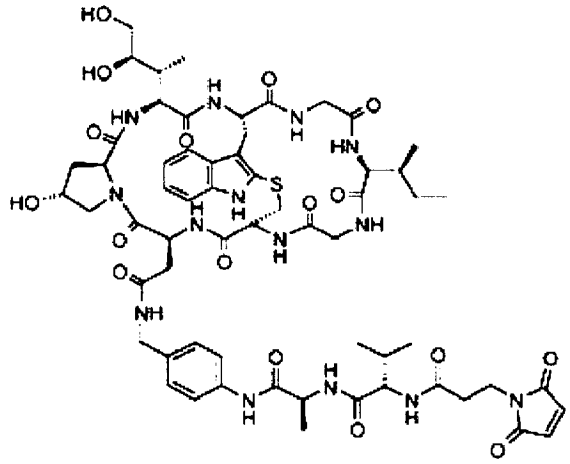
где Ab показан для обозначения точки присоединения Ab.

В некоторых вариантах осуществления, Am-L-Z-Ab является



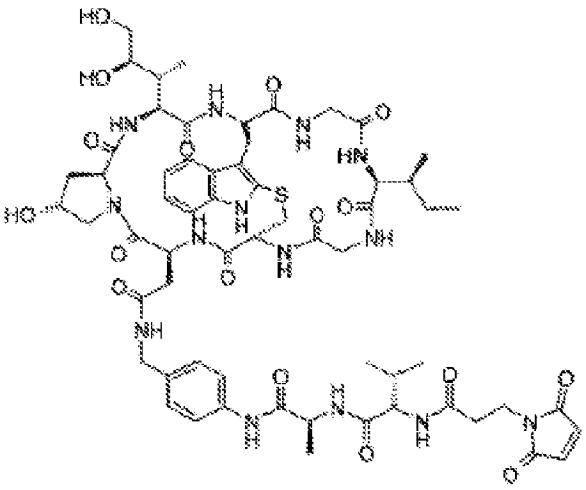
где Ab показан для обозначения точки присоединения Ab.

В некоторых вариантах осуществления, предшественником Am-L-Z-Ab, Am-L-Z', является



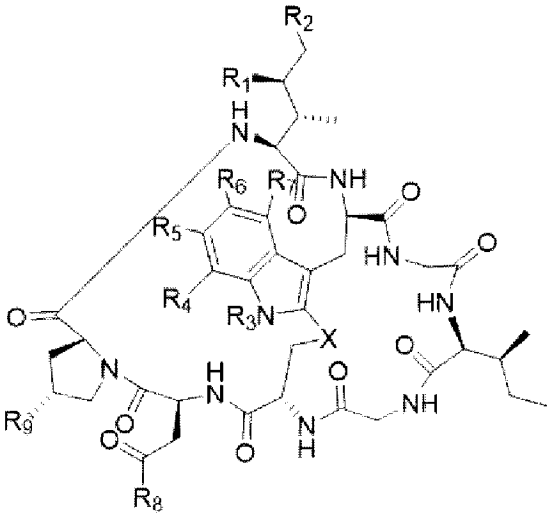
где малеимид взаимодействует с тиольной группой, найденной на цистеине в антителе.

В некоторых вариантах осуществления, предшественником Am-L-Z-Ab, Am-L-Z', является



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

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



(IA)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

R_4 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C является -L-Z;

R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом),

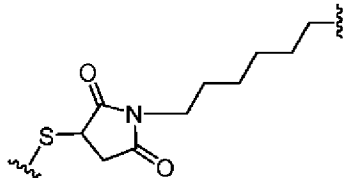
необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

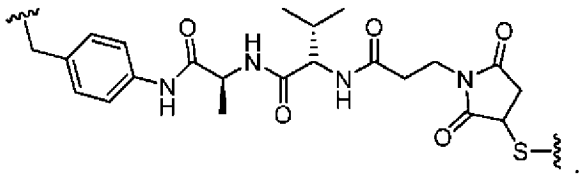
L является линкером, таким как необязательно замещенный алкилен (например, C_1-C_6 алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C_1-C_6 гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C_2-C_6 алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C_2-C_6 гетероалкенилен), 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, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или их комбинация;

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и рекционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которая связывает HC антиген (т.е., анти-HC антитело, например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело); и

где Am содержит только один R_C заместитель.

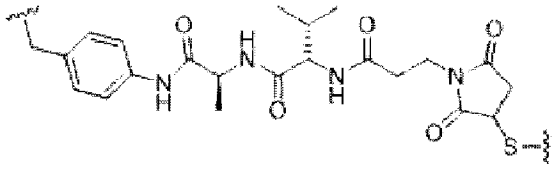
В некоторых вариантах осуществления, L-Z является



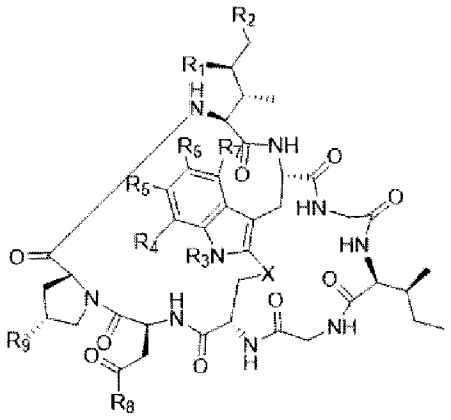


или

В некоторых вариантах осуществления, L-Z является



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



(IB)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

R_4 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C является -L-Z;

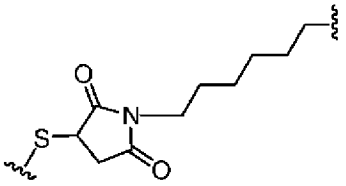
R_D является необязательно замещенным алкилом (например, C_1-C_6 алкилом), необязательно замещенным гетероалкилом (например, C_1-C_6 гетероалкилом), необязательно замещенным алкенилом (например, C_2-C_6 алкенилом), необязательно замещенным гетероалкенилом (например, C_2-C_6 гетероалкенилом), необязательно замещенным алкинилом (например, C_2-C_6 алкинилом), необязательно замещенным гетероалкинилом (например, C_2-C_6 гетероалкинилом), необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

L является линкером, таким 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, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или их комбинация;

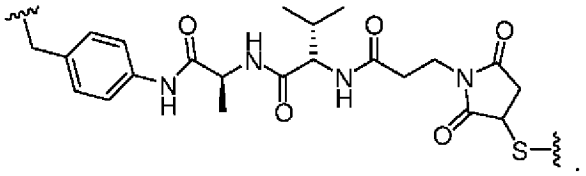
Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и рекционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которая связывает HC антиген (т.е., анти-HC антитело, например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело); и

где Am содержит только один R_C заместитель.

В некоторых вариантах осуществления, L-Z является

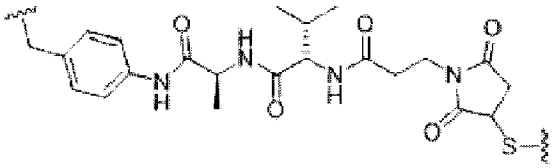


или

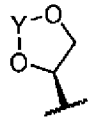


.

В некоторых вариантах осуществления, L-Z является



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



где Y является -(C=O)-, -(C=S)-, -(C=NR_E)- или -($CR_ER_{E'}$)-; и

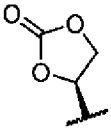
R_E и $R_{E'}$ каждый независимо является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилен-R_C, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилен-R_C, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилен-R_C, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилен-R_C, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилен-R_C, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилен-R_C, необязательно замещенным циклоалкилен-R_C, необязательно замещенным гетероциклоалкилен-R_C, необязательно замещенным арилен-R_C или необязательно замещенным гетероарилен-R_C.

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

где R_1является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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



R_3 является H или R_C;

R_4 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_5 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_6 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_7 является H, OH, OR_C, OR_D, R_C или R_D;

R_8 является OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

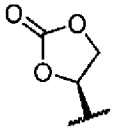
где R_C и R_D такие, как определены выше.

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

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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



R_3 является H или R_C;

R_4 и R_5 каждый независимо является H, OH, OR_C, R_C или OR_D;

R_6 и R_7 каждый является H;

R_8 является OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

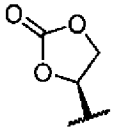
где R_C такой, как определен выше.

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

где R_1 является H, OH или OR_A;

R_2 является H, OH или OR_B;

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



R_3, R_4, R_6 и R_7 каждый является H;

R_5 является OR_C;

R_8 является OH или NH_2;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

где R_C такой, как определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны,

например, в публикации заявки на патент США № 2016/0002298, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

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

где R_1 и R_2 каждый независимо является H или OH;

R_3 является R_C;

R_4, R_6 и R_7 каждый является H;

R_5 является H, OH или OC_1-C_6 алкилом;

R_8 является OH или NH_2;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

где R_C такой, как определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0294865, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

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

где R_1 и R_2 каждый независимо является H или OH;

R_3, R_6 и R_7 каждый является H;

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

R_8 является OH или NH_2;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

где R_C такой, как определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

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

где R_1 и R_2 каждый независимо является H или OH;

R_3, R_6 и R_7 каждый является H;

R_4 и R_5 каждый независимо является H или OH;

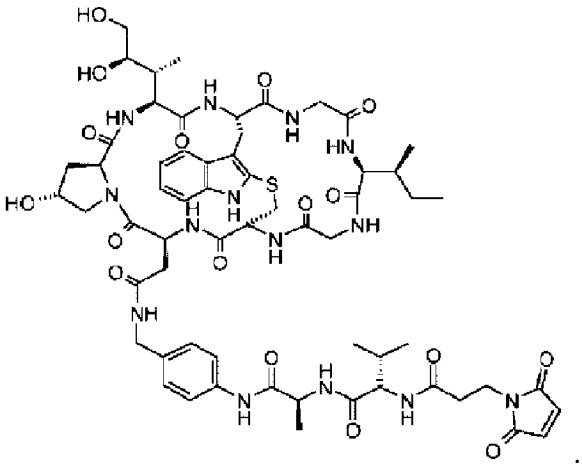
R_8 является OH, NH_2, OR_C или NHR_C;

R_9 является H или OH;

X является -S-, -S(O)- или -SO_2-; и

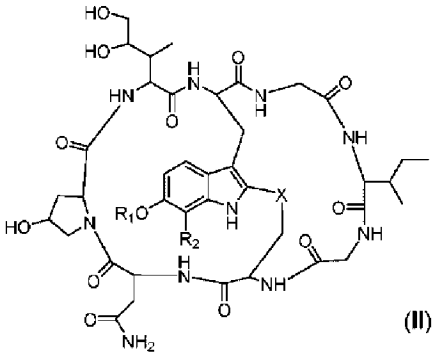
где R_C такой, как определен выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в патентах США №№ 9,233,173 и 9,399,681, а также в US 2016/0089450, описания каждого из которых включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, Am-L-Z' является

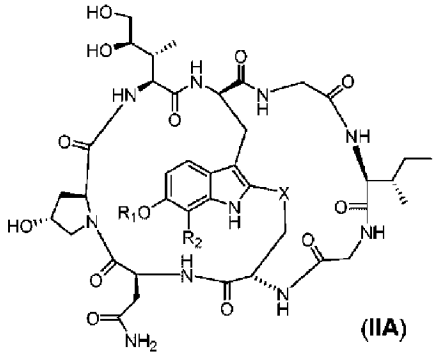


Дополнительные аматоксины, которые могут применяться в конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в WO 2016/142049; WO 2016/071856; WO 2017/149077; WO 2018/115466; и WO 2017/046658, описания каждого из которых включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

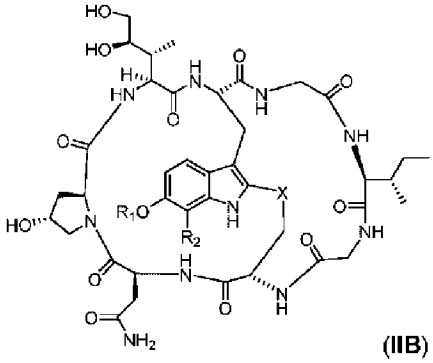
В некоторых вариантах осуществления, Am-L-Z представлен формулой (**II**), формулой (**IIA**) или формулой (**IIB**)



(II)



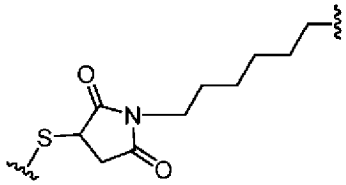
(IIA)



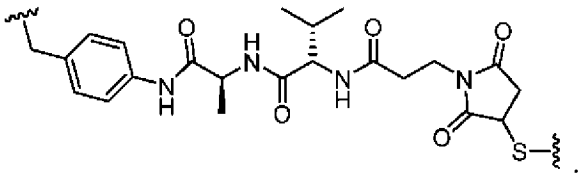
(IIB)

где X является S, SO или SO_2; R_1 является H или линкером, ковалентно связанным с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через химическую группу Z, образованную реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и R_2 является H или линкером, ковалентно связанным с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через

химическую группу Z, образованную реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; где если R_1 является H, R_2 является линкером, и если R_2 является H, R_1 является линкером. В некоторых вариантах осуществления, R_1 является линкером и R_2 является H и линкер и химическая группа вместе как L-Z являются

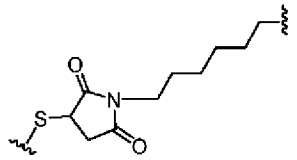


или



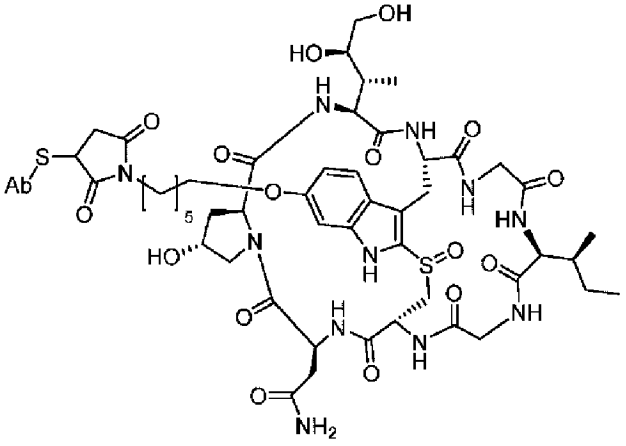
.

В некоторых вариантах осуществления, L-Z является



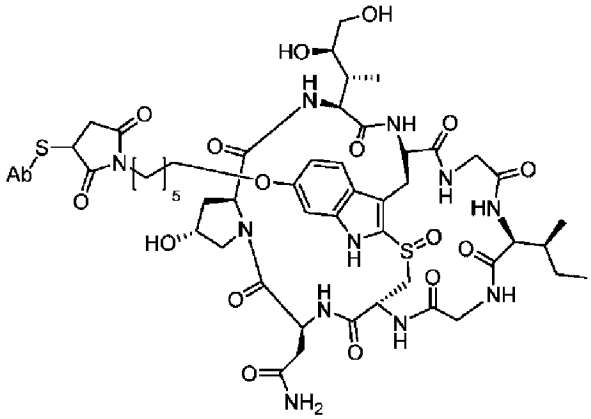
.

В одном варианте осуществления, Am-L-Z-Ab является:



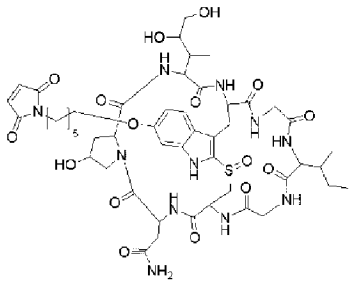
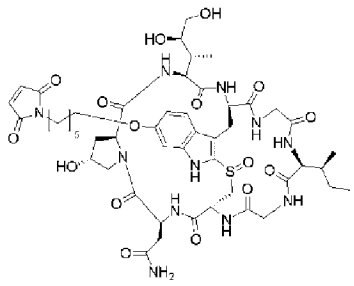
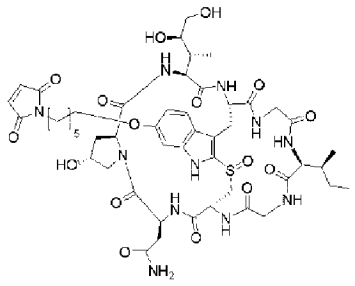
.

В одном варианте осуществления, Am-L-Z-Ab является:



.

В некоторых вариантах осуществления, предшественником Am-L-Z-Ab (т.е., Am-L-Z') является один из:

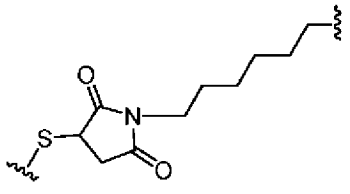
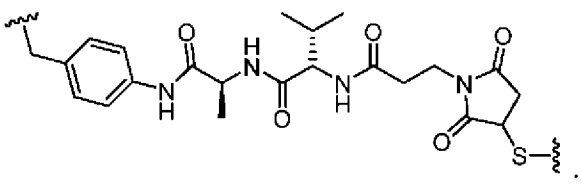




;

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

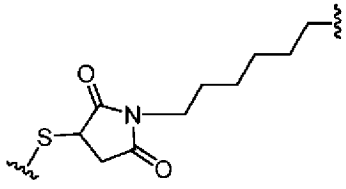
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является α-аманитин. В некоторых вариантах осуществления, α-аманитин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, α-аманитин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к α-аманитину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата α-аманитин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala and Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются

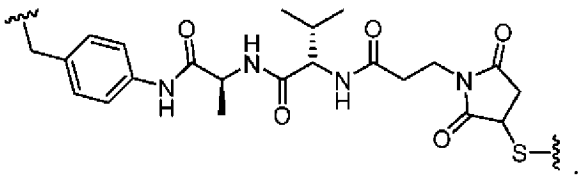

или

.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является β-аманитин. В некоторых вариантах осуществления, α-аманитин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, β-аманитин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к β-аманитину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата β-аманитин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются



или

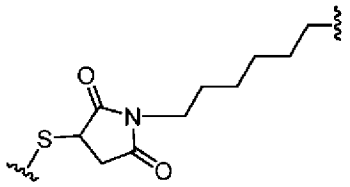


.

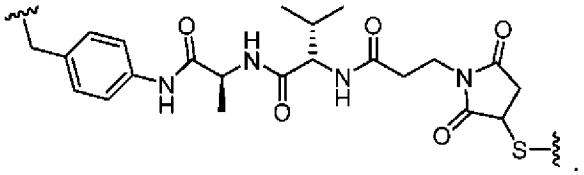
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является γ-аманитин. В некоторых вариантах осуществления, γ-аманитин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, γ-аманитин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к γ-аманитину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата γ-аманитин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах

осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, является



или

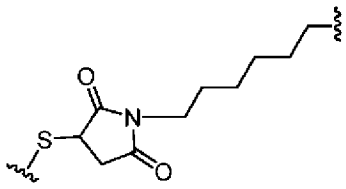


.

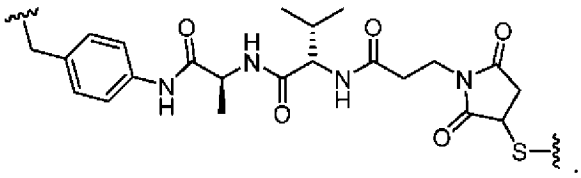
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является ε-аманитин. В некоторых вариантах осуществления, ε-аманитин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, ε-аманитин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к ε-аманитину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата ε-аманитин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную

группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются



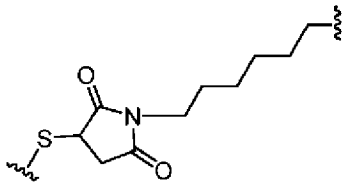
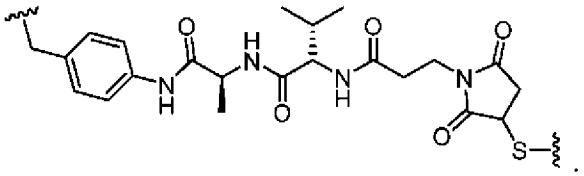
или



.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является аманин. В некоторых вариантах осуществления, аманин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, аманин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата аманин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 1-6.

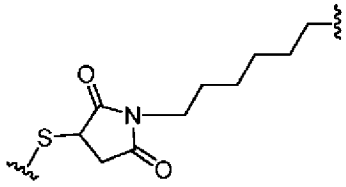
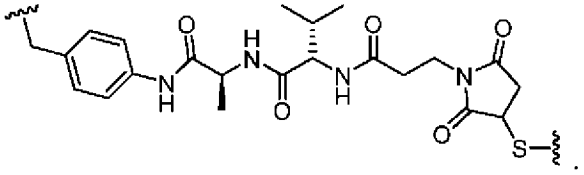
В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$ - единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются

или

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является аманинамид. В некоторых вариантах осуществления, аманинамид является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, аманинамид формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманинамиду формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата аманинамид-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются

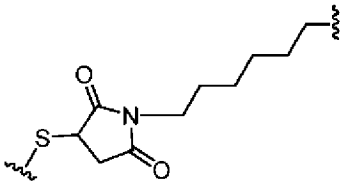



или

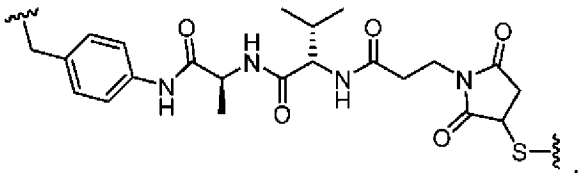
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является амануллин. В некоторых вариантах осуществления, амануллин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, амануллин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к амануллину формулы **III**

на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением аманулин-линкер конъюгат формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются



или

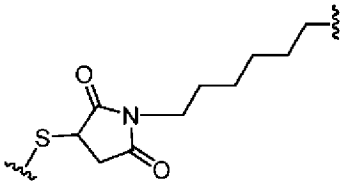


.

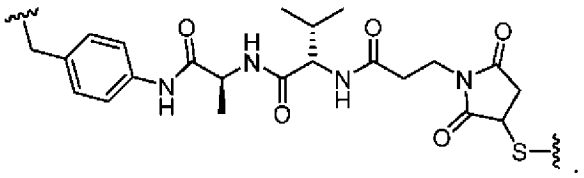
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является аманулиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, аманулиновая кислота является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, аманулиновая кислота формулы **III** присоединена к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к аманулиновой кислоте формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата аманулиновая кислота-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах

осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, является



или

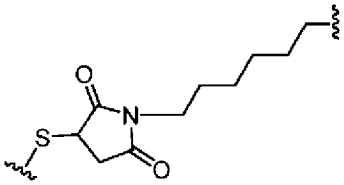


.

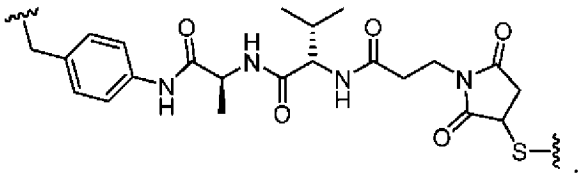
В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является проамануллин. В некоторых вариантах осуществления, проамануллин является соединением формулы **III**. В некоторых вариантах осуществления, проамануллин формулы **III** присоединен к анти-HC антителу через линкер L. Линкер L может быть присоединен к проамануллину формулы **III** на любом из нескольких возможных положений (например, любом из R^1-R^9) с получением конъюгата проамануллин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^1. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^2. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^3. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^4. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^5. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^6. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^7. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^8. В некоторых вариантах осуществления, линкер присоединен в положении R^9. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$- единицу, где n

равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются:



или



.

Синтетические способы получения аматоксина описаны в патенте США № 9,676,702, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как α-аманитин или его вариант, с применением методов конъюгации, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе. Например, антитела или их антигенсвязывающ фрагменты, которые распознают и связывают антиген-мишень (анти-HC антитело, например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как α-аманитин или его вариант, как описано в US 2015/0218220, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой он относится, например, к аматоксинам, таким как α-аманитин и его вариант, а также ковалентным линкерам, которые могут применяться для ковалентной конъюгации.

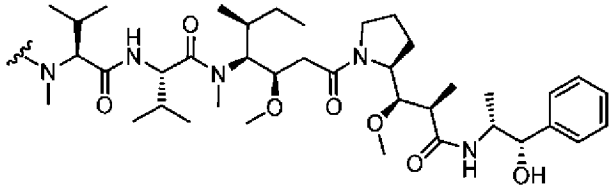
Ауристатины

Анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является ауристатин (Патенты США №№ 5,635,483; 5,780,588). Ауристатины являются анти-митотичекими агентами, которые вмешиваются в динамику микротрубочек, GTP гидролиз и деление ядер и клеток (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковым (Патент США № 5,663,149) и противогрибковым действием (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). (Патенты США №№ 5,635,483; 5,780,588). Ауристатиновое лекарственное средство может быть присоединено к антителу через N (амино) окончание или C (карбоксильное) окончание пептидного лекарственного средства (WO 02/088172).

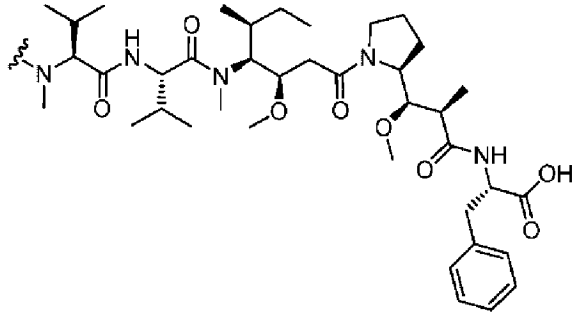
Типовые варианты ауристатина включают связанные на N-конце группы монометилауристатинового лекарственного средства DE и DF, описанные у Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number

623, presented Mar. 28, 2004, описание которых прямо включено в качестве ссылки полностью.

Типовым вариантом ауристатина является MMAE, где волнистая линия означает точку ковалентного присоединения к линкеру конъюгата антитело-линкер (-L-Z-Ab или -L-Z′, как описано в настоящем документе).



Другим типовым вариантом ауристатина является MMAF, где волнистая линия означает точку ковалентного присоединения к линкеру конъюгата антитело-линкер (-L-Z-Ab или -L-Z′, как описано в настоящем документе), как описано в US 2005/0238649:



Ауристатины могут быть получены согласно способам: Патент США № 5,635,483; Патент США № 5,780,588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; и Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

Майтанзиноиды

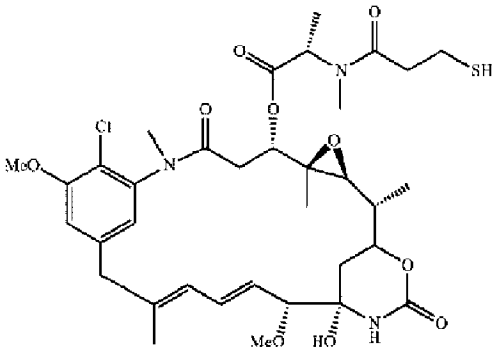
Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который является агентом, связывающим микротрубочки. В некоторых вариантах осуществления, агентом, связывающим микротрубочки, является майтанзин, майтанзиноид или аналог майтанзиноида. Майтанзиноиды являются митотическими ингибиторами, которые связывают микротрубочки и действуют через ингибирование полимеризации тубулина. Майтанзин сначала был выделен из восточноафриканского кустарника Maytenus serrata (Патент США № 3,896,111). Затем было обнаружено, что определенные микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры С-3 майтанзинола (Патент США № 4,151,042). Синтетический майтанзинол и их производные и аналоги описаны, например, в Патентах США №№ 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; и 4,371,533. Группы майтанзиноидного лекарственного средства являются

привлекательными группами лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство, так как они: (i) относительно доступны для получения ферментацией или химической модификацией, дериватизацией продуктов ферментации, (ii) подвержены дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации через не дисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества опухолевых клеточных линий.

Примеры подходящих майтанзиноидов включают сложные эфиры майтанзинола, синтетический майтанзинол и аналоги и производные майтанзинола. В настоящий документ включены любые цитотоксины, которые ингибируют образование микротрубочек, и которые являются высокотоксичными для клеток млекопитающих, такие как майтанзиноиды, майтанзинол и аналоги и производные майтанзинола.

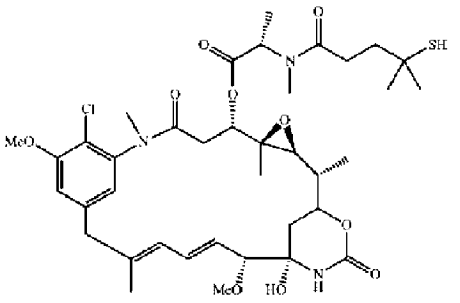
Примеры подходящих сложных эфиров майтанзинола включают такие, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, и которые имеют модификации на других положениях. Такие подходящие майтанзиноиды описаны в Патентах США №№ 4,137,230; 4,151,042; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,424,219 ;4,450,254; 4,322,348; 4,362,663; 4,371,533; 5,208,020; 5,416,064; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; 6,333,410; 7,276,497; и 7,473,796, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, в которой они относятся к майтанзиноидам и их производным.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) настоящего описания применяют тиол-содержащий майтанзиноид (DM1), формально названный $N^{2'}$-деацетил-$N^{2'}$-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин, в качестве цитотоксического агента. DM1 представлен следующей структурной формулой V:



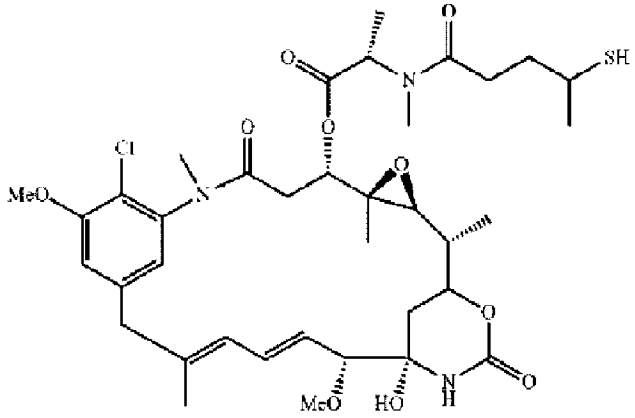
(V)

В другом варианте осуществления, конъюгаты настоящего описания применяют тиол-содержащий майтанзиноид $N^{2'}$-деацетил-$N^{2'}$(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (например, DM4) в качестве цитотоксического агента. DM4 представлен следующей структурной формулой VI:



(VI)

Другим майтанзиноидом, содержащим боковую цепь, которая содержит пространственно затрудненную тиольную связь, является $N^{2'}$-деацетил-N-$^{2'}$(4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (названный DM3), представленный следующей структурной формулой VII:



(VII)

Каждый из майтанзиноидов, описанных в Патентах США №№ 5,208,020 и 7,276,497, также может применяться в конъюгатах настоящего описания. В связи с этим, полное описание 5,208,020 и 7,276,697 включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Многие положения на майтанзиноидах могут служить в качестве положений для ковалентного связывания связывающей группы и, следовательно, антитела или его антигенсвязывающих фрагментов (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в настоящем документе). Например, ожидается, что все из C-3 положения, имеющего гидроксильную группу, C-14 положения, модифицированного с гидроксиметилом, C-15 положения, модифицированного с гидрокси и C-20 положения, имеющего гидроксигруппу, буду полезны. В некоторых вариантах осуществления, C-3 положение служит в качестве положения для ковалентного связывания линкерной группы и, в некоторых конкретных вариантах осуществления, C-3 положение майтанзинола служит в качестве положения для ковалентной связи связывающей группы. Существует множество связывающих групп, известных в данной области техники, для получения конъюгатов антитело-майтанзиноид, включая, например, те, которые описаны в Патентах США №№ 5,208,020, 6,441,163 и EP патенте № 0425235 B1; Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); и U.S. 2005/0169933 A1, описания которых прямо включены в настоящий документ в качестве ссылки. Дополнительные связывающие группы описаны и представлены примерами в настоящем документе.

Настоящее описание также включает разные изомеры и смеси майтанзиноидов и конъюгатов. Определенные соединения и конъюгаты настоящего описания могут существовать в разных стереоизомерных, энантиомерных и диастереомерных формах. Несколько описаний для получения таких конъюгатов антитело-майтанзиноид в Патентах США №№ 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,716,821; и 7,368,565, каждый из которых включен в настоящий документ в полностью.

Антрациклины

В других вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является молекула антрациклина. Антрациклины являются антибиотиками, которые демонстрируют цитотоксическую активность. Исследования показали, что антрациклины могут действовать на уничтожение клеток множеством разных механизмов, включая: 1) интеркаляцию молекул лекарственного средства в ДНК клетки, тем самым ингибируя DNA-зависимый синтез нуклеиновой кислоты; 2) продуцирование лекарственным средством свободных радикалов, которые затем взаимодействуют с клеточными макромолекулами, чтобы вызвать повреждение клеток, или 3) взаимодействия молекул лекарственного средства с клеточной мембраной [см., например, C. Peterson et al., «Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia» in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, «Free Radical Damage» id. at pp.97-102]. Благодаря их цитотоксическому потенциалу, антрациклины применяют в лечении множества видов рака, таких как лейкоз, карцинома груди, карцинома легких, аденокарцинома яичников и саркомы [см., например, P.H- Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11]. Широко применяемые антрациклины включают доксорубицин, эпирубицин, идарубицин и дауномицин.

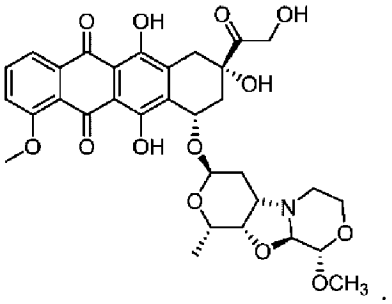
Считается, что аналог антрациклина, доксорубицин (ADRIAMYCINO) взаимодействует с ДНК через интеркаляцию и ингибирование прогрессирования фермента топоизомеразы II, который раскручивает ДНК для транскрипции. Доксорубицин стабилизирует комплекс топоизомеразы II после того, как он разрывает цепь ДНК для репликации, предотвращая повторное закрытие двойной спирали ДНК и, тем самым, останавливая процесс репликации. Доксорубицин и даунорубицин (DAUNOMYCIN) являются прототипами химиотерапевтических агентов на основе цитотоксического натурального продукта антрациклина (Sessa et al., (2007) Cardiovasc. Toxicol. 7:75-79).

Широко применяемые антрациклины включают доксорубицин, эпирубицин, идарубицин и дауномицин. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина.

Типовые примеры антрациклинов включают, но не ограничивается ими, даунорубицин (Церубидин; Bedford Laboratories), доксорубицин (Адриамицин; Bedford Laboratories; также называемый гидрохлорид доксорубицина, гидрокси-даунорубицин и

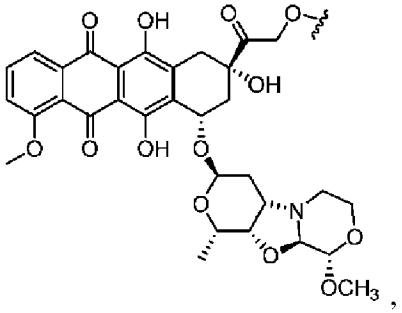
Рубекс), эпирубицин (Элленц; Pfizer) и идарубицин (Идамицин; Pfizer Inc.) Считается, что аналог антрациклина, доксорубицин (ADRIAMYCINO), взаимодействует с ДНК через интеркаляцию и ингибирование прогрессирования фермента топоизомеразы II, который раскручивает ДНК для транскрипции. Доксорубицин стабилизирует комплекс топоизомеразы II после того, как он разрывает цепь ДНК для репликации, предотвращая повторное закрытие двойной спирали ДНК и, тем самым, останавливая процесс репликации. Доксорубицин и даунорубицин (DAUNOMYCIN) являются прототипами химиотерапевтических агентов на основе цитотоксического натурального продукта антрациклина (Sessa et al., (2007) Cardiovasc. Toxicol. 7:75-79).

Другим неограничивающим примером подходящего антрациклина для применения в настоящем документе является PNU-159682 («PNU»). PNU демонстрирует более чем 3000-кратную цитотоксичность относительно исходного неморубицина (Quintieri et al., Clinical Cancer Research 2005, 11, 1608-1617). PNU представлен структурной формулой:



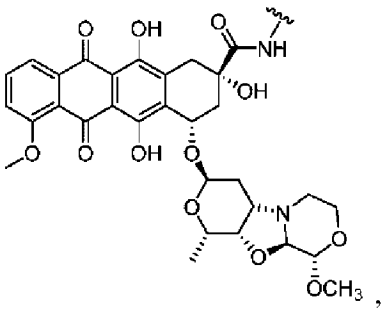
Множество положений на антрациклинах, таких как PNU, могут служить в качестве положений для ковалентного связывания связывающей группы и, следовательно, анти-CD117 антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе. Например, линкеры могут быть введены через модификации гидроксиметилкетоновой боковой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является производное PNU, представленное структурной формулой:



где волнистая линия указывает на место ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является производное PNU, представленное структурной формулой:

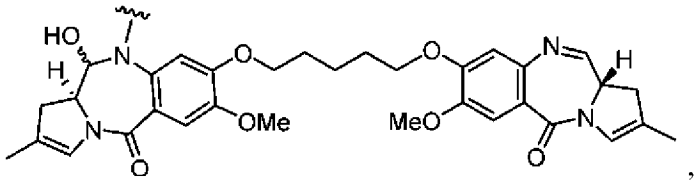


где волнистая линия указывает на место ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

Пирролобензодиазепины (PBD)

В других вариантах осуществления, анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является пирролобензодиазепин (PBD) или цитотоксин, который содержит PBD. PBD являются природными продуктами, полученными определенными актиномицетами, и было показано, что они являются сиквенс-селективными ДНК алкилирующими агентами. PBD цитотоксины включают, но не ограничивается ими, антрамицин, димерные PBD и те, которые описаны, например, у Hartley, JA (2011) The development of pyrrolobenzodiazepines as antitumour agents. Expert Opin Inv Drug, 20(6), 733-744 и Antonow D, Thurston DE (2011) Synthesis of DNA-interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs). Chem Rev 111: 2815-2864.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является димер пирролобензодиазепина, представленный структурной формулой:

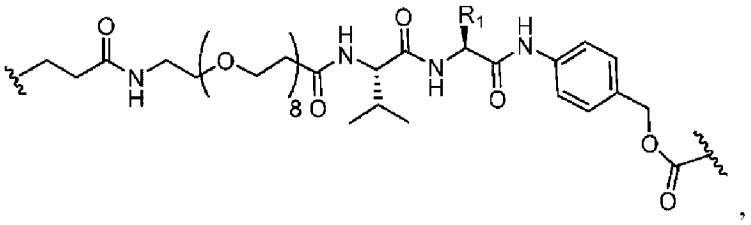


где волнистая линия указывает на место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксин конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом путем малеимидокапроилового линкера.

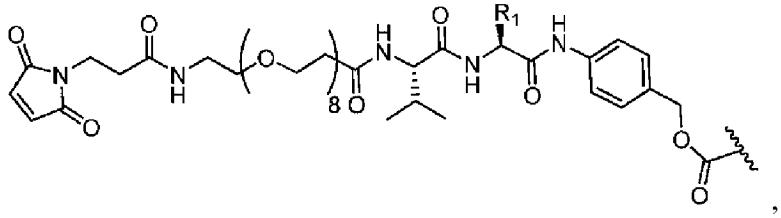
В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит один или несколько пептидов, олигосахарид, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_q-$, $-(C=O)(CH_2)_r-$, $-(C=O)(CH_2CH_2O)_t-$, $-(NHCH_2CH_2)_u-$,-PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB, где каждый из p, q, r, t и u являются целыми числами 1-12, выбранными независимо в каждом случае.

В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет структуру формулы:



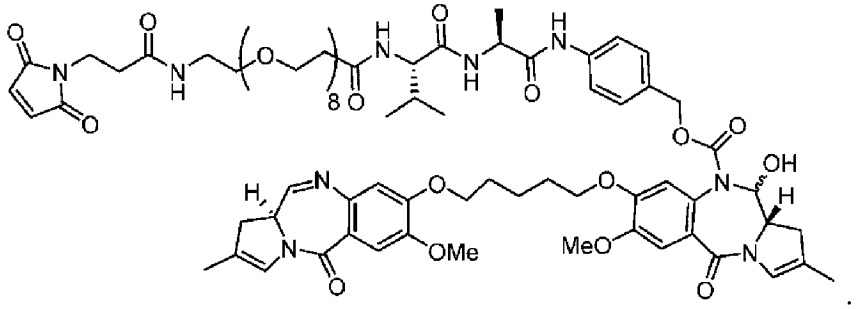
где R_1 является CH_3 (Ala) или $(CH_2)_3NH(CO)NH_2$ (Cit).

В некоторых вариантах осуществления, линкер, до конъюгации с антителом и включая реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как L-Z', имеет структуру:



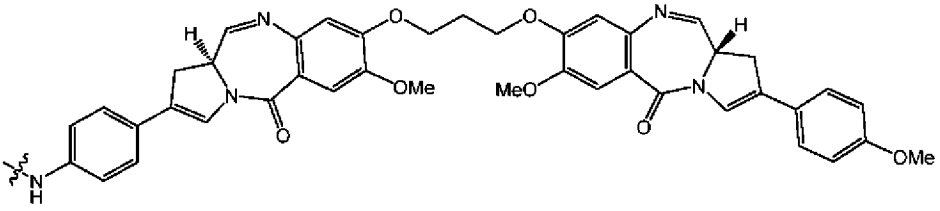
где волнистая линия означает точку присоединения к цитотоксину (например, PBD). В некоторых вариантах осуществления, R_1 является CH_3.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат цитотоксин-линкер, до конъюгации с антителом и включая реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как Cy-L-Z', имеют структурную формулу:



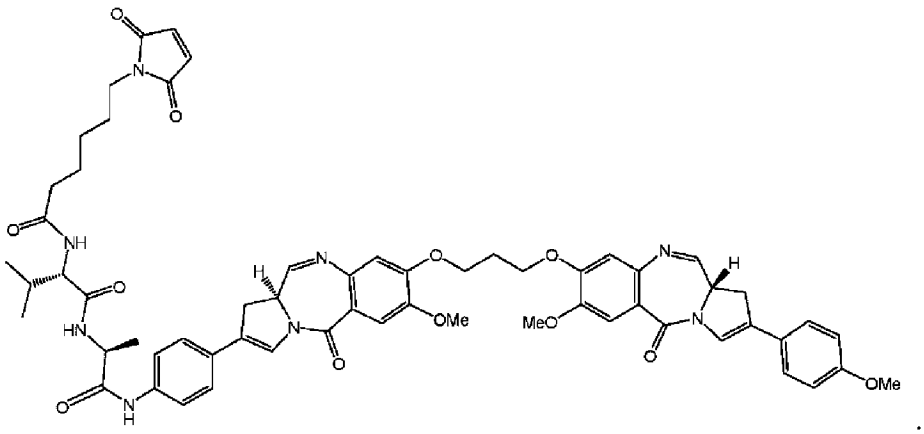
Этот конкретный конъюгат цитотоксин-линкер известен как тесирин (SG3249) и был описан в, например, Howard et al., ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7(11), 983-987, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является димер пирролобензодиазепина, представленный структурной формулой:



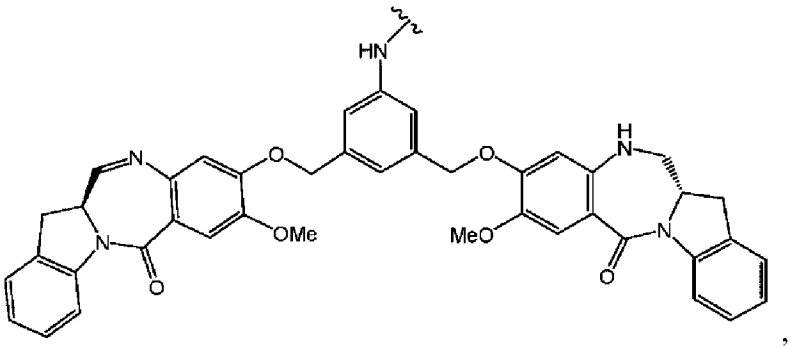
где волнистая линия указывает на место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат цитотоксин-линкер, до конъюгации с антителом и включая реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как Cy-L-Z', имеет структурную формулу:



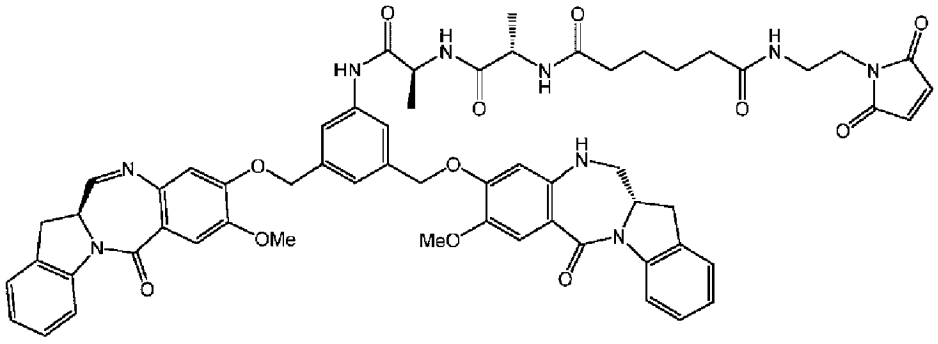
Этот конкретный конъюгат цитотоксин-линкер известен как талирин и был описан, например, в связи с ADC Вадастуксимабом талирином (SGN-CD33A), Mantaj et al., Angewandte Chemie International Edition English 2017,56, 462-488, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксином является псевдодимер индолинобензодиазепина, имеющий структурную формулу:



где волнистая линия указывает на место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат цитотоксин-линкер, до конъюгирования с антителом, и включая реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как Cy-L-Z', имеет структурную формулу:



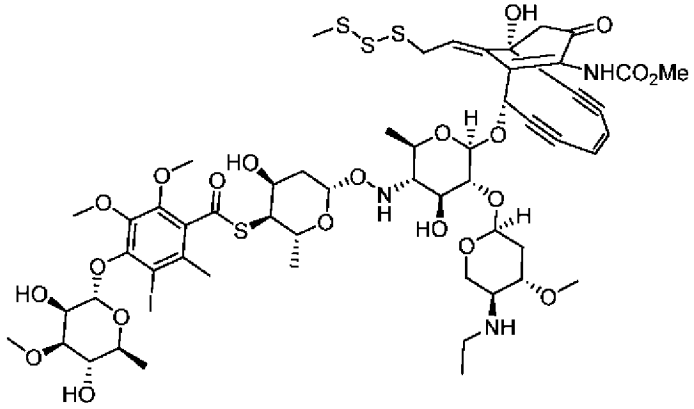
который содержит ADC IMGN632, описанный, например, в публикации международной заявки на патент № WO2017004026, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Калихеамицин

В других вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие

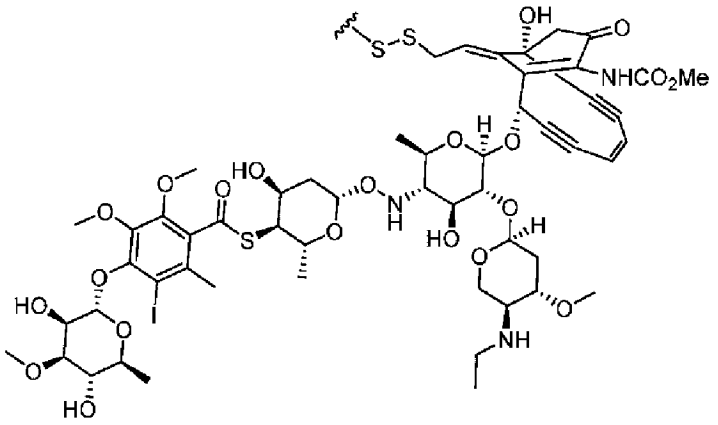
фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является энедииновый противоопухолевый антибиотик (например, калихеамицины, озогамицин). Семейство калихеамициновых антибиотиков способно вызывать разрывы двухцепочечных ДНК в суб-пикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов семейства калихеамицина, см. патенты США №№ 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; и 5,877,296 (все принадлежат American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые могут применяться включают, но не ограничивается ими, описанные у, например, Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеуказанных патентах США, принадлежащих American Cyanamid.

Типовой калихеамицин обозначен γ_1, который в настоящем документе обозначен просто как гамма и имеет структурную формулу:



В некоторых вариантах осуществления, калихеамицином является производное гамма-калихеамицина или производное N-ацетил гамма-калихеамицина. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут применяться, включают, но не ограничиваются ими, описанные, например, в Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеуказанных патентах США. Калихеамицины содержат метилтрисульфидную группу, которая может взаимодействовать с подходящими тиолами с образованием дисульфидов, в то же время вводят функциональную группу, которую применяют при присоединении производного калихеамицина к анти-CD117 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в настоящем документе, через линкер. Для получения конъюгатов семейства калихеамицина, см. патенты США №№ 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; и 5,877,296 (все принадлежат American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые могут применяться, включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в, например, Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеуказанных патентах США, принадлежащих American Cyanamid.

В одном варианте осуществления, цитотоксином ADC, описанным в настоящем документе, является производное дисульфида калихеамицина, представленное структурной формулой:



,

где волнистая линия указывает на место присоединения линкера.

Дополнительные цитотоксины

В других вариантах осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, отличным от дополнительным к тем, которые описаны в настоящем документе выше. Дополнительные цитотоксины, подходящие для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают, без ограничений, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен, адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, альтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминолевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антареликс, анти-дорсализирующий морфогенетический белок-1, антиандроген, карциному простаты, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколин глицинат, модуляторы гена апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновую кислоту, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины, бензоилстауроспорин, производные бета-лактама, бета-алетин, бетакламицин B, бетулиновую кислоту, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрен, бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен A, биселезин, брефлат, блеомицин A2, блеомицин B2, бропиримин, будотитан, бутионин сульфоксимин, кальципотриол, кальфостин C, производные камптотецина (например, 10-гидрокси-камптотецин), капецитабин, карбоксамид-амино-триазол, карбоксиамидотриазол, карцелезин, ингибиторы казеинкиназы, кастаноспермин, цекропин B, цетрореликс, хлорины, хлорхиноксалин сульфонамид, цикапрост, цис-порфирин, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллизмицин A, коллизмицин B, комбретастатин A4, аналоги комбретастатина, конагенин, крамбецидин 816, криснатол, криптофицин 8, производные криптофицина A, курацин A, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, окфосфат цитарабина, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин B, 2'дезоксикоформицин (DCF), дезлорелин, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин B, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацитидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенил спиромустин, дискодермолид, докозанол, доласетрон, доксифлуридин, дролоксифен,

дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпитилоны, эпристерид, эстрамустин и его аналоги, этопозид, 4'-фосфат этопозида (также называемый этопофос), экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, флуастерон, флударабин, гидрохлорид фтородауноруницина, форфенимекс, форместан, фостриецин, фотемустин, тексафирин гадолиния, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомохаррингтонин (ННТ), гиперицин, ибандроновую кислоту, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, иобенгуан, йодоксорубицин, ипомеанол, иринотекан, ироплакт, ирсогладин, изобенгазол, джасплакинолид, кахалалид F, триацетат ламелларина-N, ланреотид, лейнамицин, ленограстим, сульфат лентинана, лептолстатин, летрозол, липофильные соединения платины, лизоклинамид 7, лобаплатин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, локсорибин, луртотекан, тексафирин лютеция, лизофиллин, мазопрокол, маспин, ингибиторы матричной металлопротеиназы, меногарил, рнербарон, метерелин, метониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, ифепристон, милтефозин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол, митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, микапероксид B, мириапорон, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, нерамидроновую кислоту, нилутамид, низамицин, нитруллин, октреотид, окиценон, онапристон, ондансетрон, орацин, ормаплатин, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел и его аналоги, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновую кислоту, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргазу, пелдезин, пентозан полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритреким, подофиллотоксин, порфиромицин, ингибиторы пуриновой нуклеозидфосфорилазы, ралтитрексед, ризоксин, роглетимид, рогитукин, рубигинон B1, рубоксил, сафингол, сентопин, саркофитол A, сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфосиновую кислоту, спикамицин D, спиромустин, стипиамид, сульфинозин, таллимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин, триметрексат, верамин, винорелбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и зиласкорб, среди прочих.

Линкеры

Множество линкеров может применяться для конъюгации антител или фрагментов антител, описанных в настоящем документе (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела) с цитотоксической молекулой.

Термин «линкер», как применяется в настоящем документе, означает двухвалентную химическую группу, содержащую ковалентную связь или цепь атомов, которая ковалентно соединяет конъюгаты анти-HC антитела (например, анти-CD117

антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) и лекарственного средства (ADC) настоящего описания (ADC; Ab-Z-L-D, где D является цитотоксином). Подходящие линкеры имеют два реакционноспособных конца, один для конъюгации с антителом, и дугой для конъюгации с цитотоксином. Конъюгирующийся с антителом реакционноспособный конец линкера (реакционноспособная группа, Z′) обычно является сайтом, который способен конъюгироваться с антителом через тиольную группу цистеина или аминовую группу лизина на антителе, и поэтому обычно является тиол-реакционноспособной группой, такой как двойная связь (как в малеимиде), или уходящей группой, такой как хлор, бром, йод или R-сульфанильная группа, или амин-реакционноспособной группой, такой как карбоксильная группа; в то время как коньюгирующийся с антителом реакционноспособный конец линкера обычно является сайтом, который способен конъюгироваться с цитотоксином через формирование амидной связи с основным амином или карбоксильной группой на цитотоксине, и поэтому обычно является карбоксильной или основной аминовой группой. Если термин «линкер» применяют при описании линкера в конъюгированной форме, один или несколько из реакционноспособных концов будет отсутствовать (например, реакционноспособная группа Z′, превращенная в химическую группу Z) или являться неполным (например, являясь только карбонилом карбоновой кислоты) из-за формирования связей между линкером и/или цитотоксином и между линкером и/или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Такие реакции конъюгации описаны дополнительно в настоящем документе ниже.

В некоторых вариантах осуществления, линкер отщепляется во внутриклеточных условиях, так, что отщепление линкера высвобождает единицу лекарственного средства из антитела во внутриклеточной среде. В дополнительных вариантах осуществления, линкерная единица не отщепляется, и лекарственное средство выделяется, например, при разложении антитела. Линкеры, применяемые для настоящих ADC, предпочтительно являются стабильными вне клетки, предотвращают агрегацию молекул ADC и сохраняют ADC свободно растворимым в водной среде и в мономерном состоянии. Перед транспортировкой или доставкой в клетку, ADC предпочтительно является стабильным и остается интактным, т.е. антитело остается связанным с группой лекарственного средства. Линкеры являются стабильными вне клетки-мишени и могут быть отщеплены с определенной эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер: (i) сохраняет свойства специфического связывания антитела; (ii) позволяет внутриклеточную доставку группы конъюгата или лекарственного средства; (iii) остается стабильным и интактным, т.е. не отщепляется до доставки или транспортировки конъюгата в сайт-мишень; и (iv) сохраняет цитотоксический, уничтожающий клетку эффект или цитостатический эффект цитотоксической группы. Стабильность ADC может быть измерена стандартными методами анализа, такими как масс спектроскопия, ВЭЖХ и метод отделения/анализа ЖХ/МС. Ковалентное присоединение антитела и группы лекарственного средства требует

чтобы линкер имел две реакционноспособных функциональных группы, т.е. двухвалентности в смысле реакционной способности. Двухвалентные линкерные реагенты, которые применяют для присоединения двух или нескольких функциональных или биологически активных групп, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, известны, и описаны способы их получаемых конъюгатов (Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p. 234-242).

Линкеры включают такие, которые могут быть расщеплены, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в щелочных условиях, окислением, дисульфидным восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации). Подходящие расщепляемые линкеры могут включать, например, химические группы, такие как гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид.

Линкеры, гидролизуемые в кислых условиях, включают, например, гидразоны, полукарбазоны, тиополукарбазоны, цис-аконитовые амиды, ортоэфиры, ацетали, кетали или подобные. (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, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального pH, например, в крови, но являются нестабильными при pH ниже 5.5 или 5.0, приблизительного pH лизосомы.

Линкеры, отщепляемые в условиях восстановления, включают, например, дисульфид. Множество дисульфидных линкеров известно в данной области техники, включая, например, такие, которые могут быть образованы с применением SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол), SPDB и SMPT (См., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4,880,935, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

Линкеры, подверженные ферментативному гидролизу, могут быть *например*, пептидсодержащими линкерами, которые отщепляются ферментом внутриклеточной пептидазы или протеазы, включая, но не ограничиваясь ими, лизосомальную или эндосомальную протеазу. Одним преимуществом применения внутриклеточного протеолитического выделения терапевтического агента является то, что агент обычно

ослабляется, будучи конъюгированным, и стабильность конъюгатов в сыворотке обычно является высокой. В некоторых вариантах осуществления, пептидильный линкер имеет, по меньшей мере, две аминокислоты в длину, или, по меньшей мере, три аминокислоты в длину. Типовые аминокислотные линкеры включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры подходящих пептидов включают такие, которые содержат аминокислоты, такие как валин, аланин, цитруллин (Cit), фенилаланин, лизин, лейцин и глицин. Аминокислотные остатки, которые содержат компонент аминокислотного линкера, включают такие, которые существуют в природе, а также незначительные аминокислоты и не существующие в природе аминокислотные аналоги, такие как цитруллин. Типовые дипептиды включают валин-цитруллин (vc или val-cit) и аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Типовые 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, описаны в, например, Патенте США № 6,214,345, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью в той части, в которой оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit.

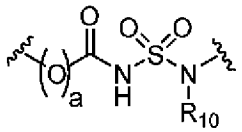
Линкеры, подходящие для конъюгации антител или фрагментов антител, описанных в настоящем документе, с цитотоксической молекулой включают такие, которые способны выделять цитотоксин через процесс 1,6-элиминации («саморасщепляющаяся» группа). Химические группы, способные на такой процесс элиминации, включают *n*-аминобензильную (PAB) группу, 6-малеимидогексановую кислоту, pH-чувствительные карбонаты и другие реагенты, как описано у Jain et al., Pharm. Res. 32:3526-3540, 2015, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью в той части, в которой он относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает «саморасщепляющуюся» группу, такую как вышеуказанный PAB или PABC (пара-аминобензилоксикарбонил), который описан у, например, Carl et al., J. Med. Chem. (1981) 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; W098/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; W02004/032828). Другие такие химические группы, подходящие для такого процесса («саморасщепляющиеся линкеры») включают метиленкарбаматы и гетероарильные группы, такие как аминотиазолы, аминоимидазолы, аминопиримидины и подобные. Линкеры, содержащие такие гетероциклические саморасщепляющиеся группы, описаны в, например, публикациях патентов США №№ 20160303254 и 20150079114 и 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. В

некоторых вариантах осуществления, дипептид применяют в комбинации с саморасщепляющимся линкером.

Линкеры, подходящие для применения в настоящем документе, дополнительно может включать одну или несколько 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 комбинаций, каждый из которых может быть необязательно замещен. неограничивающие примеры таких групп включают $(CH_2)_p$, $(CH_2CH_2O)_p$ и $-(C=O)(CH_2)_p-$ единицы, где p равен целому числу 1-6, независимо выбранному для каждого случая.

Подходящие линкеры могут содержать группы, имеющие свойства, улучшающие растворимость. Линкеры, включающие $(CH_2CH_2O)_p$ единицу (полиэтиленгликоль, ПЭГ), например, может улучшать растворимость, как и алкильные цепи с остатками амино, сульфоновой кислоты, фосфоновой кислоты или фосфорной кислоты. Линкеры, включающие такие группы, описаны в, например, Патентах США №№ 8,236,319 и 9,504,756, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Дополнительно, группы, улучшающие растворимость, включают, например, ацильные и карбаимоильные сульфамидные группы, имеющие структуру:



где a равен 0 или 1; и

R^{10} выбирают из группы, состоящей из водорода, C_1-C_{24} алкильных групп, C_3-C_{24} циклоалкильных групп, C_1-C_{24} (гетеро)арильных групп, C_1-C_{24} алкил(гетеро)арильных групп и C_1-C_{24} (гетеро)арилалкильных групп, C_1-C_{24} алкильных групп, C_3-C_{24} циклоалкильных групп, C_2-C_{24} (гетеро)арильных групп, C_3-C_{24} алкил(гетеро)арильных групп и C_3-C_{24} (гетеро)арилалкильных групп, каждая из которых может быть необязательно замещена и/или необязательно прервана одним или несколькими гетероатомами, выбранными из O, S и $NR^{11}R^{12}$, где R^{11} и R^{12} независимо выбирают из группы, состоящей из водорода и C_1-C_4 алкильных групп; или R^{10} является цитотоксином, где цитотоксин необязательно соединен с N через спейсерную группу. Линкеры, содержащие такие группы, описаны, например, в патенте США № 9,636,421 и публикации заявки на патент США № 2017/0298145, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью, в той части, которая относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации с цитотоксинами и антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления, линкер может включать один или несколько из гидразина, дисульфида, тиоэфира, дипептида, *n*-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, необязательно замещенного гетероарила, группы, улучшающей растворимость, ацила, -(C=O)- или -$(CH_2CH_2O)_p$- группы, где p равен целому числу 1-6. Специалист в данной области техники поймет, что одна или несколько из этих перечисленных групп может присутствовать в форме двухвалентного (дирадикального) соединения, *например*, C_1-C_6 алкилена и подобных.

В некоторых вариантах осуществления, линкер включает п-аминобензильную группу (PAB). В одном варианте осуществления, п-аминобензильная группа расположена между цитотоксическим лекарственным средством и сайтом отщепления протеазы в линкере. В одном варианте осуществления, п-аминобензильная группа является частью п-аминобензиллксикарбонильной единицы. В одном варианте осуществления, п-аминобензильная группа является частью п-аминобензиламидо единицы.

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 нескольких пептидов, олигосахаридов, -$(CH_2)_p$-, -$(CH_2CH_2O)_p$-, 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.

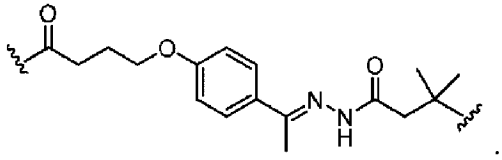
В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит -(C=O)$(CH_2)_p$- единицу, где p равен целому числу 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит -$(CH_2)_n$-единицу, где n равен целому числу 2-6.

В некоторых вариантах осуществления, линкером ADC является малеимидокапроил-Val-Ala-пара-аминобензил (mc-Val-Ala-PAB).

В некоторых вариантах осуществления, линкером ADC является малеимидокапроил-Val-Cit-пара-аминобензил (mc-vc-PAB).

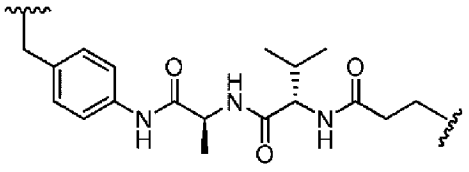
В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит



.

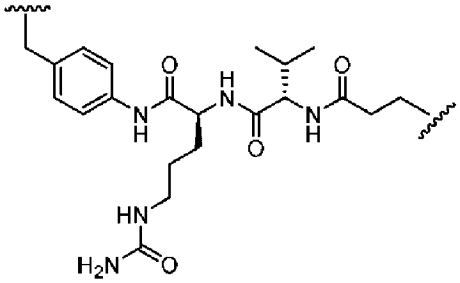
В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит MCC (4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат).

В одном конкретном варианте осуществления, линкер содержит структуру



,

где волнистые линии означают точки присоединения к цитотоксину и реакционноспособной группе Z′. В другом конкретном варианте осуществления, линкер содержит структуру



где волнистые линии означают точки присоединения к цитотоксину и реакционноспособной группе Z′. Такие PAB-дипептид-пропионильные линкеры описаны в, *например,* Публикации заявки на патент № WO2017/149077, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки полностью. Дополнительно, цитотоксины, описанные в WO2017/149077, включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Линкеры, которые могут применяться для конъюгации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксическим агентом включают такие, которые ковалентно связаны с цитотоксическим агентом на одном конце линкера и, на другом конце линкера, содержит химическую группу, образованную в реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает CD117 (такой как GNNK+ CD117). Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которые связывают CD117 (такой как GNNK+ CD117) включают, без ограничений, гидроксильные группы сериновых, треониновых и тирозиновых остатков; аминогруппы лизиновых остатков; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные группы цистеиновых остатков, а также пропаргильные, азидо, галоарильные (например, фторарильные), галогетероарильные (например, фторгетероарильные), галоалкильные и галогетероалкильные группы не существующих в природе аминокислот.

Примеры линкеров, полезных для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают такие, которые содержат электрофилы, такие как акцепторы Майкла (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, среди прочих, подходящие для реакции с нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителах или антигенсвязывающих фрагментах, такими как аминовые и тиольные группы. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело, включают, без ограничений, сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N- сукцинимидилйодацетат (SIA), сульфо-SMCC, m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидилйодацетат, среди прочих, описанных, например, у Liu et al., 18:690-697,

1979, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают не расщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно полезны для конъюгации агентов, разрывающих микротрубочки, таких как ауристатины, описанные у Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам для химической конъюгации.

Специалист в данной области техники поймет, что любая одна или несколько химических групп, фрагментов и признаков, описанных в настоящем документе, может быть объединена множеством путей для образования линкеров, применяемых для конъюгации антител и цитотоксинов, описанных в настоящем документе. Дополнительно, линкеры, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в Публикации заявки на патент США № 2015/0218220, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

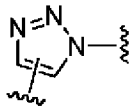
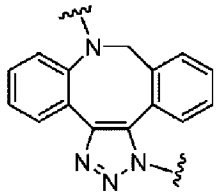
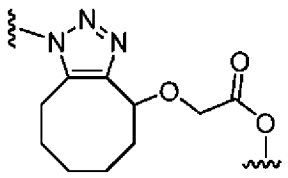
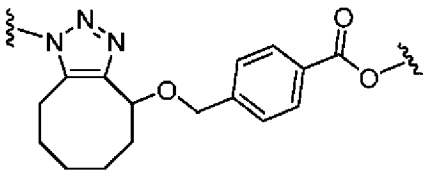
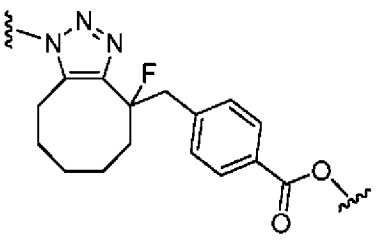
В некоторых вариантах осуществления, промежуточное соединение, которое является предшественником линкера, взаимодействует с группой лекарственного средства в подходящих условиях. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособные группы применяют на лекарственном средстве и/или промежуточном соединении или линкере. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением или дериватизированным лекарственным средством затем подвергают взаимодействию с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в подходящих условиях. Альтернативно, линкер или промежуточное соединение сначала может быть подвергнуто взаимодействию с антителом или дериватизированным антителом, и затем подвергнуто взаимодействию с лекарственным средством или дериватизированным лекарственным средством. Такие реакции конъюгации далее буду описаны более подробно.

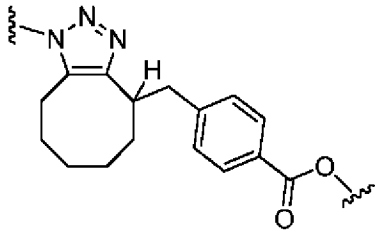
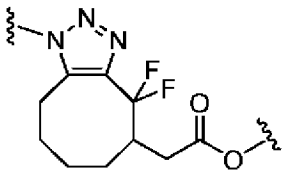
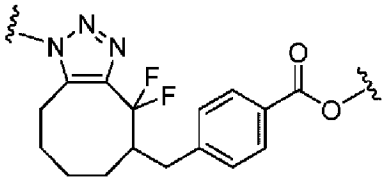
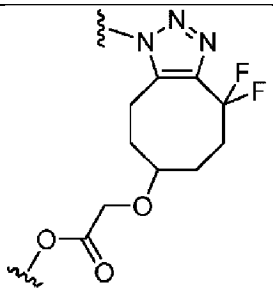
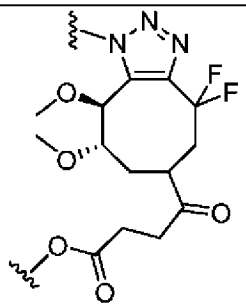
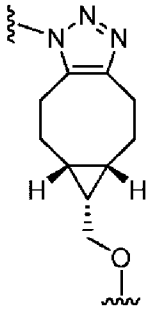
Множество разных реакций доступны для ковалентного присоединения линкеров или конъюгатов лекарственное средство-линкер к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Подходящие точки присоединения на молекуле антитела включают аминовые группы лизина, группы свободной карбоновой кислоты глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и разные группы ароматических аминокислот. Например, неспецифическое ковалентное присоединение может быть проведено с применением реакции карбодиимида для связывания карбокси (или амино) группы на соединении с амино (или карбокси) группой на группе антитела. Дополнительно, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидоэфиры, также могут применяться для связывания аминогруппы на соединении с аминогруппой на группе антитела. Также для присоединения лекарственных средств к связывающим агентам применяют реакцию основания Шиффа. Этот способ включает периодатное окисление лекарственного средства, которое содержит гликолевую или гидроксигруппу,

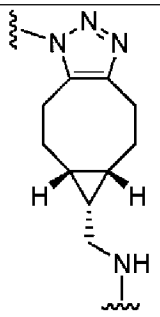
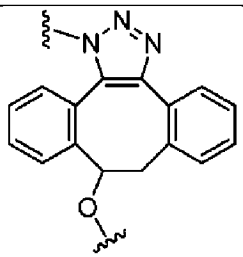
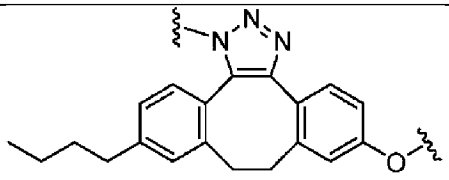
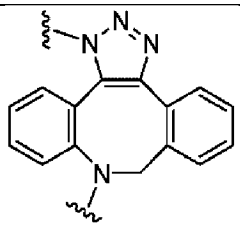
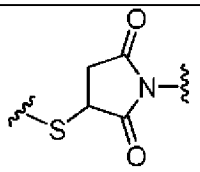
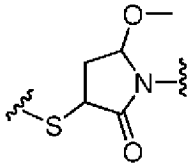
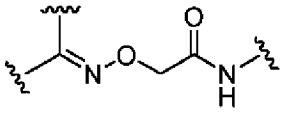
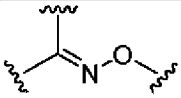
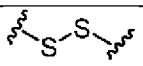
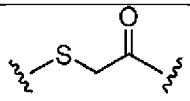
таким образом, получая альдегид, который затем подвергают взаимодействию со связывающим агентом. Присоединение происходит через образование основания Шиффа с аминогруппами связывающего агента. Изотиоцианаты также могут применяться в качестве сочетающих агентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим агентам. Другие методы известны специалистам в данной области техники и включены в объем настоящего описания.

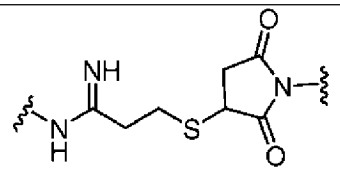
Линкеры, применяемые для конъюгации с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, как описано в настоящем документе, включают, без ограничений, линкеры, содержащие химические группы Z, образованные реакциями сочетания, как изображено в таблице 4 ниже. Волнистые линии означают точки присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту и цитотоксической молекуле, соответственно.

Таблица 4. Типовые химические группы Z, образованные реакциями сочетания, в образовании конъюгатов антитело-лекарственное средство

Типовые реакции сочетания	Химическая группа Z, образованная реакциями сочетания
[3+2] Циклоприсоединение	
[3+2] Циклоприсоединение	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	

[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	

[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Эстерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение	
Добавление Майкла	
Добавление Майкла	
Конденсация имина, Амидирование	
Конденсация имина	
Образование дисульфида	
Алкилирование тиола	

Конденсация, Добавление Майкла	

Специалист в данной области техники поймет, что реакционноспособный заместитель Z′, присоединенный к линкеру, и реакционноспособный заместитель на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте соединяются в реакции ковалентного сочетания с получением химической группы Z, и сможет распознать реакционноспособную группу Z′. Поэтому конъюгаты антитело-лекарственное средство, применяемые в сочетании со способами, описанными в настоящем документе, могут быть сформированы реакцией антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, как описано в настоящем документе, линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, включая реакционноспособный заместитель Z′, подходящий для реакции с реакционноспособным заместителем на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, с получением химической группы Z.

Как изображено в таблице 4, примеры подходящих реакционноспособных заместителей на линкере и антителе или его антигенсвязывающем фрагменте включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галоалкил, пару амин/карбонил или пару тиол/α,β-ненасыщенный карбонил и подобные), пару диен/диенофил (например, пару азид/алкин или пару диен/α,β-ненасыщенный карбонил, среди прочих) и подобные. Реакции сочетания между реакционноспособными заместителями для образование химической группы Z включают, без ограничений, алкилирование тиола, алкилирование гидроксила, алкилирование амина, конденсацию амина или гидроксиламина, образование гидразина, амидирование, эстерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Алдера, [3+2] циклоприсоединение Хьюсгена, среди прочих), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционноспособные модальности, известные в данной области техники или описанные в настоящем документе. Предпочтительно, линкер содержит электрофильную функциональную группу для реакции с нуклеофильной функциональной группой на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают, без ограничений, нуклеофильные группы, такие как (i) N-концевые аминовые группы, (ii) боковые цепи аминовых групп, например лизина, (iii) боковые цепи тиольных групп, например цистеина, и (iv) гидроксильные или аминогруппы сахара, где антитело глкозилировано. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают, без ограничений, гидроксильные группы сериновых, треониновых и тирозиновых остатков; аминогруппы лизиновых остатков; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные группы

цистеиновых остатков, а также пропаргильные, азидо, галоарильные (например, фторарильные), галогетероарильные (например, фторгетероарильные), галоалкильные и галогетероалкильные группы не существующих в природе аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособные заместители, присутствующие в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, как описано в настоящем документе, включают аминовые или тиольные группы. Определенные антитела имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела могут быть сделаны реакционноспособными к конъюгации с линкерными реагентами через обработку с восстанавливающим агентом, таким как DTT (дитиотреитол). Каждый цистеиновый мостик, таким образом, будет образовывать, теоретически, реакционноспособные тиольные нуклеофилы. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела через реакцию лизинов с 2-иминотиоланом (реагентом Трота) с превращением амина в тиол. Реакционноспособные тиольные группы могут быть введены в антитело (или его фрагмент) через введение одного, двух, трех или четырех цистеиновых остатков (например, получение мутантного антитела, содержащего один или несколько не нативных цистеиновых аминокислотных остатков). Патент США № 7,521,541 описывает конструирование антител через введение реакционноспособных цистеиновых аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособная группа Z', присоединенная к линкеру, является нуклеофильной группой, которая может взаимодействовать с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Полезные электрофильные группы на антителе включают, но не ограничивается ими, альдегид и кетон карбонильных групп. Гетероатом нуклеофильной группы может взаимодействовать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с антителом. Полезные нуклеофильные группы включают, но не ограничивается ими, гидразид, оксим, амино, гидроксил, гидразин, тиополукарбазон, карбоксилат гидразина и арилгидразид.

В некоторых вариантах осуществления, Z является продуктом реакции между реакционноспособными нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителах или его антигенсвязывающих фрагментов, такими как аминовые и тиольные группы, и реакционноспособным электрофильным заместителем Z'. Например, Z' может быть акцептором Майкла (например, малеимидом), активированным сложным эфиром, электронодефицитным карбонильным соединением и альдегидом, среди прочих.

Например, линкеры, подходящие для синтеза ADC, включают, без ограничений, реакционноспособные заместители Z', такие как малеимидные или галоалкильные группы. Они могут быть присоединены к линкеру через реагенты, такие как сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил йодацетат (SIA), сульфо-SMCC, *м*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидил йодацетат, среди прочих, описанных, например, у Liu et al., 18:690-697, 1979, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособный заместитель Z′, присоединенным к линкеру L, является малеимид, азид или алкин. Примером малеимидсодержащего линкера является не отщепляемый линкер на основе малеимидокапроила, который особенно полезен для конъюгации агентов, разрывающих микротрубочки, таких как ауристатины. Такие линкеры описаны у Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в той части, которая относится к линкерам для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособным заместителем Z′ является -(C=O)- или -NH(C=O)-, так, что линкер может быть соединен с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через амидную или мочевинную группу, соответственно, с получением в результате реакции -(C=O)- или -NH(C=O)- группы с аминогруппой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособным заместителем является N-малеимидильная группа, галогенированная N-алкиламидогруппа, сульфонилокси N-алкиламидогруппа, карбонатная группа, сульфонилгалогенидная группа, тиольная группа или ее производное, алкинильная группа, содержащая внутреннюю тройную связь углерод-углерод, (гетеро)циклоалкинильная группа, бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ильная группа, алкенильная группа, содержащая внутреннюю двойную связь углерод-углерод, циклоалкенильная группа, тетразинильная группа, азидогруппа, фосфиновая группа, нитрильная оксидная группа, нитроновая группа, нитрилиминовая группа, диазогруппа, кетоновая группа, (O-алкил)гидроксиламиногруппа, гидразиновая группа, галогенированная N-малеимидильная группа, 1,1-бис(сульфонилметил)метилкарбонильная группа или ее выбывающие производные, карбонилгалогенидная группа или алленамидная группа, каждая из которых может быть необязательно замещена. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособный заместитель содержит циклоалкеновую группу, циклоалкиновую группу или необязательно замещенную (гетеро)циклоалкинильную группу.

Неограничивающие примеры конъюгатов аматоксин-линкер, содержащих реакционноспособный заместитель Z′, подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, включают, без ограничений, 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил) пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-карбоксиргорапамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-

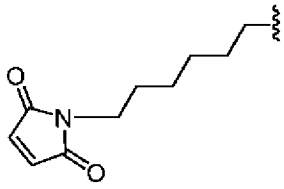
(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)аматоксин;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

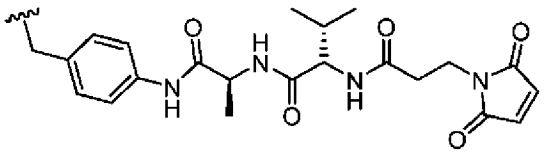
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)аматоксин; 6'O-(2-((6-(малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)аматоксин; 6'O-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)аматоксин; 6'O-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил) аматоксин; 6'O-(6-(2-бромацетамидо)гексил)аматоксин; 7'C-(4-(6-(азидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(гекс-5-иноиламино)пиперидин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)аматоксин; 6'O-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[b, f]азоцин-5-ил)-6-оксогексанамидо)гексил)аматоксин; 6'O-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)аматоксин; 6'O-(6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)аматоксин; 6'O-((6-аминоокси)гексил)аматоксин; и 6'O-(6-(2-йодацетамидо)гексил)аматоксин.

Специалист в данной области техники распознает структуру группы линкер-реакционноспособный заместитель до конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим малеимид в качестве группы Z'. Вышеупомянутые линкерные группы и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочих, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, Публикации заявки на патент США № 2015/0218220 и Публикации заявки на патент № WO2017/149077, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, структурой группы линкер-реакционноспособный заместитель L-Z', до конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, является:

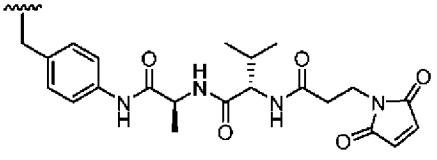


или



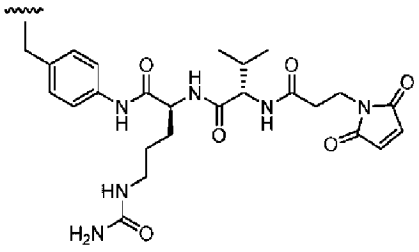
.

В некоторых вариантах осуществления, аматоксин, описанный в настоящем документе, конъюгирован с линкером-реакционноспособной группой -L-Z', имеющей следующую формулу:



.

В некоторых вариантах осуществления, аматоксин, описанный в настоящем документе, конъюгирован с линкером-реакционноспособной группой -L-Z', имеющей следующую формулу:



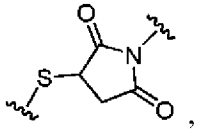
Вышеупомянутые линкерные группы и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочих, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в Публикации заявки на патент США № 2015/0218220 и Публикации заявки на патент № WO2017/149077, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Вышеупомянутые линкерные группы и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочих, применяемые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в Публикации заявки на патент США № 2015/0218220 и Публикации заявки на патент № WO2017/149077, описание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, ADC содержит анти-CD117 антитело, конъюгированное с аматоксином, включая, но не ограничиваясь ими, аматоксин любой из формул **I, IA, IB, II, IIA** или **IIB,** описанных в настоящем документе, через линкер и химическую группу Z. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает пара-аминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает группу PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -((C=O)$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 1-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-.

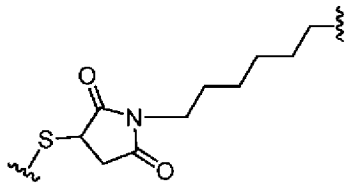
В некоторых вариантах осуществления, линкер включает -$(CH_2)_n$- единицу, где n равен целому числу 2-6. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Cit-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -PAB-Ala-Val-((C=O)$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -$(CH_2)_n$-. В некоторых вариантах осуществления, линкер является -($(CH_2)_n$-, где n равно 6.

В некоторых вариантах осуществления, химическую группу Z выбирают из таблицы 4. В некоторых вариантах осуществления, химической группой Z является

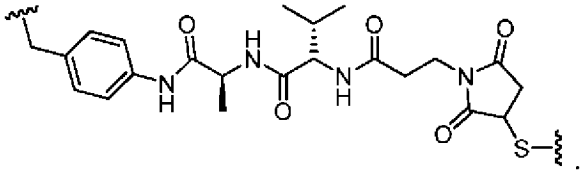


где S является атомом серы, которая представляет реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которая связывает CD117 (например, из -SH группы цистеинового остатка).

В некоторых вариантах осуществления, линкер L и химическая группа Z, взятые вместе как L-Z, являются



или



Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

В ADC настоящего описания (ADC; D-L-Z-Ab, где D является а цитотоксином) как описано в настоящем документе, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгирован м одни или несколькими группами цитотоксического лекарственного средства (D), *например*, от примерно 1 до примерно 20 группами лекарственного средства на антитело, через линкер L и химическую группу Z, как описано в настоящем документе. ADC настоящего описания могут быть получены несколькими путями, с применением реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области техники, включая: (1) реакцию реакционноспособного заместителя антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с двухвалентным линкерным реагентом с получением Ab-Z-L, как описано в настоящем документе выше, с последующей реакцией с группой лекарственного средства D; или (2) реакцию реакционноспособного заместителя группы лекарственного средства с двухвалентным линкерным реагентом с образованием D-L-Z', с последующей реакцией с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе выше, с образованием ADC формулы D-L-Z-Ab, такой как Am-Z-L-Ab. Дополнительные способы получения ADC описаны в настоящем документе.

В другом аспекте, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающ фрагмент имеет один или несколько лизиновых остатков, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или нескольких сульфгидрильных групп. ADC затем получают конъюгацией через атом серы сульфгидрильной группы, как описано в настоящем документе выше. Реагенты, которые могут применяться для модификации лизина, включают, но не ограничивается ими, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) и гидрохлорид 2-иминотиолана (реагент Трота).

В другом аспекте, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь одну или несколько карбогидратных групп, которые могут быть химически модифицированы так, чтобы иметь одну или несколько сульфгидрильных групп. ADC затем получают конъюгацией через атом серы сульфгидрильной группы, как описано в настоящем документе выше.

В еще одном аспекте, анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-

CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающ фрагмент, может иметь одну или несколько углеводных групп, которые могут быть окислены с получением альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). ADC затем получают конъюгацией через соответствующий альдегид, как описано в настоящем документе выше. Другие протоколы для модификации белков для присоединения или ассоциации цитотоксинов описаны у Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

Способы конъюгации групп линкер-лекарственное средство с направленными на клетки белками, такими как антитела, иммуноглобулины или их фрагменты, найдены, например, в патенте США № 5,208,020; патенте США № 6,441,163; WO2005037992; WO2005081711; и WO2006/034488, все из которых прямо включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Альтернативно, слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, может быть получен, например, рекомбинантными методами или пептидным синтезом. Длина ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо соседние друг другу, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, которые не разрушает желаемые свойства конъюгата.

ADC, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту (например, пациенту-человеку, страдающему иммунным заболеванием или раком) во множестве лекарственных форм. Например, ADC, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту, страдающему иммунным заболеванием или раком, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают агенты, модифицирующие вязкость. Водный раствор может быть стерилизован с применением методов, известных в данной области техники.

Фармацевтические составы, содержащие анти-HC ADC (например, анти-CD117 ADC, анти-CD45 ADC, анти-CD2 ADC, анти-CD5 ADC, анти-CD137 ADC или анти-CD252 ADC), как описано в настоящем документе, получают смешиванием таких ADC с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, в общем, являются не токсичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, и включают, но не ограничивается ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10

остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-протеин); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Способы лечения

Дополнительно, в настоящем документе раскрыты композиции и способы лечения различных расстройств, таких как заболевания клеточного типа в гемопоэтической линии, рак, аутоиммунные заболевания, метаболические расстройства, расстройства стволовых клеток, болезнь трансплантат против хозяина, среди прочих. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут (i) напрямую истощать популяцию клеток, вызывающих патологию, такую как популяция раковых клеток (например, лейкозных клеток) и аутоиммунных клеток (например, аутореакционноспособных Т-клеток) и/или (ii) истощать популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток так, чтобы способствовать энграфтменту трансплантатированных гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивая нишу, в которой могут размещаться трансплантированные клетки. Вышеупомянутые активности могут быть достигнуты путем введения ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный эндогенной клеткой, вызывающей болезнь, или гемопоэтической стволовой клеткой. В случае прямого лечения заболевания, такое введение может вызвать уменьшение количества клеток, вызывающих патологию, представляющую интерес. В случае подготовки пациента для гемопоэтической терапии трансплантатом стволовых клеток, это введение может вызвать селективное обеднение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая вакансию в гемопоэтической ткани, такой как костный мозг, которая впоследствии может быть заполнена трансплантированными экзогенными гемопоэтическими стволовыми клетками. Изобретение частично основано на открытии, что ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками, такими как Т клетки (например, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252), могут быть введены пациенту для осуществления обеих вышеуказанных активностей. ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антиген, экспрессированный иммунными клетками (например, зрелыми иммунными клетками), такими как Т клетки (например, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252) могут вводиться пациенту, страдающему раком или аутоиммунным заболеванием, для прямого

обеднения популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток, и также могут быть введены пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, для того, чтобы способствовать выживанию и энграфтменту трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток.

Как описано в настоящем документе, терапия трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки может быть введена субъекту, нуждающемуся в лечении, чтобы заселить или повторно заселить один или несколько типов клеток крови. Гемопоэтические стволовые клетки в общем демонстрируют мультиактивность и могут таким образом дифференцировать во множество разных клеточных линий крови, включая, но не ограничиваясь ими, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK клетки, B клетки и T клетки). Гемопоэтические стволовые клетки также способны к самообновлению и, таким образом, могут давать начало дочерним клеткам, которые обладают таким же потенциалом, что и материнская клетка, и также обладают способностью повторно вводиться в трансплантат реципиента, после чего они размещаются в нише для гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Гемопоэтические стволовые клетки таким образом могут вводиться пациенту с дефектом или дефицитом одного или нескольких типов клеток гемопоэтической линии, чтобы воссоздать дефектную или дефицитную популяцию клеток in vivo, тем самым вылечивая патологию, связанную с дефектом или обеднением эндогенной популяции клеток крови. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут таким образом использоваться для лечения не злокачественной 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, описанные в настоящем документе, могут использоваться для лечения иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения приобретенного иммунодефицита (например, приобретенного иммунодефицита, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ и СПИД). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения метаболического расстройства (например, метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из нарушений отложения гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза и метахроматической лейкодистрофией).

Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения злокачественных образований или пролиферативного расстройства, такого как гематологический рак,

миелопролиферативное расстройство. В случае лечения рака, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть введены пациенту так, чтобы обеднить популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток до терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, в этом случае трансплантированные клетки могут размещаться в нише, созданной на стадии обеднения эндогенных клеток и устанавливать продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, обедненных во время уничтожения раковых клеток, например, во время системной химиотерапии. Типовые гематологические раки, которые могут быть лечены с применением композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничений, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную В-крупноклеточную лимфому и неходжкинскую лимфому, а также другие раковые состояния, включая нейробластому.

Дополнительные заболевания, которые можно лечить с помощью композицией и способов, описанных в настоящем документе, включают без ограничений, дефицит аденозиндезаминазы и тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром гипериммуноглобулина М, болезнь Чедиака-Хигаши, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз и ювенильный ревматоидный артрит.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты, описанные в настоящем документе, могут использоваться для вызова толерантности к трансплантату солидного органа. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы при обеднении или удалении популяции клеток из ткани-мишени (например, обеднении гемопоэтических стволовых клеток из ниши стволовых клеток костного мозга). После такого обеднения клеток из тканей-мишеней, популяция стволовых клеток или клеток-предшественников от донора органа (например, гемопоэтических стволовых клеток от донора органа) может быть введена в трансплантат реципиента, и после энграфтмента таких стволовых клеток или клеток-предшественников, может быть достигнут временный или стабильный смешанный химеризм, тем самым обеспечивая возможность долгосрочной толерантности трансплантата органа без необходимости дополнительных иммунодепрессантов. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для вызова толерантности к трансплантату в твердом органе реципиента (например, трансплантату почки, трансплантату легких, трансплантату печени и трансплантату сердца, среди прочих). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, хорошо подходят для использования в связи с индукцией толерантности к трансплантату твердого органа, например, потому, что низкая доля временного или стабильного энграфтмента донора достаточна для индукции долгосрочной толерантности к трансплантированному органу.

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут

применяться для прямого лечения рака, такого как рак, характеризуемый клетками, которые являются CD117+ (например, GNNK+ CD117), CD45+, CD2+, CD5+, CD137+ или CD252+. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения лейкоза, например, у пациентов, которые демонстрируют CD117+ лейкозные клетки. Через обеднение CD117+ раковых клеток, таких как лейкозные клетки, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для прямого лечения разных видов рака. Типовые виды рака, которые могут быть лечены таким образом, включают гематологические раки, такие как острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная В-крупноклеточная лимфома и неходжкинская лимфома.

Острый миелоидный лейкоз (AML) является раком миелоидной линии клеток крови, характеризуемым быстрым ростом аномальных лейкоцитов, которые образуются в костном мозге и препятствуют продуцированию нормальных клеток крови. AML является наиболее частым острым лейкозом, поражающим взрослых, и заболеваемость им увеличивается с возрастом. Симптомы AML вызваны заменой нормального костного мозга лейкозными клетками, что вызывает снижение количества эритроцитов, тромбоцитов и нормальных лейкоцитов. Как острый лейкоз, AML быстро прогрессирует и может привести к летальному исходу в течение недель или месяцев, если его не лечить. В одном варианте осуществления, анти-CD117 ADC, описанные в настоящем документе, используют для лечения AML у пациента-человека, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-CD117 ADC истощает клетки AML у леченных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, 50% или более AML клеток истощены. В других вариантах осуществления, 60% или более AML клеток истощены, или 70% или более AML клеток истощены, или 80% или более, или 90% или более, или 95% или более AML клеток истощены. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-CD117 ADC представляет собой лечение одной дозой. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-CD117 ADC одной дозой истощает 60%, 70%, 80%, 90% или 95% или более AML клеток.

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения аутоиммунных расстройств. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть введено субъекту, такому как пациент-человек, страдающему аутоиммунным расстройством так, чтобы уничтожить CD45+, CD2+, CD5+, CD137+ или CD252+ иммунную клетку. Например, CD45+, CD2+, CD5+, CD137+ или CD252+ иммунной клеткой может быть аутореакционноспособный лимфоцит, такой как Т клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор, который специфически связывает и устанавливает иммунный ответ против самоантигена. При обеднении самореакционноспособных CD45+, CD2+, CD5+, CD137+ или CD252+ клеток, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения аутоиммунных патологий, таких как описаны ниже. Дополнительно или

альтернативно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения аутоиммунного заболевания через обеднение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток до терапии трансплантацией гемопоэтической стволовой клетки, в этом случае трансплантированные клетки могут размещаться в нише, созданной на стадии обеднения эндогенных клеток и устанавливать продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, обедненных во время уничтожения аутоиммунных клеток.

Аутоиммунные заболевания, которые можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничений, псориаз, псориатический артрит, сахарный диабет 1 типа (диабет 1 типа), ревматоидный артрит (RA), системную волчанку (SLE) человека, множественный склероз (MS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), лимфоцитарный колит, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальную алопецию, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидного антитела (APS), апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Шагаса, хроническую усталостная иммунодефелиопатия, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, целиакию-герпетиформный дерматит, болезнь холодовых агглютининов, синдром CREST, болезнь Дегоса, дискоидную волчанку, вегето-сосудистую дистонию, 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, нейропатию IgA, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, красный плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), миастению гравис, нейромиотонию, опсо-миоклональный синдром (OMS), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, вульгарную пузырчатку, пернициозную анемию, полихондрит, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгиу, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный артериит»), язвенный колит, коллагенозный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводинию («вестибулит вульвы») и гранулематоз Вегенера.

Дополнительно в настоящем документе представлены способы профилактики и лечения болезни трансплантат против хозяина (GVHD) и аутоиммунных заболеваний через введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, способного

связывать антиген (например, CD137, CD2 или CD5), экспрессированный гемопоэтическими клетками, где антитело содержит Fc область, содержащую D265C, L234A, L235A, и/или H435A мутацию. Такое введение может вызвать селективное обеднение популяции Т клеток, которые являются реакционноспособными против хозяина. Например, антитело, его антигенсвязывающ фрагмент или ADC, способное связывать CD137, может вводиться пациенту для профилактики и лечения GVHD и аутоиммунных заболеваний, таких, которые возникают при терапии трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Анти-CD137 антитела и их конъюгаты и родственные способы применения найдены, например, в заявке на патент США № 62/448,741 и публикации PCT № WO 2018/134787, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для обеднения активированных Т клеток (например, экспрессирующих CD137, CD252, CD134 и т.д.), которые ассоциированы с отторжением трансплантата и аутоиммунными заболеваниями для достижения толерантности к трансплантату. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, особенно полезны для профилактики и лечения GVHD и аутоиммунных заболеваний. Способы и композиции, описанные в настоящем документе, также полезны для снижения риска отторжения трансплантата у пациента-человека, получающего аллогенный трансплантат. Предпочтительным субъектом является человек. Вводимое количество антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или конъюгата лиганд-лекарственное средство, должно быть достаточным для обеднения, например, активированных Т клеток, которые способствуют GVHD или аутоиммунному заболеванию.

Антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство может быть введен пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, одновременно с или после трансплантации клеток или солидного органа пациенту. В одном варианте осуществления, анти-CD137 ADC вводят пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, до (например, примерно за 3 дня, примерно за 2 дня, примерно за 12 часов, примерно за 12 часов - 3 дня, примерно за 1-3 дня, примерно за 12 часов - 2 дня или примерно за 1-2 дня) трансплантации клеток или солидного органа. В одном варианте осуществления, анти-CD137 ADC вводят пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, после (например, примерно через 1 день, примерно через 2 дня, примерно через 3 дня или примерно через 4 дня) трансплантации клеток или солидного органа. Одна доза анти-CD137 ADC может быть введена пациенту-человеку до, одновременно с или после трансплантации клеток или органа, где такой одной дозы достаточно для лечения или профилактики GVHD или отторжения трансплантата.

Способы и композиции, описанные в настоящем документе, могут применяться для профилактики или лечения отторжения трансплантата. Отказ трансплантата или отторжение трансплантата, включая отказ после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, может проявляться в общем как отсутствие начального энграфтмента донорских клеток или потеря донорских клеток после

начального энграфтмента (обзор см. в Mattsson et al. (2008) Biol Blood Marrow Transplant. 14(Suppl 1): 165-170). Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для обеднения CD137, экспрессирующих активированные Т клетки в трансплантате или сценарии трансплантации, представляющем интерес, например, где пациент-человек имеет риск развития отторжения трансплантата после трансплантации солидного органа или клеток, в частности, если трансплантированные клетки или орган являются аллогенными.

В одном варианте осуществления, анти-CD137 антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или конъюгат лиганд-лекарственное средство применяют для обеднения CD137, экспрессирующих донорные клетки, например, активированные Т клетки, экспрессирующие CD137, через контакт клеток, трансплантата или солидного органа с анти-CD137 антителом, конъюгатом антитело-лекарственное средство или конъюгатом лиганд-лекарственное средство до трансплантации клеток, трансплантата или органа пациенту-человеку. В одном варианте осуществления, клетки, трансплантат или орган является аллогенным.

Риск GVHD остается высоким после трансплантации имеющимися терапиями. Способы и композиции, описанные в настоящем документе, могут применяться для ингибирования заболевания трансплантат против хозяина (GVHD) у пациента-человека. Анти-CD137 ADC могут применяться для селективного направленного воздействия на активированные Т клетки у пациента, который будет получать трансплантат, такой как трансплантат стволовой клетки. Анти-CD137 ADC, как описано в настоящем документе, также могут применяться для снижения риска GVHD целенаправленным воздействием и обеднением CD137 положительных клеток у пациента-человека, который собирается или уже получил трансплантат, такой как, но не ограничиваясь ими, HSC трансплантат. Анти-CD252 ADC, как описано в настоящем документе, также могут применяться для снижения риска GVHD через целенаправленное воздействие и обеднение CD137 положительных клеток у пациента-человека, который собирается или уже получил трансплантат, такой как, но не ограничиваясь ими, HSC трансплантат. В некоторых вариантах осуществления, композиции и способы, описанные в настоящем документе, предназначены для лечения GVHD до появления симптомов GVHD у пациента после трансплантационной терапией, например, аллогенными HSC.

Способы, описанные в настоящем документе, также полезны для профилактики реакций хозяин против трансплантата (HvG). Например, анти-CD137-ADC также могут быть использованы в качестве иммунодепрессанта для предотвращения реакций хозяин против трансплантата (HvG), тем самым предотвращая или снижая риск отторжения аллогенного трансплантата. Использование анти-CD137 ADC у пациента с риском реакции HvG позволяет осуществить энграфтмент донорских клеток с большей степенью HLA-несовпадения. Дополнительные применения включают индукцию толерантности в трансплантате твердых органов, где реакции хозяин против трансплантата предотвращаются или подавляются с помощью CD137-ADC. Они могут включать

трансплантаты твердого органа с или без трансплантатов гемопоэтической стволовой клетки, включая ксенотрансплантаты, где орган происходит не от человека и/или является генетически модифицированным.

В одном варианте осуществления, анти-CD137-ADC применяют для профилактики реакции трансплантат против хозяина (GvG) в контексте аллогенных трансплантатов, где применяют два донора. Примеры включают применение 2 доноров стволовых клеток пуповинной крови у взрослого человека и детей. Профилактика GvG позволит более быстрое гемопоэтическое (например, нейтрофилов и тромбоцитов) восстановление после трансплантата, когда оба источника стволовых клеток успешно приживутся.

Другие способы лечения с применением анти-CD137 антител или ADC описаны в US 10,434,185, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Другие способы лечения с применением анти-CD252 антител или ADC, включая профилактику заболевания трансплантат против хозяина и индукцию толерантности к трансплантату после трансплантации, описаны в US WO 2019/173780, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Другие способы лечения с применением анти-CD2 антител или ADC описаны в WO 2019/108860, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Другие способы лечения с применением анти-CD5 антител или ADC описаны в WO 2019/108863, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

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

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

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

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, трансплантатом может быть любой солидный орган или трансплантат кожи. В некоторых вариантах осуществления, трансплантат выбирают из группы, состоящий из трансплантата почек, трансплантата сердца, трансплантата печени, трансплантата поджелудочной железы, трансплантата легких, трансплантата кишечника и трансплантата кожи.

Дополнительно, в настоящем документе описаны способы лечения или профилактики отторжения трансплантированных аллогенных клеток у субъекта-человека, т.е., лечения или профилактики заболевания хозяин против трансплантата (HvG) с применением антител или их конъюгатов, имеющих модифицированные Fc области, описанные в настоящем документе. Например, способы, описанные в настоящем документе, включают введение и анти-CD137 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (которое связывается с эндогенными CD137+ иммунными клетками, например, активированными Т клетками) и терапию аллогенными клетками, где анти-CD137 антитело содержит Fc область, содержащую D265C, L234A, L235A, и/или H435A

мутацию. При введении анти-CD137 ADC пациенту-человеку, получающему трансплантат аллогенных клеток, эндогенные CD137+ Т клетки обедняются, таким образом снижая риск реакции эндогенных клеток против терапии аллогенными клетками.

Способы введения и дозирование

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, могут быть введены пациенту (например, пациенту-человеку, страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки) в различных дозированных формах. Например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту, страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки в виде водного раствора, такого как водный раствор, содержащий один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтически приемлемые эксципиенты для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают модификаторы вязкости. Водный раствор может быть стерилизован с использованием методик, известных в данной области техники.

Фармацевтические составы, содержащие анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), или их конъюгаты (например, ADC как описано в настоящем документе) получают смешиванием такого антитела или ADC с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители в общем являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают, но не ограничивается ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-протеин); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, могут быть введены различными путями, такими как пероральный, трансдермальный, подкожный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный,

внутриглазной или парентеральный. Наиболее подходящий способ введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретного вводимого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пациента, способов фармацевтического составления, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста пациента, массы тела, пола, тяжести лечимых заболеваний, диеты и скорости выведения из организма пациента.

Эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, может варьироваться, например от примерно 0,001 до примерно 100 мг/кг массы тела на одно (например, болюс) введение, множество введений или непрерывное введение, или для достижения оптимальной концентрации в сыворотке (например, концентрации в сыворотке 0,0001-5000 мкг/мл) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Доза может вводиться один или несколько раз (например, 2-10 раз) в сутки, неделю или месяц субъекту (например, человеку), страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или проходящему подготавливающую терапию для подготовки для получения трансплантата гемопоэтической стволовой клетки.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет от примерно 0,1 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет от примерно 0,15 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет от примерно 0,15 мг/кг до примерно 0.25 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет от примерно 0,2 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет примерно 0,25 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет примерно 0,1 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет примерно 0,2 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC (например, анти-CD117 антитела, конъюгированного через линкер с аматоксином) вводимая пациенту-человеку составляет примерно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, доза анти-HC ADC, описанного в настоящем

документе, вводимая пациенту-человеку, составляет от примерно 0,001 мг/кг до 10 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до 9,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 9 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 8,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 8 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 7,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 7 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 6,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 6 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 5,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 4,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 4 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до 3,5 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до 3 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 10 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 9 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 8 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 7 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 6 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 5 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 4 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до 3 мг/кг.

В одном варианте осуществления, анти-HC ADC, описанный в настоящем документе, который вводят пациенту-человеку для лечения или подготовки, имеет период полужизни равный или меньше 24 часа, равный или меньше 22 часа, равный или меньше 20 часов, равный или меньше 18 часов, равный или меньше 16 часов, равный или меньше 14 часов, равный или меньше 13 часов, равный или меньше 12 часов, равный или меньше 11 часов, равный или меньше 10 часов, равный или меньше 9 часов, равный или меньше 8 часов, равный или меньше 7 часов, равный или меньше 6 часов или равный или меньше 5 часов. В одном варианте осуществления, период полужизни анти-HC ADC составляет от 5 часов до 7 часов; составляет от 5 часов до 9 часов; составляет от 15 часов до 11 часов; составляет от 5 часов до 13 часов; составляет от 5 часов до 15 часов; составляет от 5 часов до 20 часов; составляет от 5 часов до 24 часов; составляет от 7 часов до 24 часов; составляет от 9 часов до 24 часов; составляет от 11 часов до 24 часов; 12 часов до 22 часов; 10 часов до 20 часов; 8 часов до 18 часов; или 14 часов до 24 часов.

В одном варианте осуществления, описанные в настоящем документе, минимизируют гепатотоксичность у пациента, получающего ADC для подготовки. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем документе, позволяют уровню печеночного маркера оставаться ниже известного уровня токсичности у пациента в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. В других вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем документе, позволяют уровню печеночного маркера оставаться в пределах эталонного диапазона у пациента в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем документе, позволяют уровню печеночного маркера повышаться не боле чем в 1,5 раза выше эталонного диапазона, не более чем в 3 раза выше эталонного диапазона, не более чем в 5 раз выше эталонного диапазона или не более чем в 10 раз выше эталонного диапазона в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. Примеры печеночных маркеров, которые могут применяться для тестирования токсичности, включают аланинаминотрансаминазу (ALT), лактатдегидрогеназу (LDH) и аспартатаминотрансаминазу (AST). В некоторых вариантах осуществления, введение ADC, как описано в настоящем документе, т.е., в которых две дозы вводят вместо одной дозы, вызывает временное повышение печеночного маркера,

например, AST, LDH, и/или ALT. В некоторых случаях, может быть достигнут повышенный уровень печеночного маркера, указывающий на токсичность, но в течение определенного периода времени, например, примерно 12 часов, примерно 18 часов, примерно 24 часа, примерно 36 часов, примерно 48 часов, примерно 72 часа, примерно 3 дня, примерно 3,5 дня, примерно 4 дня, примерно 4,5 дня, примерно 5 дней, примерно 5,5 дней, примерно 6 дней, примерно 6,5 дней, примерно 7 дней, примерно 7,5 дней или менее недели, уровень печеночного маркера возвращается к нормальному уровню, не ассоциированному с гепатотоксичностью. Например, у человека (средний взрослый мужчина) нормальный не токсический уровень ALT составляет 7-55 единиц на литр (ЕД/Л); и нормальный не токсичный уровень AST составляет 8-48 ЕД/Л. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из уровней AST, ALT или LDH в крови пациента не достигает токсического уровня между введениями первой ADC и 14 днями после введения первой дозы пациенту. Например, пациенту может быть введена первая доза, и затем вторая доза, третья доза, четвертая доза или более доз в течение, например, 5, 10 или 14 дней от введения первой дозы, при этом уровни AST, ALT или LDH не будут достигать токсического уровня между введением первой дозы ADC и 14 днями после введения первой дозы пациенту.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из уровней AST, ALT или LDH в крови пациента не поднимается выше нормальных уровне, не поднимается выше чем в 1,5 раза выше нормальных уровней, не поднимается выше чем в 3 раза выше нормальных уровней, не поднимается выше чем в 5 раз выше нормальных уровней или не поднимается выше чем в 10 раз выше нормальных уровней.

Настоящее изобретение включает схемы дозирования, которые снижают побочные эффекты и токсичности при применении ADC, которые способны связывать антиген, экспрессированный гемопоэтической клеткой, такой как гемопоэтическая стволовая клетка, иммунная клетка или раковая клетки. Примеры таких антигенов включают, ограничиваются ими, CD117, CD2, CD5, CD45, CD252, CD134 и CD137.

В случае подготовки перед трансплантацией гемопоэтической стволовой клетки, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть введен пациенту в момент времени, который оптимально способствует энграфтменту экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от примерно 1 часа до примерно 1 недели (например, примерно 1 часа, примерно 2 часов, примерно 3 часов, примерно 4 часов, 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 часов, примерно 22 часов, примерно 23 часов, примерно 24 часов, примерно 2 дней, примерно 3 дней, примерно 4 дней, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней) или более до введения трансплантата экзогенной гемопоэтической стволовой клетки. Диапазоны, включая числа, указанные в настоящем документе, также включены в рассматриваемые способы.

Диапазоны дозирования, описанные выше, могут быть объединены с анти-HC ADC, имеющими периоды полужизни, указанные в настоящем документе.

Применяя способы, описанные в настоящем документе, специалист в данной области техники сможет вводить пациенту-человеку, нуждающемуся в терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками, такими как Т-клетки (например, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252). Таким образом, популяция эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может быть обеднена до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, чтобы способствовать энграфтменту трансплантата гемопоэтической стволовой клетки. Антитело может быть ковалентно конъюгировано с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в данной области техники. Например, анти-CD117 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (такое как анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело) или его антигенсвязывающ фрагмент) может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином, таким как экзотоксин синегнойной палочки А, деБуганин, дифтеротоксин, аматоксин, такой как γ-аманитин, α-аманитин, сапорин, майтанзин, майтанзиноид, ауристатин, антрациклин, калихеамицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепин, димер индолинобензодиазепин или их варианты. Эта конъюгация может быть проведена с применением методов, образующих ковалентные связи, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело может впоследствии вводиться пациенту, например, внутривенным введением, до трансплантации экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аутологические, сингенные или аллогенные гемопоэтические стволовые клетки) пациенту.

Анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), его антигенсвязывающий фрагмент или ADC может быть введено в количестве, достаточном для снижения количества эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, на примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или более до терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки. Снижение количества гемопоэтических стволовых клеток может отслеживаться с применением обычных методов, известных в данной области техники, например, FACS анализом клеток, экспрессирующих характеристические поверхностные антигены гемопоэтической стволовой клетки в образце крови, взятом у пациента в разные моменты времени во время подготавливающей терапии. Например, специалист в данной области техники сможет

взять образец крови у пациента в разные моменты времени во время подготавливающей терапии и определить степень снижения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток при проведении FACS анализа для изучения относительных концентраций гемопоэтических стволовых клеток в образце с применением антител, которые связываются с маркерными антигенами гемопоэтических стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда концентрация гемопоэтических стволовых клеток достигнет минимального значения в ответ на подготавливающую терапию анти-HC антителом (например, анти-CD117 антителом, анти-CD45 антителом, анти-CD2 антителом, анти-CD5 антителом, анти-CD137 антителом или анти-CD252 антителом), его антигенсвязывающим фрагментом или ADC, специалист в данной области техники может сделать завершить подготавливающую терапию и может начать готовить пациента терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки.

Анти-HC антитело (например, анти-CD117 антитело, анти-CD45 антитело, анти-CD2 антитело, анти-CD5 антитело, анти-CD137 антитело или анти-CD252 антитело), его антигенсвязывающий фрагмент или ADC может вводиться пациенту в водном растворе, содержащем один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, таких как модификатор вязкости. Водный раствор может быть простерилизован с применением методов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело может вводиться пациенту в дозе, например, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до 9,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 9 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 8,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 8 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 7,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 7 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 6,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 6 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 5,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 4,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до 4 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до 3,5 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до 3 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 10 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 9 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 8 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 7 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 6 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 5 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до 4 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до 3 мг/кг до введения трансплантата гемопоэтической стволовой клетки пациенту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело может быть введено пациенту в момент времени, который оптимально способствует энграфтменту экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от примерно 1 часа до примерно 1 недели (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 боле до

введения трансплантата экзогенной гемопоэтической стволовой клетки.

После завершения подготавливающей терапии пациент может затем получить инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от того же врача, который проводил подготавливающую терапию, или от другого врача. Врач может ввести пациенту инфузию аутологических, сингенных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от 1×10^3 до 1×10^9 гемопоэтических стволовых клеток/кг. Врач может контролировать энграфтмент 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, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты) после введения трансплантата. Этот анализ может проводиться, например, от примерно 1 часа до примерно 6 месяцев или более после терапии трансплантатом гемопоэтической стволовой клетки (например, примерно 1 часа, примерно 2 часов, примерно 3 часов, примерно 4 часов, 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 часа, примерно 22 часа, примерно 23 часа, примерно 24 часа, примерно 2 дней, примерно 3 дней, примерно 4 дней, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 5 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель, примерно 11 недель, примерно 12 недель, примерно 13 недель, примерно 14 недель, примерно 15 недель, примерно 16 недель, примерно 17 недель, примерно 18 недель, примерно 19 недель, примерно 20 недель, примерно 21 недель, примерно 22 недель, примерно 23 недель, примерно 24 недель или более). То, что концентрация гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии повысилась (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 терапии трансплантатом относительно концентрации соответствующего типа клеток до терапии трансплантатом является одним из показателей того, что лечение анти-HC антителом (например, анти-CD117 антителом, анти-CD45 антителом, анти-CD2 антителом, анти-CD5 антителом, анти-CD137 антителом или анти-CD252 антителом), его антигенсвязывающим фрагментом или ADC успешно способствовала энграфтменту трансплантированного трансплантата гемопоэтической стволовой клетки.

Энграфтмент трансплантатов гемопоэтической стволовой клетки благодаря

введению анти-HC антитела (например, анти-CD117 антитела, анти-CD45 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD137 антитела или анти-CD252 антитела), его антигенсвязывающих фрагментов или ADC может проявляться во множестве эмпирических измерений. Например, энграфтмент трансплантатированных гемопоэтических стволовых клеток может быть оценен через оценку конкурентных репопулирующих единиц (CRU), присутствующих в костном мозге пациента после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессированный гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45) или антиген, экспрессированный зрелыми иммунными клетками, такими как Т клетки (например, CD2, CD5, CD137 или CD252) и последующего введения трансплантата гемопоэтической стволовой клетки. Дополнительно, можно наблюдать энграфтмент трансплантата гемопоэтической стволовой клетки через введение гена-репортера, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию, дающую флуоресцентный, хромофорный или люминесцентный продукт, в вектор, которым донорные гемопоэтические стволовые клетки были трансфицированы, и последующее отслеживание соответствующего сигнала в ткани, в которой разместились гемопоэтические стволовые клетки, такой как костный мозг. Также можно наблюдать энграфтмент гемопоэтической стволовой клетки через оценку количества и выживаемости гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, например, по данным способов анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), известных в данной области техники. Энграфтмент также может быть определен через измерение количества лейкоцитов в периферической крови во время пост-трансплантационного периода, и/или измерение восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце пунктата костного мозга.

Примеры

Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники описание того, как композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы, сделаны и оценены, и предназначены для использования исключительно в качестве примеров изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Ab1 относится к анти-CD117 антителу, имеющему вариабельные области анти-CD117 антитела Ab67, последовательности которых представлены в таблице 5. Ab2 относится к анти-CD117 антителу, имеющему вариабельные области анти-CD117 антитела Ab85, последовательности которых представлены в таблице 5. Ab3 относится к анти-CD117 антителу, имеющему вариабельные области анти-CD117 антитела Ab249, последовательности которых представлены в таблице 5. Ab4 относится к анти-CD117 антителу, имеющему вариабельные области анти-CD117 антитела CK6, последовательности которых представлены в таблице 5. Ab5 относится к моноклональному антителу, направленному против CD45 (т.е., анти-CD45 антителу)). Дополнительно, «ADC1» и«ADC2» относятся к двум конъюгатам антитело-лекарственное

средство, содержащим антитело (как описано в настоящем документе), конъюгированное с, по меньшей мере, одним лекарственным средством, где лекарственное средство является вариантом аматоксина, описанным в настоящем документе, где вариант аматоксина ADC1 отличается от варианта аматоксина ADC2. Анти-CD117 ADC, применяемый примере 7 - примере 11, назван здесь ADC1, и анти-CD117 антитело Ab85 (т.е., Ab2), имеющее Fc мутации D265C и H435A (определенные по EU индексу)), конъюгировано с аматоксином через отщепляемый линкер.

Пример 1. In vitro исследования Fc-связывания с Fc вариантами

Чтобы идентифицировать модификации Fc, которые отменяют связывание Fc гамма рецептора и тем самым выключают эффекторную функцию антитела, IgG антитела, содержащие одно или несколько аминокислотных замещений в Fc области, оценивают в анализе связывания Octet для измерения их способности связываться с различными Fc гамма рецепторами. Были протестированы следующие аминокислотные замещения Fc области IgG1 (аминокислотные положения относятся к Fc области согласно индексу EU):

D265A
D265C
D265C/H435A
D265C/LALA
D265A/ LALA
D265C/LALA/H435A
D265C/N297G
D265C/N297G/H435A
D265C (EPLVLAdelG; также называемое в настоящем документе «IgG2*»)
D265C (EPLVLAdelG; также называемое в настоящем документе «IgG2*»)/H435A
D265C/N297Q/H435A
D265C/N297Q
EPLVLAdelG/H435A
N297A
N297G
N297Q
D265C/N297A/H435A
LALA/P329G
EPLVLAdelG
LALA/P331G
D265A/H435A
D265C/LALA/P331G/H435A
N297A.IHH (т.е., N297A.I253A.H310A.H435A)
CH2 делеция
D265C/LALA
D265C/LALA/P329A/H435A

«IgG2*», применяемый в контексте Fc модификации в этих примерах, относится к Fc области, имеющей следующие мутации: E233P, L234V, L235A, делецию G236 в скелете hIgG1 (т.е., EPLVLAdelG).

Дикий тип (ДТ), применяемый в этих примерах, относится к IgG1 Fc области, которая не имеет каких-либо замещений (если не указано иное), включая замещения, описанные в настоящем документе. «LALA», применяемый во всех примерах, относится к двум аминокислотным замещениям в положениях 234 и 235, более конкретно, L234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD117 антитело (или анти-CD45 антитело) в настоящем документе содержит Fc область, содержащую одну из следующих модификаций или комбинаций модификаций: D265A, D265C, D265C/H435A, D265C/LALA, D265C/LALA/H435A, D265C/N297G, D265C/N297G/H435A, D265C (EPLVLAdelG в IgG1), D265C (EPLVLAdelG в IgG1)/H435A, D265C/N297Q/H435A, D265C/N297Q, EPLVLAdelG/H435A, N297A, N297G, N297Q, D265C/N297A/H435A, LALA/P329G, EPLVLAdelG, LALA/P331G, D265A/H435A, D265C/LALA/P331G/H435A, N297A.IHH, CH2 делеция, D265C/LALA или D265C/LALA/P329A/H435A. Разные замещения и комбинации замещений тестируют на множестве разных анти-CD117 антител (см. Фиг. 1A - 1E), включая нейтральное анти-CD117 антитело человека (т.е., Ab1), CK6 (также называемое 3100 (т.е., Ab4)), антагонистические анти-CD117 антитела человека (т.е., Ab2 и Ab3; оба Ab2 и Ab3 являются антагонистическими антителами, отличными от CK6) и моноклональное антитело, направленное против CD45 (т.е., Ab5 (анти-CD45 антитело)).

Анализы связывания проводят при 25°C в солевом растворе с фосфатным буфером с (0,1% BSA, 0,02% Tween-20) с применением устройства для биослойной интерферометрии (ForteBio). Разные Fc гамма рецепторы (т.е., FcγR1(hFcγR1) человека, FcγRI яванского макака (FcγR1 яванского макака), hFcγR2A 167R, hFcγR2A 167H, hFcγR2B, hFcγR2A 167F, hFcγR3A 176V или hFcγR3B) метят биотином («Bio») или гистидином («His») и иммобилизуют на стрептавидиновых биодатчиках или анти-нистидиновых биодатчиках, соответственно, в концентрации 10-25 нМ. Для стадии ассоциации, указанное антитело добавляют в концентрации 25 нМ для анализов связывания FcγR1 или в концентрации 300 нМ для анализов связывания FcγR2A, 2B или 3A. Измеренный ответ связывания для каждого варианта антитела нормализуют до уровня связывания ДТ IgG1 в похожих условиях.

Нормализованный ответ связывания каждого варианта антитела относительно связывания WT IgG1 показан на **Фиг. 1A,** и количественная оценка нормализованного ответа связывания варианта антитела показана на **Фиг. 1B**.

Дополнительные анализы связывания проводят как описано выше для тестирования разных Fc мутаций и комбинаций Fc мутаций на основе анти-CD45 антитела (т.е., Ab5) и соответствующих анти-CD45 ADC (см. **Фиг. 1C**) а также анти-CD117 антитело (т.е., Ab2) и соответствующие анти-CD117 ADC (см. **Фиг. 1D** и **1E**), нормализованные до уровня связывания ДТ IgG1 в похожих условиях.

Эти результаты демонстрируют, что только D265C не может полностью отменить связывание Fc гамма рецептора (см. **Фиг. 1A** и **1B**). Данные позволяют предположить, что для отмены связывания Fc гамма рецептора, D265C мутация должна быть объединена с другими мутациями, такими как аминокислотные замещения L234A и L235A («LALA») (см. **Фиг. 1A** и **1B**). То есть, антитела, содержащие мутации D265C LALA, по существу по существу не могут связывать Fc гамма рецепторы и поэтому выключены в том, что касается эффекторных функций (см. **Фиг. 1A** и **1B**). Действительно, уровень связывания для анти-CD117 антитела (см. **Фиг. 1A** и **1B**), имеющего Fc область с D265C LALA мутациями, по существу является нулевым или неопределяемым. Кроме того, данные в **Фиг. 1C** показывают, что D265A вариант (отдельно) или LALA вариант (отдельно) показывают некоторое наблюдаемое связывание с Fc гамма R1 (т.е., «Hu Fc1»), комбинация D265A и LALA, а также комбинация D265C, N297A и H435A (т.е., «D265C.N297A.H435A») не может по существу связывать Fc гамма рецепторы и поэтому выключена в том, что касается эффекторных функций. Антитело «YTH24.5 rIgG2b» является контрольным анти-CD45 антителом, известным как имеющее эффекторную функцию. Данные показывают, что порядок выключения на Fc гамма R1 человека (т.е., «Hu Fc1») является наиболее значительным для комбинации D265A и LALA (т.е., «D265A.LALA») и комбинации D265C и N297A (данные не представлены), затем LALA (отдельно), N297A (отдельно; данные не представлены), D265A (отдельно) и дикого типа (ДТ) (см. **Фиг. 1C**). Данные также позволяют предположить, что и связывание с голым (не конъюгированым) антителом Ab5 и с соответствующим ADC (т.е., конъюгированным антителом) было одинаковым (см. **Фиг. 1C**), показывая, что токсин не значительно влияет на Fc выключение, и также позволяя предположить, что соответствующие ADC с выключенной Fc минимизируют нецелевую токсичность. Данные на **Фиг. 1D** и **1E** показывают, что комбинация D265C, LALA и H435A (т.е., «D265C.LALA.H435A») не может по существу связывать Fc гамма рецепторы и поэтому выключена в том, что касается эффекторных функций. Данные также демонстрируют, что голое (не конъюгированное) антитело (т.е., изотипический контроль) и Ab2 ADC (т.е., конъюгированное антитело) не могут по существу связывать тестированные Fc гамма рецепторы и поэтому выключены в том, что касается эффекторных функций (см. **Фиг. 1D** и **1E**), показывая, что токсин не влияет на Fc выключение, и также позволяя предположить, что соответствующие ADC с выключенной Fc минимизируют нецелевую токсичность.

Пример 2. In vitro анализ Fc вариантов с применением анализа дегрануляции тучных клеток

Для анализа степени, в которой Fc модификации могут снижать инициированную антителом дегрануляцию тучных клеток, антитела, имеющие Fc мутации, описанные в примере 1, оценивают с применением in vitro анализа дегрануляции тучных клеток.

Тучные клетки получают из CD34+ клеток мобилизованной периферической крови через 8-12 недель in vitro культивирования в присутствии IL-6 и SCF. Клетки

культивируют в течение ночи в отсутствии IL-6 и SCF и в присутствии 150 нг/мл интерферона гамма (IFNy). 100нМ каждого указанного антитела инкубируют вместе с тучными клетками при 37°C в течение 30 минут. Дегрануляцию тучных клеток оценивают через измерение выделения бета-гексозаминидазы в культуральные супернатанты после обработки тучных клеток с положительными контрольными антителами (т.е., «NEG085» и «104D2»), отрицательным контрольным антителом (hIgG1) или каждым из указанных нейтральных или антагонистических вариантов антитела.

Выделение бета-гексозаминидазы измеряют объединением супернатантов с п-нитрофенил N-ацетил-β-D-глюкозамидом (PNAG) в течение 60-90 минут при 37°C с последующим добавлением глицина и представляют как абсорбцию при 405 нм на **Фиг. 2**. Эти результаты показывают, что D265C LALA комбинация мутаций (т.е., «D265C.LALA»), которые были идентифицированы как выключающие Fc мутации в примере 1, также способна снижать активацию дегрануляции тучных клеток в контексте нейтрального антитела (т.е., Ab1), так как определенные уровни были аналогичны таковым, полученным для отрицательного контроля (IgG1 совпадающий изотип).

Пример 3. In vitro анализ Fc вариантов с применением анализа выделения цитокина

Антитела с модифицированными Fc областями оценивают на способность каждого антитела (например, Ab1, Ab2, Ab4 и Ab5) инициировать выделение цитокина с применением in vitro анализа выделения цитокина (CRA) из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека.

PBMC человека, выделенные у четырех доноров, ресуспендируют в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с 2% аутологической сывороткой (**Фиг. 3A-3D**). Указанные анти-CD117 антитела (т.е., Ab1 и Ab2) и варианты (т.е., Ab1 и Ab2 варианты) или положительный контроль (OKT3) иммобилизуют влажным покрытием (методика описана ниже) антитела при 37°C в течение 1 ч на планшете для нетканевых культур до добавления PBMC человека (**Фиг. 3A-3D**). PBMC инкубируют с покрытым антителом в течение ночи. Супернатанты собирают и анализируют с набором провоспалительной культуры тканей (TC) Meso Scale Discovery (MSD) для оценки выделения цитокина по сравнению с положительными контролями (т.е., изотипом hIgG1, OKT3 (положительный контроль), алемтузумабом (положительный контроль)).

Тестируемыми цитокинами являются IL-6 (**Фиг. 3A**), IL-8 (**Фиг. 3B**), TNFa (**Фиг. 3C**), IL-1B (**Фиг. 3D**), IL12p70 (данные не показаны), IL-10 (данные не показаны) и IFNg (данные не показаны). IL12p70, IL10 и IFNg уровни были ниже предела количественного определения.

Для всех тестированных цитокинов (**Фиг. 3A-3D**), значительное снижение выделения цитокина наблюдают в Fc выключенных анти-CD117 антителах (например, D265C LALA).

Дополнительно, анализы in vitro выделения цитокина проводят для оценки способности дополнительных вариантов антитела (т.е., Ab4 и Ab5) для инициации

выделения цитокина (например, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)) с применением in vitro анализа выделения цитокина (CRA) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека (т.е., **Фиг. 3E**).

Для таких in vitro анализов цитокина используют три разных способа презентирования антитела. Для способа влажного покрытия, 10 мкг антител в 100-150 мкл ФРФБ применяют для влажного покрытия обработанного нетканевой культурой круглодонного 96-луночного планшета в течение от одного до двух часов при 37°C. После влажного покрытия антителом, избыток антитела удаляют и промывают 1x 200 мкл ФРФБ. Свежие PBMC человека выделяют из цельной крови четырех доноров. PBMC ресуспендируют в среде RPMI с 2% аутологической сывороткой. 250000 PBMC в 200 мкл среды затем добавляют в каждую лунку и инкубируют с влажными порытыми антителами в течение ночи при 37°C в 5% CO_2 инкубаторе для культивирования тканей. 96-луночный планшет затем центрифугируют при 500G в течение 10 мин и 100 мкл супернатанта собирают и анализируют с применением набора Human TC Proinflammatory для Meso Scale Discovery мультиплексированного анализа (MSD) (Meso Scale Diagnostics, LLC; № продукта K15008B). Анти-CD3 mAb клон OKT3 применяют в качестве положительного контроля для анализа выделения цитокина.

Для способа сухого покрытия, 1 или 10 мкг антитела в 20 мкл ФРФБ добавляют в обработанный нетканевой культурой круглодонный 96-луночный планшет в течение ночи при комнатной температуре для выпаривания раствора и сухого покрытия антитела. Свежие PBMC человека выделяют из цельной крови доноров и ресуспендируют. 250000 PBMC в 200 мкл 2% аутологической сыворотки с 1% Pen-strep в среде RPMI 1640 добавляют в каждую лунку в планшете и инкубируют в течение ночи при 37°C в 5% CO_2 инкубаторе для культивирования клеток. 96-луночный планшет затем центрифугируют при 500G в течение 10 мин, и 100 мкл супернатанта собирают и анализируют с применением набора Human TC Proinflammatory для Meso Scale Discovery мультиплексированного анализа (MSD) (Meso Scale Diagnostics, LLC; № продукта K15008B). Анти-CD3 mAb клон OKT3 применяют в качестве положительного контроля для анализа выделения цитокина.

Для способа покрытия раствором, свежие PBMC человека выделяют из цельной крови доноров и ресуспендируют. 250000 PBMC в 200 мкл 2% аутологической сыворотки с 1% Pen-strep в среде RPMI 1640. Клетки затем высевают в обработанный нетканевой культурой круглодонный 96-луночный планшет. добавляют в каждую лунку в планшете и инкубируют в течение ночи при 37°C в 5% CO_2 инкубаторе для культивирования клеток. 10 мкг антитела добавляют в лунки, содержащие PBMC, и инкубируют в течение ночи при 37°C в 5% CO_2 инкубаторе для культивирования клеток. Планшет затем центрифугируют при 500G в течение 10 мин, и 100 мкл супернатанта собирают и анализируют с применением набора Human TC Proinflammatory для Meso Scale Discovery мультиплексированного анализа (MSD) (Meso Scale Diagnostics, LLC; № продукта

K15008B). Анти-CD3 mAb клон OKT3 применяют в качестве положительного контроля для анализа выделения цитокина.

Результаты на **Фиг. 3E** демонстрируют значительное снижение выделения цитокина GM-CSF в Fc выключенном анти-CD45 антителе (т.е., Ab5) (например, D265C.H435A) и Ab4 для каждого из трех способов презентирования антитела. Аналогичные результаты, показывающие, что Fc выключенное анти-CD45 антитело (т.е., Ab5) предотвращает in vitro выделение цитокина, наблюдают для TNFα, IL-1β, IFNγ и IL-6 (данные не показаны).

Пример 4. In vitro анализ Fc вариантов с применением анализа фагоцитоза

Для анализа степени, в которой Fc модификации могут снизить антителозависимый клеточный фагоцитоз, анти-CD117 антитела (т.е., Ab2), имеющие Fc мутации D265C.LALA.H435A или D265C.H435A оценивают с применением in vitro анализа антителозависимого фагоцитоза по сравнению с контролем.

Моноциты выделяют из свежесобранной цельной крови человека с применением набора RosetteSep (StemCell Technologies), затем инкубируют в течение 6 дней в присутствии макрофагагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) для создания производных из моноцитов макрофагов (MDM). Полученные MDM метят окрашиванием находящихся на поверхности CD14 и инкубируют в течение 2 часов с CFSE-меченными клетками Kasumi-1 и 1:2 молярным отношением MDM к клеткам Kasumi-1. Полученную смесь инкубируют с повышающимися концентрациями указанного антитела в течение двух часов при 37°C. Антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) оценивают с применением проточной цитометрии через определение соэкспрессии CFSE и CD134 окрашивание (Фиг. **4A**) после инкубирования с указанным антителом (т.е., Ab2 (ДТ), Ab2 D265C.LALA.H435A и Ab2 D265C.H435A), положительным контролем (т.е., усиленным эффектором анти-CD117 антителом) или отрицательным контролем (т.е., изотипом hIgG4 и изотипом hIgG1).

Результаты показывают, что усиленное эффектором анти-CD117 антитело (положительный контроль) и Ab2 (ДТ) способствуют устойчивой активности ADCP (Фиг. **4B**). Кроме того, частичное снижение активности ADCP из-за повышенного выключения Fc эффектора наблюдают для Ab2 D265C.H435A (т.е., EC_{50} повышается от EC_{50} 14,7 пМ для усиленного эффектором анти-CD117антитело и EC_{50} 23,7 пМ для Ab2 (ДТ) до EC_{50} 36,4 рМ для Ab2 D265C.H435A), в то время как результаты для Ab2 D265C.LALA.H435A показывают значительно снижение активности ADCP благодаря устойчивому выключению Fc эффектора по сравнению с подходящими контролями (Фиг. **4B**). Вместе эти данные демонстрируют, что активность ADCP может быть понижена до базовых уровней с применением антител, сконструированных как Fc выключенные.

Пример 5. In vitro анализ термостабильности Fc вариантов

Fc-модифицированные антитела оценивают дифференциальной сканирующей флуориметрией (DSF) для оценки термостабильности каждого антитела, имеющего указанные аминокислотные замещения. 20 микрограммов антитела, объединенные с

буфером белкового теплового сдвига и красителем согласно спецификациям набора для белкового теплового сдвига (Applied biosystems, Protein Thermal Shift Dye kit (Part # 4461146), анализируют с применением инструмента Applied Biosystems Quant Studio 7 Flex от Life Technologies и определяют температуру плавления (Tm) каждого антитела (см. **Фиг. 5A, 5B и 5C** и **Фиг. 6A** и **6B**).

Мутации на одном и том же скелете антитела вызывают изменения только температур развертывания CH2 домена. Температуры развертывания Fab остаются постоянными (**Фиг. 6A** и **6B**). Введение D265C снижает термостабильность ДТ (**Фиг. 6A**). H435A также вызывает снижение стабильности (**Фиг. 6A**). Однако введение LALA мутации в модифицированную Fc область не вызывает дополнительную нестабильность (**Фиг. 6A** и **6B**).

Пример 6: In vitro анализ усиленной стабильности Fc вариантов

Усиленную стабильность каждого указанного антитела (и вариантов антитела) оценивают после инкубирования при 60 градусах Цельсия в течение 30 минут хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC) и гель-хроматографией (SEC). Для оценки уровня гидрофобных деградантов после обработки каждого указанного антитела в течение 30 минут при 60 градусах Цельсия, 25 мкг указанного антитела впрыскивают в Tosoh TSKgel Phenyl-5PW, 7,5 мм ВД x 7,5 см, 10 мкМ колонку на системе Waters ACQUITY Arc HPLC. Элюированный белок определяют с применением УФ абсорбции при 280 нм, и результаты показывают как процент площади пика мономера антитела (**Фиг. 7A, 7B, 8A** и **8D**) или пика гидрофобного деградаанта (**Фиг. 7A, 7B, 8B, 8C** и **8E**). D265C LALA и D265C H435A LALA варианты демонстрируют низкие уровни гидрофобных деградантов после термического стресса (**Фиг. 8A**). Кроме того, D265C.H435A.LALA вариант демонстрирует значительно улучшенную стабильность по сравнению D265C.H435A вариантом (**Фиг. 8C**).

Каждый вариант антитела также тестируют на долю образования видов с высокой молекулярной массой (HMW), показатель предрасположенности к агрегации с применением SEC после обработки каждого антитела в течение 30 минут при 60 градусах Цельсия. SEC анализ проводят на системе Waters ACQUITY Arc HPLC с колонкой Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column, 200Å, 1,7 мкм, 4,6 мм X 150 мм. 25 мкг указанного антитела впрыскивают на колонку, и элюированный белок определяют с применением УФ абсорбции при 280 нм. Результаты показывают как процент площади пика мономера антитела (**Фиг. 9A** и **9D**) или процента пика агрегата HMW (**Фиг. 9B, 9C** и **9E**). D265C LALA и D265C H435A LALA варианты демонстрируют низкий уровень агрегатов после термического стресса (**Фиг. 9B**). Кроме того, D265C.H435A.LALA вариант демонстрирует улучшенную стабильность с более низким уровнем агрегатов по сравнению с D265C.H435A вариантом (**Фиг. 9C**).

Пример 7. Анализ фармакокинетики у приматов, не относящихся к человеку

Анализ фармакокинетики у приматов, не относящихся к человеку, проводят для определения скоростей клиренса анти-CD117 ADC, содержащего анти-CD117 антитело

Ab85 (также названное в настоящем документе взаимозаменяемо как Ab2), имеющего Fc мутации D265C и H435A (определенные EU индексом, т.е., Ab2 D265C.H435A), конъюгированное через линкер (расщепляемый) с аматоксином. Результаты на **Фиг. 10A** и **10B** показывают, что ADC с Fc-модифицированным Ab85 (т.е., Ab2) антителом показывает быстрый клиренс у яванских макаков с периодом полужизни, подходящим для подготовки пациента к трансплантации (n=3/группу). Скорости клиренса были аналогичными для определения общего ADC (сплошные линии) и аматоксина (пунктирные линии). **Фиг. 10A** показывает скорости клиренса для общего ADC (сплошные линии) и аматоксина (пунктирные линии). Как показано на **Фиг. 10A** и **10B**, ADC больше не определяется через три дня после введения. Это дает окно после обеднения клетки-мишени и быстрого удаления ADC для безопасной инфузии трансплантата.

Пример 8. Анализ обеднения клетки-мишени в In Vivo анализе повышения дозы

Анти-CD117 ADC содержащий анти-CD117 антитело Ab2, конъюгированное через линкер с аматоксином конструируют так, чтобы иметь D265C и H435A мутации (т.е., ADC1), с получением быстрого периода полужизни анти-CD117 ADC. Когортам яванских макаков (3 макака на когорту) вводят разные дозы ADC1 или контроля (т.е., 0,1 мг/кг; 0,3 мг/кг; или контроль (ФРФБ)) в 0 день. Пунктаты костного мозга собирают на 7 день после дозирования. Фенотипические HSC количественно оценивают проточной цитометрией (полученные данные представлены на **Фиг. 11A** и **11C**) и через оценку колониеобразующих единиц (CFU) из пунктата костного мозга (полученные данные представлены на **Фиг. 11B** и **11D**). Данные графически представляют как функцию от варьирующихся доз ADC1 конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) к контролю (т.е., ФРФБ) (ось x), как показано на **Фиг. 11A-11D**. На **Фиг. 11C** и **11D** дополнительно показывают данные, соответствующие неконъюгированному анти-CD117 антителу («анти-CD117»). **Фиг. 11E** показывает фенотипический анализ костного мозга, собранного на 7 день и исследованного проточной цитометрией (**Фиг. 11E**).

Результаты на **Фиг. 11A-11D** показывают, что сконструированный анти-CD117-аматоксин ADC с быстрым периодом полужизни (т.е., ADC1) селективно обедняет популяции клеток-мишеней у яванских макаков. Более конкретно, данные показывают, что наблюдается целевое дозозависимое обеднение HSC (**Фиг. 11A** и **11C**) и CFU (**Фиг. 11B** и **11D**). Следовательно, эти данные демонстрируют, что ADC1 демонстрирует эффективное селективное устранение NHP HSC и предшественников in vivo, в то время как быстрый период полужизни ADC1 обеспечивает модель для обеднения клетки-мишени и быстрого клиренса до трансплантации костного мозга, что потенциально обеспечивает значительное улучшение стандартов лечения для подготовки пациента до трансплантации костного мозга и позволяет получать трансплантат большему количеству пациентов.

Пример 9. Анализ количества нейтрофилов и количества лимфоцитов в In

Vivo анализе повышения дозы

Когортам яванских макаков (3 макака на когорту) вводят разные дозы ADC1 или контроля (т.е., 0,1 мг/кг; 0,3 мг/кг; или контроль (ФРФБ)) в 0 день. Периферическую кровь собирают в течение всего хода исследования. Гематологию оценивают в течение всего хода исследования. Количество нейтрофилов (10^3/мл) и количество лимфоцитов (10^3/мл) измеряют и графически представляют как функцию от дней после введения дозы, как показано на **Фиг. 12A-12C**. На **Фиг. 12C** дополнительно показывает данные, соответствующие количеству лимфоцитов у яванских макаков, получавших неконъюгированное анти-CD117 антитело («анти-CD117»).

Результаты на **Фиг. 12A-12C** показывают целевое дозозависимое обеднение, наблюдаемое для нейтрофилов, в то время как лимфоциты сохраняются (т.е., количество лимфоцитов остается в нормальном диапазоне). Эти данные также показывают сохранение адаптивной иммунной системы с отложенным наступлением надира нейтрофилов (18 дней), потенциально сокращая период нейтропении.

Пример 10. Анализ ALT и билирубина в плазме в In Vivo анализе повышения дозы

Когортам яванских макаков (3 макака на когорту) вводят разные дозы ADC1, сконструированных так, чтобы иметь D265C и H435A мутации, дающие анти-CD117 ADC с быстрым периодом полужизни (т.е., 0,1 мг/кг; 0,3 мг/кг; или контроля (ФРФБ)) в 0 день. Клиническую химию оценивают в течение всего хода исследования. Измеренные уровни ALT (аланинаминотрансаминазы) и билирубина представляют графически как функцию от дней после введения дозы, как показано на **Фиг. 13A-13C**. На **Фиг. 13C** дополнительно показаны данные, соответствующие уровням ALT в плазме яванских макаков, получавших неконъюгированое анти-CD117 антитело («анти-CD117»). Ткани печени и почек дополнительно оценивают через 35 дней после лечения (**Фиг. 14**). Ткани фиксируют в формалине, заливают парафином, окрашивают гематоксилином и эозином (H&E) и визуализируют на сканере с высокой пропускной способностью Aperio AT2 (**Фиг. 14**).

Результаты на **Фиг. 13A-13C** показана временная дозозависимая оценка ферментов печени и билирубина, наблюдаемых в группах с наибольшими дозами изотипа-AM (данные не показаны) и разных доз ADC1 (*p <0,05, **p<0,01 при сравнении ADC1 с носителем). никаких изменений выше верхнего предела нормы (ULN) для дополнительных параметров, т.е., GGT, альбумина, BUN, PT, ALP, креатинина, глюкозы, LDH или PTT, не наблюдается. Дополнительно, никаких гистопатологических изменений не наблюдается в тканях печени и почек через 35 дней после лечения, как показано на **Фиг. 14**.

Пример 11. Анализ количества ретикулоцитов в In Vivo исследовании

Когортам яванских макаков вводят разные дозы ADC1, сконструированных так, чтобы иметь D265C и H435A мутации, дающие анти-CD117 ADC с быстрым периодом полужизни (0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг), неконъюгированного CD117 антитела или контроля

(ФРФБ) в 0 день. Количество ретикулоцитов (10^9/L) измеряют с применением анализатора гематологии и графически представляют как функцию от дней после введения дозы, как показано на **Фиг. 15**.

Результаты на **Фиг. 15** показывают дозозависимое обеднение ретикулоцитов при введении ADC 1 с быстрым периодом полужизни (доза 0,1 мг/кг - доза 0,3 мг/кг) по сравнению с базовым количеством ретикулоцитов (т.е., ФРФБ). Никакого обеднения не наблюдают для изотип-АМ контроля (данные не показаны), указывая на целевое обеднение ретикулоцитов.

ТАБЛИЦА 5: КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Идентификатор последовательности	**Описание**	**Аминокислотная последовательность**
SEQ ID NO:1	CK6 CDR-H1	SYWIG
SEQ ID NO:2	CK6 CDR-H2	IIYPGDSDTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	CK6 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO:4	CK6 CDR-L1	RASQGISSALA
SEQ ID NO:5	CK6 CDR-L2	DASSLES
SEQ ID NO:6	CK6 CDR-L3	CQQFNSYPLT
SEQ ID NO:7	Ab85 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO:8	Ab85 CDR-H2	IINPRDSDTRYRPSFQG
SEQ ID NO:9	Ab85 CDR-H3	HGRGYEGYEGAFDI
SEQ ID NO:10	Ab85 CDR-L1	RSSQGIRSDLG
SEQ ID NO:11	Ab85 CDR-L2	DASNLET
SEQ ID NO:12	Ab85 CDR-L3	QQANGFPLT
SEQ ID NO:13	Вариабельная область тяжелой цепи Ab 85	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNY WIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:14	Вариабельная область легкой цепи Ab 85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIRSDL GWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPLT FGGGTKVEIK
SEQ ID NO:15	Константная область тяжелой цепи (дикий тип	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK

	(ДТ))	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV**D**VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HN**H**YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:16	Константная область тяжелой цепи с L234A, L235A (LALA) мутациями (мутации выделены жирным)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:17	Константная область тяжелой цепи с D265C мутацией (мутация выделена жирным)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVV**C**VSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:18	Константная область тяжелой цепи с H435A мутацией (мутация	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

	выделена жирным)*	YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH N**A**YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:19	Константная область тяжелой цепи: модифицированная Fc область с L234A, L235A, D265C мутациями (мутации выделены жирным)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV**C**VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:20	Константная область тяжелой цепи: модифицированная Fc область с L234A, L235A, D265C, H435A мутациями (мутации выделены жирным)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV**C**VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HN**A**YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:21	последовательность Ab85 полноразмерной тяжелой цепи; константная область подчеркнута	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNY WIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSS<u>AS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u>

		EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:22	последовательность Ab85 полноразмерной тяжелой цепи; константная область подчеркнута; модифицированная Fc область с L234A, L235A мутациями (мутации выделены жирным)*	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNY WIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:23	последовательность Ab85 полноразмерной тяжелой цепи: константная область подчеркнута; модифицированная Fc область с L234A, L235A, D265C мутациями (мутации	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNY WIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVV**C**VSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF

	выделены жирным)*	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:24	последовательность Ab85 полноразмерной тяжелой цепи (LALA - D265C - H435A мутант); константная область подчеркнута	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNY WIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDSDTRYRPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVV**C**VSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN **A**YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:25	Константная область легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:26	Ab85 полноразмерная легкая цепь; константная область подчеркнута	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIRSDL GWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:27	аминокислотная последовательность CK6 вариабельной области тяжелой цепи (CDR	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFT**S YWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPGDSDTRYS PSFQG**QVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR**HGRGYNGYEGAFDI**WGQGTMVTVS S

	выделены жирным)	
SEQ ID NO:28	аминокислотная последовательность CK6 вариабельной области легкой цепи (CDR выделены жирным)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGISSAL A**WYQQKPGKAPKLLIY**DASSLES**GVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY**CQQFNSYPLT** FGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 29	CD2 последовательность человека	MSFPCKFVAS FLLIFNVSSK GAVSKEITNA LETWGALGQD INLDIPSFQM SDDIDDIKWE KTSDKKKIAQ FRKEKETFKE KDTYKLFKNG TLKIKHLKTD DQDIYKVSIY DTKGKNVLEK IFDLKIQERV SKPKISWTCI NTTLTCEVMN GTDPELNLYQ DGKHLKLSQR VITHKWTTSL SAKFKCTAGN KVSKESSVEP VSCPEKGLDI YLIIGICGGG SLLMVFVALL VFYITKRKKQ RSRRNDEELE TRAHRVATEE RGRKPHQIPA STPQNPATSQ HPPPPPGHRS QAPSHRPPPP GHRVQHQPQK RPPAPSGTQV HQQKGPPLPR PRVQPKPPHG AAENSLSPSS N
SEQ ID NO: 30	Анти-CD2 антитело CDR-H1	EYYMY
SEQ ID NO: 31	Анти-CD2 антитело CDR-H2	RIDPEDGSIDYVEKFKK
SEQ ID NO: 32	Анти-CD2 антитело CDR-H3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 33	Анти-CD2 антитело CDR-L1	RSSQSLLHSSGNTYLN
SEQ ID NO: 34	Анти-CD2 антитело CDR-L2	LVSKLES
SEQ ID NO: 35	Анти-CD2 антитело CDR-L3	MQFTHYPYT

SEQ ID NO: 36	Анти-CD2 Вариабельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTE YYMYWVRQAPGQGLELMGRIDPEDGSIDYV EKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAV YYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 37	Анти-CD2 Вариабельная область легкой цепи	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSS GNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPD RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFT HYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 38	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-H1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 39	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-H2	SGGGF
SEQ ID NO: 40	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-H3 Вариант 1	SSYGEIMDY
SEQ ID NO: 41	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-H3 Вариант 2	SSYGELMDY
SEQ ID NO: 42	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-L1	RASQRIGTSIH
SEQ ID NO: 43	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-L2	YASESIS
SEQ ID NO: 44	Анти-CD2 (RPA-2.10) CDR-L3	QQSHGWPFTF
SEQ ID NO: 45	Анти-CD2 (RPA-2.10) вариабельная область тяжелой цепи Вариант 1	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY DMSWVRQTPEKRLEWVASISGGGFLYYLDSV KGRFTISRDNARNILYLHMTSLRSEDTAMYYC ARSSYGEIMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 46	Анти-CD2 (RPA-2.10) вариабельная область тяжелой	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY DMSWVRQTPEKRLEWVASISGGGFLYYLDSV KGRFTISRDNARNILYLHMTSLRSEDTAMYYC ARSSYGELMDYWGQGTSVTVSS

	цепи Вариант 2	
SEQ ID NO: 47	Анти-CD2 (RPA-2.10) Вариабельная область легкой цепи	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQRIGTSIH WYQQRTTGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS GTDFTLSINSVESEDVADYYCQQSHGWPFTFG GGTKLEIE
SEQ ID NO: 48	аминокислотная последовательность CD5 человека (изоформа 1)	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGRLSWYD PDFQARLTRSNSKCQGQLEVYLKDGWH MVCSQSWGRS SKQWEDPSQA SKVCQRLNCG VPLSLGPFLV TYTPQSSIIC YGQLGSFSNCSHSRNDMCHS LGLTCLEPQK TTPPTTRPPP TTTPEPTAPP RLQLVAQSGG QHCAGVVEFYSGSLGGTISY EAQDKTQDLE NFLCNNLQCG SFLKHLPETE AGRAQDPGEP REHQPLPIQWKIQNSSCTSL EHCFRKIKPQ KSGRVLALLC SGFQPKVQSR LVGGSSICEG TVEVRQGAQWAALCDSSSAR SSLRWEEVCR EQQCGSVNSY RVLDAGDPTS RGLFCPHQKL SQCHELWERNSYCKKVFVTC QDPNPAGLAA GTVASIILAL VLLVVLLVVC GPLAYKKLVK KFRQKKQRQWIGPTGMNQNM SFHRNHTATV RSHAENPTAS HVDNEYSQPP RNSHLSAYPA LEGALHRSSMQPDNSSDSDY DLHGAQRL
SEQ ID NO: 49	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) Вариабельная область тяжелой цепи (CDR выделены жирным)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTFSG**FSLSTSG** **MG**VGWIRQAPGKGLEWVAHI**WWDDD**VYY NPSLKSRLTITKDASKDQVSLKLSSVTAADTA VYYCVR**RRATGTGFDY**WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 50	Анти-CD5 (гуманизированного 5D7)	NIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS**QDVGTA** VAWYQQKPDQSPKLLIY**WTSTRHT**GVPDRF TGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYFCHQ**YNSYN**

	Вариабельная область легкой цепи (CDR выделены жирным)	**T**FGSGTKLEIK
SEQ ID NO: 51	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-H1	FSLSTSGMG
SEQ ID NO: 52	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-H2	WWDDD
SEQ ID NO: 53	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-H3	RRATGTGFDY
SEQ ID NO: 54	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-L1	QDVGTA
SEQ ID NO: 55	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-L2	WTSTRHT
SEQ ID NO: 56	Анти-CD5 (гуманизированное 5D7) CDR-L3	YNSYNT
SEQ ID NOs: 57-277	CDR аминокислотные последовательности для разных анти-CD5 антител	
SEQ ID NO: 278	Анти-CD137 антитело CDR-H1	STYWIS
SEQ ID NO: 279	Анти-CD137 антитело CDR-H2	KIYPGDSYTNYSPSFQG
SEQ ID NO: 280	Анти-CD137 антитело CDR-H3	RGYGIFDY
SEQ ID NO: 281	Анти-CD137 антитело CDR-L1	SGDNIGDQYAH
SEQ ID NO: 282	Анти-CD137	QDKNRPS

	антитело CDR-L2	
SEQ ID NO: 283	Анти-CD137 антитело CDR-L3	ATYTGFGSLAV
SEQ ID NO: 284	Анти-CD137 антитело CDR-L3	STYTFVGFTTV
SEQ ID NO: 285	Анти-CD137 антитело CDR-H1	NSYAIS
SEQ ID NO: 286	Анти-CD137 антитело CDR-H2	GIIPGFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 287	Анти-CD137 антитело CDR-H3	RKNEEDGGFDH
SEQ ID NO: 288	Анти-CD137 антитело CDR-L1	SGDNLGDYYAS
SEQ ID NO: 289	Анти-CD137 антитело CDR-L2	DDSNRPS
SEQ ID NO: 290	Анти-CD137 антитело CDR-L3	QTWDGTLHFV
SEQ ID NO: 291	Анти-CD137 антитело CDR-H1	SDYYMH
SEQ ID NO: 292	Анти-CD137 антитело CDR-H2	VISGSGSNTYYADSVKG
SEQ ID NO: 293	Анти-CD137 антитело CDR-H3	RLYAQFEGDF
SEQ ID NO: 294	Анти-CD137 антитело CDR-L1	SGDNIGSKYVS
SEQ ID NO: 295	Анти-CD137 антитело CDR-L2	SDSERPS
SEQ ID NO: 296	Анти-CD137 антитело CDR-L3	QSWDGSISRV
SEQ ID NO: 297	Анти-CD137 (ch-BBK2) последовательность тяжелой цепи (CDR выделены	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA**SGYTFTSYW**INWVKQRPGQGLEWIG**NIYPSDSYT**NYNQKFKDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAVYYC**TRNGVEGYPHYYAME**YWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

	жирным)	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 298	Анти-CD137 (ch-BBK2) последовательность легкой цепи (CDR выделены жирным)	DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRA**SQDLSNH** LYWYQQKPDGTVKLLI**YYTS**RLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYF**CQQGYTL PY**TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 299	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-H1	SGYTFTSYW
SEQ ID NO: 300	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-H2	NIYPSDSYT
SEQ ID NO: 301	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-H3	TRNGVEGYPHYYAME
SEQ ID NO: 302	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L1	SQDLSNH
SEQ ID NO: 303	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L2	YYTS
SEQ ID NO: 304	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L3	CQQGYTLPY
SEQ ID NO: 305	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-H1	SYWIN
SEQ ID NO: 306	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-H2	NIYPSDSYTNYNQKFKD
SEQ ID NO: 307	Анти-CD137 (ch-	NGVEGYPHYYAMEY

	BBK2) CDR-H3	
SEQ ID NO: 308	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L1	RASQDLSNHLY
SEQ ID NO: 309	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L2	YTSRLHS
SEQ ID NO: 310	Анти-CD137 (ch-BBK2) CDR-L3	QQGYTLPYT
SEQ ID NO: 311	Анти-CD137 последовательность вариабельной области тяжелой цепи (BBK2)	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTS YWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQ KFKDKATLTVDKSSNTVYMQLNSPTSEDSAV YYCTRNGVEGYPHYYAMEYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 312	Анти-CD137 последовательность вариабельной области легкой цепи (BBK2)	DIQMTQTTSALSASLGDRVTIGCRASQDLSNH LYWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTIRNLEQEDVATYFCQQGYTLP YTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 313	CD252 человека (т.е., OX40L) - Изоформа 1	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVI QGLGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKV QFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINC DGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQL KKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSL DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
SEQ ID NO: 314	CD252 человека (т.е., OX40L) - Изоформа 2	MVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKE DEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNI SLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYK DKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL
SEQ ID NO: 315	Анти-CD252 VH аминокислотная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGATRYAD SVKGRFTISRDNSRNTVYLQMNSLRVEDTAV FYCTKDRLIMATVRGPYYYGMDVWGQGTTV TVSS
SEQ ID NO: 316	Анти-CD252 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL

	аминокислотная последовательность	NWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSVSFTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 317	Анти-CD252 CDR-H1 аминокислотная последовательность	GFTFSNYA
SEQ ID NO: 318	Анти-CD252 CDR-H2 аминокислотная последовательность	ISGSGGAT
SEQ ID NO: 319	Анти-CD252 CDR-H3 аминокислотная последовательность	TKDRLIMATVRGPYYYGMDV
SEQ ID NO: 320	Анти-CD252 CDR-L1 аминокислотная последовательность	QSISSY
SEQ ID NO: 321	Анти-CD252 CDR-L2 аминокислотная последовательность	AAS
SEQ ID NO: 322	Анти-CD252 CDR-L3 аминокислотная последовательность	QQSHSVSFT
SEQ ID NO: 323	окселумаб	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSY

	аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи	AMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSGGFTYYADS VKGRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDRLVAPGTFDYWGQGALVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	
SEQ ID NO: 324	окселумаб аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 325	окселумаб CDR-H1 аминокислотная последовательность	GFTFNSYA	
SEQ ID NO: 326	окселумаб CDR-H2 аминокислотная последовательность	ISGSGGFT	
SEQ ID NO: 327	окселумаб CDR-H3 аминокислотная последовательнос	AKDRLVAPGTFDY	

	ть	
SEQ ID NO: 328	окселумаб CDR-L1 аминокислотная последовательность	QGISSW
SEQ ID NO: 329	окселумаб CDR-L2 аминокислотная последовательность	AAS
SEQ ID NO: 330	окселумаб CDR-L3 аминокислотная последовательность	QQYNSYPYT
SEQ ID NO: 331	окселумаб VH аминокислотная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSY AMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSGGFTYYADS VKGRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDRLVAPGTFDYWGQGALVTVSS
SEQ ID NO: 332	окселумаб VL аминокислотная последовательность	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYT FGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 333	CD45RA (Изоформа CD45 человека)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPS PTGLTTAKMPSVPLSSDPLPTHTTAFSPASTFE RENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLDNASAFN TTDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKP TCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNEN VECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCT APDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTI CLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKE IKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIK TDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSF HNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKP

		YTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKS APPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRN GPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKD LQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYN SKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRS CNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLET YKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARK PFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSN YINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWR MIWEQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWPS MEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIV NKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLL LKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTY IGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCL MVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSEL HPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSW RTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLK HELEMSKESEHDSDESSDDDSDSEEPSKYINA SFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQ RKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEGKQT YGDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDS RTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVK QKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTG IFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARP GMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNN HQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKL PEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALN QGS
SEQ ID NO: 334	CD45RB (Изоформа CD45 человека)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPS PTGVSSVQTPHLPTHADSQTPSAGTDTQTFSG SAANAKLNPTPGSNAISDAYLNASETTTLSPS GSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYN KETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNL TECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKF QLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNI

		TYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSE ILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEA AHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLN LDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQ RNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSD NSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLV RNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGD YPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALL VVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQ LMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQS IPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRYVDILPYDYN RVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAA QGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCE EGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQ HKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTS WPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIV VHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDV YGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEY NQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPL EAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNS NVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDD DSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPL KETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEI CAQYWGEGKQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLR VFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAE PKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPL LIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIF QVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTY PAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDA NCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPE HSVNGPASPALNQGS
SEQ ID NO: 335	CD45RC (Изоформа CD45 человека)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPS PTDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTLSLAHHSS AALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTTLSPSG SAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNK

		ETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNLT ECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQ LHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNIT YRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEI LYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEA AHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLN LDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQ RNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSD NSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLV RNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGD YPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALL VVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQ LMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQS IPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRYVDILPYDYN RVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAA QGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCE EGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQ HKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTS WPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIV VHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDV YGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEY NQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPL EAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNS NVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDD DSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPL KETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEI CAQYWGEGKQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLR VFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAE PKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPL LIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIF QVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTY PAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDA NCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPE HSVNGPASPALNQGS
SEQ ID NO: 336	CD45RO	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPS

	(Изоформа CD45 человека)	PTDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKP TCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNEN VECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCT APDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTI CLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKE IKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIK TDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSF HNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKP YTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKS APPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRN GPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKD LQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYN SKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRS CNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLET YKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARK PFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSN YINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWR MIWEQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWPS MEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIV NKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLL LKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTY IGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCL MVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSEL HPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSW RTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLK HELEMSKESEHDSDESSDDDSDSEEPSKYINA SFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQ RKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEGKQT YGDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDS RTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVK QKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTG IFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARP GMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNN HQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKL PEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALN

		QGS
SEQ ID NO: 337	Апамистамаб Вариабельная область тяжелой цепи	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPTSSTINFTPSL KDKVFISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYY CARGNYYRYGDAMDYWGQGTSVTVSSA
SEQ ID NO: 338	Апамистамаб Вариабельная область легкой цепи	DIALTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSG YSYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSR ELPFTFGSGTKLEIKR
SEQ ID NO: 339	аминокислотная последовательность CD5 человека (изоформа 2)	MVCSQSWGRSSKQWEDPSQASKVCQRLNCG VPLSLGPFLVTYTPQSSIICYGQLGSFSNCSHSR NDMCHSLGLTCLEPQKTTPPTTRPPPTTTPEPT APPRLQLVAQSGGQHCAGVVEFYSGSLGGTIS YEAQDKTQDLENFLCNNLQCGSFLKHLPETE AGRAQDPGEPREHQPLPIQWKIQNSSCTSLEH CFRKIKPQKSGRVLALLCSGFQPKVQSRLVGG SSICEGTVEVRQGAQWAALCDSSSARSSLRW EEVCREQQCGSVNSYRVLDAGDPTSRGLFCP HQKLSQCHELWERNSYCKKVFVTCQDPNPA GLAAGTVASIILALVLLVVLLVVCGPLAYKKL VKKFRQKKQRQWIGPTGMNQNMSFHRNHTA TVRSHAENPTASHVDNEYSQPPRNSHLSAYPA LEGALHRSSMQPDNSSDSDY DLHGAQRL
SEQ ID NO:340	Ab249 CDR-H1	TSWIG
SEQ ID NO:341	Ab249 CDR-H2	IIYPGDSDTRYSPSFQG
SEQ ID NO:342	Ab249 CDR-H3	HGLGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO:343	Ab249 CDR-L1	RASQGIGSALA
SEQ ID NO:344	Ab249 CDR-L2	DASNLET
SEQ ID NO:345	Ab249 CDR-L3	QQLNGYPLT
SEQ ID NO:346	Вариабельная область тяжелой цепи Ab 249	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTTS WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:347	Вариабельная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSAL

	область легкой цепи Ab 249	AWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGYPLT FGQGTRLEIK
SEQ ID NO:348	Ab67 CDR-H1	FTFSDADMD
SEQ ID NO:349	Ab67 CDR-H2	RTRNKAGSYTTEYAASVKG
SEQ ID NO:350	Ab67 CDR-H3	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO:351	Ab67 CDR-L1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO:352	Ab67 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO:353	Ab67 CDR-L3	QQSYIAPYT
SEQ ID NO:354	Вариабельная область тяжелой цепи Ab 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDA DMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYTTE YAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED TAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID NO:355	Вариабельная область легкой цепи Ab 67	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYIAPYTF GGGTKVEIK

Другие варианты

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в этой спецификации, включены в настоящий документ в качестве ссылок в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка была специфически и индивидуально указана для включения в качестве ссылки.

Хотя изобретение было описано в связи с его специфическими вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дополнительные модификации, и эта заявка предназначена для охвата любых вариантов, использования или адаптации изобретения, следуя, в общем, принципам изобретения, и включает такие отклонения от изобретения, которые входят в известную или обычную практику в области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам настоящего документа, изложенным выше, и ниже в объеме формулы изобретения.

Другие варианты осуществления представлены в формуле изобретения

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащая Fc область, где Fc области содержат аминокислотные замещения в положениях L234, L235 (EU индекс) и D265 (EU индекс).

2. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс).

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-3, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-4, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.5, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-6, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.7, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-8, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-9, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.10, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-9, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-12, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.13, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

15. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-12, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

16. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-15, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

17. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.16, где I253 аминокислотным

замещением является I253A.

18. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-17, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

19. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.18, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

20. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении N297 и D265 (EU индекс).

21. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.20, где аминокислотным замещением в положении D265 является D265C или D265A (EU индекс).

22. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.20 или 21, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

23. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-22, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс).

24. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.23, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.23 или 24, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-25, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.26, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

28. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-27, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-28, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

30. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.29, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

31. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-28, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

32. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-31, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

33. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.32, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-31, где Fc

область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-34, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.35, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 20-36, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.37, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

39. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащая Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E233, L234, L235 и D265 (EU индекс) и делецию G236 (EU индекс) и аминокислотное замещение на D265 (EU индекс).

40. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.39, где аминокислотным замещением на D265 является D265C или D265A (EU индекс).

41. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.39 или 40, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

42. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-41, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

43. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-42, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

44. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-43, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

45. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.44, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

46. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-45, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

47. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.46, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

48. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-45, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

49. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-48, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

50. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.49, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

51. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-48, где Fc

область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

52. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-51, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

53. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.52, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

54. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 39-53, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

55. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.54, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

56. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении H435and D265 (EU индекс).

57. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.56, где аминокислотным замещением в положении D265 является D265C или D265A (EU индекс).

58. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.56 или 57, где H435 аминокислотным замещением является H435A.

59. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-58, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

60. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.59, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

61. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-60, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс).

62. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.61, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

63. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.61 или 62,где L235 аминокислотным замещением является L235A.

64. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-63, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

65. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.64, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

66. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-65, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

67. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-66, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

68. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.67, где P331

аминокислотным замещением является P331G.

69. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-66, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

70. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-69, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

71. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.70, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

72. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-69, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

73. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-72, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

74. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.73, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

75. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 56-74, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

76. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.75, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

77. Антитело или его антигенсвязывающая часть содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс) и аминокислотное замещение P329 (EU индекс).

78. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.77, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

79. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.77 или 78, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

80. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-79, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс).

81. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.80, где D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс).

82. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-81, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

83. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.82, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

84. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-83, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

85. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.84, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

86. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-85, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

87. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-86, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

88. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.87, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

89. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-86, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

90. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-89, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

91. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.90, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

92. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 77-91, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

93. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.92, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

94. Антитело или его антигенсвязывающая часть содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс) и аминокислотное замещение P331 (EU индекс).

95. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.94, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

96. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.94 или 95, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

97. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-96, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс).

98. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.97, где D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс).

99. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-98, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

100. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.99, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

101. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-100, где Fc

область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

102. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.101, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

103. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-102, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

104. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-103, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

105. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.104, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

106. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-103, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

107. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-106, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

108. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.107, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

109. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 94-108, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

110. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.109, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

111. Антитело или его антигенсвязывающая часть содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E233 и L234 и L235 (EU индекс), делецию G236 (EU индекс).

112. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.111, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

113. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.112 или 113, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

114. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-113, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

115. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-114, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H435 (EU индекс).

116. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.115, где H435 аминокислотным замещением является H435A.

117. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-116, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

118. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.117, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q (EU индекс).

119. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-118, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

120. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.119, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

121. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-118, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

122. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-121, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

123. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.122, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

124. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-121, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

125. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-124, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

126. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.125, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

127. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 111-126, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

128. Антитело по п.127, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

129. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях I253, H310 и H345 (EU индекс).

130. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.129, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

131. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.129 или 130, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

132. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-131, где H435 аминокислотным замещением является H435A

133. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-132, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

134. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.133, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и N297Q

(EU индекс).

135. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-134, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении D265 (EU индекс).

136. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.135, где D265 аминокислотным замещением является D265C или D265A (EU индекс).

137. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-136, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

138. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.137, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

139. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-138, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

140. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-139, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

141. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.140, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

142. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-139, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

143. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-142, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

144. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.143, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

145. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 129-142, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

146. Антитело или его антигенсвязывающая часть содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотное замещение в положении N297 (EU индекс).

147. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.146, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс).

148. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.147, где L234 аминокислотным замещением является L234A или L234V.

149. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.147 или 148, где L235 аминокислотным замещением является L235A.

150. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.146, где Fc область не включает замещение в положениях L234 и L235 (EU индекс).

151. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-150, где N297 аминокислотное замещение выбирают из группы, состоящей из N297A, N297G и

N297Q.

152. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-151, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении E233 (EU индекс).

153. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.152, где E233 аминокислотным замещением является E233P (EU индекс).

154. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-153, где Fc область дополнительно содержит делецию G236 (EU индекс).

155. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-154, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P331 (EU индекс).

156. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.155, где P331 аминокислотным замещением является P331G.

157. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-154, где Fc область не включает замещение в положении P331 (EU индекс).

158. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-157, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении P329 (EU индекс).

159. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.158, где P329 аминокислотным замещением является P329G.

160. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-159, где Fc область не включает замещение в положении P329 (EU индекс).

161. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-160, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении I253 (EU индекс).

162. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.161, где I253 аминокислотным замещением является I253A.

163. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 146-162, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H310 (EU индекс).

164. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.163, где H310 аминокислотным замещением является H310A.

165. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-164, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении S239 (EU индекс).

166. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.165, где S239 аминокислотным замещением является S239C.

167. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-55, 77-114, 117-132 и 134-166, где Fc область дополнительно содержит аминокислотное замещение в положении H435 (EU индекс).

168. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.165, где H435 аминокислотным замещением является H435A.

169. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.166, где антитело, содержащее аминокислотное замещение H435A, имеет пониженный период полужизни относительно идентичного интактного IgG антитела, содержащего немодифицированную Fc область.

170. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения L234A, L235A, S239C и D265A (EU индекс).

171. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения L234A, L235A, S239C и D265C (EU индекс).

172. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A и D265C (EU индекс).

173. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A и D265A (EU индекс).

174. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений L234A, L235A, S239C и D265A (EU индекс).

175. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений H435A, L234A, L235A и D265C (EU индекс).

176. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297A и D265C (EU индекс).

177. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297G и D265C (EU индекс).

178. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297Q и D265C (EU индекс).

179. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297A и D265A (EU индекс).

180. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297G и D265A (EU индекс).

181. Антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее Fc область, где Fc

область содержит аминокислотные замещения, состоящие, по существу, из аминокислотных замещений N297Q и D265A (EU индекс).

182. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-181, где антитело имеет снижение эффекторной функции, определенное как снижение связывания с Fc гамма рецептором (FcγR) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc область с FcγR.

183. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.182, где снижение связывания составляет, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область с FcγR.

184. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.182, где антитело не имеет определяемого связывания с FcγR.

185. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 182-184, где связывание антитела с FcγR оценивают биослойной интерферометрией (BLI).

186. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 182-185, где FcγR является FcγR1 рецептором.

187. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 182-186, где FcγR рецептором является FcγR2 рецептор или FcγR3 рецептор.

188. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.187, где FcγR2 рецептором является FcγR2A, FcγR2B или FcγR2C.

189. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.187, где FcγR3 рецептором является FcγR3A или FcγR3B.

190. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 182-189, где Fc рецептором является Fc рецептор человека.

191. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-181, где антитело снижает выделение цитокина в in vitro анализе выделения цитокина со снижением выделения цитокина на, по меньшей мере, 50% относительно выделения цитокина идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

192. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.191, где снижение выделения цитокина составляет, по меньшей мере, 60% снижение, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение выделения цитокина относительно выделения цитокина идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

193. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.191, где антитело не показывает определяемое выделение цитокина.

194. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 191-193, где in vitro анализом выделения цитокина является провоспалительный анализ культуры ткани

(TC) Meso Scale Discovery (MSD).

195. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-181, где антитело снижает дегрануляцию тучных клеток в in vitro анализе дегрануляции тучных клеток со снижением дегрануляции тучных клеток на, по меньшей мере, 50% относительно дегрануляции тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

196. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.195, где снижение дегрануляции тучных клеток составляет, по меньшей мере, 60% снижение, по меньшей мере, 70% снижение, по меньшей мере, 80% снижение, по меньшей мере, 90% снижение, по меньшей мере, 95% снижение, по меньшей мере, 98% снижение, по меньшей мере, 99% снижение или 100% снижение дегрануляции тучных клеток относительно дегрануляции тучных клеток идентичным антителом, содержащим немодифицированную Fc область.

197. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.196, где антитело не демонстрирует определяемую дегрануляцию тучных клеток.

198. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 195-197, где in vitro анализом дегрануляции тучных клеток является анализ дегрануляции тучных клеток на основе бета-гексозаминидазы.

199. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-198, где IgG изотипом является IgG 1 изотип, IgG2 изотип, IgG3 изотип или IgG4 изотип.

200. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-199, где антителом является антитело человека, химерное или гуманизированное антитело.

201. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-200, где антителом является биспецифическое антитело.

202. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-201, где антителом является моноклональное антитело.

203. Антитело по любому из пп. 1-202, где антителом является интактное IgG антитело.

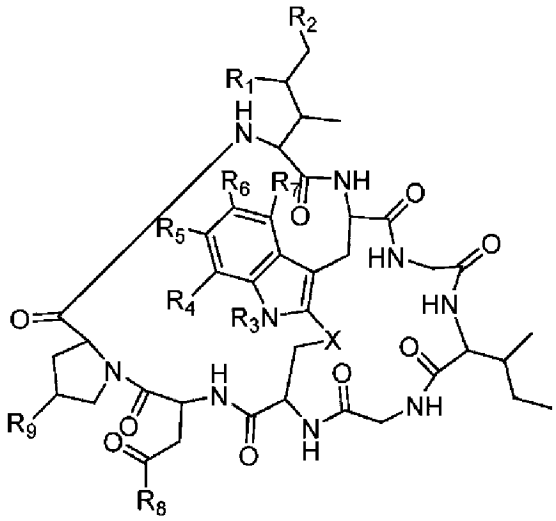
204. Антитело по любому из пп. 1-203, где антитело специфически связывает CD117, CD45, CD2, CD5, CD137 или CD252.

205. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, по любому из пп. 1-204, где антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгировано с цитотоксином через линкер.

206. ADC по п.205, где цитотоксином является ингибитор РНК полимеразы.

207. ADC по п.206, где ингибитором РНК полимеразы является аматоксин.

208. ADC по п.207, где аматоксин представлен формулой (**III**)



(**III**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

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

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2-$;

R_C является -L-Z;

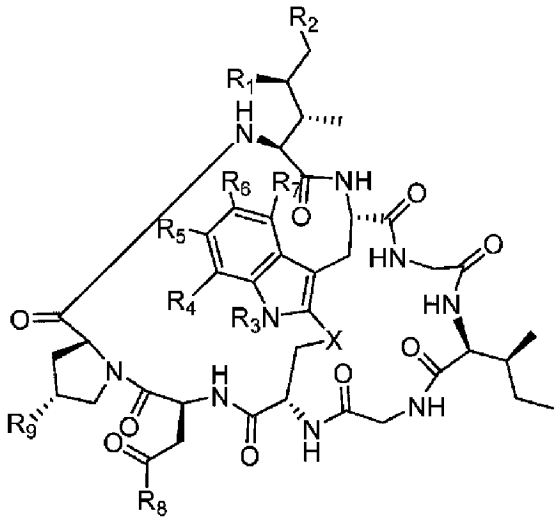
R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, пептидом, дипептидом, -(C=O)-, дисульфидом, гидразоном или их комбинацией; и

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am содержит только один R_C заместитель.

209. ADC по п.207, где аматоксин представлен формулой (**IB**)



(**IB**)

где R_1 является H, OH, OR_A или OR_C;

R_2 является H, OH, OR_B или OR_C;

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

R_3 является H, R_C или R_D;

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

R_8 является OH, NH_2, OR_C, OR_D, NHR_C или NR_CR_D;

R_9 является H, OH, OR_C или OR_D;

X является -S-, -S(O)- или $-SO_2$-;

R_C является -L-Z;

R_D является необязательно замещенным C_1-C_6 алкилом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкенилом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкинилом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкинилом, необязательно замещенным циклоалкилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом, необязательно замещенным арилом или необязательно замещенным гетероарилом;

L является необязательно замещенным C_1-C_6 алкиленом, необязательно замещенным C_1-C_6 гетероалкиленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкениленом, необязательно замещенным C_2-C_6 алкиниленом, необязательно замещенным C_2-C_6 гетероалкиниленом, необязательно замещенным циклоалкиленом, необязательно замещенным гетероциклоалкиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, пептидом, дипептидом, -(C=O)-, дисульфидом, гидразоном или их комбинацией; и

Z является химической группой, образованной реакцией сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

где Am содержит только один R_C заместитель.

210. ADC по п.206, где ингибитором РНК полимеразы является аманитин.

211. ADC по п.210, где аманитин выбирают из группы, состоящей из α-аманитина,

β-аманитина, γ-аманитина, ε-аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и проамануллина.

212. ADC по п.205, где цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина синегнойной палочки A, деБуганина, дифтеротоксина, сапорина, майтанзина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихеамицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина.

213. ADC по п.212, где ауристатином является MMAE или MMAF.

214. ADC по любому из пп. 205-213, где антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгирована с цитотоксином через межцепочечную конъюгацию с нативным шарнирным цистеином.

215. ADC по любому из пп. 205-214, где антитело или его антигенсвязывающая часть конъюгировано с цитотоксином через цистеиновый остаток в Fc домене антитела.

216. ADC по п.215, где цистеиновый остаток введен путем аминокислотного замещения в Fc домене антитела.

217. ADC по п.216, где аминокислотным замещением является D265C.

218. ADC по п.216, где аминокислотным замещением является S239C.

219. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или ADC по любому из пп. 1-218 и фармацевтически приемлемый носитель.

220. Способ обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток (HSC) у пациента-человека, где способ включает введение пациенту эффективного количества антитела или ADC по любому из пп. 1-218.

221. Способ по п.220, дополнительно включающий введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

222. Способ по п.221, где трансплантат является аллогенным.

223. Способ по п.221, где трансплантат является аутологичным.

224. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело или ADC по любому из пп. 1-218 в количестве, достаточном для обеднения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

225. Способ по п.224, где гемопоэтической стволовой клеткой является CD117+ или CD45+ клетка.

226. Способ по любому из пп. 220-224, где пациент имеет заболевание крови, метаболическое расстройство, рак или аутоиммунное заболевание или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID).

227. Способ лечения лейкоза у пациента-человека, где указанный способ включает введение антитела или ADC по любому из пп. 1-218 пациенту-человеку, имеющему лейкоз.

228. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, где пациенту ранее вводили антитело

или ADC по любому из пп. 1-218 в количестве, достаточном для обеднения популяции иммунных клеток у пациента.

229. Способ по п.228, где иммунной клеткой является CD137+, CD2+ или CD5+ клетка.

230. Способ по п.228 или 229, где иммунной клеткой является Т клетка.

231. Композиция, содержащая антитело или ADC по любому из пп. 1-218, где композиция содержит менее 25% гидрофобного деградаанта после термического стресса.

232. Композиция по п.231, где композиция содержит менее 20% гидрофобного деградаанта после термического стресса.

233. Композиция по п.231, где композиция содержит менее 15% гидрофобного деградаанта после термического стресса.

234. Композиция по п.231, где композиция содержит менее 10% гидрофобного деградаанта после термического стресса.

235. Композиция по п.231, где композиция содержит менее 5% гидрофобного деградаанта после термического стресса.

236. Способ лечения нарушения, связанного со стволовыми клетками, у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC по любому из пп. 1-218.

237. Способ лечения расстройства иммунодефицита у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC по любому из пп. 1-218.

238. Способ по п.237, где расстройством иммунодефицита является врожденный иммунодефицит или приобретенный иммунодефицит.

239. Способ лечения метаболического расстройства у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC по любому из пп. 1-218.

240. Способ по п.239, где метаболическое расстройство выбирают из группы, состоящей из нарушений отложения гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза и метахроматической лейкодистрофии.

241. Способ лечения аутоиммунного расстройства у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC по любому из пп. 1-218.

242. Способ по п.241, где аутоиммуное заболевание выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, лечения псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного

синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, целиакии-герпетиформного дерматита, болезни холодовых агглютининов, синдрома CREST, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, дизавтономии, эндометриоза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпастура, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, IgA невропатии, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромиотонии, опсо-миоклонального синдрома, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, обычной пузырчатки, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узелкового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

243. Способ лечения рака у пациента-человека, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC по любому из пп. 1-218.

244. Способ по п.243, где рак выбирают из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и нейробластомы.

По доверенности

Нормализованный ответ
(% от нейтрального ДТ)
250
200
150
100
50
0
-50
FcR1 человека
FcR1 яванского макака
FcR2A 167R человека
FcR2A 167H человека
FcR2B человека
FcR3A 176V человека
Ab1 ДТ
Ab1 D265A
Ab1 D265C
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A
Ab2 ДТ
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C H435A
Ab3 D265C H435A
Ab4 ДТ
Ab4 EPLVLAdelG H435A
Ab4 N297A
Ab4 N297G
Ab4 N297Q
Изотип ДТ

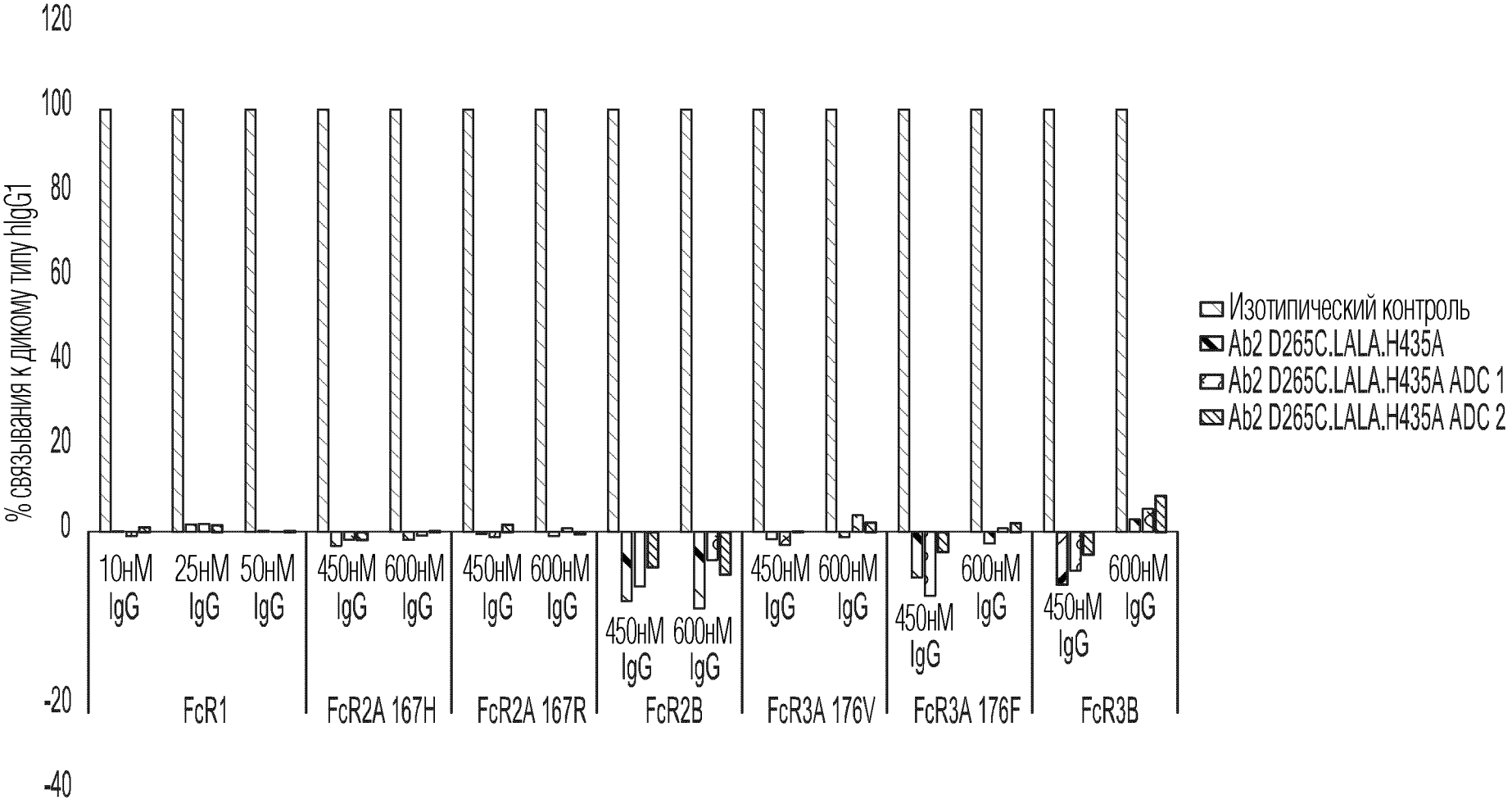
ФИГ. 1А

Антитело	Bio-hFcR1 Нормализ. Человека FcR1	His-hFcR1 Ответ Человека FcR1	His-яванского макака FcR1 Ответ Яванского макака FcR1	Bio-hFcR2A 167R Человека FcR2A 167R	Bio hFcR2A 167H Человека FcR2A 167H	Bio-hFcR2B Человека FcR2B	Bio-hFcR3A 176V Человека FcR3A 176V
Ab1 ДТ	100	100	100	100	100	100	100
Ab1 D265A	48	36	69	3	3	2	-1
Ab1 D265C	18	13	39	-1	-1	8	0
Ab1 D265C H435A	25	23	68	1	0	8	0
Ab1 D265C LALA	-1	1	1	0	-1	-1	0
Ab1 D265C LALA H435A	-3	0	1	0	-1	8	-1
Ab1 D265C N297G	3	1	13	4	0	0	-1
Ab1 D265C N297G H435A	16	9	30	2	-1	4	-1
Ab1 D265C EPLVLAdelG	-1	1	1	-3	1	3	0
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A	-1	2	1	2	1	2	1
Ab2 ДТ	83	87	83	95	97	117	95
Ab2 D265C N297Q H435A	1	2	7	-1	-1	4	1
Ab2 D265C N297Q	-1	0	7	-1	0	9	0
Ab2 D265C H435A	19	17	49	-2	-2	9	1
Ab3 D265C H435A	14	26	78	0	-1	4	0
Ab4 ДТ	97	119	117	147	141	188	117
Ab4 EPLVLAdelG H435A	-2	-1	0	1	30	5	2
Ab4 N297A	36	24	51	0	-1	6	0
Ab4 N297G	10	6	25	0	0	4	0
Ab4 N297Q	13	10	43	-1	1	0	0
Изотип ДТ	91	85	82	102	90	95	92

ФИГ. 1B

Антитело	Hu Fc1	Hu Fc2A 167R	Hu Fc2A 167H	Hu Fc2B	Hu Fc3A 176F	Hu Fc3A 176V
Ab5 (ДТ)	100	100	100	100	100	100
Ab5 D265C.H435A	33	0	0	3	-3	-1
Ab5 D265C.N297A.H435A	1	0	-1	2	-4	0
Ab5 LALA.P329G	1	2	-1	-1	-1	-1
Ab5 EPLVLAdelG	1	15	66	10	9	16
Ab5 LALA.P331G	4	1	-1	8	0	0
Ab5 D265A.H435A	35	0	3	1	-4	-1
Ab5 D265C.LALA.P331G.H435A	0	-1	0	-1	0	0
Ab5 N297A.I253A.H310A.H435A	25	-2	0	0	-3	0
Ab5 CH2 делеция	-1	0	-1	1	0	0
Ab5 D265A	40	-1	2	2	0	0
Ab5 LALA	21	2	4	3	19	34
Ab5 D265A.LALA	0	0	1	-1	-2	1
Ab5 D265C.LALA.P329G.H435A	4	0	0	-4	1	1
rIgG2a (крысы IgG2a изотипический контроль)	0	74	3	8	1	0
YTH24.5(анти-CD45rIgG2b)	121	56	150	120	62	51
Ab5ADC1(WT) межцепочечное PAR 4	94	152	146	175	150	107
Ab5ADC1D265A.H435A межцепочечное PAR 4	43	2	5	10	2	1
Ab5APC1 P265A межцепочечное PAR 4	49	24	46	11	4	1
Ab5 ADC1 D265C.H435A DAR 2	37	0	0	3	2	0

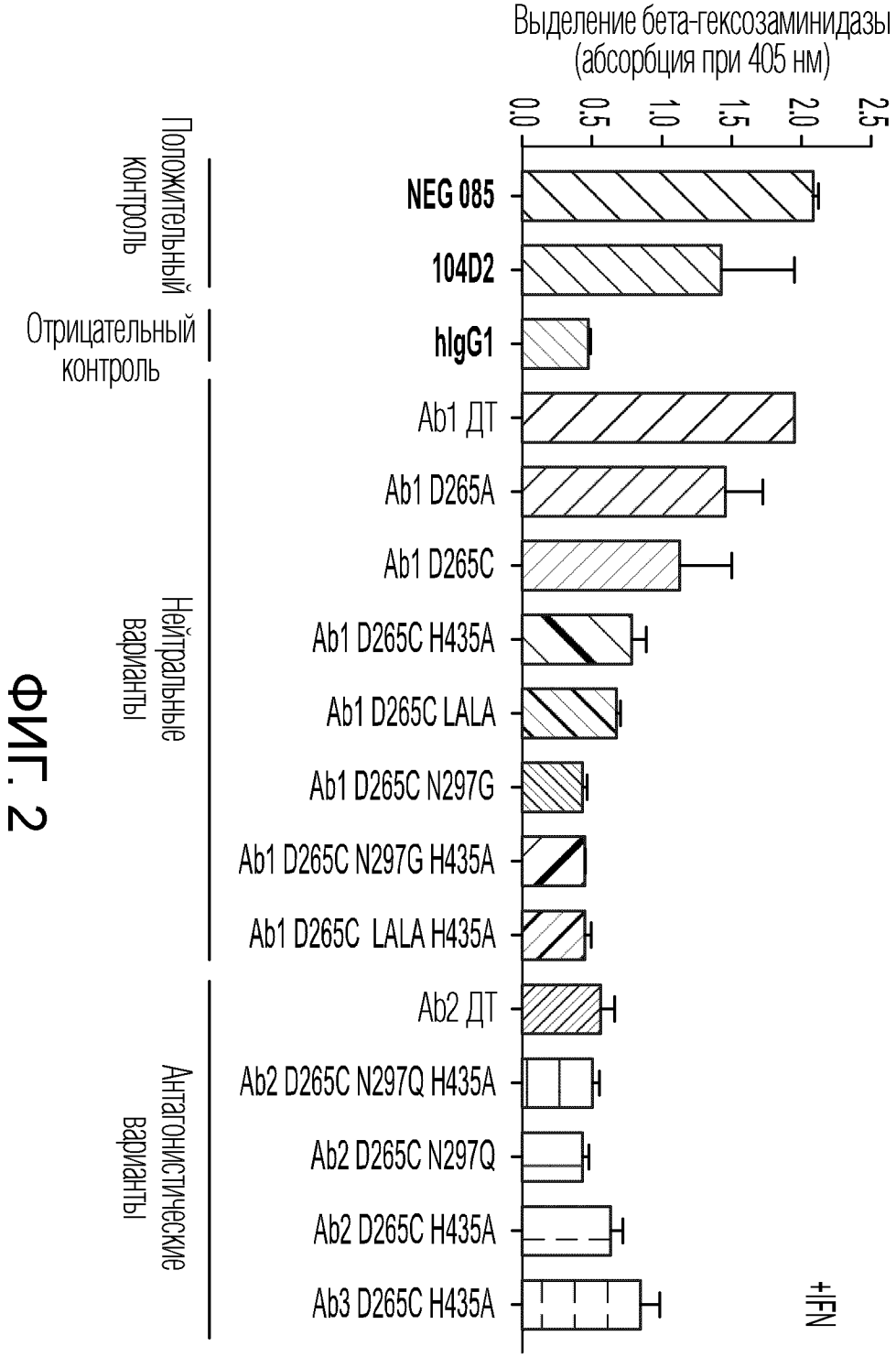
ФИГ. 1C


120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
% связывания к дикому типу hIgG1
10нМ IgG
25нМ IgG
50нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
450нМ IgG
600нМ IgG
FcR1
FcR2A 167H
FcR2A 167R
FcR2B
FcR3A 176V
FcR3A 176F
FcR3B
Изотипический контроль
Ab2 D265C.LALA.H435A
Ab2 D265C.LALA.H435A ADC 1
Ab2 D265C.LALA.H435A ADC 2

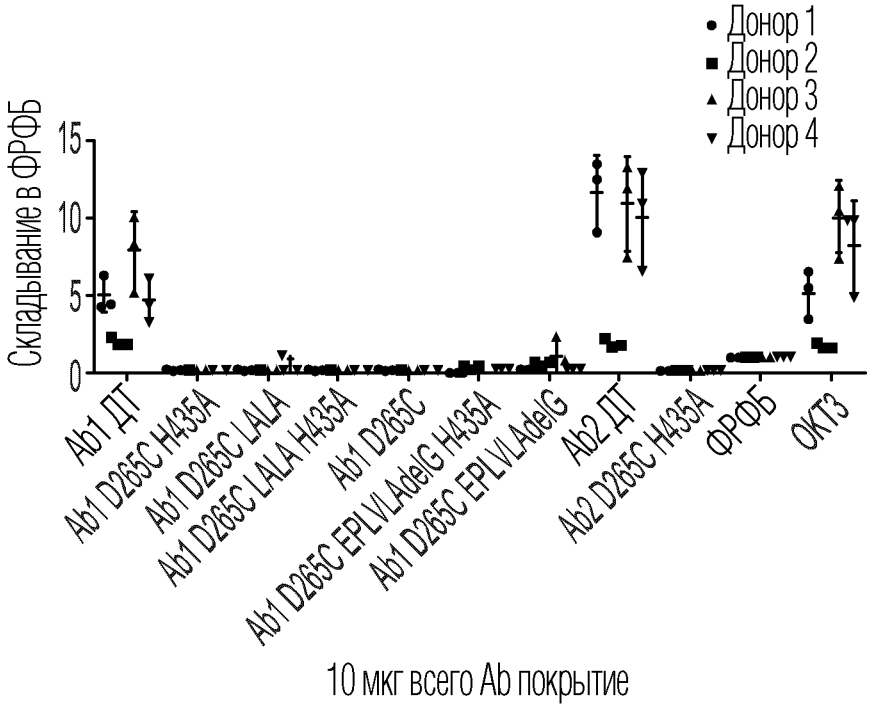
ФИГ. 1D

	FcR1			FcR2A 167H		FcR2A 167R		FcR2B		FcR3A 176V		FcR3A 176F		FcR3B	
Антитело	10нМ IgG	25нМ IgG	50нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG	450нМ IgG	600нМ IgG
Изотип. контроль	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ab2 D265C. LALA.H435A	0	2	0	-3	-2	-1	-1	-16	-18	-2	-1	-11	-3	-13	3
Ab2 D265C. LALA.H435A ADC1	-1	2	0	-2	-1	-1	1	-13	-7	-3	4	-15	1	-9	5
Ab2 D265C. LALA.H435A ADC2	1	2	0	-2	0	2	-1	-8	-10	0	2	-5	2	-5	9

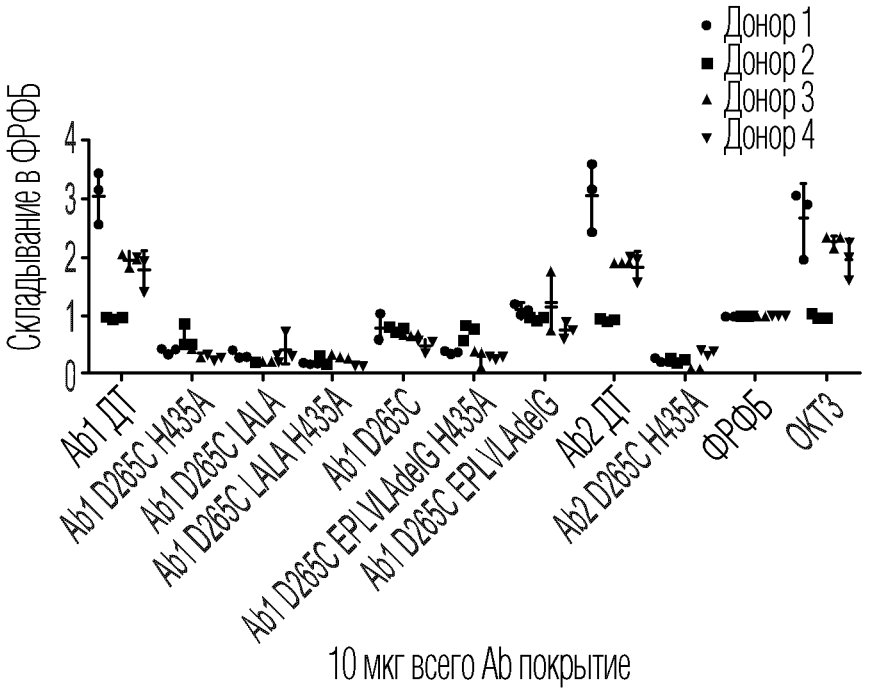
ФИГ. 1E


Выделение бета-гексозаминидазы
(абсорбция при 405 нм)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Положительный контроль
Отрицательный контроль
Нейтральные варианты
Антагонистические варианты
NEG 085
104D2
hIgG1
Ab1 ДТ
Ab1 D265A
Ab1 D265C
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C LALA H435A
Ab2 ДТ
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C H435A
Ab3 D265C H435A
+IFN

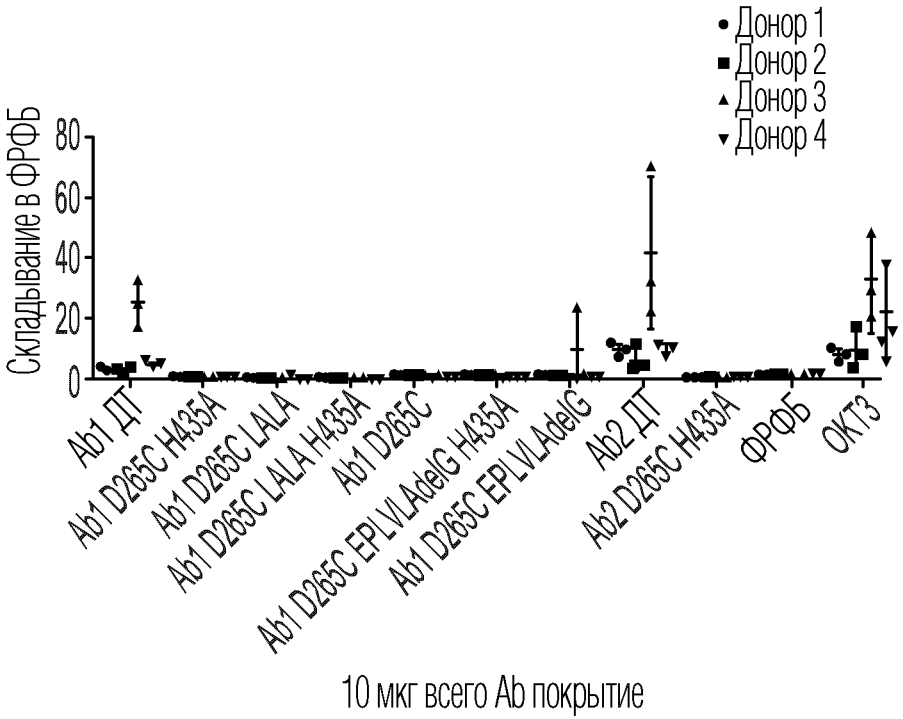
ФИГ. 2


Складывание в ФРФБ
15
10
5
0
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Ab1 ДТ
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
ФРФБ
ОКТ3
10 мкг всего Ab покрытие

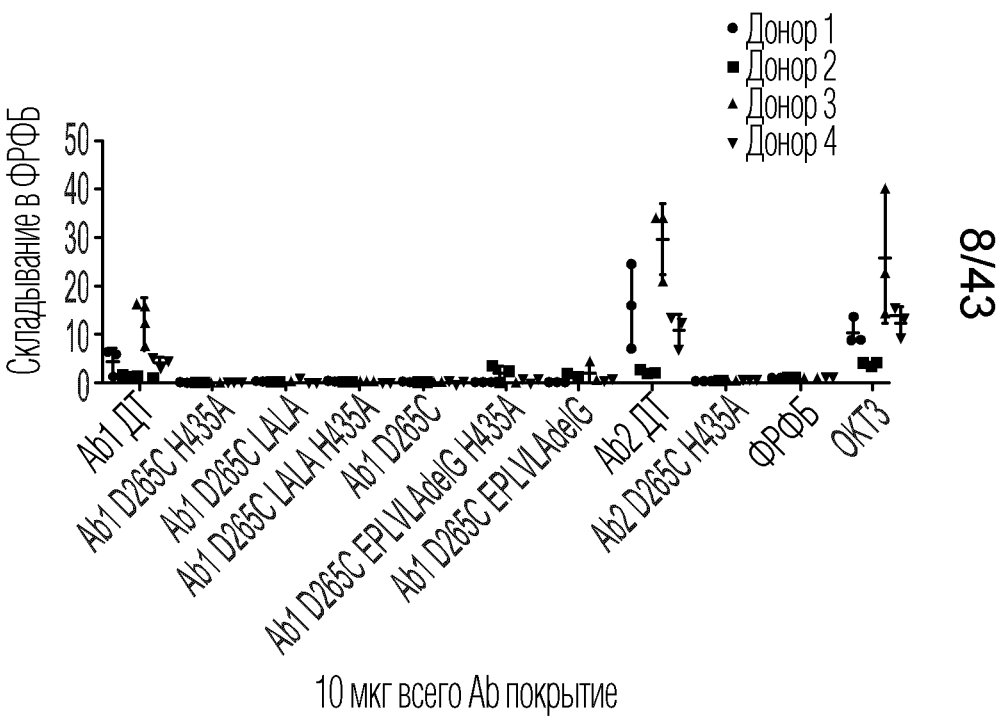
ФИГ. 3А


Складывание в ФРФБ
4
3
2
1
0
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Ab1 ДТ
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
ФРФБ
ОКТ3
10 мкг всего Ab покрытие

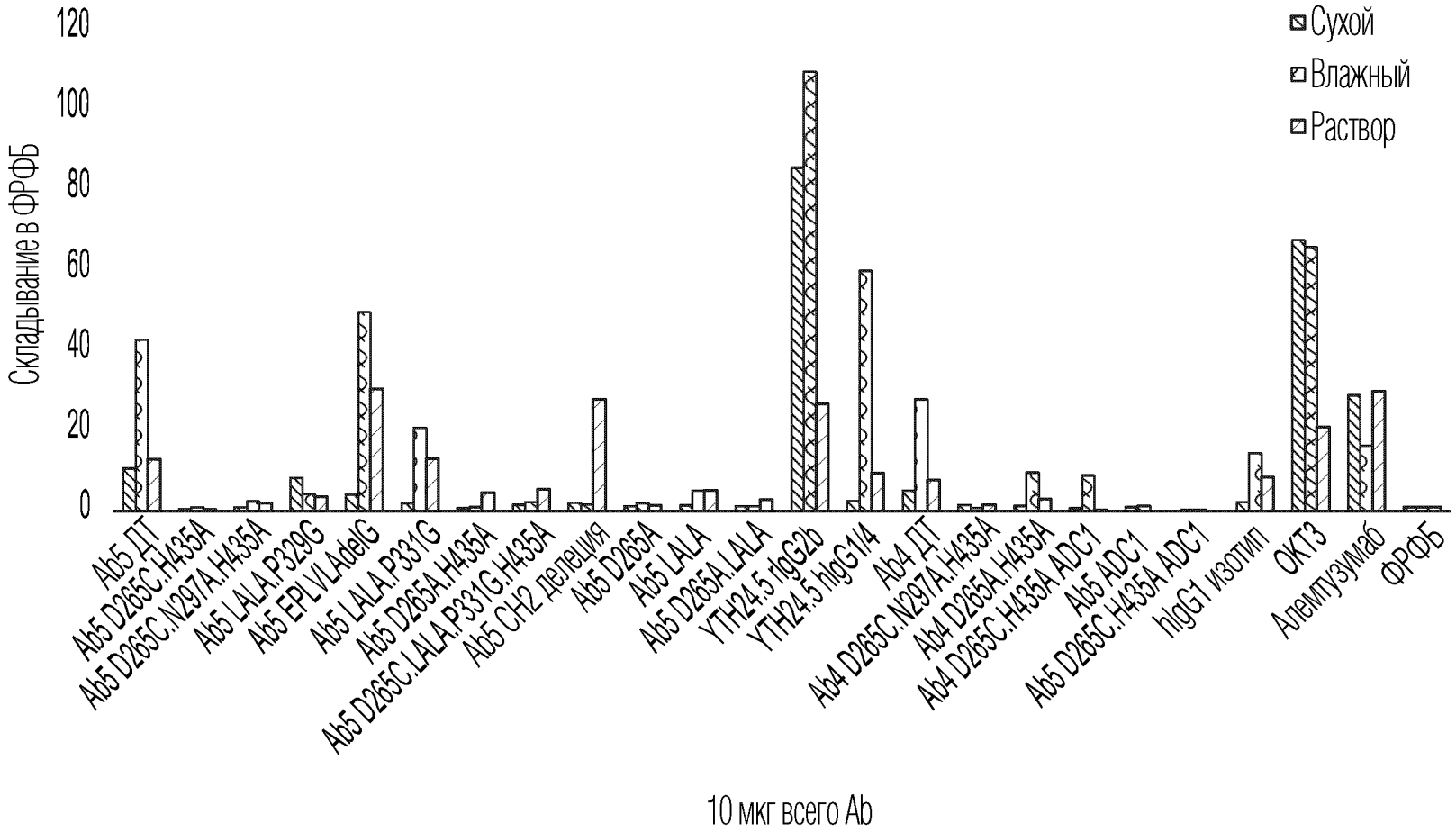
ФИГ. 3В


Складывание в ФРФБ
80
60
40
20
0
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Ab1 ДТ
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
ФРФБ
ОКТ3
10 мкг всего Ab покрытие

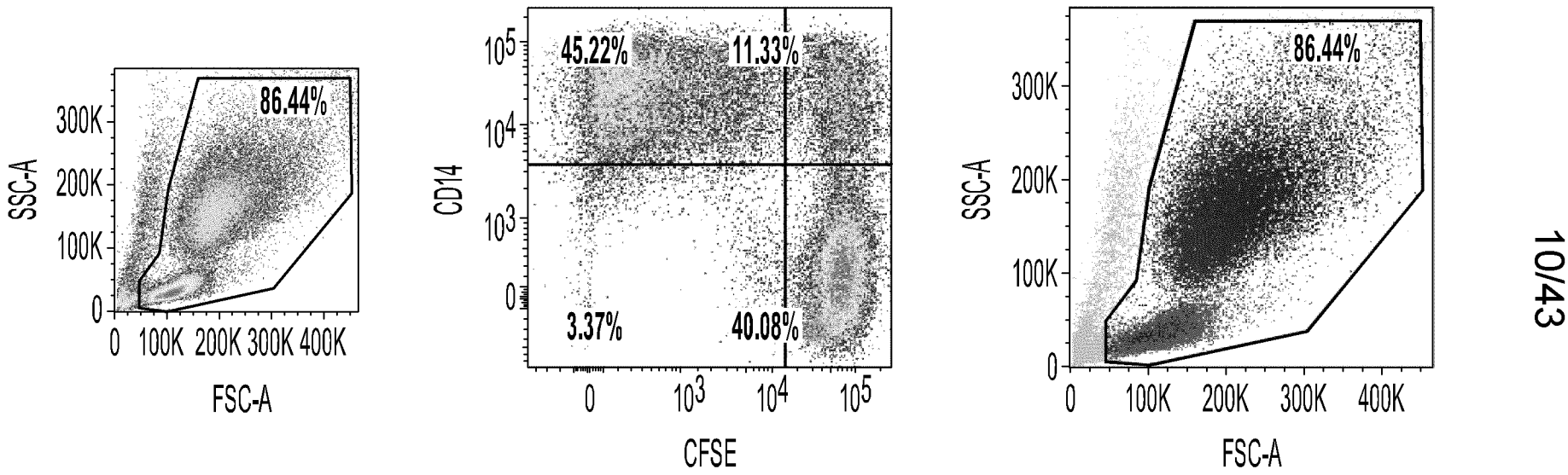
ФИГ. 3C


Складывание в ФРФБ
50
40
30
20
10
0
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Ab1 ДТ
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C
Ab1 D265C EPLVLAdelG H435A
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
ФРФБ
ОКТ3
10 мкг всего Ab покрытие

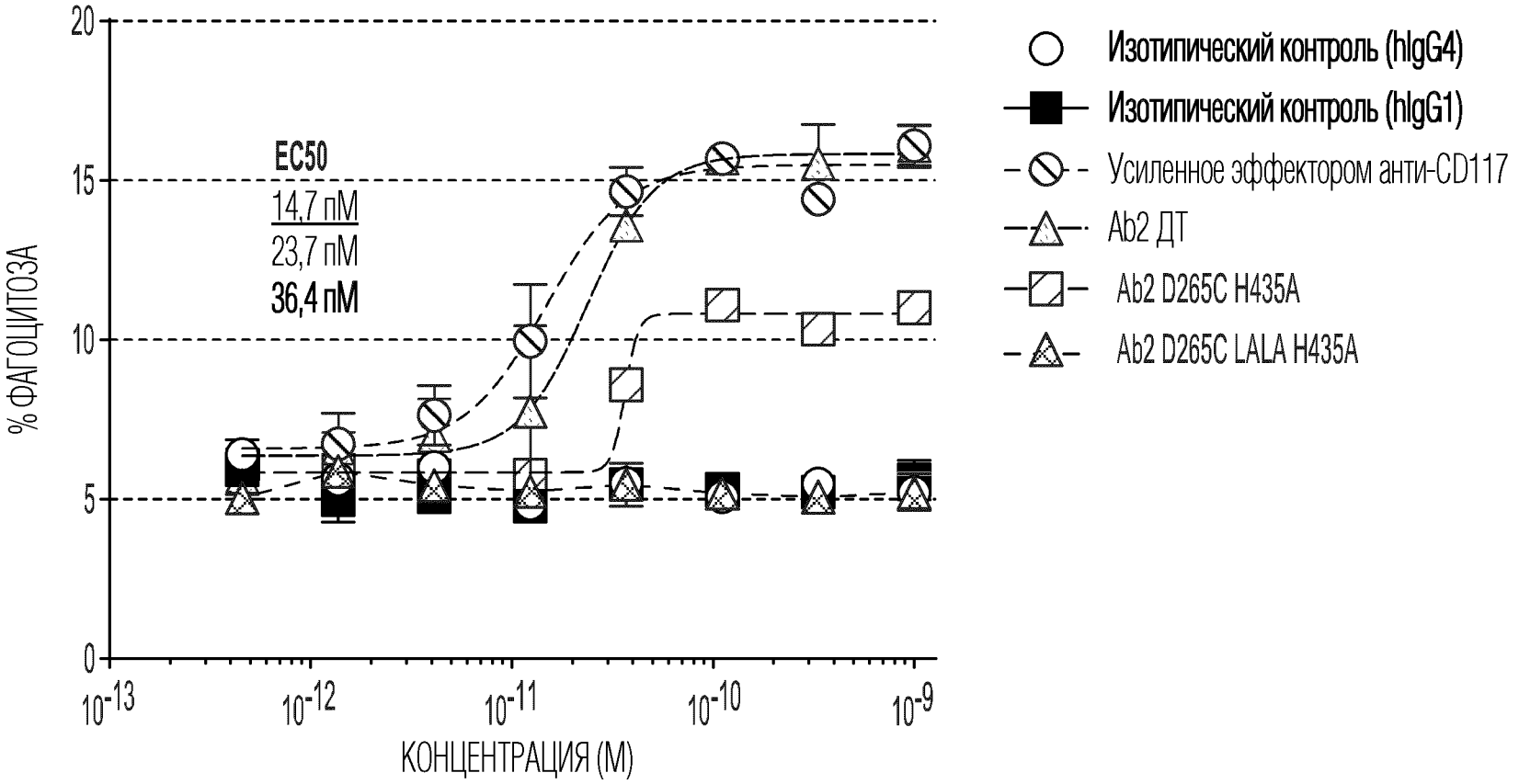
ФИГ. 3D


Складывание в ФРФБ
120
100
80
60
40
20
0
Сухой
Влажный
Раствор
Ab5 ДТ
Ab5 D265C.H435A
Ab5 D265C.N297A.H435A
Ab5 LALA.P329G
Ab5 EPILVLAdelG
Ab5 LALA.P331G
Ab5 D265A.H435A
Ab5 D265C.LALA.P331G.H435A
Ab5 CH2 делеция
Ab5 D265A
Ab5 LALA
Ab5 D265A.LALA
YTH24.5 hIgG2b
YTH24.5 hIgG1/4
Ab4 ДТ
Ab4 D265C.N297A.H435A
Ab4 D265A.H435A
Ab4 D265C.H435A ADC1
Ab5 ADC1
Ab5 D265C.H435A ADC1
hIgG1 изотип
OKT3
Алемтузумаб
ФРФБ
10 мкг всего Ab

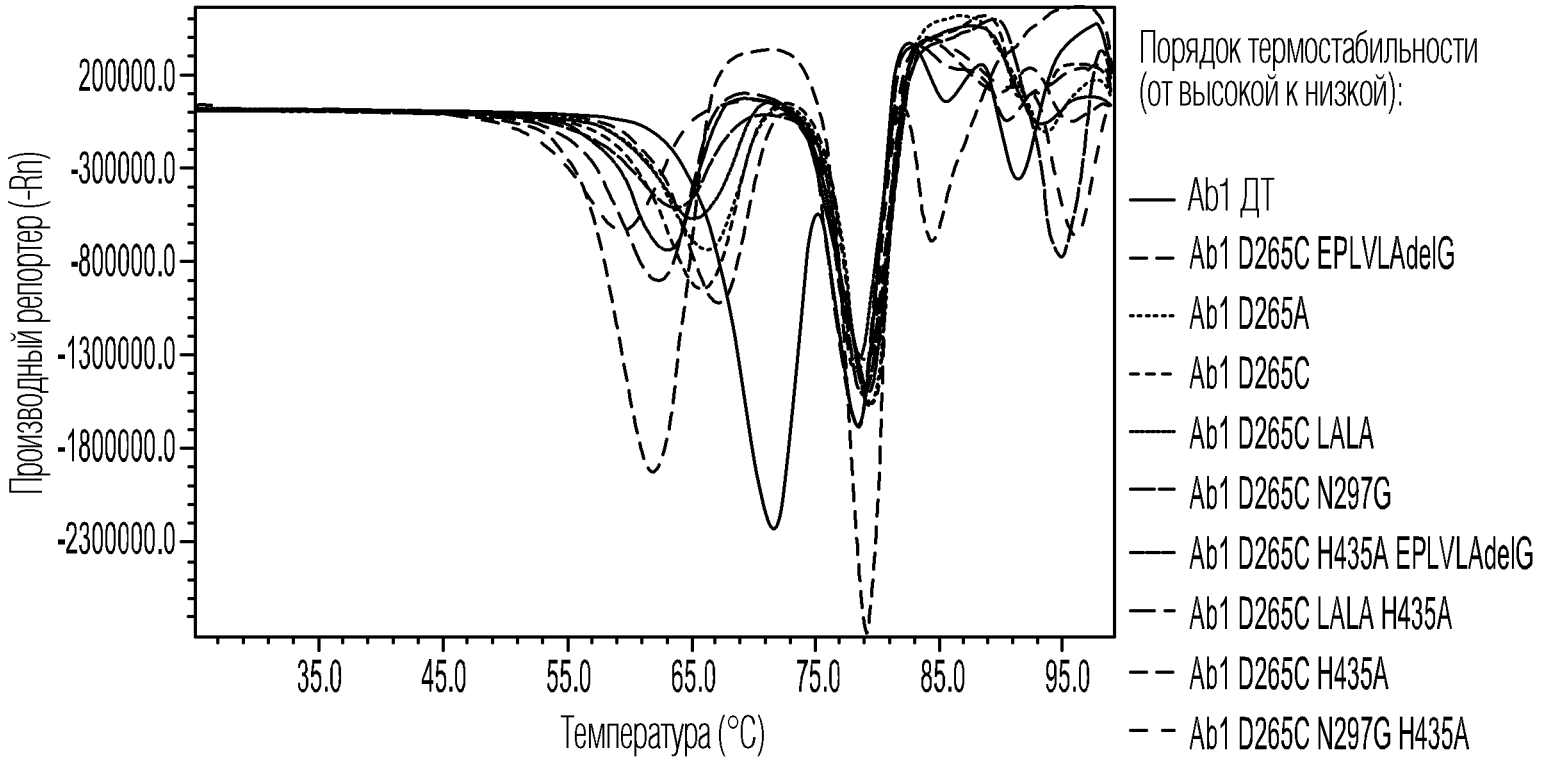
ФИГ. 3E


SSC-A
300K
200K
100K
0
86.44%
0 100K 200K 300K 400K
FSC-A
CD14
10^5
10^4
10^3
0
45.22%
11.33%
3.37%
40.08%
0 10^3 10^4 10^5
CFSE
SSC-A
300K
200K
100K
0
86.44%
0 100K 200K 300K 400K
FSC-A

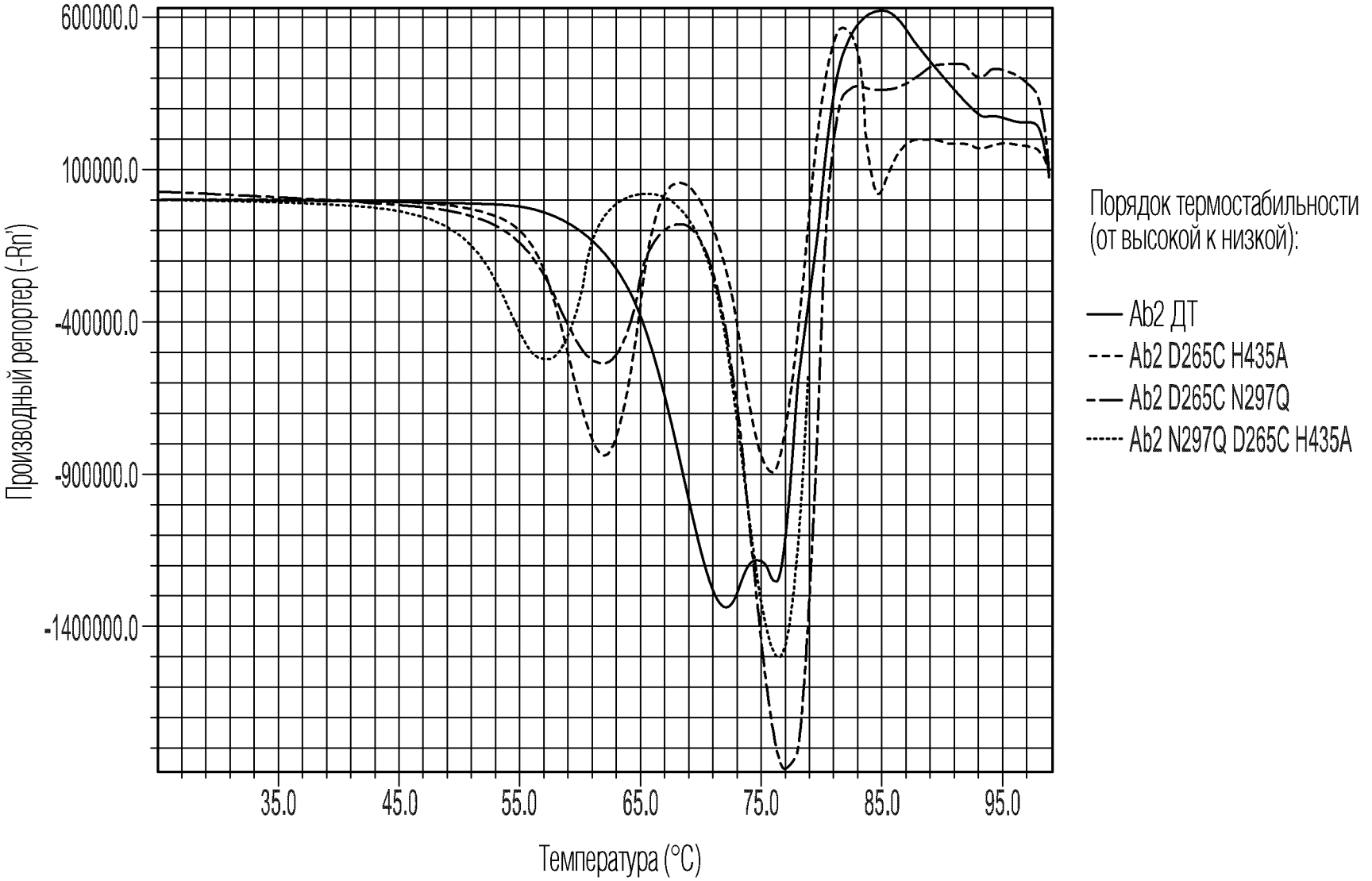
ФИГ. 4А


20
15
10
5
0
% ФАГОЦИТОЗА
EC50
14,7 пМ
23,7 пМ
36,4 пМ
10^{-13}
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
КОНЦЕНТРАЦИЯ (М)
Изотипический контроль (hIgG4)
Изотипический контроль (hIgG1)
Усиленное эффектором анти-CD117
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C LALA H435A

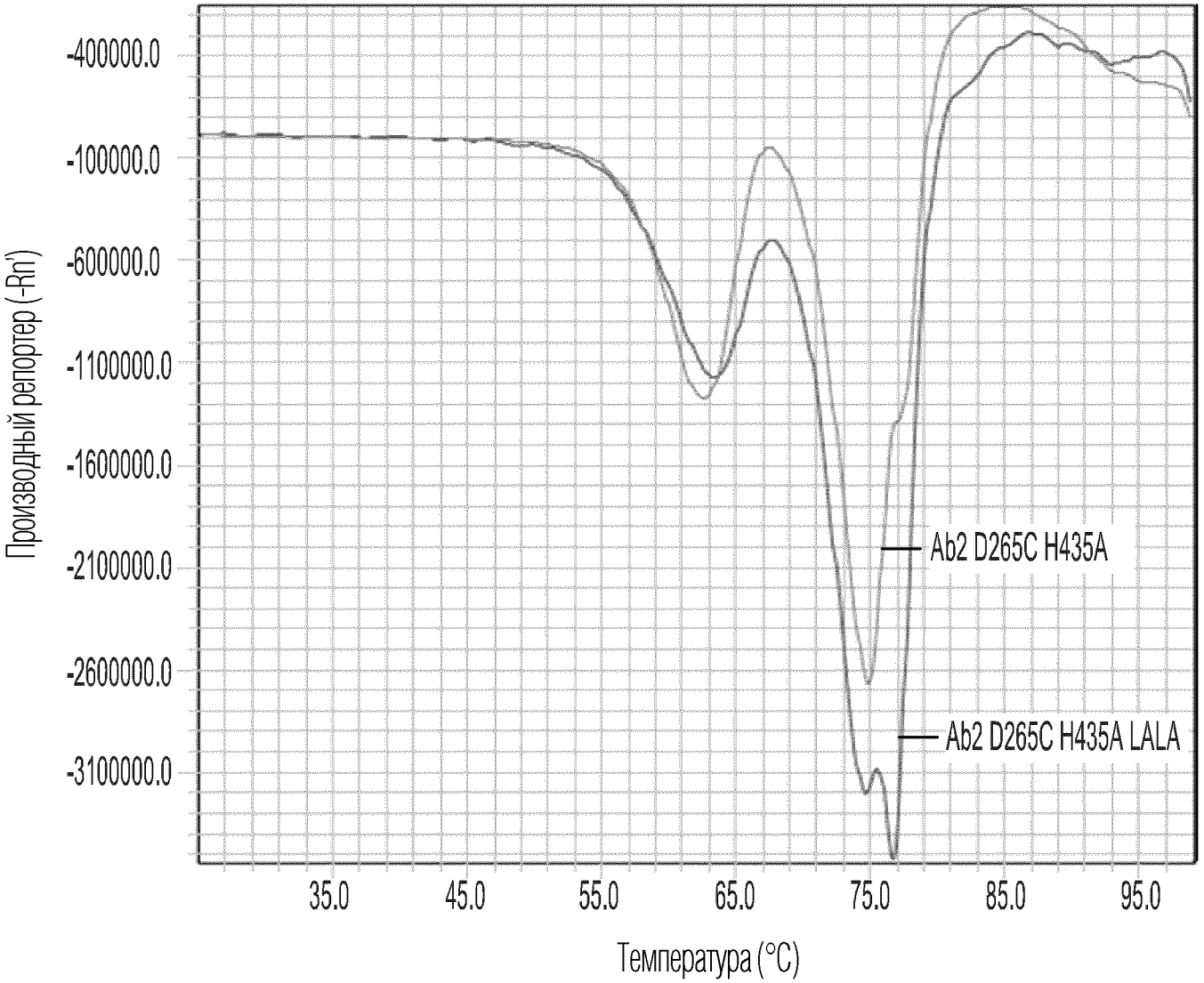
ФИГ. 4B


Производный репортер (-Rn)
200000.0
-300000.0
-800000.0
-1300000.0
-1800000.0
-2300000.0
35.0
45.0
55.0
65.0
75.0
85.0
95.0
Температура (°C)
Порядок термостабильности
(от высокой к низкой):
Ab1 ДТ
Ab1 D265C EPLVLAdelG
Ab1 D265A
Ab1 D265C
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C H435A EPLVLAdelG
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C N297G H435A

ФИГ. 5A


600000.0
100000.0
-400000.0
-900000.0
-1400000.0
Производный репортер (-Rn')
35.0
45.0
55.0
65.0
75.0
85.0
95.0
Температура (°C)
Порядок термостабильности
(от высокой к низкой):
Ab2 ДТ
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C N297Q
Ab2 N297Q D265C H435A

ФИГ. 5B


-400000.0
-100000.0
-600000.0
-1100000.0
-1600000.0
-2100000.0
-2600000.0
-3100000.0
Производный репортер (-Rn')
35.0
45.0
55.0
65.0
75.0
85.0
95.0
Температура (°C)
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A LALA

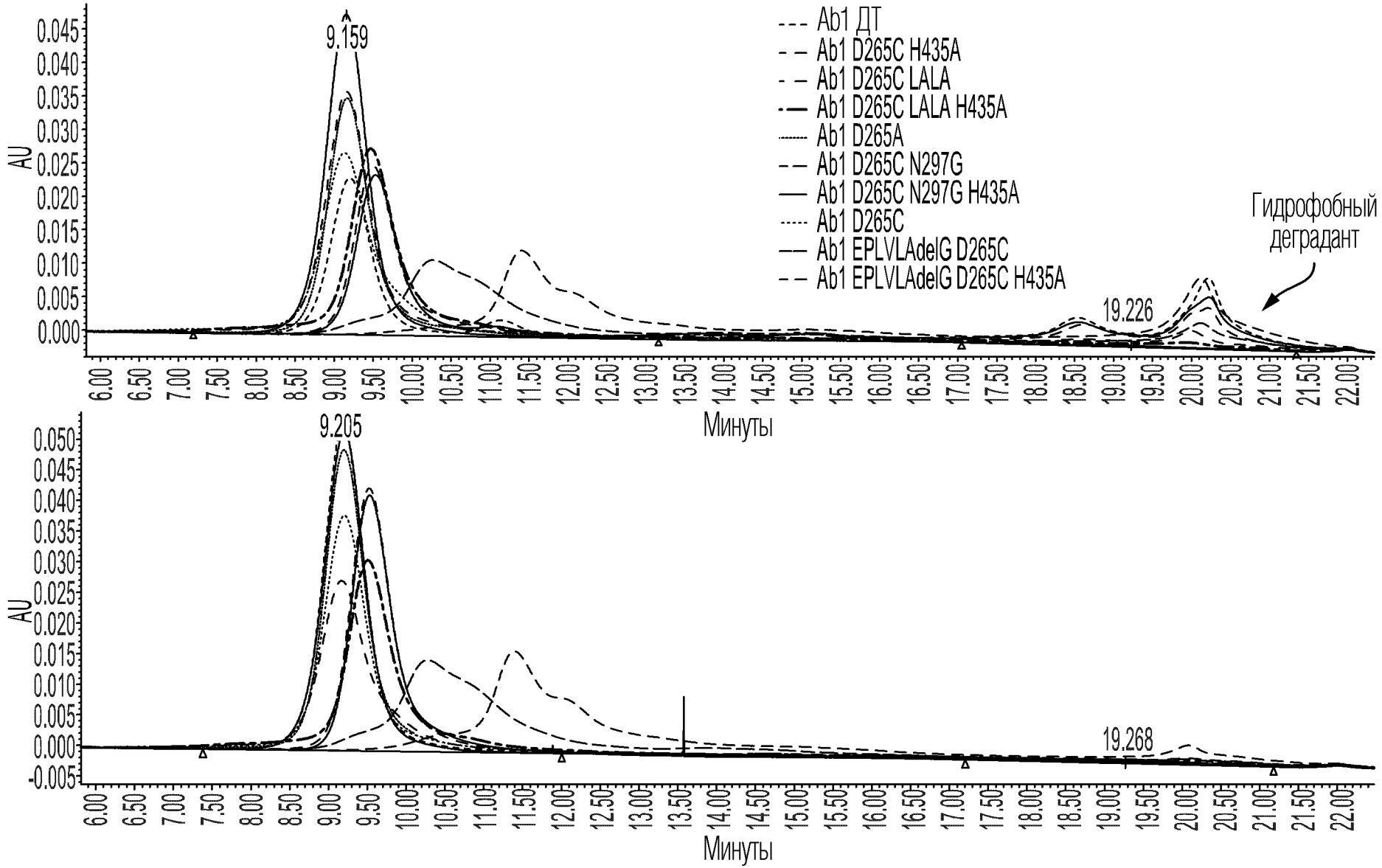
ФИГ. 5C

Антитело	Tm1(CH2 Развертывание)	Tm 2 (Fab/CH3 Развертывание)
Ab1 ДТ	71.48	78.28
Ab1 D265C H435A	61.87	79.17
Ab1 D265C LALA	65.27	78.43
Ab1 D265C LALA H435A	62.31	78.28
Ab1 D265A	66.16	79.32
Ab1 D265C N297G	63.64	78.88
Ab1 D265C N297G H435A	59.50	78.88
Ab1 D265C	65.86	79.17
Ab1 D265C E233P.L234V.L235A.DelG236	67.19	78.73
Ab1 D265C H435A E233P.L234V.L235A.DelG236	62.90	79.17

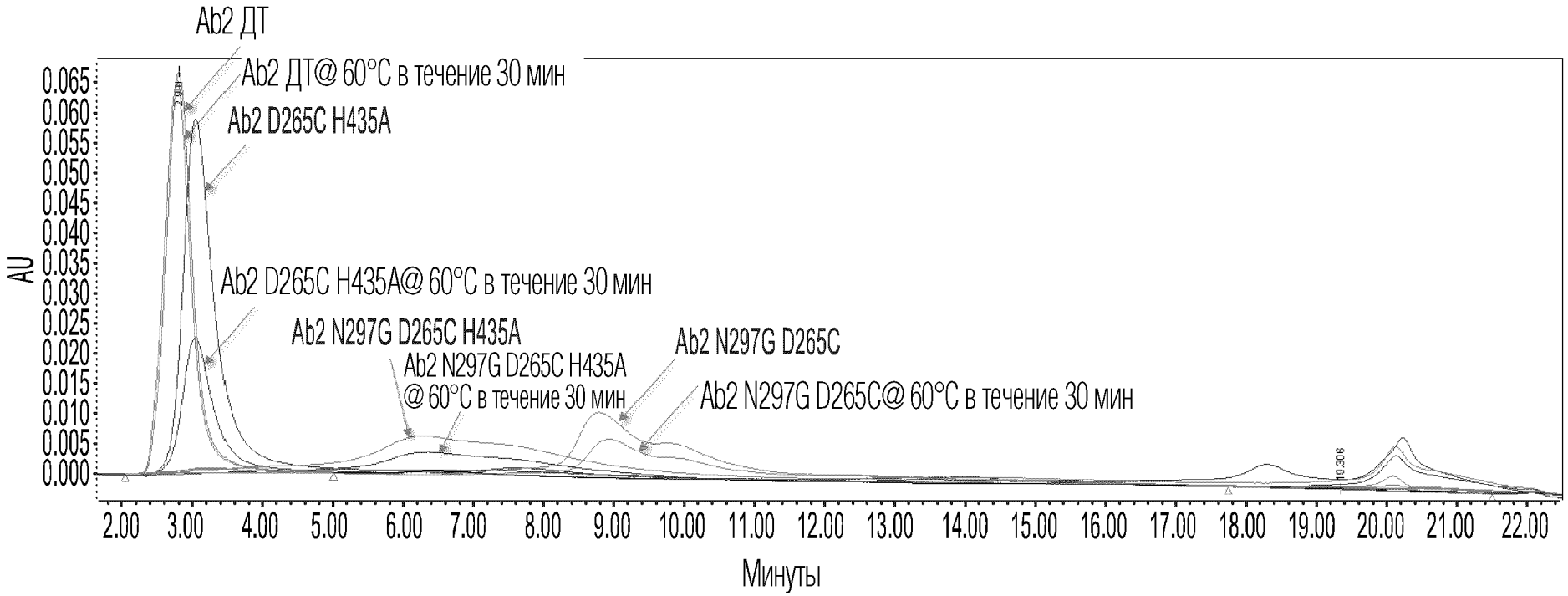
ФИГ. 6A

Антитело	Tm1(CH2 Развертывание)	Tm 2 (Fab/CH3 Развертывание)
Ab2 ДТ	72.07	-
Ab2 D265C N297Q H435A	57.14	76.36
Ab2 D265C N297Q	61.87	77.10
Ab2 D265C H435A	62.02	75.92
Ab2 D265C H435A LALA	63.33	76.06

ФИГ. 6B


Ab1 ДТ
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265A
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C
Ab1 EPLVLAdelG D265C
Ab1 EPLVLAdelG D265C H435A
9.159
19.226
Гидрофобный деградант
AU
Минуты
9.205
19.268
AU
Минуты

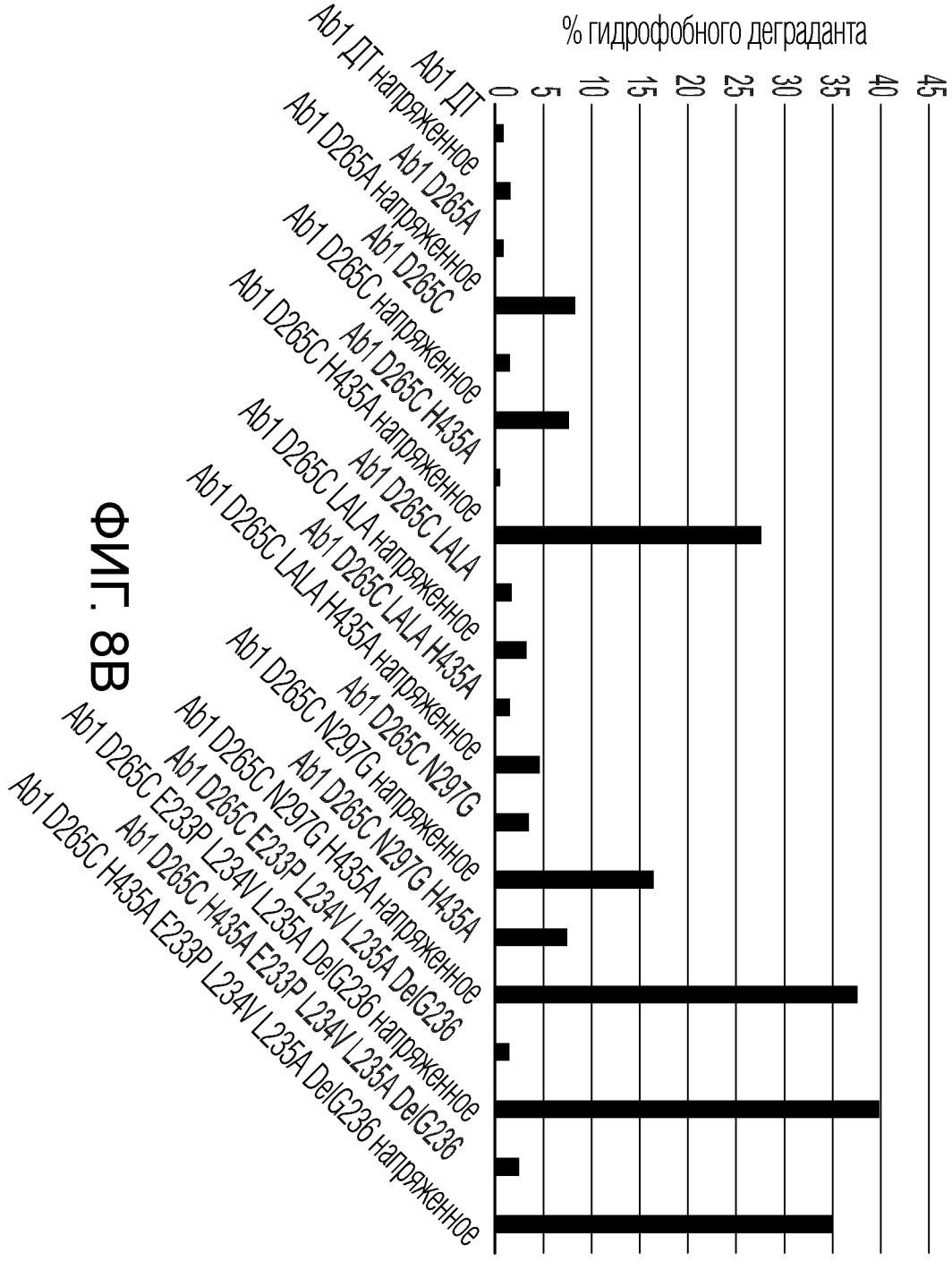
ФИГ. 7А


Ab2 ДТ
Ab2 ДТ@ 60°C в течение 30 мин
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A@ 60°C в течение 30 мин
Ab2 N297G D265C H435A
Ab2 N297G D265C H435A
@ 60°C в течение 30 мин
Ab2 N297G D265C
Ab2 N297G D265C@ 60°C в течение 30 мин
AU
0.065
0.060
0.055
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
19.308
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
Минуты

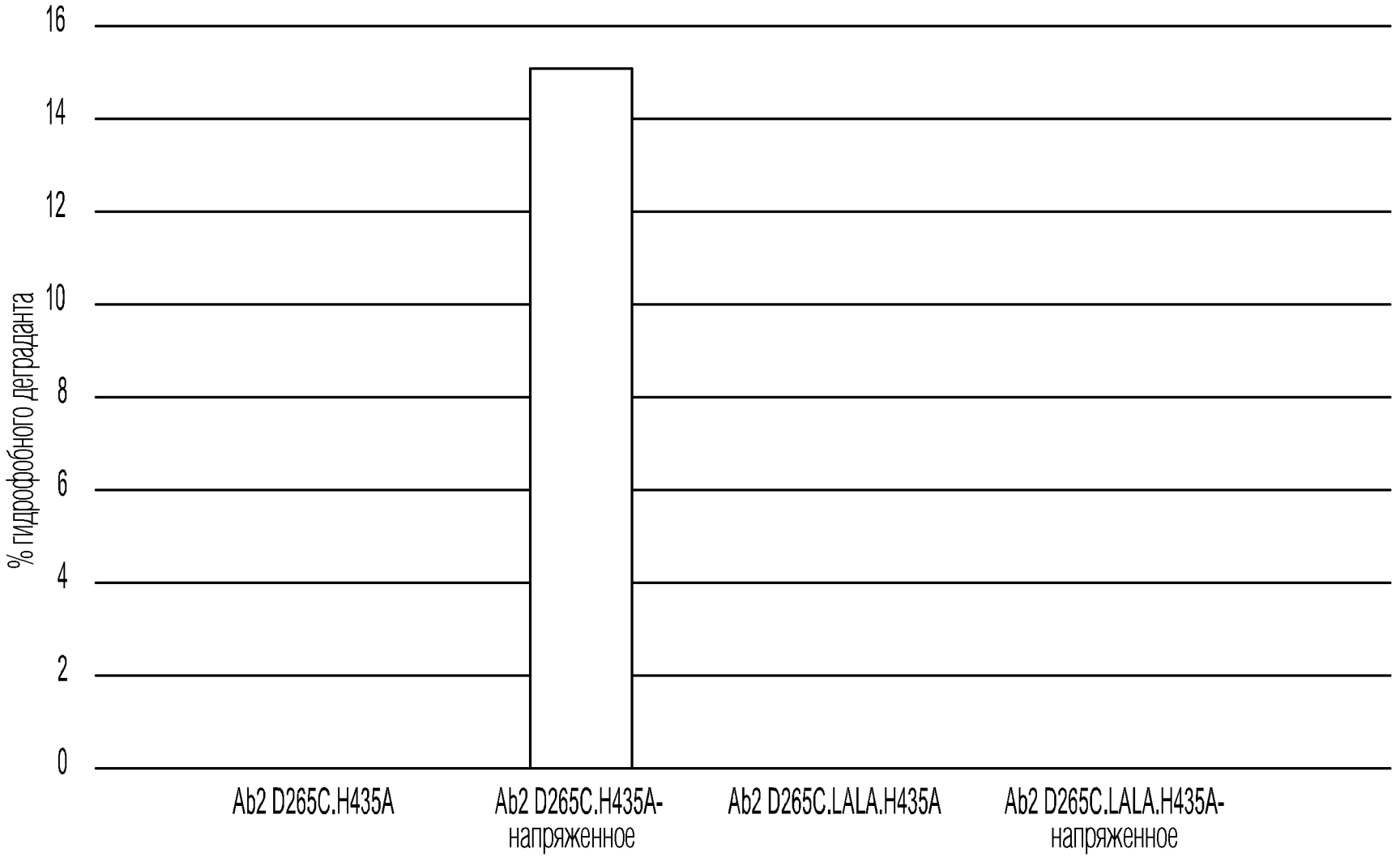
ФИГ. 7B

120
100
80
60
40
20
0
% ОСНОВНОГО ПИКА
Ab1 ДТ
Ab1 ДТ напряженное
Ab1 D265A
Ab1 D265A напряженное
Ab1 D265C
Ab1 D265C напряженное
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C H435A напряженное
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA напряженное
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C LALA H435A напряженное
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G напряженное
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C N297G H435A напряженное
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236 напряженное
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236 напряженное

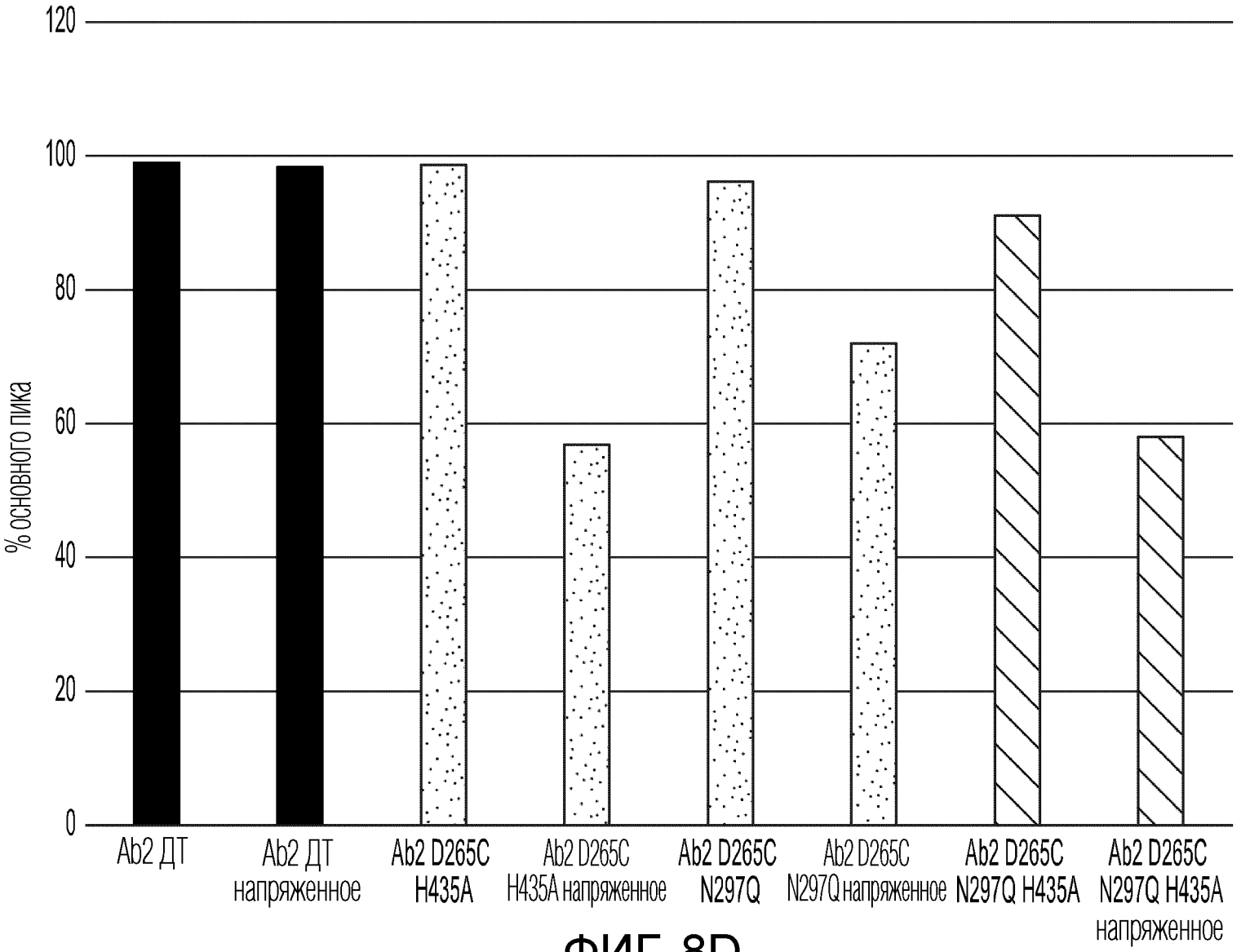
ФИГ. 8A


% гидрофобного деградата
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Ab1 ДТ
Ab1 ДТ напряженное
Ab1 D265A
Ab1 D265A напряженное
Ab1 D265C
Ab1 D265C напряженное
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C H435A напряженное
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA напряженное
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C LALA H435A напряженное
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G напряженное
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C N297G H435A напряженное
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236 напряженное
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236 напряженное

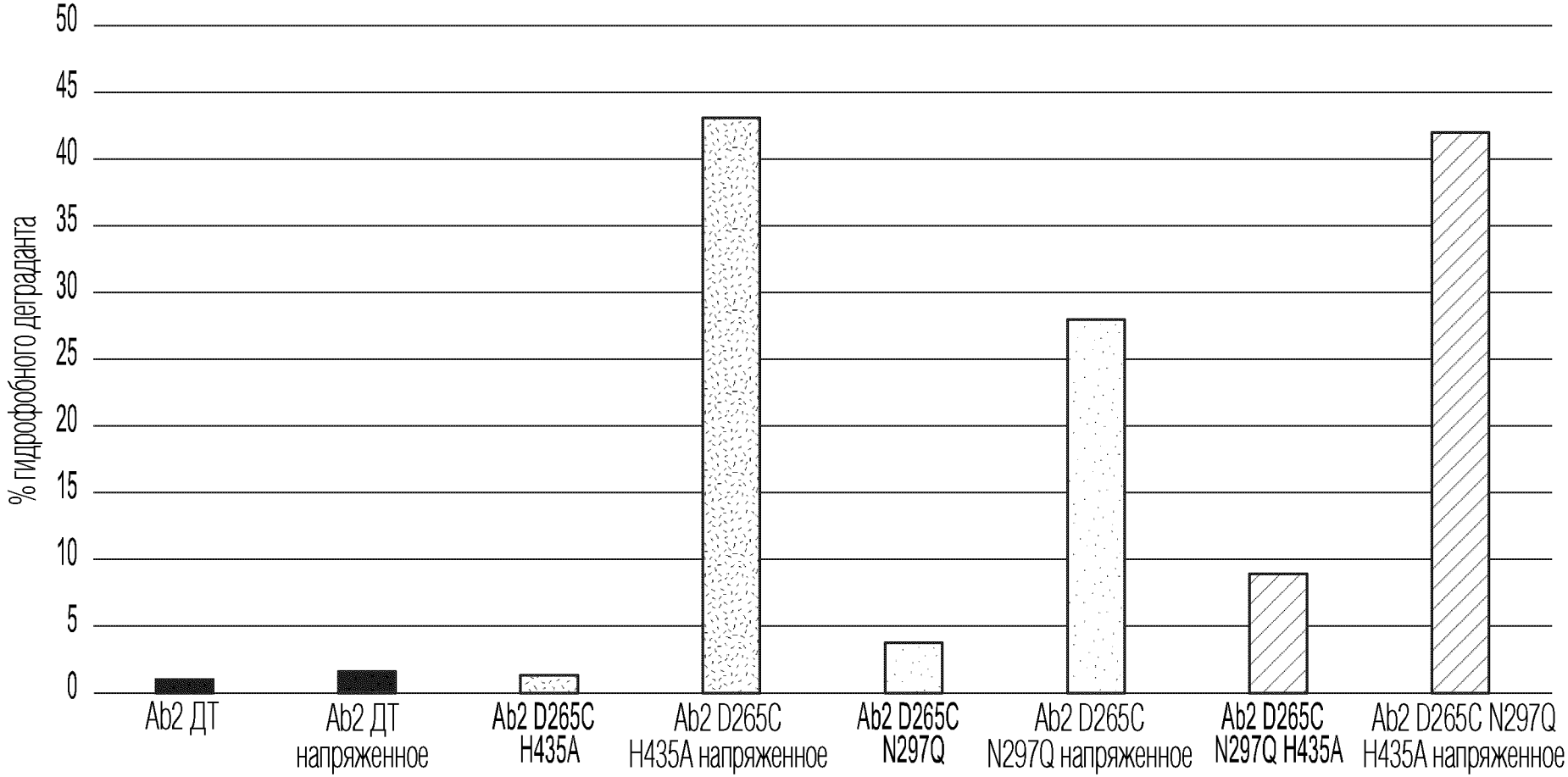
ФИГ. 8В


% гидрофобного деграданта
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Ab2 D265C.H435A
Ab2 D265C.H435A-напряженное
Ab2 D265C.LALA.H435A
Ab2 D265C.LALA.H435A-напряженное

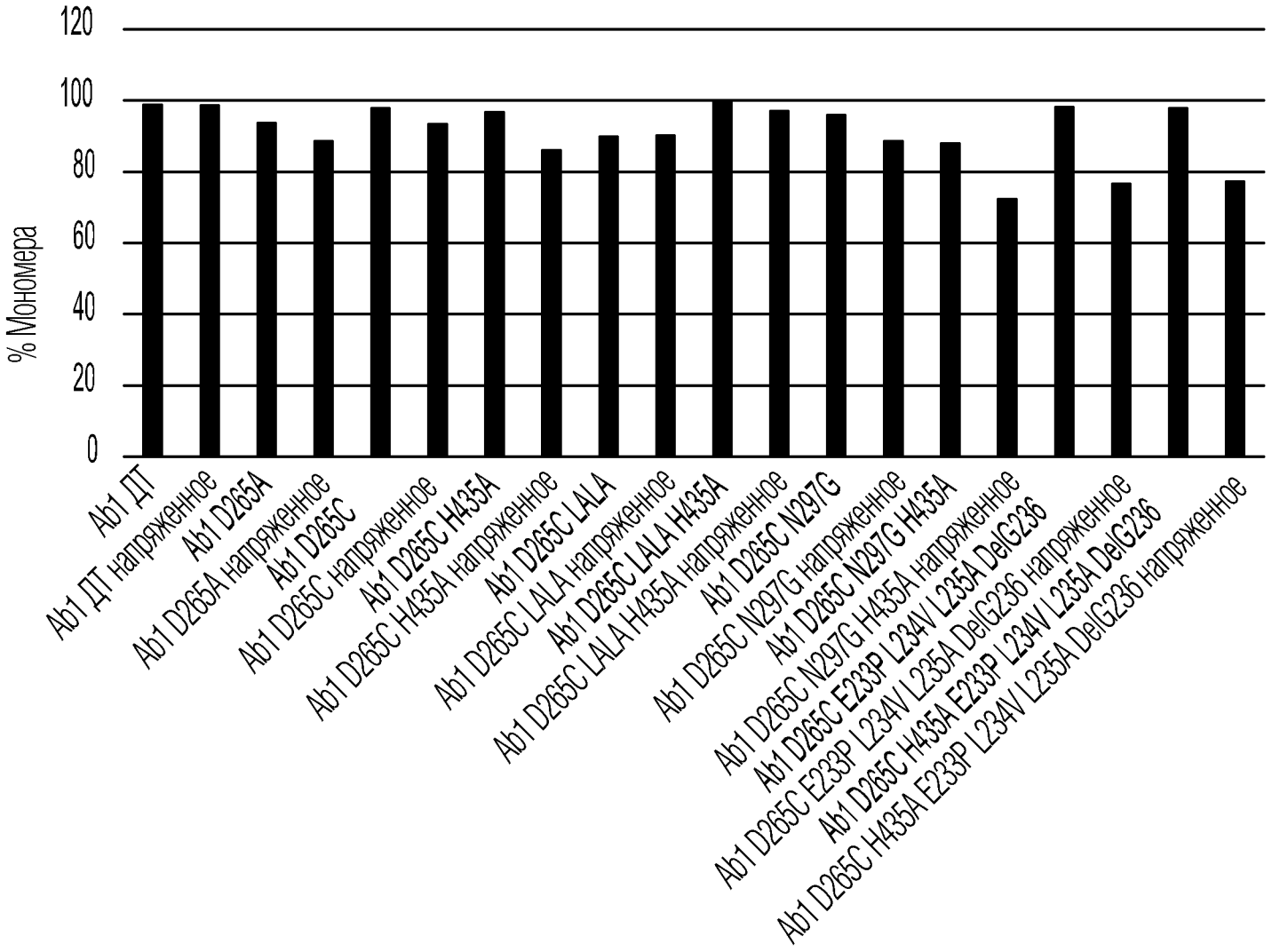
ФИГ. 8C


120
100
80
60
40
20
0
% ОСНОВНОГО ПИКА
Ab2 ДТ
Ab2 ДТ напряженное
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A напряженное
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C N297Q напряженное
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q H435A напряженное

ФИГ. 8D


% гидрофобного деграданта
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Ab2 ДТ
Ab2 ДТ напряженное
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A напряженное
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C N297Q напряженное
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q H435A напряженное

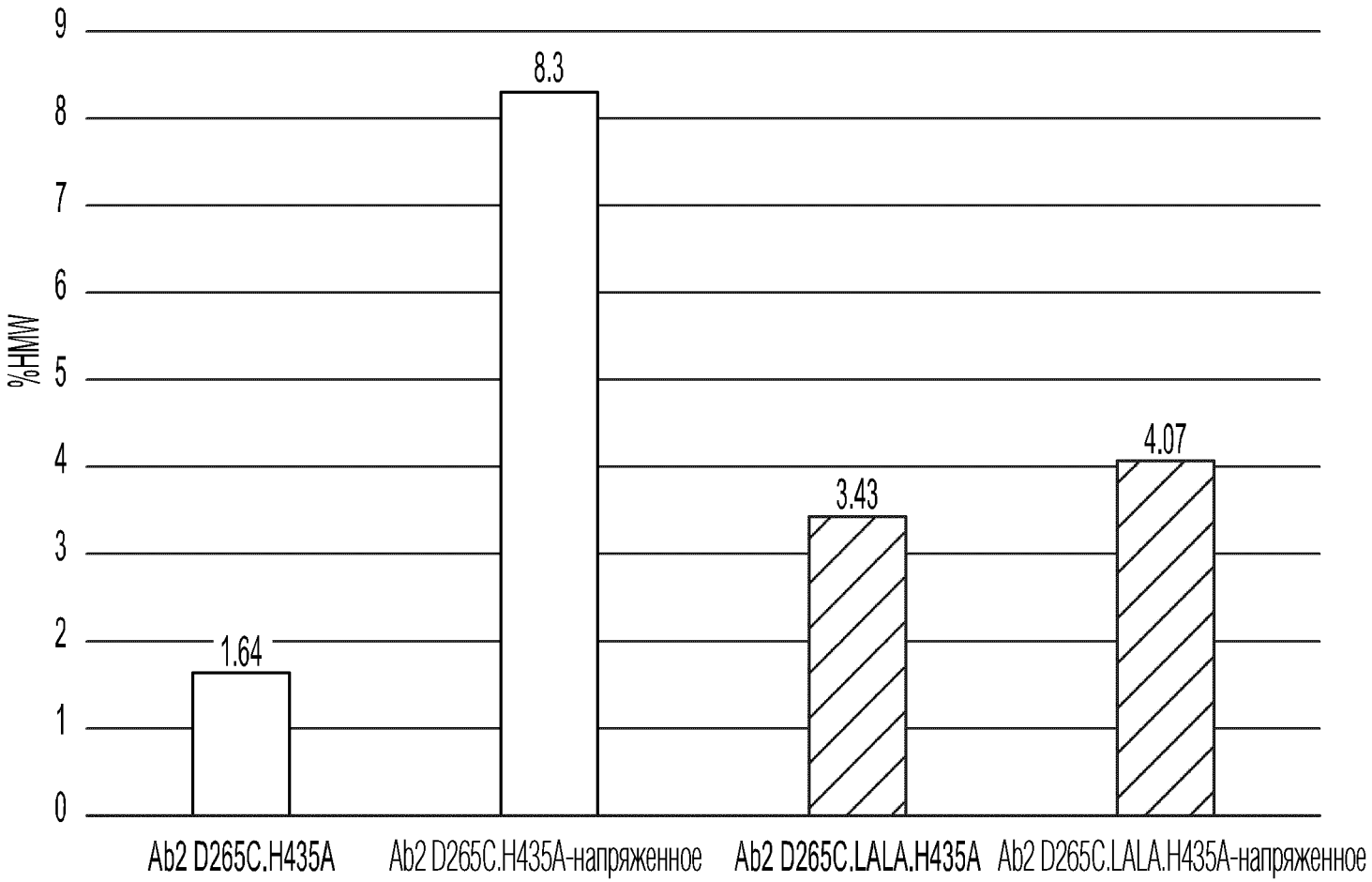
ФИГ. 8E


120
100
80
60
40
20
0
% Мономера
Ab1 ДТ
Ab1 ДТ напряженное
Ab1 D265A
Ab1 D265A напряженное
Ab1 D265C
Ab1 D265C напряженное
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C H435A напряженное
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA напряженное
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C LALA H435A напряженное
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G напряженное
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C N297G H435A напряженное
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236 напряженное
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236 напряженное

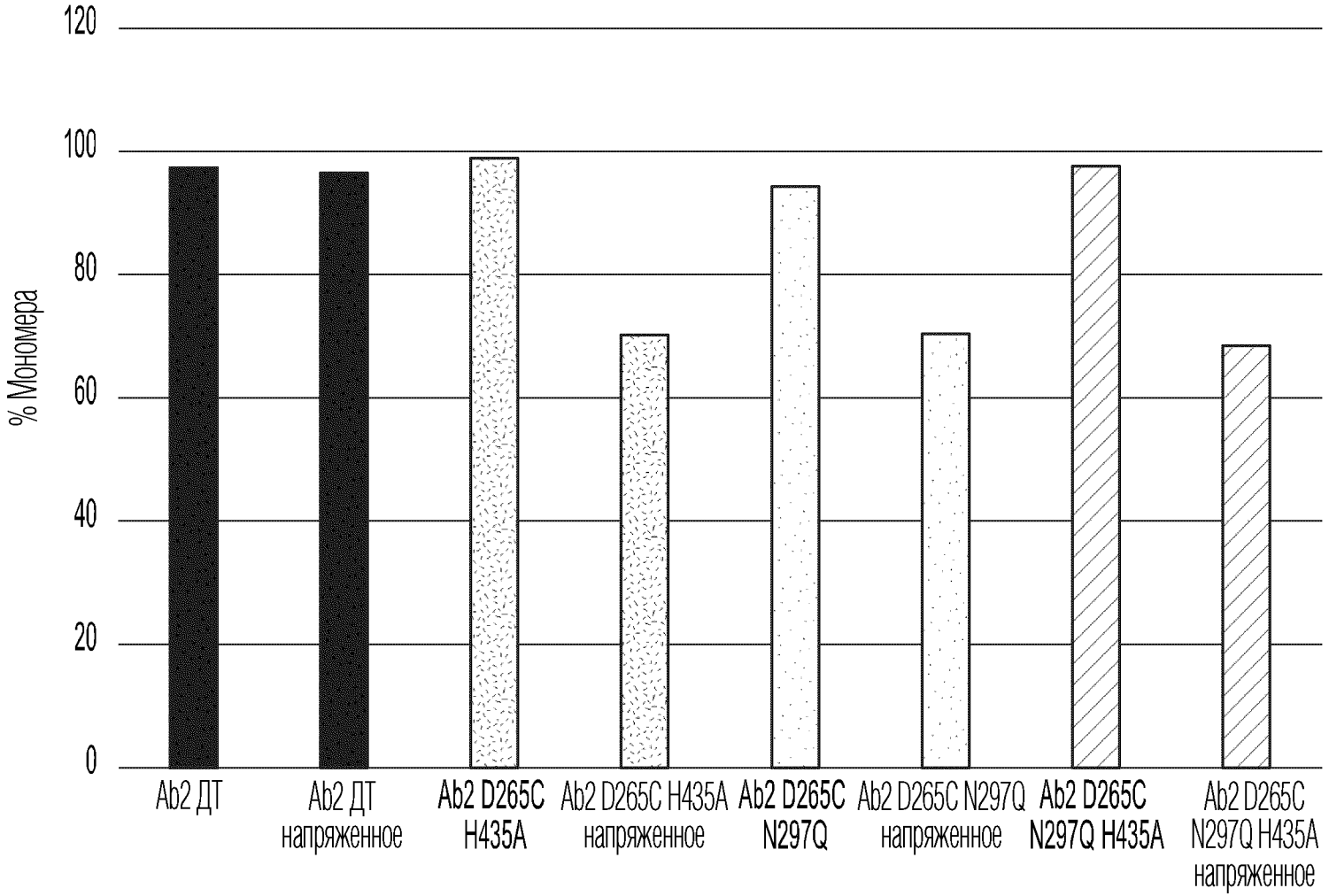
ФИГ. 9A

%HMW
30
25
20
15
10
5
0
Ab1 ДТ
Ab1 ДТ напряженное
Ab1 D265A
Ab1 D265A напряженное
Ab1 D265C
Ab1 D265C напряженное
Ab1 D265C H435A
Ab1 D265C H435A напряженное
Ab1 D265C LALA
Ab1 D265C LALA напряженное
Ab1 D265C LALA H435A
Ab1 D265C LALA H435A напряженное
Ab1 D265C N297G
Ab1 D265C N297G напряженное
Ab1 D265C N297G H435A
Ab1 D265C N297G H435A напряженное
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C E233P L234V L235A DelG236 напряженное
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236
Ab1 D265C H435A E233P L234V L235A DelG236 напряженное

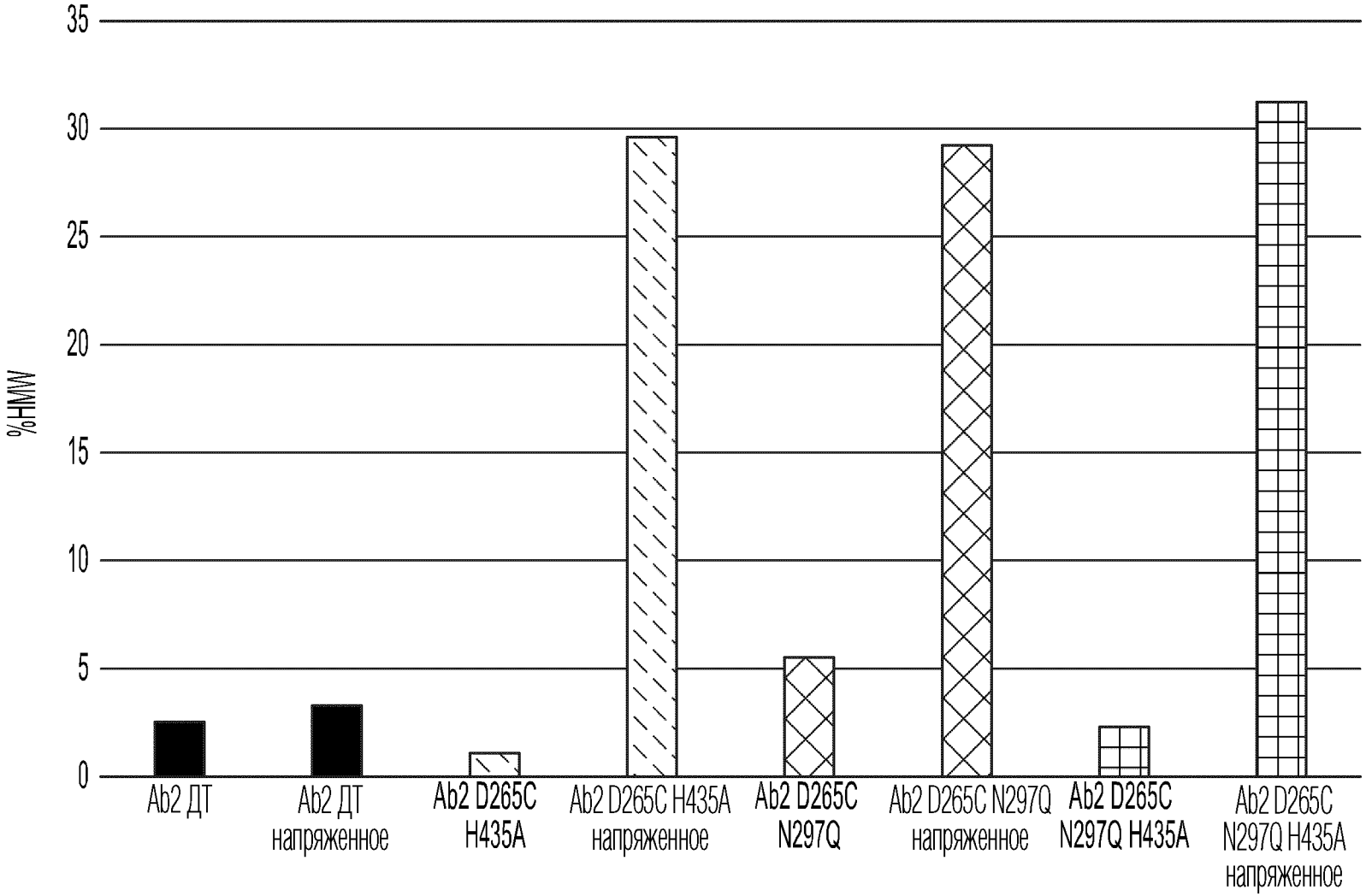
ФИГ. 9B


9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
%HMW
8.3
4.07
3.43
1.64
Ab2 D265C.H435A
Ab2 D265C.H435A-напряженное
Ab2 D265C.LALA.H435A
Ab2 D265C.LALA.H435A-напряженное

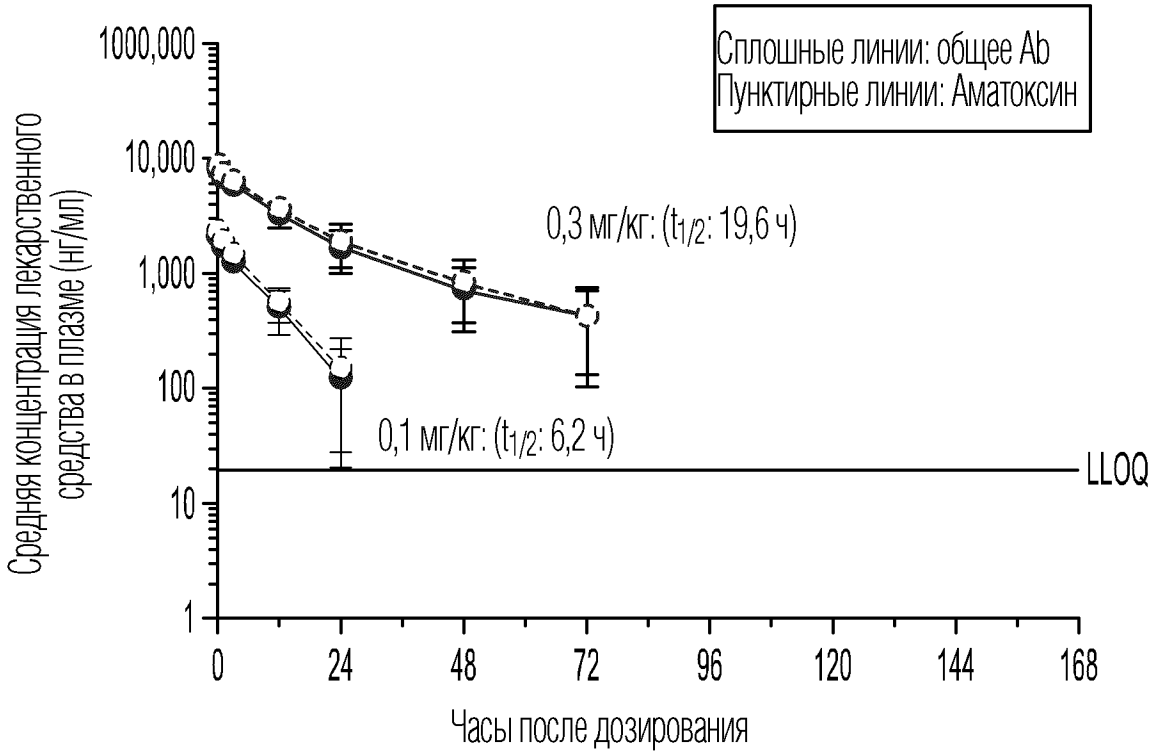
ФИГ. 9C


120
100
80
60
40
20
0
% Мономера
Ab2 ДТ
Ab2 ДТ напряженное
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A напряженное
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C N297Q напряженное
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q H435A напряженное

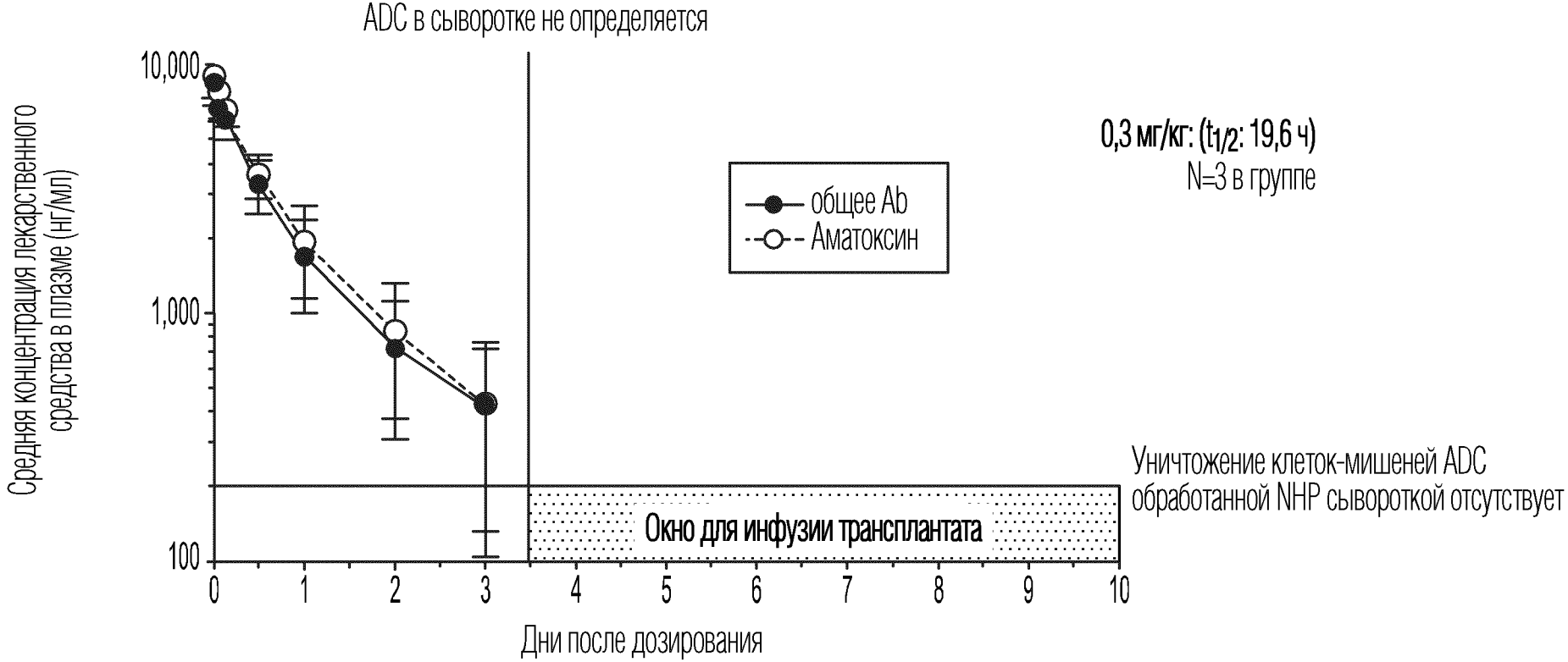
ФИГ. 9D


35
30
25
20
15
10
5
0
%MMH
Ab2 ДТ
Ab2 ДТ напряженное
Ab2 D265C H435A
Ab2 D265C H435A напряженное
Ab2 D265C N297Q
Ab2 D265C N297Q напряженное
Ab2 D265C N297Q H435A
Ab2 D265C N297Q H435A напряженное

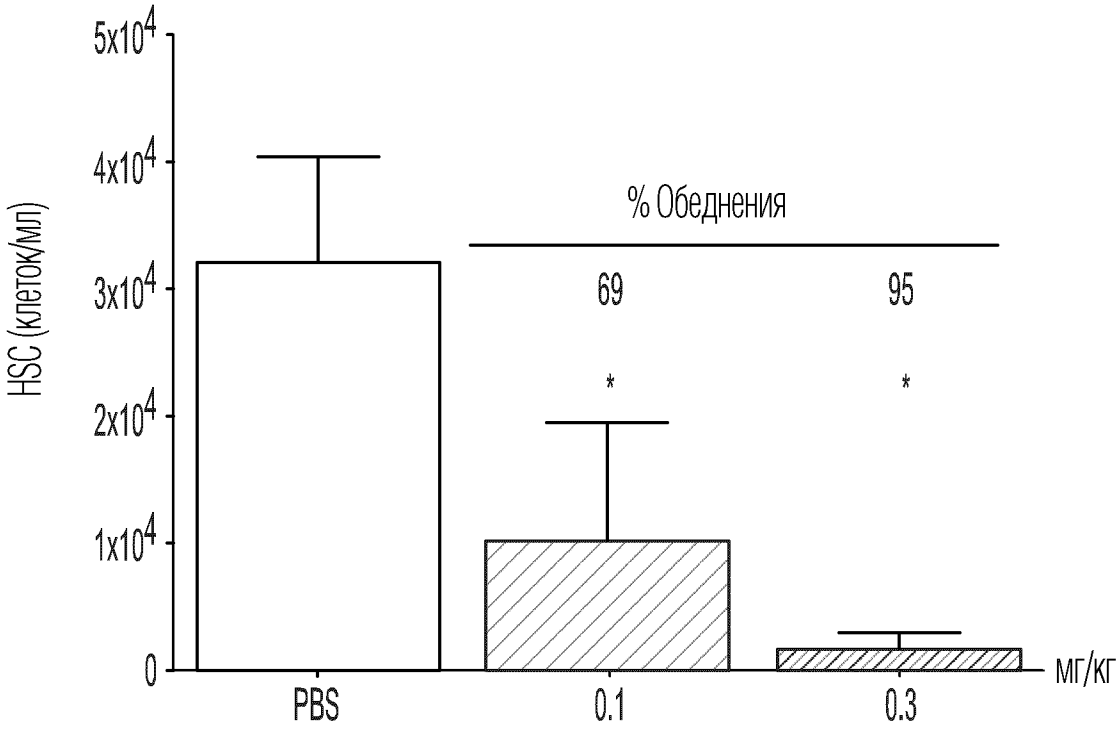
ФИГ. 9E


Сплошные линии: общее Ab
Пунктирные линии: Аматоксин
Средняя концентрация лекарственного средства в плазме (нг/мл)
1000,000
10,000
1,000
100
10
1
0,3 мг/кг: ($t_{1/2}$: 19,6 ч)
0,1 мг/кг: ($t_{1/2}$: 6,2 ч)
LLOQ
0
24
48
72
96
120
144
168
Часы после дозирования

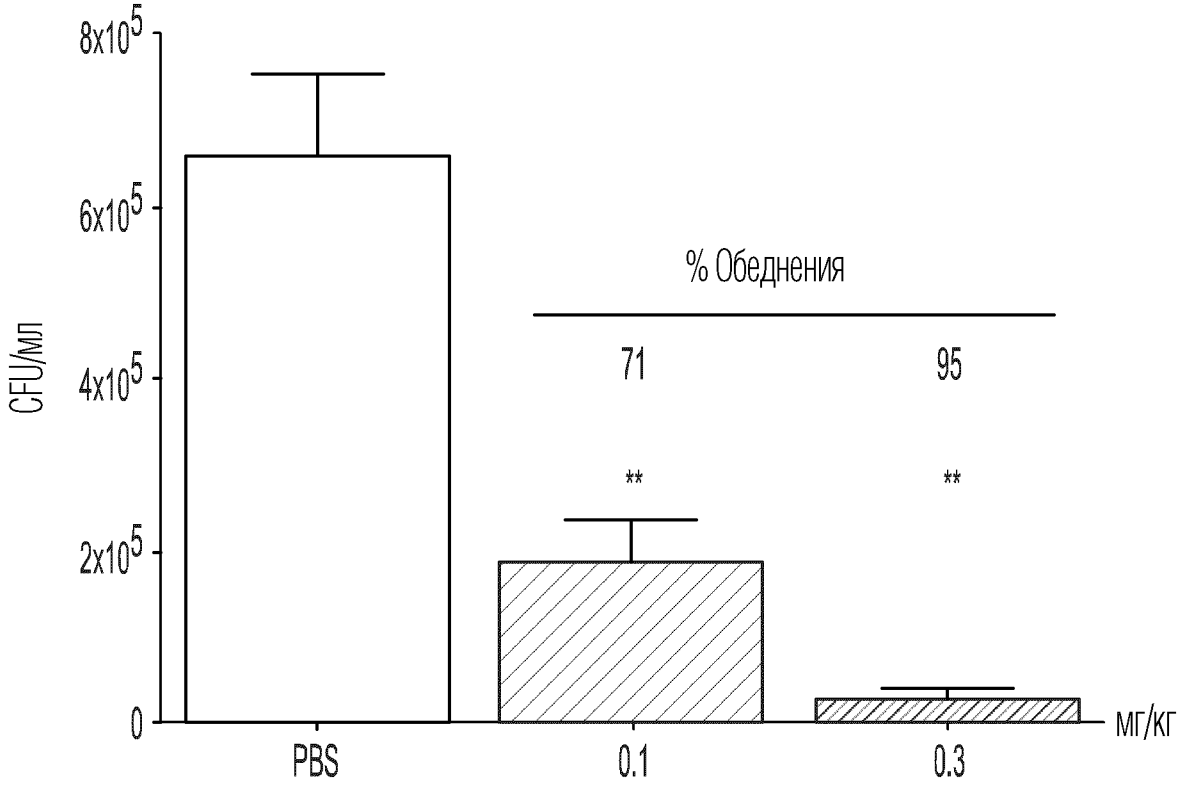
ФИГ. 10А


ADC в сыворотке не определяется
Средняя концентрация лекарственного средства в плазме (нг/мл)
10,000
1,000
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Дни после дозирования
общее Ab
Аматоксин
0,3 мг/кг: (t1/2: 19,6 ч)
N=3 в группе
Окно для инфузии трансплантата
Уничтожение клеток-мишеней ADC обработанной NHP сывороткой отсутствует

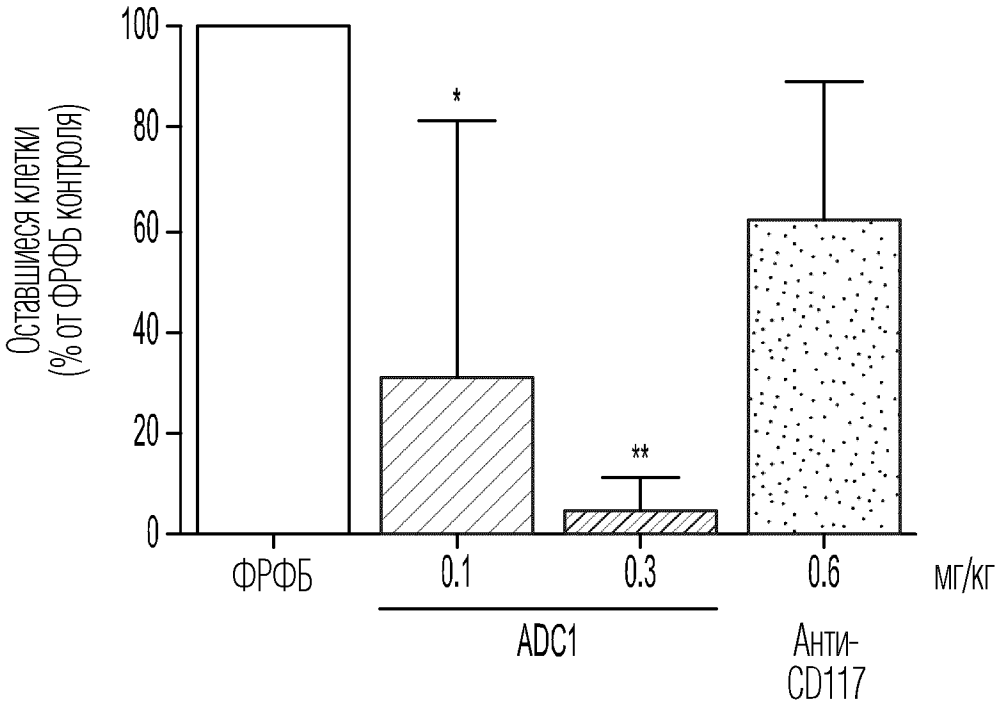
ФИГ. 10B


5x10^4
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
0
HSC (клеток/мл)
% Обеднения
69
95
*
*
PBS
0.1
0.3
мг/кг

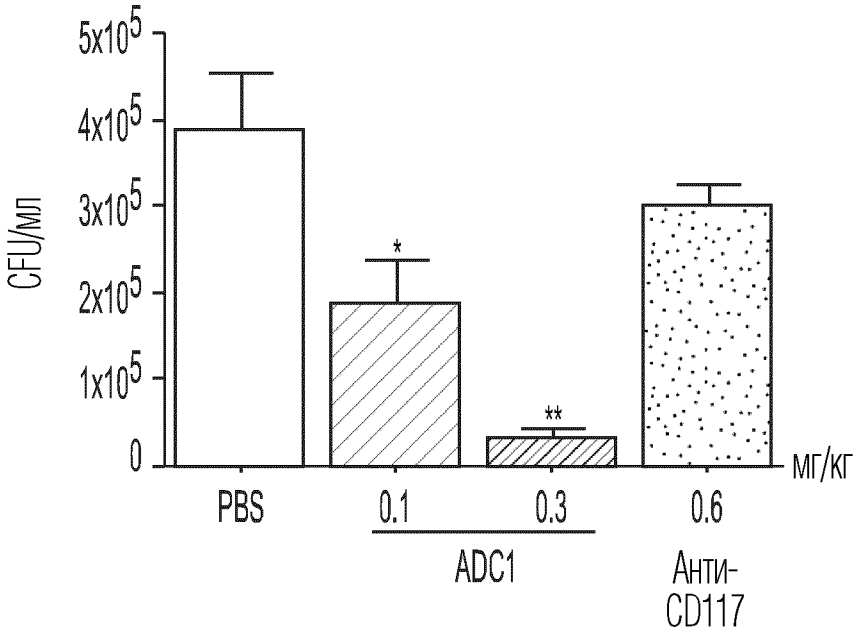
ФИГ. 11А


8x10^5
6x10^5
4x10^5
2x10^5
0
CFU/мл
% Обеднения
71
95
**
**
PBS
0.1
0.3
мг/кг

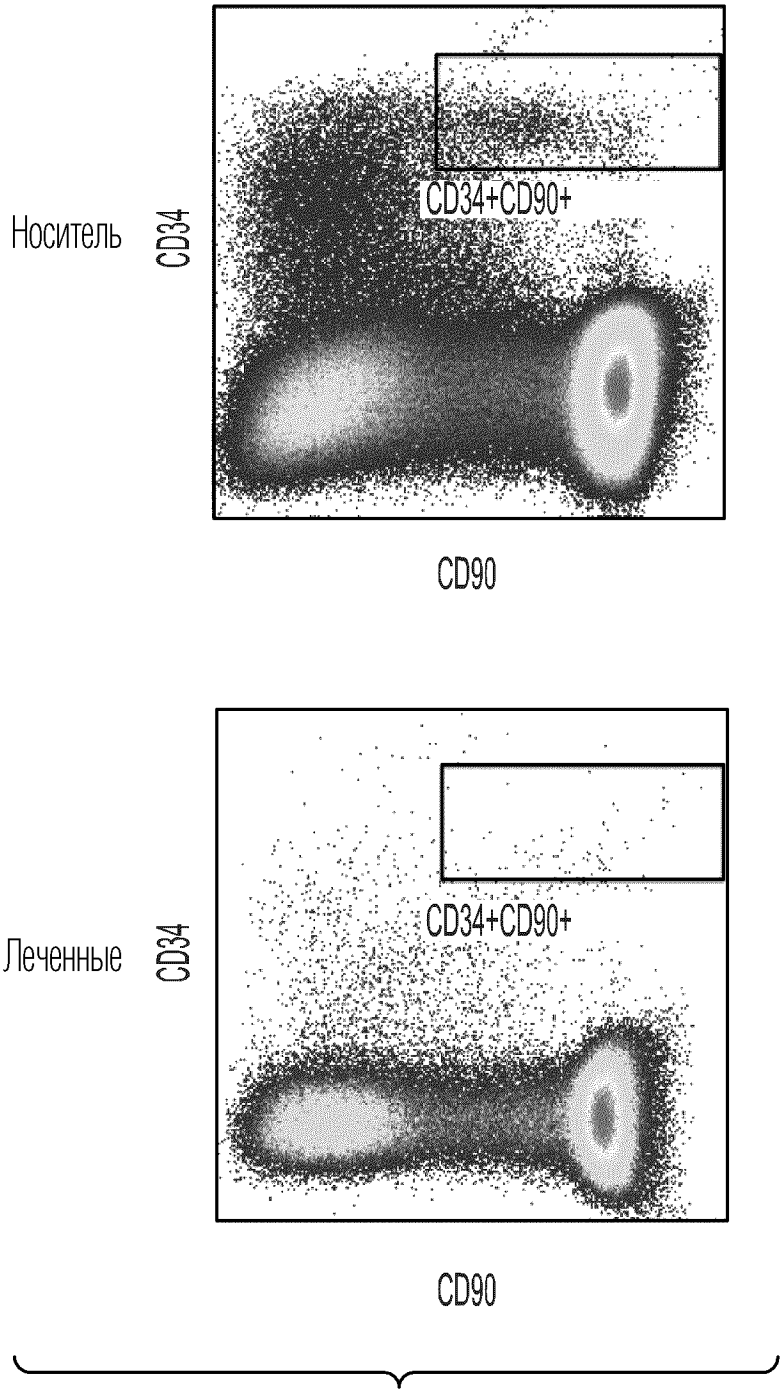
ФИГ. 11B


Оставшиеся клетки
(% от ФРФБ контроля)
100
80
60
40
20
0
*
**
ФРФБ
0.1
0.3
0.6
мг/кг
ADC1
Анти-
CD117

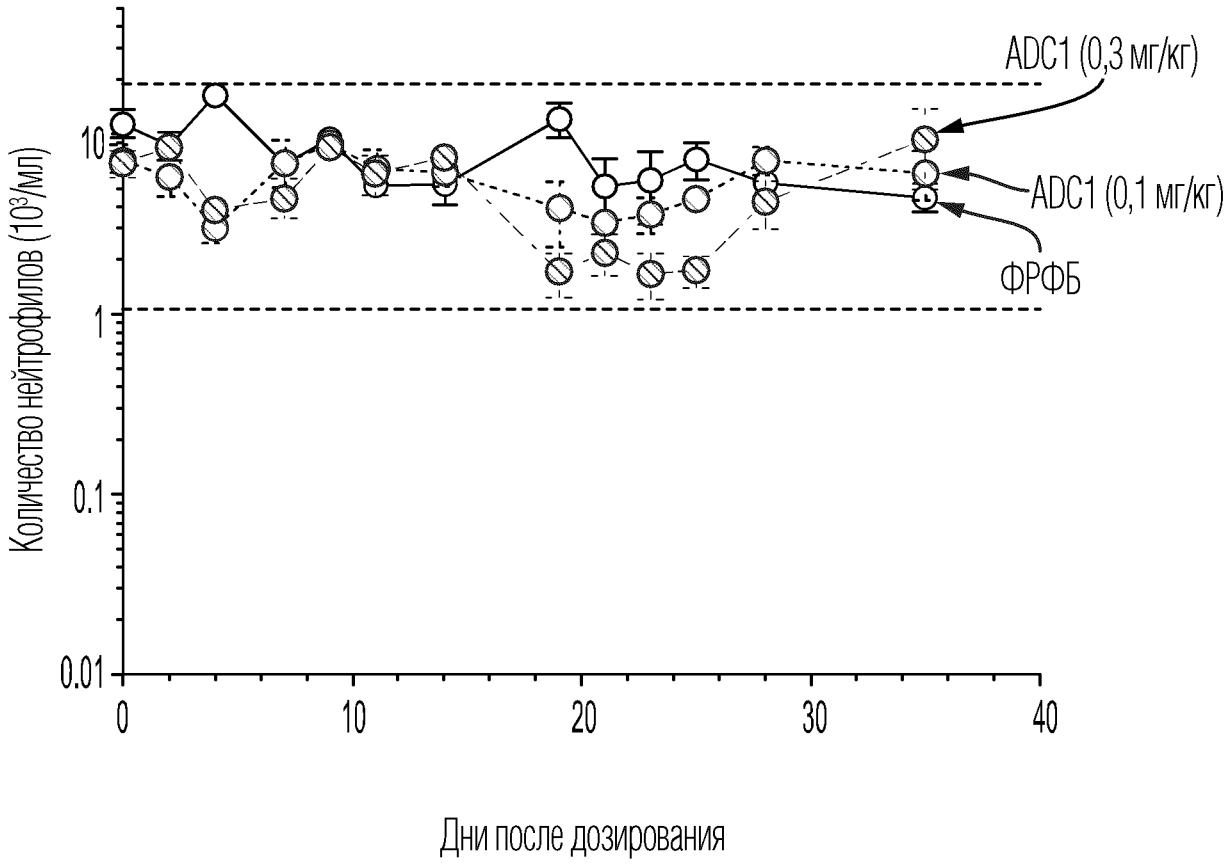
ФИГ. 11C


5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
CFU/мл
*
**
PBS
0.1
0.3
0.6
мг/кг
ADC1
Анти-
CD117

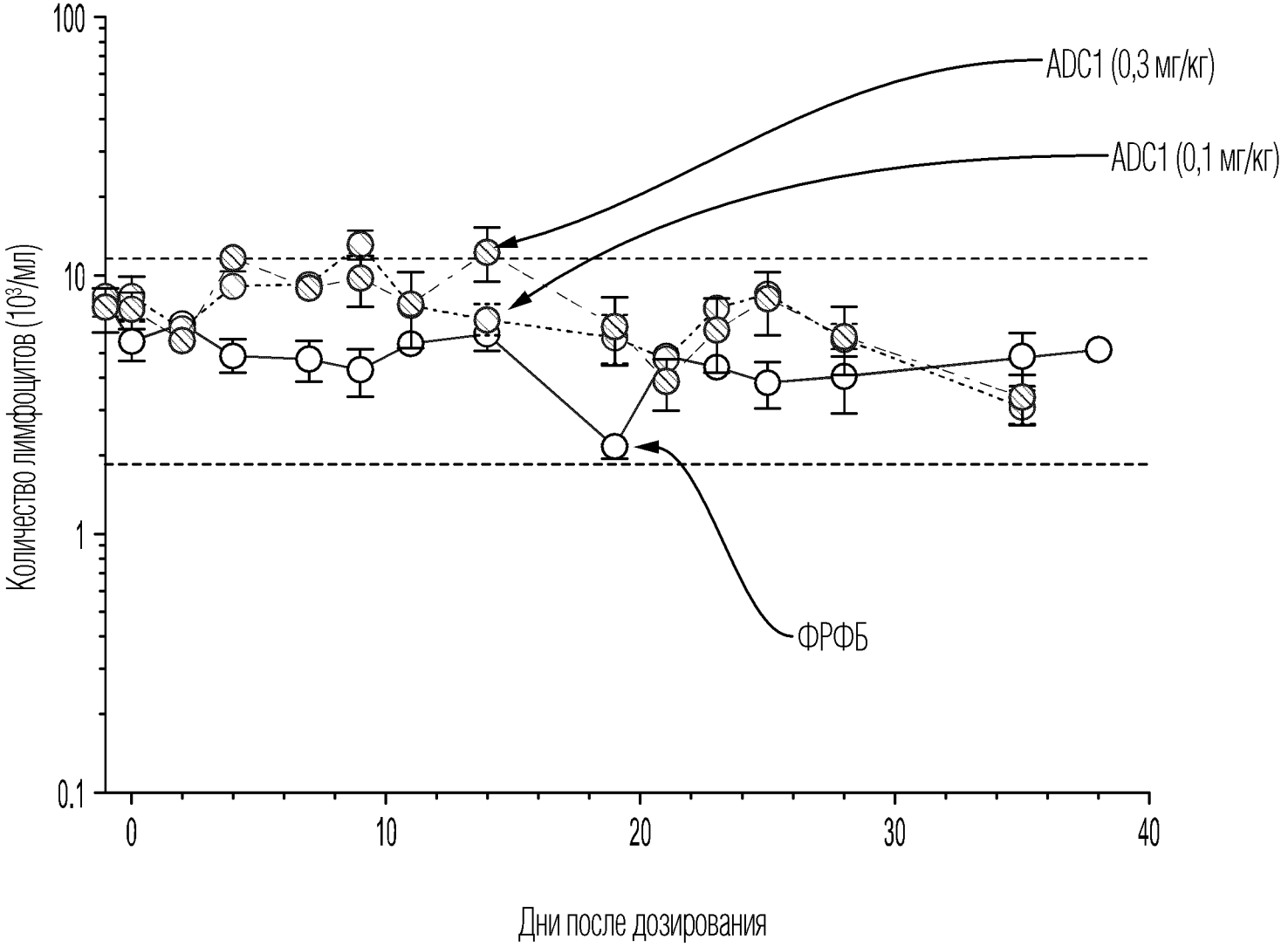
ФИГ. 11D



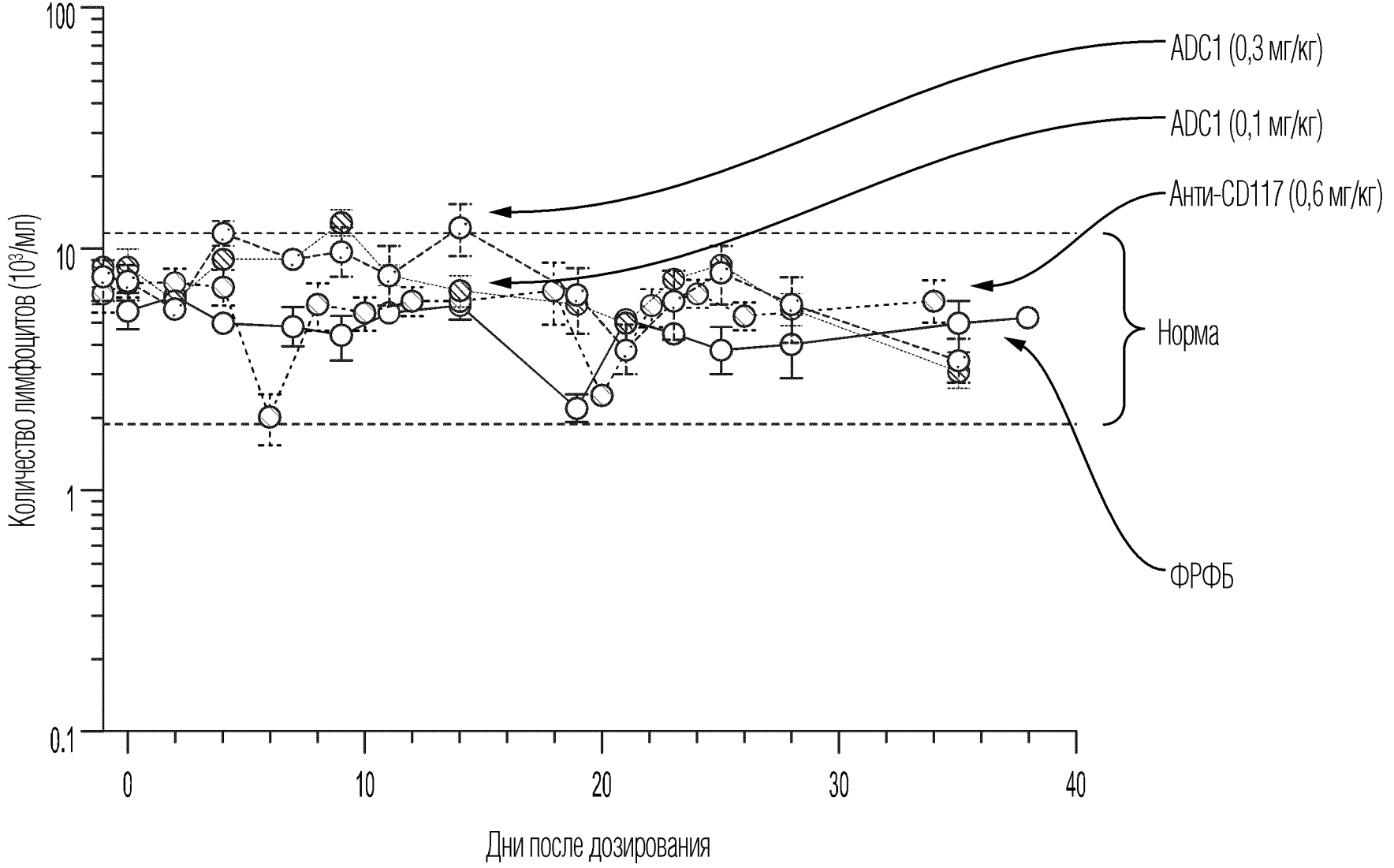
ФИГ. 11E


ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
ФРФБ
Количество нейтрофилов (10^3/мл)
10
1
0.1
0.01
0
10
20
30
40
Дни после дозирования

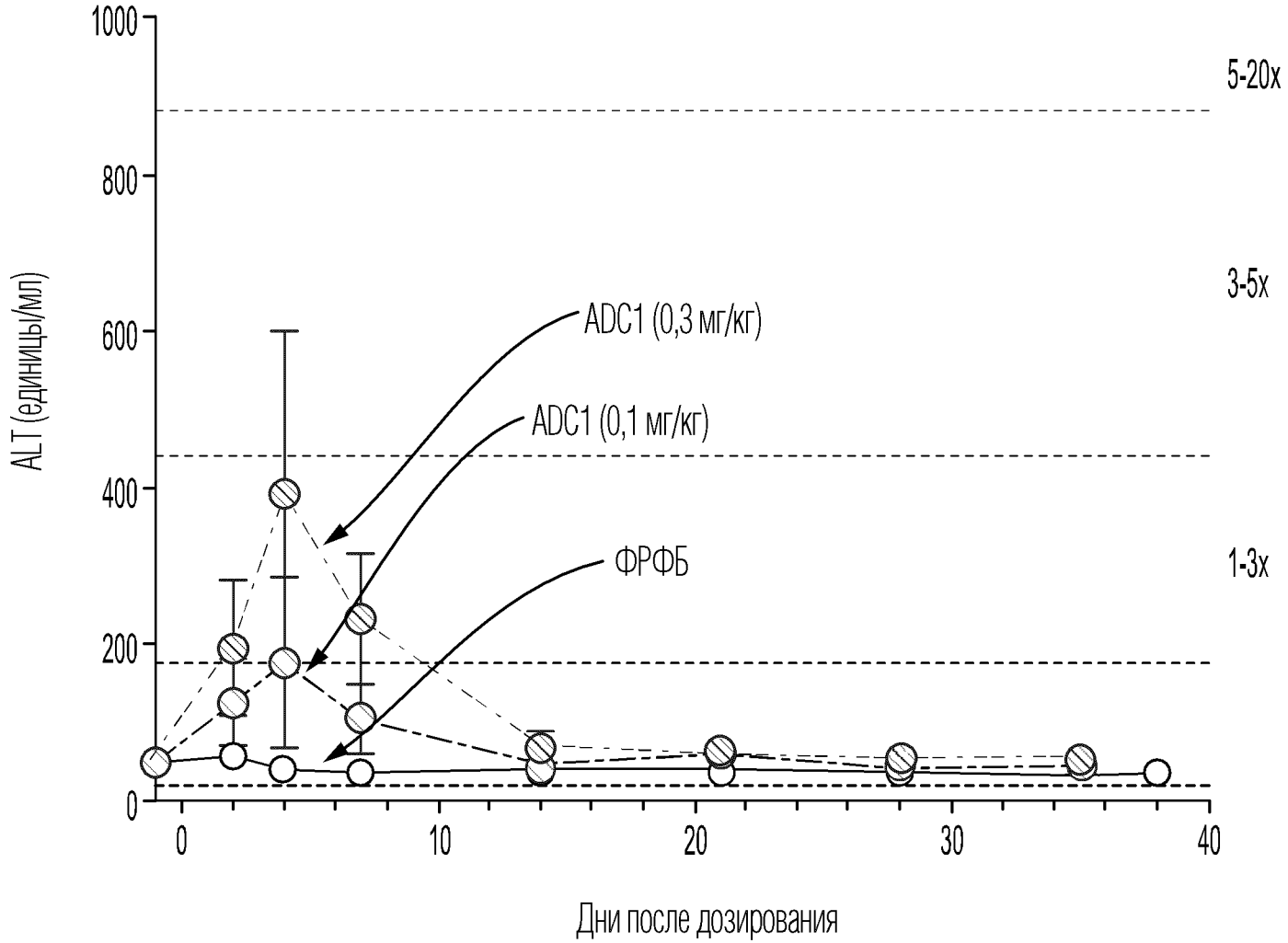
ФИГ. 12А


100
10
1
0.1
0
10
20
30
40
Количество лимфоцитов (10^3/мл)
Дни после дозирования
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
ФРФБ

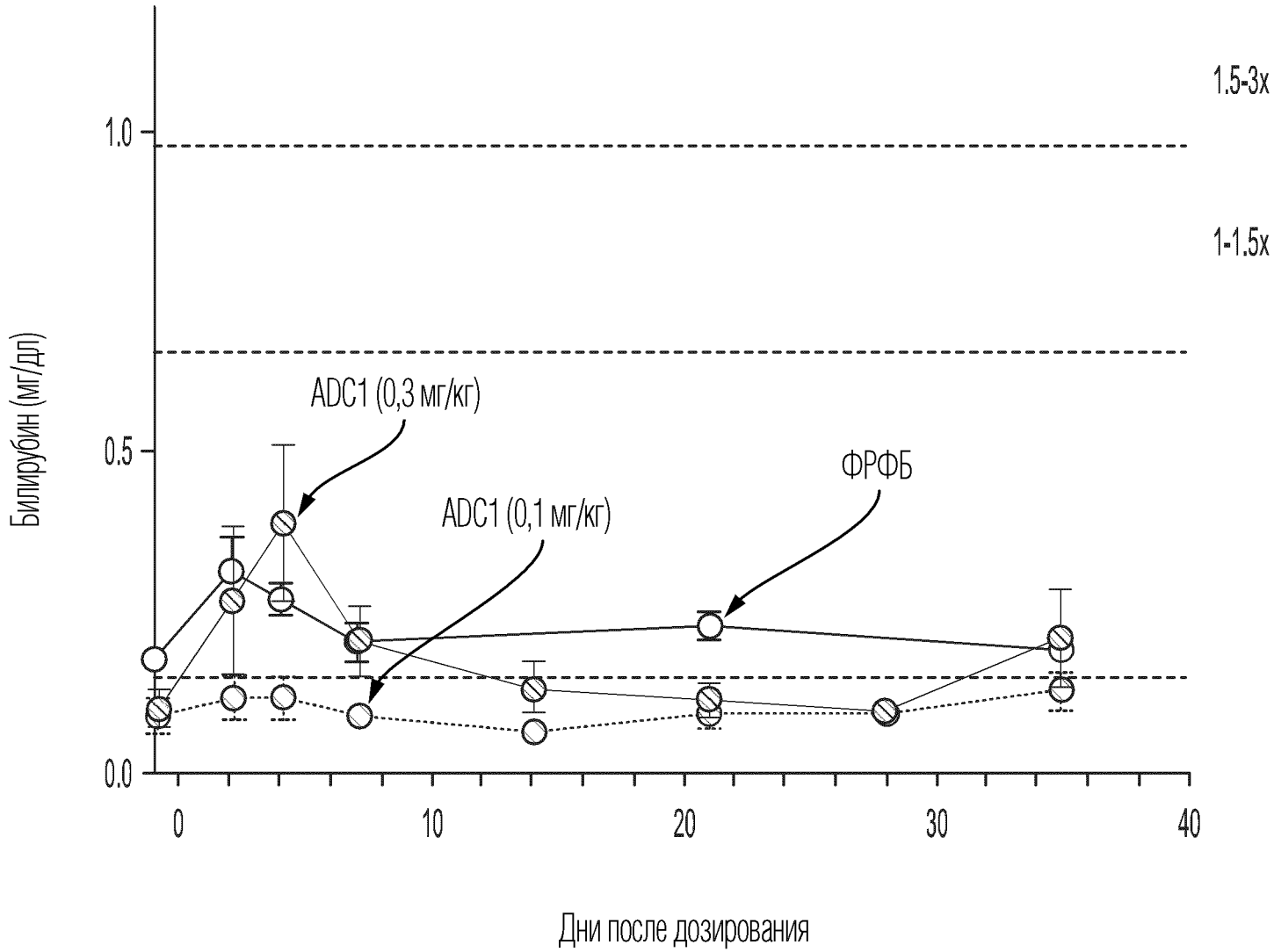
ФИГ. 12B


100
10
1
0.1
Количество лимфоцитов (10³/мл)
0
10
20
30
40
Дни после дозирования
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
Анти-CD117 (0,6 мг/кг)
Норма
ФРФБ

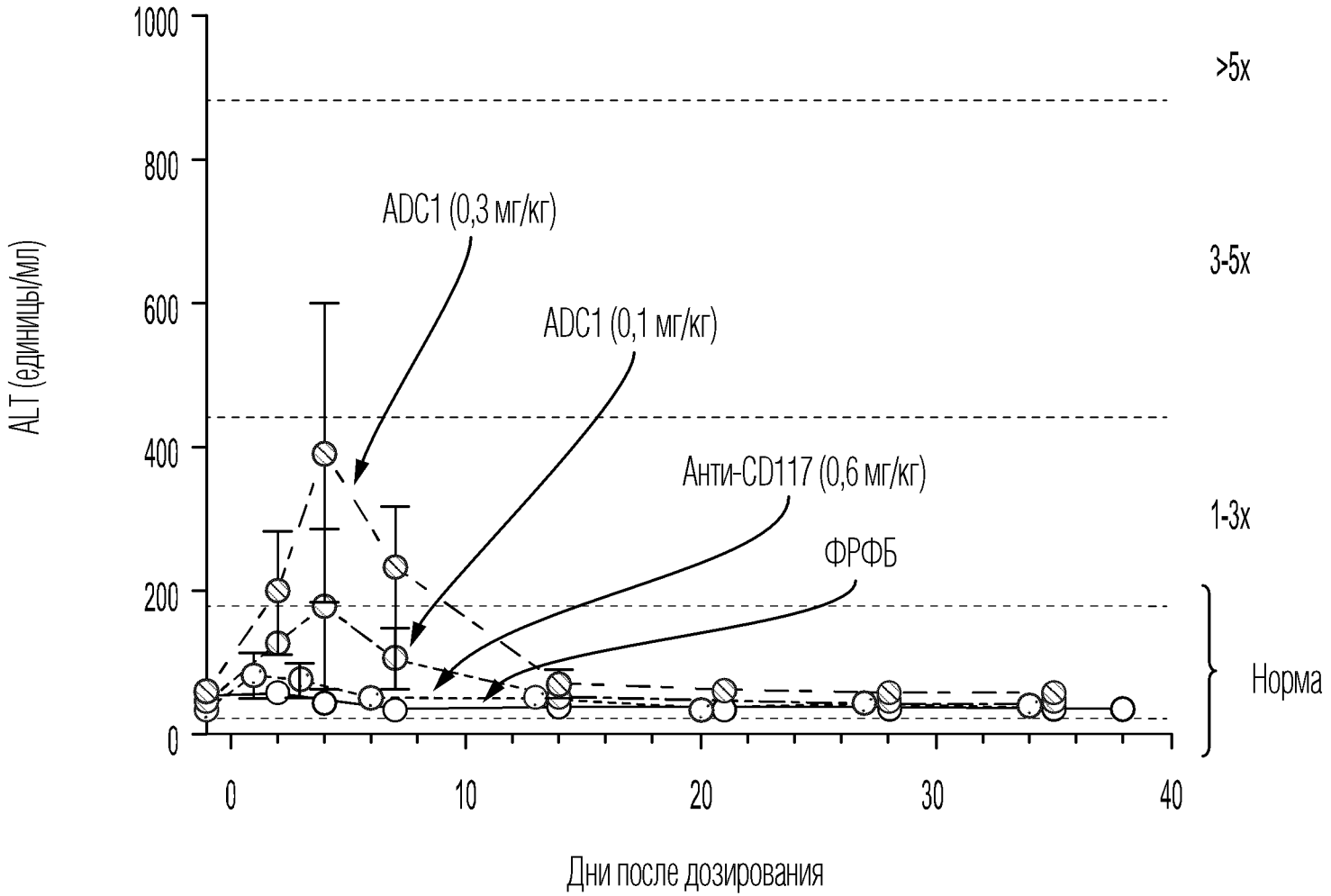
ФИГ. 12C


1000
800
600
400
200
0
ALT (единицы/мл)
0
10
20
30
40
Дни после дозирования
5-20x
3-5x
1-3x
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
ФРФБ

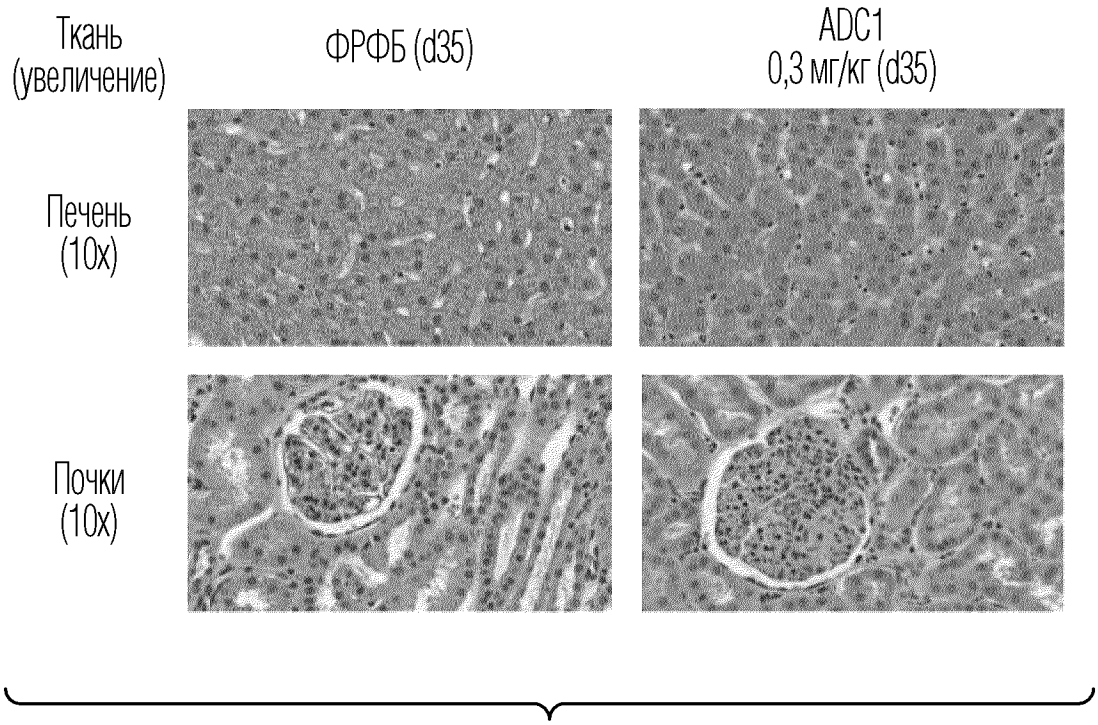
ФИГ. 13А


1.5-3x
1-1.5x
1.0
0.5
0.0
Билирубин (мг/дл)
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
ФРФБ
0
10
20
30
40
Дни после дозирования

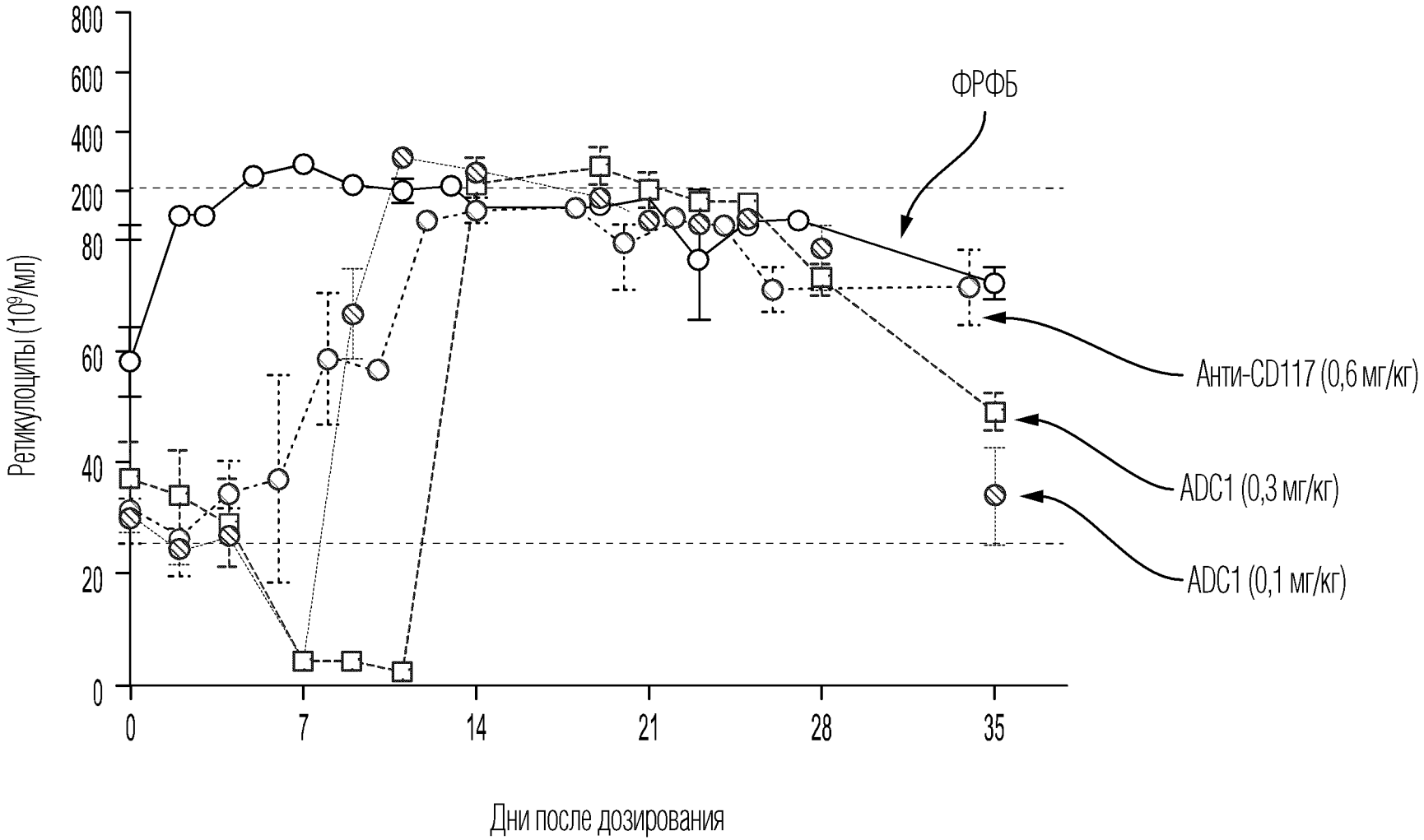
ФИГ. 13B


1000
800
600
400
200
0
ALT (единицы/мл)
0
10
20
30
40
Дни после дозирования
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)
Анти-CD117 (0,6 мг/кг)
ФРФБ
>5x
3-5x
1-3x
Норма

ФИГ. 13C


Ткань
(увеличение)
ФРФБ (d35)
ADC1
0,3 мг/кг (d35)
Печень
(10x)
Почки
(10x)

ФИГ. 14


800
600
400
200
80
60
40
20
0
Ретикулоциты (10^9/мл)
0
7
14
21
28
35
Дни после дозирования
ФРФБ
Анти-CD117 (0,6 мг/кг)
ADC1 (0,3 мг/кг)
ADC1 (0,1 мг/кг)

ФИГ. 15