

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190835** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.10

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.30

**(54) СПОСОБЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

(31) 62/752,828; 62/773,873; 62/882,362
(32) 2018.10.30; 2018.11.30; 2019.08.02
(33) US
(86) PCT/US2019/058973
(87) WO 2020/092655 2020.05.07
(71) Заявитель:
МАДЖЕНТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Палчаудхури Рахул, Проктор
Дженифер Линн, Джиллард
Джеффри О., Бойтано Энтони, Хайзи
Шэрон, Кук Майкл, Хартиган Эдам
(US)

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

(57) В данном документе описаны композиции и способы, применимые для истощения клеток CD117+ или CD45+ и для лечения различных гемопоэтических заболеваний, среди прочего, нарушения обмена веществ, рака и аутоиммунных заболеваний. Композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения расстройства, например, путем истощения популяции раковых клеток CD117+ или CD45+ или аутоиммунных клеток. Композиции и способы, описанные в данном документе, также можно использовать для подготовки пациента к лечению трансплантатом аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и для улучшения приживления трансплантата аллогенных гемопоэтических стволовых клеток путем избирательного истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток перед процедурой трансплантации.

A1

202190835

202190835

A1

**СПОСОБЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК****Ссылка на родственные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/752828, поданной 30 октября 2018 года; предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/773873, поданной 30 ноября 2018 года; и предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/882362, поданной 2 августа 2019 года. Полное содержание каждой из вышеприведенных приоритетных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие относится к лечению пациентов, страдающих различными патологиями, среди прочего такими как заболевания крови, нарушения обмена веществ, рак и аутоиммунные заболевания, путем введения конъюгата антитело-лекарственное средство, способного связывать CD117 или CD45, экспрессируемый гемопоэтической клеткой, такой как гемопоэтическая стволовая клетка.

Предшествующий уровень техники

Лечение аллогенными клетками включает трансплантацию клеток пациенту, причем трансплантированные клетки получают у донора, не являющегося пациентом. Общие типы аллогенных доноров, используемых для лечения аллогенными клетками, включают родных братьев и сестер с совместимыми HLA, совместимых неродственных доноров, частично совместимых доноров - членов семьи, родственных доноров пуповинной крови и неродственных доноров пуповинной крови. Конечная цель клеточной терапии состоит в идентификации методов лечения аллогенными клетками, которые могут лечь в основу «серийных» продуктов (Brandenberger, et al. (2011). BioProcess International. 9 (suppl. I): 30-37), которые расширят использование лечения аллогенными клетками.

Несмотря на перспективы, в настоящее время терапевтическое использование аллогенных клеток может иметь осложнения, затрудняющие это лечение. У иммунокомпетентных хозяев трансплантированные аллогенные клетки быстро отторгаются, этот процесс называется отторжение трансплантат против хозяина (HvG). HvG может существенно снизить эффективность перемещенных клеток, а также вызвать побочные эффекты у реципиентов, ограничивая использование аллогенных клеток. В настоящее время имеется потребность в композициях и способах, способствующих приживлению трансплантатов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток таким образом, чтобы после трансплантации сохранялась мультиактивность и гемопоэтическая функциональность этих клеток.

Сущность изобретения

В данном документе представлены антитела или ADC, применимые в процедурах

подготовки, в которых пациента готовят к получению трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки. Согласно способам, описанным в данном документе, пациента можно подготовить к лечению трансплантатом аллогенных гемопоэтических стволовых клеток путем введения пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими клетками (например, гемопоэтическими стволовыми клетками), такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45 в комбинации с иммунодепрессантом. Как описано в данном документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

В одном аспекте, представленном в данном документе, представлен способ истощения популяции клеток CD117+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство и иммунодепрессанта перед получением пациентом трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ, включающий введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство и иммунодепрессанта в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD117+ у пациента; и впоследствии введение пациенту трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, причем пациенту ранее вводили антитело против CD117 и конъюгат иммунодепрессанта-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления CD117 является GNNK+ CD117.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессанта перед получением пациентом трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ, включающий введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессанта в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента; и впоследствии введение пациенту трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, причем пациенту ранее вводили конъюгат антитело

против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессант в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, причем пациенту ранее вводили конъюгат антитело против CD45-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту иммунодепрессанта после получения пациентом трансплантата.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлен способ истощения популяции клеток CD117+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает (а) введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD117+ у пациента; (b) введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки; и (с) впоследствии введение пациенту иммунодепрессанта.

В дополнительном аспекте, представленном в данном документе, представлен способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает (а) введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента; (b) введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки; и (с) впоследствии введение пациенту иммунодепрессанта.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит МНС-совместимые (например, HLA-совместимыми) аллогенные гемопоэтические стволовые клетки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, в которых все HLA-антигены совместимы с HLA-антигенами у пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат по меньшей мере одно несовпадение HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере два несовпадения HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере три несовпадения HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере четыре несовпадения HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере пять несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах

осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере шесть несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере семь несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере восемь несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере девять несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки имеют полное несоответствие HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат от одного до четырех несовпадений HLA, от одного до трех несовпадений HLA, от одного до двух несовпадений HLA, от двух до четырех несовпадений HLA, от двух до трех несовпадений HLA или от трех до четырех несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат несовпадение по меньшей мере одного минорного антигена гистосовместимости (miHA) относительно минорных антигенов гистосовместимости у пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки с несовпадающим HLA.

В некоторых вариантах осуществления способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 80% донорского химеризма. В некоторых вариантах осуществления способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 85% донорского химеризма. В некоторых вариантах осуществления способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 90% донорского химеризма. В некоторых вариантах осуществления способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 95% донорского химеризма. В некоторых вариантах осуществления донорский химеризм оценивают по меньшей мере 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель или 10 недель после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления донорский химеризм представляет собой периферический миелоидный химеризм. В некоторых вариантах осуществления донорский химеризм представляет собой Т-клеточный химеризм.

В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессантом является циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессантом является 30F11. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессантом является циклофосфамид (цитоксан, например, цитоксан в низкой дозе). В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессантом является 30F11 и циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессантом является общее облучение тела (TBI,

например, низкая доза TBI). В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант (например, цитоксан) вводят после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант (например, 30F11) вводят перед трансплантатом. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят по существу в то же время, когда пациент получает трансплантат.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат поглощается раковой клеткой, аутоиммунной клеткой или гемопоэтической стволовой клеткой после введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как в крови пациента существенно упадет концентрация конъюгата.

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

В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливать гемопоэз после трансплантации пациенту гемопоэтических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления при трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранной из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглий, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, клеток-натуральных киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется нарушение функции стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется гемоглобинопатическое расстройство, аутоиммунное расстройство, миелодиспластическое расстройство, иммунодефицитное состояние или нарушение обмена веществ.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело против CD117, содержащее набор CDR (CDR1, CDR2 или CDR3) тяжелой цепи/легкой цепи (HC/LC) или набор переменных областей HC/LC, как описано в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата имеет скорость диссоциации (KOFF) 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} при измерении с помощью биослойной интерферометрии (BLI).

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата связывает CD117 с KD приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 90 нМ или менее, приблизительно 80 нМ или менее, приблизительно 70 нМ или менее, приблизительно 60 нМ или менее,

приблизительно 50 нМ или менее, приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 30 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 8 нМ или менее, приблизительно 6 нМ или менее, приблизительно 4 нМ или менее, приблизительно 2 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее при определении с помощью анализа биослойной интерферометрии (BLI).

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой человеческое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой интактное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления IgG представляет собой изотип IgG1, изотип IgG2, изотип IgG3 или изотип IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксином с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНК-полимеразы представляет собой 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 А синегнойной палочки, дебуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтанзина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихимицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензодиазепина, димера пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепина, димера индолинбензодиазепина и псевдодимера индолинбензодиазепина. В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой MMAE или MMAF.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с токсином с помощью цистеинового остатка в Fc-домене антитела. В некоторых вариантах осуществления цистеиновый остаток вводят с помощью аминокислотной замены в Fc-домене антитела. В некоторых вариантах осуществления аминокислотной заменой является D265C.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1J графически представлен дизайн и результаты исследования *in vivo* подготовки ADC перед мышинным трансплантатом реципиентам DBA/2 донорских клеток Balb/c с небольшим несовпадением, причем ADC против CD45 (104-сапорин; «CD45-SAP») или ADC против CD117 (2B8-сапорин; «CD117-SAP») сочетают с 30F11 и посттрансплантационным цитоксаном. На фиг. 1A и 1B представлена схема мышинной модели *in vivo* (фиг. 1A) и схема применения препарата для разных экспериментальных групп (фиг. 1B). CD45-SAP, CD117-SAP, или контрольное лечение (например, 2 Гр TBI или без TBI) вводили реципиентам трансплантата в комбинации с иммунодепрессантом

(30F11) перед трансплантатом и цитоксаном после трансплантации. На фиг. 1С графически представлена степень истощения костного мозга (при измерении по количеству долгосрочных HSC (LT-HSC) на бедро (ось y)) в качестве функции условий лечения семь дней после введения мышам C57BL/6. На фиг. 1D графически представлен процент общего донорского химеризма крови (CD45.1+) в периферической крови через 12 недель после трансплантации. На фиг. 1E графически представлен процент миелоидного химеризма, В-клеточного химеризма и Т-клеточного химеризма через 12 недель после трансплантации.

На фиг. 2A-2C графически представлены результаты исследования *in vivo* подготовки ADC перед мышинным трансплантатом реципиентам DBA/2 донорских клеток Balb/cByJ с небольшим несовпадением, причем ADC против CD45 (104-сапорин; «CD45-SAP») сочетают с цитоксаном после трансплантации. На фиг. 2A-2C графически представлен процент общего донорского химеризма (ось y), процент периферического донорского миелоидного химеризма (фиг. 2A) и процент донорского Т-клеточного химеризма (фиг. 2B) у реципиентов трансплантата в качестве функции режима лечения у мышей DBA/2, которым трансплантировали клетки CD45.1+, на 8 неделе после трансплантации. На фиг. 2D графически представлено количество полученных от донора долгосрочных HSC (LT-HSC) на бедро (ось y) у реципиентов трансплантата через 12 недель после трансплантации.

На фиг. 3A-3B графически представлены результаты анализа истощения *in vivo*, показывающие, что CD45-ADC эффективно истощает мышинные HSC и лимфоциты у мышей C57. На фиг. 3A представлена схема исследования *in vivo* для оценки истощения мышинных HSC с помощью ADC против CD45 (CD45-сапорин или «CD45-SAP»). На фиг. 3B представлена стратегия гейтирования с помощью проточной цитометрии и результаты, показывающие истощение долгосрочных HSC с помощью CD45-SAP в костном мозге, собранном на 7 день. На фиг. 3C графически представлен уровень долгосрочных HSC в костном мозге через семь дней после введения дозы PBS, изотипа-SAP или CD45-SAP. На фиг. 3D графически представлен уровень периферических лимфоцитов через семь дней после введения дозы PBS, изотипа-SAP или CD45-SAP. звездочка (*) обозначает $p < 0,05$ по сравнению с любой контрольной группой.

На фиг. 4A-4C графически представлены результаты исследования *in vivo* мышинной модели трансплантата костного мозга с полным несовпадением. Мышей C57Bl/6 (H-2b, CD45.2+) готовили с помощью ADC против CD45 (PDB против CD45 или «CD45-PBD») отдельно или с антителами против CD4 и против CD8 и трансплантировали костный мозг Balb/c (H-2d, CD45.1+). На фиг. 4A графически представлен процент донорского химеризма у реципиентов трансплантата, который определяли на 3- и 8-неделе после трансплантации в крови с использованием антигена CD45.1+. На фиг. 4B графически представлен процент периферического донорского миелоидного химеризма, процент В-клеточного химеризма и процент Т-клеточного химеризма в качестве функции режима лечения у реципиентов трансплантата на 8 неделе после трансплантации. На фиг.

4C и 4D графически представлено общее количество клеток (CD45+) в периферической крови (фиг. 4C) и селезенке (фиг. 4D) через два дня после введения ADC.

На фиг. 5A-5G графически представлены результаты исследования *in vivo* мышинной модели трансплантата костного мозга с полным несовпадением. Мышей C57Bl/6 (H-2b, CD45.2+) готовили с помощью ADC против CD45 («104-PBD») отдельно или с пониженной дозой TBI и трансплантировали костный мозг Balb/c (H-2d, CD45.1+). На фиг. 5A графически представлено количество долгосрочных HSC (LT-HSC) на бедро (ось y) в качестве функции условий лечения с разными уровнями облучения у реципиентов трансплантата через два дня после введения ADC. На фиг. 5B-5E графически представлена степень истощения в костном мозге (клеток на бедро (ось y)) общих клеток CD45+ (фиг. 5B), миелоидных клеток (фиг. 5C), В-клеток (фиг. 5D) или Т-клеток (фиг. 5E) в качестве функции условий лечения с разными уровнями облучения у реципиентов трансплантата через два дня после введения ADC. На фиг. 5F графически представлен процент донорского химеризма в периферической крови реципиентов трансплантата через четыре недели после трансплантации. На фиг. 5G графически представлен процент миелоидного химеризма, В-клеточного химеризма и Т-клеточного химеризма у реципиентов трансплантата через четыре недели после трансплантации.

Подробное описание изобретения

В данном документе представлены антитела или ADC, применимые в процедурах подготовки, в которых пациента готовят к получению трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Согласно способам, описанным в данном документе, пациента можно подготовить к лечению трансплантатом аллогенных гемопоэтических стволовых клеток путем введения пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими клетками (например, гемопоэтическими стволовыми клетками), такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45 в комбинации с иммунодепрессантом. Как описано в данном документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Введение ADC, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата лекарственное средство-антитело, способного связывать один или более вышеприведенных антигенов, в комбинации с иммунодепрессантом пациенту, нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, путем избирательного истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, создавая тем самым нишу, заполняемую трансплантатом экзогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Определения

В рамках настоящего изобретения термин «приблизительно» относится к значению, которое находится в пределах 5% выше или ниже описанного значения.

В рамках настоящего изобретения термин «аллогенный» при использовании в контексте трансплантации используют для определения клеток (или ткани или органа), которые трансплантируют от генетически несходного донора реципиенту того же вида.

В рамках настоящего изобретения термин «аутологичный» относится к клеткам или трансплантату, когда донором и реципиентом является один и тот же субъект.

В рамках настоящего изобретения термин «ксеногенные» относится к клеткам, когда виды донора и реципиента отличаются.

В рамках настоящего изобретения термин «иммунная клетка» предназначен охватывать, но без ограничения, клетку, которая имеет гемопоэтическое происхождение и которая имеет значение для иммунного ответа. Иммунные клетки включают, но без ограничения, Т-клетки и клетки-натуральные киллеры (NK). Клетки-натуральные киллеры хорошо известны в данной области. В одном варианте осуществления клетки-натуральные киллеры включают линии клеток, таких как клетки NK-92. Дополнительные примеры линий клеток NK включают клетки NKG, YT, NK-YS, HANK-1, YTS и клетки NKL. Иммунная клетка может быть аллогенной или аутологичной.

В рамках настоящего изобретения термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с конкретным антигеном или иммунологически реагирует с ним. Антитело включает, но без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), генетически сконструированные антитела и иным образом модифицированные формы антител, включая, но без ограничения, химерные антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгированные антитела (например, би-три- и quadro-специфические антитела, диатела, триатела и тетратела) и фрагменты антител (то есть антигенсвязывающие фрагменты антител), включая, например, фрагменты Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv, при условии, что они демонстрируют требуемую антигенсвязывающую активность.

Антитела согласно настоящему раскрытию обычно являются выделенными или рекомбинантными. В рамках настоящего изобретения «выделенные» относится к полипептиду, например, антителу, которое было идентифицировано и выделено и/или извлечено из клетки или клеточной культуры, в которой оно было экспрессировано. Первоначально, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки. Таким образом, «выделенное антитело» относится к антителам, которые по существу не содержат других антител, имеющих иную антигенную специфичность. Например, выделенные антитела, которые специфически связываются с CD117, по существу не содержат антител, которые специфически связывают антигены, не являющиеся CD117. Аналогично, выделенные антитела, которые специфически связываются с CD45 по существу не содержат антител, которые специфически связывают антигены, не являющиеся CD45.

Термин «моноклональные антитела» в рамках настоящего изобретения относится к антителам, которые получены из одного клона, включая любой эукариотический,

прокариотический или фаговый клон, с помощью любого средства, доступного или известного в данной области, и без ограничения антителами, полученными с помощью гибридной технологии. Моноклональные антитела, применимые в настоящем раскрытии, можно получить с использованием большого множества методов, известных в данной области, включая использование методов гибридомы, рекомбинантного и фагового дисплея или их комбинаций. Если не указано иное, термин «моноклональное антитело» (mAb) подразумевает включение как интактных молекул, так и фрагментов антител (включая, например, фрагменты Fab и F(ab')₂), которые способны специфически связываться с белком-мишенью. В рамках настоящего изобретения фрагменты Fab и F(ab')₂ относятся к фрагментам антител, у которых отсутствует фрагмент Fc интактного антитела. В одном варианте осуществления фрагмент антитела содержит Fc-область.

Обычно, антитела содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие антигенсвязывающие области. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно 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 (сокращенно LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» в рамках настоящего изобретения относится к одной или нескольким частям антитела, которые сохраняют возможность специфического связывания с антигеном-мишенью. Антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Фрагментами антител могут быть, например, Fab, F(ab')₂, scFv, диатело, триатело, аффитело, нанотело, аптамер или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охваченные термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают, но без ограничения: (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb, содержащее домены VH и VL; (vi) фрагмент dAb, который состоит из домена VH (см., например, Ward et al. Nature 341:544-546, 1989); (vii) dAb, которое состоит из домена

VH или VL; (viii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); и (ix) комбинацию двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, закодированы отдельными генами, их можно соединить с использованием рекомбинантных методов линкером, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); См., например, Bird et al. *Science* 242:423-426, 1988 и Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антител можно получить с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области, а фрагменты можно скринировать на пригодность таким же образом, как интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты можно получить с помощью методов рекомбинантной ДНК, ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов или в некоторых случаях с помощью химических методов пептидного синтеза, известных в данной области.

В рамках настоящего изобретения термин «антитело против CD117» или «антитело, которое связывается с CD117» относится к антителу, которое способно связывать CD117 с достаточной аффинностью таким образом, чтобы антитело было применимо в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на CD117.

В рамках настоящего изобретения термин «антитело против CD45» или «антитело, которое связывается с CD45» относится к антителу, которое способно связывать CD45 с достаточной аффинностью таким образом, чтобы антитело было применимо в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на CD45.

В рамках настоящего изобретения термин «диатело» относится к бивалентному антителу, содержащему две полипептидные цепи, причем каждая полипептидная цепь содержит домены VH и VL, соединенные линкером, который является слишком коротким (например, линкером, состоящим из пяти аминокислот) для обеспечения внутримолекулярной ассоциации доменов VH и VL в одной и той же пептидной цепи. Эта конфигурация обеспечивает спаривание каждого домена с комплементарным доменом в другой полипептидной цепи с образованием гомодимерной структуры. Соответственно, термин «триатело» относится к тривалентным антителам, содержащим три пептидные цепи, каждая из которых содержит один домен VH и один домен VL, соединенные линкером, который является чрезвычайно коротким (например, линкером, состоящим из 1-2 аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярную ассоциацию доменов VH и VL в пределах одной и той же пептидной цепи. Для складывания в свои нативные структуры пептиды, сконфигурированные таким образом, обычно подвергают тримеризации для расположения доменов VH и VL соседних пептидных цепей пространственно рядом друг с другом (см., например, Holliger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, 1993).

В рамках настоящего изобретения термин «биспецифическое антитело» относится,

например, к 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 антигене поверхности гемопоэтической стволовой клетки, таком как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45, а другая может специфически связывать эпитоп на другом антигене поверхности гемопоэтической стволовой клетки или другом белке поверхности клетки, таком как рецептор или субъединица рецептора, участвующего в пути передачи сигнала, который, среди прочего, усиливает рост клеток. В некоторых вариантах осуществления специфичность связывания может быть направлена на уникальные, неперекрывающиеся эпитопы одного и того же антигена-мишени (то есть бипаратопного антитела). «интактное» или «полноразмерное» антитело в рамках настоящего изобретения относится к антителу, имеющему два полипептида тяжелой (H) цепи и два полипептида легкой (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В рамках настоящего изобретения термин «определяющая комплементарность область» (CDR) относится к гипервариабельной области, находящейся в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи антитела. Более высококонсервативные части переменных доменов называются каркасными областями (FR). Положения аминокислот, которые определяют гипервариабельную область антитела, можно варьировать в зависимости от контекста и различных определений, известных в данной области. Некоторые положения внутри переменного домена можно рассматривать как гибридные гипервариабельные положения в том смысле, что эти положения можно считать находящимися внутри гипервариабельной области согласно одному набору критериев, и в то же время считать находящимися за пределами гипервариабельной области согласно другому набору критериев. Одно или несколько из этих положений также могут находиться в расширенных гипервариабельных областях. Антитела,

описанные в данном документе, могут содержать модификации в этих гибридных гипервариабельных положениях. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре каркасные области, которые в основном принимают β -листовую конфигурацию, соединенную тремя CDR, которые образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях образуют часть β -листовой структуры. CDR в каждой цепи удерживают вместе в непосредственной близости с помощью каркасных областей в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и вместе с CDR из других цепей антитела способствуют образованию связывающего мишень участка антител (см. Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, MD. 1987). В некоторых вариантах осуществления, если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков иммуноглобулина выполнена согласно системе нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулина по Kabat et al. (хотя можно использовать любую схему нумерации антител, включая, но без ограничения, IMGT и Chothia).

Термин «специфически связывает» в рамках настоящего изобретения относится к способности антитела (или ADC) распознавать и связываться с конкретной белковой структурой (эпитопом), а не с белками в целом. Если антитело является специфическим для эпитопа «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободной, немеченой А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченых А, связанных с антителом. Например, антитело «специфически связывается» с мишенью, если антитело, когда мечено, может конкурентно вытесняться от своей мишени соответствующим немеченым антителом. В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с мишенью, например, антигеном, экспрессируемым гемопоэтическими стволовыми клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117), или CD45 или антигеном, экспрессируемым зрелыми иммунными клетками (например, Т-клетками), такими как CD4 или CD8, если антитело имеет KD для мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, приблизительно 10^{-5} М, приблизительно 10^{-6} М, приблизительно 10^{-7} М, приблизительно 10^{-8} М, приблизительно 10^{-9} М, приблизительно 10^{-10} М, приблизительно 10^{-11} М, приблизительно 10^{-12} М или менее (менее означает количество менее приблизительно 10^{-12} , например, 10^{-13}). В одном варианте осуществления термин «специфически связывает» относится к способности антитела связываться с антигеном с KD по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, приблизительно 1×10^{-8} М, приблизительно 1×10^{-9} М, приблизительно 1×10^{-10} М, приблизительно 1×10^{-11} М, приблизительно 1×10^{-12} М или более и/или связываться с антигеном с аффинностью по меньшей мере в два раза больше его аффинности для неспецифического антигена. В одном варианте осуществления KD определяют с помощью стандарт биослойной интерферометрии (BLI). Однако должно быть понятно, что антитело может быть способно специфически связываться с двумя или более антигенами, которые связаны в последовательности. Например, в одном варианте осуществления антитело может специфически связываться как с человеческими, так и нечеловеческими (например, мыши или не являющегося человеком примата) ортологами антигена, например, CD117

(например, GNNK+ CD117) или CD45.

Термин «химерное» антитело в рамках настоящего изобретения относится к антителу, имеющему вариабельные последовательности, полученные из нечеловеческого иммуноглобулина, такому как крысиное или мышьеантитело, а константные области иммуноглобулина человека обычно выбирают из матрицы иммуноглобулина человека. В данной области известны способы получения химерных антител. 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 №№ 5807715; 4816567; и 4816397. Термины «Fc», «Fc-область», «Fc-домен» и «Fc-домен IgG» в рамках настоящего изобретения относятся к части иммуноглобулина, например, к молекуле IgG, которая коррелирует с кристаллизующимся фрагментом, полученным путем разложения папаина молекулы IgG. Fc-область содержит C-концевую половину двух тяжелых цепей молекулы IgG, которые связаны дисульфидными связями. Она не обладает антигенсвязывающей активностью, но содержит углеводный фрагмент и связывающие участки для комплемента и рецепторов Fc, включая рецептор FcRn (см. ниже). Например, Fc-домен содержит второй константный домен CH2 (например, остатки в положениях ЕС 231-340 IgG1 человека) и третий константный домен CH3 (например, остатки в положениях ЕС 341-447 IgG1 человека). В рамках настоящего изобретения Fc-домен содержит «нижнюю шарнирную область» (например, остатки в положениях ЕС 233-239 IgG1 человека).

Fc может относиться к этой области отдельно или к этой области в контексте антитела, фрагмента антитела или белка слияния Fc. Полиморфизмы наблюдались в ряде положений в Fc-доменах, включая, но без ограничения, положения ЕС 270, 272, 312, 315, 356 и 358, и, таким образом, могут существовать небольшие различия между последовательностями, представленными в настоящей заявке, и последовательностями, известными в данной области. Таким образом, «Fc-домен IgG дикого типа» или «Fc-домен IgG WT» относится к любой существующей в природе области Fc IgG (то есть к любому аллелю). Последовательности тяжелых цепей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека могут находиться в ряде баз данных последовательностей, например, в базе данных Uniprot (www.uniprot.org) с учетными номерами P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN) и P01861 (IGHG1_HUMAN), соответственно.

Термины «модифицированная Fc-область» или «вариантная Fc-область» в рамках настоящего изобретения относятся к Fc-домену IgG, содержащему одну или несколько аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций, введенных в любое положение в Fc-домене. В некоторых аспектах вариантный Fc-домен IgG содержит одну или несколько аминокислотных замен, приводящих к понижению или устранению аффинности связывания для Fc гамма R и/или C1q по сравнению с Fc-доменом дикого типа, не содержащим одну или несколько аминокислотных замен. Кроме того, взаимодействия с Fc связыванием важны для множества эффекторных функций и последующих событий передачи сигналов, включая, но без ограничения,

антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Соответственно, в некоторых аспектах антитело, содержащее вариантный Fc-домен (например, антитело, белок слияния или конъюгат), может проявлять измененную аффинность связывания по меньшей мере с одним или несколькими Fc-лигандами (например, Fc гамма Rs) относительно соответствующего антитела, имея в противном случае такую же аминокислотную последовательность, но не содержащую одну или несколько аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций, таких как, например, немодифицированная Fc-область, содержащая существующие в природе аминокислотные остатки в соответствующей позиции в Fc-области.

Вариантные Fc-домены, описанные в данном документе, определены согласно аминокислотным модификациям, которые их составляют. Для всех аминокислотных замен, обсуждаемых в данном документе в связи с Fc-областью, нумерация всегда соответствует индексу ЕС по Kabat. Таким образом, например, D265C представляет собой вариант Fc с аспарагиновой кислотой (D) в положении 265 ЕС, замещенной цистеином (C) относительно исходного Fc-домена. Аналогичным образом, например, D265C/L234A/L235A определяет вариант Fc с заменами в положениях ЕС 265 (от D к C), 234 (от L к A) и 235 (от L к A) относительно исходного Fc-домена. Вариант также может быть обозначен в соответствии с его конечным аминокислотным составом в мутантных положениях аминокислот ЕС. Например, мутант L234A/L235A может называться «LALA». В качестве дополнительного примера мутант E233P.L234V.L235A.delG236 (делеция 236) может называться «EPLVLAdelG». В качестве другого примера мутант I253A.N310A.N435A может называться «ИНН». Следует отметить, что порядок, в котором представлены замены, является произвольным.

Термины «рецептор Fc гамма» или «Fc гамма R» в рамках настоящего изобретения относятся к любому члену семейства белков, которые связывают Fc-область антитела IgG и закодированы генами Fc гамма R. У людей это семейство включает, но без ограничения, 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 неоткрытые человеческие изоформы или аллотипы Fc гамма Rs или Fc гамма R. Fc гамма R может происходить из любого организма, включая, но без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Мышиные Fc гамма Rs включают, но без ограничения, Fc гамма RI (CD64), Fc гамма RII (CD32), Fc гамма RIII (CD16) и Fc гамма RIII-2 (CD16-2), а также любые неоткрытые мышиные изоформы или аллотипы Fc гамма Rs или Fc гамма R.

Термин «эффекторная функция» в рамках настоящего изобретения относится к биохимическому событию, которое обусловлено взаимодействием Fc-домена с рецептором Fc. Эффекторные функции включают, но без ограничения, ADCC, ADCP и

CDC. Под «эффекторной клеткой» в рамках настоящего изобретения подразумевается клетка иммунной системы, которая экспрессирует один или несколько рецепторов Fc и опосредует одну или несколько эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, но без ограничения, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, кровяные пластинки, В-клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, клетки-натуральные киллеры (NK) и гамма дельта Т-клетки и могут происходить из любого организма, включая, но без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

Термин «молчащий», «с подавленной активностью» или «сайленсинг» в рамках настоящего изобретения относится к антителу, имеющему модифицированную Fc-область, описанную в данном документе, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fc гамма (FcγR) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcγR (например, снижение связывания с FcγR по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcγR, при измерении с помощью, например, BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело с подавленной активностью Fc не обладает выявляемым связыванием с FcγR. Связывание антитела, имеющего модифицированную Fc-область, с FcγR можно определить с использованием множества методов, известных в данной области, например, но без ограничения, равновесных методов (например, иммуноферментного анализа (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализа (RIA)), или с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса или другого механизма анализа на основе кинетики (например, анализа BIACORE.RTM. Или анализа OctetTM (forteBIO)), и других способов, таких как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания, флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET), гель-электрофореза и хроматографии (например, гель-фильтрации). В этих и других способах можно использовать метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использовать множество методов обнаружения, включая, но без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в Paul, W. E. ed. *Fundamental Immunology*, 4th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), где основное внимание уделено взаимодействиям антитело-иммуноген. Одним из примеров анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого антигена с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого антигена и обнаружение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность представляющего интерес антитела к конкретному антигену и скорости отклонения связывания можно определить из данных с помощью анализа графика Скэтчарда. Конкуренцию со вторым антителом также можно определить с использованием

радиоиммуноанализа. В этом случае антиген инкубируют с представляющим интерес антителом, конъюгированным с меченым соединением в присутствии возрастающих количеств немеченого второго антитела.

В рамках настоящего изобретения термин «идентичное антитело, содержащее немодифицированную Fc-область», относится к антителу, в котором отсутствуют указанные аминокислотные замены (например, D265C, L234A, L235A и/или H435A), но в остальном имеет такую же аминокислотную последовательность, что и модифицированное Fc антитела, с которым его сравнивают.

Термины «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относятся к форме цитотоксичности, при которой полипептид, содержащий Fc-домен, например, антитело, связанное с рецепторами Fc (FcR), присутствует в некоторых цитотоксических клетках (например, в основном в NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах) и обеспечивает специфическое связывание этих цитотоксических эффекторных клеток с несущей антиген «клеткой-мишенью» и впоследствии убивать клетку-мишень цитотоксинами. (Hogarth et al. *Nature Review Drug Discovery* 2012, 11:313). Предполагается, что помимо антител и их фрагментов другие полипептиды, содержащие Fc-домены, например, белки слияния Fc и белки-конъюгаты Fc, обладающие способностью специфического связывания с несущей антиген клеткой-мишенью, будут способны влиять на клеточно-опосредованную цитотоксичность.

Для простоты клеточно-опосредованная цитотоксичность, обусловленная активностью полипептида, содержащего Fc-домен, в данном документе также называется активностью ADCC. Можно анализировать способность любого конкретного полипептида согласно настоящему раскрытию опосредовать лизис клетки-мишени с помощью ADCC. Для оценки активности ADCC представляющий интерес полипептид (например, антитело) добавляют к клеткам-мишеням в комбинации с иммунными эффекторными клетками, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитоллиз обычно обнаруживают по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или натуральных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. Подходящие эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки-натуральные киллеры (NK). Конкретные примеры анализов ADCC *in vitro* 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, активность ADCC представляющего интерес антитела можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрыта в Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652 (1998).

В рамках настоящего изобретения термины «подготовка» и «кондиционирование» относятся к процессам, с помощью которых пациента готовят к получению трансплантата, например, трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (например, как следует из устойчивого увеличения количества жизнеспособных

гемопозитических стволовых клеток в образце крови, выделенном у пациента после процедуры подготовки и последующей трансплантации гемопозитических стволовых клеток. Согласно способам, описанным в данном документе, пациента можно подготовить к лечению трансплантатом гемопозитических стволовых клеток путем введения пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый гемопозитическими стволовыми клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45. Как описано в данном документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием ADC. Введение ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать один или более вышеприведенных антигенов, пациенту, нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопозитических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата гемопозитических стволовых клеток, например, путем избирательного истощения эндогенных гемопозитических стволовых клеток, создавая тем самым нишу, заполняемую трансплантатом экзогенных гемопозитических стволовых клеток.

В рамках настоящего изобретения термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для достижения требуемого результата или для оказания воздействия на аутоиммунное заболевание или рак.

В рамках настоящего изобретения термин «время полувыведения» относится к времени, необходимому для уменьшения наполовину или на 50% концентрации в плазме лекарственного средства антитела в организме. Это 50% снижение концентрации в сыворотке отражает количество лекарственного средства в кровотоке.

В рамках настоящего изобретения термин «человеческое антитело» предназначен для охвата антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческое антитело может содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или во время перестройки генов или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело» в рамках настоящего изобретения не предназначен для охвата антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. Человеческое антитело может вырабатываться в человеческой клетке (например, из-за рекомбинантной экспрессии) или в клетке не являющегося человеком животного или в прокариотической или эукариотической клетке, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены иммуноглобулина человека (например, тяжелой цепи и/или легкой цепи). Когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может содержать линкерный пептид, который не обнаружен в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, например, от двух до приблизительно восьми глициновых или других

аминокислотных остатков, который соединяет вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение. Человеческие антитела можно получить множеством способов, известных в данной области, включая методы фагового дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческие антитела также можно получить с использованием трансгенных мышей, неспособных экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека (см., например, публикации PCT №№ WO 1998/24893; WO 1992/01047; WO 1996/34096; WO 1996/33735; патенты США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771; и 5939598).

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, которые содержат минимальные последовательности, полученные из нечеловеческого иммуноглобулина. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, а обычно из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям CDR иммуноглобулина нечеловеческого происхождения и все или по существу все области FR представляют собой области FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно часть консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антител известны в данной области. См., например, Riechmann et al. 1988, Nature 332:323-7; патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; и 6180370 to Queen et al.; EP239400; публикацию PCT WO 91/09967; патенты США № 5225539; 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 патенты США № 5565332.

В рамках настоящего изобретения термин «возможность приживления» использован для обозначения возможности репопуляции гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников в ткань, независимо от того, циркулируют ли такие клетки в естественных условиях или получены путем трансплантации. Термин охватывает все события, окружающие или ведущие к приживлению, такие как перемещение клеток в ткань и колонизация клетками представляющей интерес ткани. Эффективность приживления или скорость приживления можно оценивать или количественно определять с использованием любого клинически приемлемого параметра, известного специалистам в данной области, и они могут включать, например, оценку единиц конкурентной репопуляции (CRU); включение или экспрессию маркера в ткани (тканях), в которую стволовые клетки были перемещены, которую колонизировали или прижились; или путем оценки прогресса субъекта через прогрессирование заболевания, выживания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников или выживания реципиента. Приживление также можно определить путем измерения количества

лейкоцитов в периферической крови в посттрансплантационный период. Приживление также можно оценивать путем измерения восстановления клеток костного мозга с помощью донорских клеток в образце аспирата костного мозга.

В рамках настоящего изобретения термин «гемопоэтические стволовые клетки» («HSC») относится к незрелым клеткам крови, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки крови, включая различные клоны, включая, но без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Такие клетки могут включать клетки CD34+. Клетки CD34+ представляют собой незрелые клетки, которые экспрессируют маркер поверхности клетки CD34. Считается, что у людей клетки CD34+ включают субпопуляцию клеток со свойствами стволовых клеток, определенными выше, тогда как у мышей HSC представляют собой CD34-. Кроме того, HSC также относятся к HSC с долгосрочной репопуляцией (LT-HSC) и HSC с краткосрочной репопуляцией (ST-HSC). LT-HSC и ST-HSC дифференцируются на основе функционального потенциала и экспрессии маркеров поверхности клеток. Например, человеческие HSC представляют собой CD34+, CD38-, CD45RA-, CD90+, CD49F+ и lin- (отрицательные для маркеров зрелого клона, включая CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11B, CD19, CD20, CD56, CD235A). У мышей LT-HSC костного мозга представляют собой CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+, CD48- и lin- (отрицательные для маркеров зрелого клона, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra), тогда как ST-HSC представляют собой CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamfl/CD150+ и lin- (отрицательные для маркеров зрелого клона, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra). Кроме того, ST-HSC являются менее неподвижными и более пролиферативными, чем LT-HSC в гомеостатических условиях. Однако LT-HSC обладают большим потенциалом самообновления (то есть они выживают на протяжении всей взрослой жизни и могут быть последовательно трансплантированы через последовательных реципиентов), тогда как ST-HSC имеют ограниченное самообновление (то есть они выживают только в течение ограниченного периода времени и не обладают потенциалом для серийной трансплантации). Любой из этих HSC можно использовать в способах, описанным в данном документе. ST-HSC являются особенно полезными, потому что они являются очень пролиферативными и, таким образом, могут быстрее дать начало дифференцированному потомству.

В рамках настоящего изобретения термин «антитело против гемопоэтических клеток» или «антитело против HC» относится к антителу, которое специфически связывает антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45, или антиген, экспрессируемый зрелыми иммунными клетками (например, Т-клетками), такими как CD45.

В рамках настоящего изобретения термин «функциональный потенциал гемопоэтических стволовых клеток» относится к функциональным свойствам гемопоэтических стволовых клеток, которые включают 1) мультиактивность (которая относится к возможности дифференцироваться в несколько разных клеточных линий крови, включая, но без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, Т-клетки и В-клетки), 2) самообновление (которое относится к способности гемопоэтических стволовых клеток давать дочерние клетки, которые обладают таким же потенциалом, что и материнская клетка, и кроме того, эта способность может повторяться на протяжении всей жизни человека без истощения) и 3) возможность повторного введения гемопоэтических стволовых клеток или их потомства реципиенту через трансплантат, после чего они попадают в нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

В рамках настоящего изобретения термин «донорский химеризм» относится к процентному содержанию донорских клеток в лимфогематopoэтической системе реципиента (то есть хозяина) трансплантата аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, 85% донорский химеризм относится к лимфогематopoэтической системе, содержащей 85% донорских клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления способы согласно данному документу эффективны для обеспечения по меньшей мере 80% донорского химеризма, по меньшей мере 85% донорского химеризма или по меньшей мере 90% химеризма *in vivo*. Приживление и степень химеризма (например, процентное содержание донорских стволовых клеток у хозяина) можно определить с помощью любого количества стандартных методов. Присутствие донорских маркеров, таких как маркеры, специфичные для половых хромосом, у хозяина можно определить, например, с использованием стандартного цитогенетического анализа, полимеразной цепной реакции (PCR) с соответствующими праймерами, ПЦР с варьирующими по числу звеньев tandemными повторами (VNTR-PCR), микросателлитных маркеров или других методов мазков-отпечатков или флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Химеризм донора-хозяина также можно определить путем определения процентного содержания клеток донорского типа в крови хозяина с использованием, например, стандартных тестов комплемент-зависимой микроцитотоксичности.

В рамках настоящего изобретения термин «несовпадение» (например, «несовпадение МНС», «несовпадение HLA» или «несовпадение *miHA*») в контексте трансплантата гемопоэтических стволовых клеток относится к наличию по меньшей мере одного несходного (например, неидентичного) антигена клеточной поверхности в аллогенной клетке (или ткани или органе) (например, донорской клетке) относительно

варианта антигена, экспрессируемого реципиентом. В некоторых вариантах осуществления аллогенный трансплантат может содержать «незначительные несовпадения» относительно реципиента трансплантата. Такие «незначительные несовпадения» включают отдельные различия антигенов клеточной поверхности, не являющихся антигенами МНС или антигенами HLA. Незначительные несовпадения включают различия минорных антигенов гистосовместимости. В некоторых вариантах осуществления аллогенный трансплантат может содержать «большие несовпадения» относительно реципиента трансплантата. Такие «большие несовпадения» относятся к различиям гаплотипа МНС или гаплотипа HLA между трансплантатом и реципиентом. В иллюстративном варианте осуществления аллогенный трансплантат может иметь такой же гаплотип МНС или HLA, что и реципиент трансплантата, но может содержать одно или несколько незначительных несовпадений (также называемых в данном документе «аллогенный трансплантат с незначительным несовпадением»). В другом иллюстративном варианте осуществления аллогенный трансплантат может содержать одно или несколько больших несовпадений, отдельно или в дополнение к одному или нескольким незначительным несовпадениям. Аллогенный трансплантат с «полным несовпадением» относится к аллогенному трансплантату, который содержит одно или несколько больших несовпадений и одно или несколько незначительных несовпадений. Наличие больших и/или незначительных несовпадений можно определить с помощью стандартных анализов, используемых в данной области, таких как серологический, геномный или молекулярный анализ. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антиген главного комплекса гистосовместимости несовместим с аллелем, экспрессируемым реципиентом. Альтернативно или дополнительно, по меньшей мере один минорный антиген гистосовместимости несовместим с аллелем, экспрессируемым реципиентом.

В рамках настоящего изобретения термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, такому как человек, который получает лечение для конкретного заболевания или состояния, которое описано в данном документе. Например, пациент, такой как пациент-человек, может получать лечение перед лечением трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток для того, чтобы способствовать приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток.

В рамках настоящего изобретения термин «донор» относится к человеку или животному, у которого выделяют одну или несколько клеток перед введением клеток или их потомства реципиенту. Одна или несколько клеток могут представлять собой, например, популяцию гемопоэтических стволовых клеток.

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

В рамках настоящего изобретения термин «эндогенный» описывает вещество,

такое как молекула, клетка, ткань или орган (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка гемопоэтической клеточной линии, такая как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, натуральная клетка-киллер, Т-лимфоцит или В-лимфоцит), который встречается в природе в конкретном организме, таком как пациент-человек.

В рамках настоящего изобретения термин «образец» относится к образцу (например, крови, компоненту крови (например, сыворотке или плазме), мочи, слюны, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, ткани (например, плацентарной или дермальной), жидкости поджелудочной железы, образцу ворсинок хориона и клеток), взятому у субъекта.

В рамках настоящего изобретения термин «scFv» относится к одноцепочечному Fv-антителу, в котором переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи антитела соединены с образованием одной цепи. Фрагменты scFv содержат одну полипептидную цепь, которая содержит переменную область легкой цепи (VL) антитела (например, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3) и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела (например, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), разделенные линкером. Линкер, который соединяет области VL и VH фрагмента scFv, может быть пептидным линкером, состоящим из протеиногенных аминокислот. Альтернативные линкеры можно использовать для увеличения устойчивости фрагмента scFv к протеолитической деградации (например, линкеры, содержащие D-аминокислоты), для того, чтобы повысить растворимость фрагмента scFv (например, гидрофильные линкеры, такие как содержащие полиэтиленгликоль линкеры или полипептиды, содержащие повторяющиеся остатки глицина и серина), для улучшения биофизической стабильности молекулы (например, линкер, содержащий остатки цистеина, которые образуют внутримолекулярные или межмолекулярные дисульфидные связи), или для ослабления иммуногенности фрагмента scFv (например, линкеры, содержащие участки гликозилирования). Рядовому специалисту в данной области также будет понятно, что переменные области молекул scFv, описанных в данном документе, можно модифицировать таким образом, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от молекулы антитела, из которой они были получены. Например, можно получить нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям аминокислотных остатков (например, в остатках CDR и/или каркасной области), чтобы сохранить или повысить возможность связывания scFv с антигеном, распознанным соответствующим антителом.

В рамках настоящего изобретения фраза «по существу выводится из крови» относится к моменту времени после введения пациенту терапевтического средства (такого как антитело против CD117, антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент), когда концентрация терапевтического средства в образце крови, выделенном у

пациента, такова, что терапевтическое средство не может быть обнаружено обычными средствами (например, такова, что терапевтическое средство не обнаруживается выше порога шума устройства или анализа, используемого для обнаружения терапевтического средства). Для обнаружения антител, фрагментов антител и белковых лигандов можно использовать множество методов, известных в данной области, таких как анализы обнаружения на основе ELISA, известные в данной области или описанные в данном документе. Дополнительные анализы, которые можно использовать для обнаружения антител или фрагментов антител, включают среди прочего методы иммунопреципитации и иммуноблоттинг, известные в данной области.

В рамках настоящего изобретения термин «трансфекция» относится к любому из большого множества методов, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяин, таких как электропорация, липофекция, осаждение фосфатом кальция, трансфекция DEAE-декстраном и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения «для лечения» или «лечение» относится к уменьшению тяжести и/или частоты симптомов заболевания, устранению симптомов заболевания и/или основной причины указанных симптомов, уменьшению частоты или вероятности симптомов заболевания и/или их основной причины, и улучшению или устранению ущерба, прямо или косвенно вызванного болезнью, любому улучшению любых последствий заболевания, таких как пролонгированное выживание, снижение заболеваемости и/или уменьшение побочных эффектов, которые являются побочными продуктами альтернативного терапевтического воздействия; как легко понять в данной области, полное искоренение заболевания является предпочтительным, но не обязательным требованием лечебного действия. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, стимулирование приживления экзогенных гемопоэтических клеток у пациента после подготовительного лечения антителами, как описано в данном документе и последующего лечения трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительные положительные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток после подготовительного лечения и последующего введения пациенту трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Положительные результаты лечения, описанного в данном документе, также могут включать увеличение количества клеток или относительной концентрации одной или нескольких клеток гемопоэтической клеточной линии, такой как мегакариоцит, тромбоцит, кровяная пластинка, эритроцит, тучная клетка, миелобласт, базофил, нейтрофил, эозинофил, микроглиальная клетка, гранулоцит, моноцит, остеокласт, антигенпрезентирующая клетка, макрофаг, дендритная клетка, натуральная клетка-киллер, Т-лимфоцит или В-лимфоцит, после подготовительного лечения и последующего лечения трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительные

положительные результаты могут включать снижение величины вызывающей заболевание клеточной популяции, такой как популяция раковых клеток (например, лейкозных клеток CD117+) или аутоиммунных клеток (например, аутоиммунных лимфоцитов CD117+, таких как Т-клетки CD117+, которые экспрессируют рецептор Т-клеток, который перекрестно реагирует с аутоантигеном). Поскольку способы согласно настоящему раскрытию направлены на предотвращение расстройств, понятно, что термин «предотвращать» не требует полного предотвращения болезненного состояния. Скорее в рамках настоящего изобретения термин предотвращение относится к возможности идентификации специалистом популяции, которая восприимчива к расстройствам, так что введение соединений согласно настоящему раскрытию может происходить до начала заболевания. Этот термин не означает, что можно полностью избежать болезненного состояния.

В рамках настоящего изобретения пациенты, которые «нуждаются в» трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, включают пациентов, у которых обнаружен дефект или дефицит одного или нескольких типов клеток крови, а также пациентов, имеющих нарушение функции стволовых клеток, аутоиммунное заболевание, рак или другую патологию, описанную в данном документе. Гемопоэтические стволовые клетки обычно демонстрируют 1) мультиактивность и, таким образом, могут дифференцироваться на несколько разных линий крови, включая, но без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновление и, таким образом, могут давать дочерние клетки, которые обладают таким же потенциалом, что и материнская клетка, и 3) возможность повторного введения реципиенту трансплантата, после чего они попадают в нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз. Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или дефицитом одного или нескольких типов клеток гемопоэтической клеточной линии для того, чтобы восстановить дефективную или дефицитную популяцию клеток *in vivo*. Например, у пациента может быть рак, и дефицит может быть вызван введением химиотерапевтического средства или другого лекарственного средства, которое либо избирательно, либо неспецифично истощает популяцию раковых клеток. Дополнительно или альтернативно, у пациента может быть гемоглобинопатия (например, доброкачественная гемоглобинопатия), такая как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия и синдром Вискотта-Олдрича. У субъекта может быть тяжелый комбинированный иммунодефицит аденозиндезаминазы (ADA SCID), HIV/AIDS, метахроматическая лейкоцисторфия, анемия Даймонда-Блэкфана и синдромом Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или страдать от наследственного заболевания крови (например,

серповидноклеточной анемии) или от аутоиммунного расстройства. Дополнительно или альтернативно, субъект может иметь или страдать от злокачественного новообразования, такого как нейробластома или гематологический рак. Например, у субъекта может быть лейкоз, лимфома или миелома. В некоторых вариантах осуществления у субъекта может быть острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома или неходжкинская лимфома. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется аутоиммунное заболевание, такое как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона, диабет 1 типа или другая аутоиммунная патология, описанная в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту требуется терапия с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CART). В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется, или он иным образом страдает от нарушения метаболического накопления. У субъекта может иметься, или он иным образом страдает от нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Херлера, сфинголипидозов, метакроматической лейкодиетрофии или любых других заболеваний или расстройств, при которых можно получить пользу от описанных в настоящем документе методов лечения и терапии, и включающих, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулина М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаши, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидно-клеточную 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), раскрытие которого полностью включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к патологиям, которые можно лечить путем лечения с введением трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительно или альтернативно, пациентом, «нуждающимся в» трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, может быть пациент, у которого имеется или нет одна из вышеприведенных патологий, но у которого тем не менее имеется пониженный уровень (например, по сравнению с уровнем у здорового в остальном субъекта) одного или нескольких типов эндогенных клеток внутри гемопоэтической клеточной линии, например, мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглий, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, клеток-натуральных киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Специалист в данной области может легко определить снижен ли у него уровень одного или нескольких из вышеуказанных типов клеток или другого типа клеток крови относительно здорового в остальном субъекта,

например, с помощью проточной цитометрии и методов сортировки клеток, активируемых флуоресценцией (FACS), среди других процедур, известных в данной области.

Термин «иммунодепрессивное средство» или «иммунодепрессант» в рамках настоящего изобретения относится к веществам, которые действуют, подавляя или маскируя иммунную систему реципиента гемопозитического трансплантата. Оно может включать вещества, которые подавляют выработку цитокинов, снижают или подавляют экспрессию аутоантигена, или маскируют антигены МНС. Примеры таких средств включают ингибиторы кальциневрина/MTOR (например, такролимус, сиролимус, рапамицин, циклоспорин, эверолимус), молекулы костимулирующей блокады (например, CTLA4-Ig, антитела против CD40L), средства истощения NK, антитимоцитарный глобулин (ATG), алкилирующие средства (например, азотистый иприт, например, циклофосфамид; нитрозомочевина (например, кармустин); соединения платины), метотрексат, средства против TCR (например, муромонаб-CD3), антитела против CD20 (например, ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб и велтузумаб), флударабин, кампат (алемтузумаб), 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. патент США № 4665077 выше, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки), азатиоприн (или циклофосфамид, если есть побочная реакция на азатиоприн); бромокриптин; глутаральдегид (который маскирует антигены МНС, как описано в патенте США № 4120649 выше); антиидиотипические антитела к антигенам МНС; циклоспорин А; один или несколько стероидов, например, кортикостероиды, например, глюкокортикостероиды, такие как преднизон, метилпреднизолон, гидрокортизон и дексаметазон; антитела против интерферона- γ ; антитела против фактора некроза опухолей- α ; антитела против фактора некроза опухолей- β ; антитела против интерлейкина-2; антитела против рецепторов цитокинов, например, антитела против рецептора IL-2; гетерологичный антилимфоцитарный глобулин; рап-Т антитела, например, моноклональные антитела ОКТ-3; антитела против CD4; антитела против CD8, антитела против CD45 (например, 30-F11, YTH24.5 и/или YTH54.12 (например, комбинация YTH24.5 и YTH54.12)); стрептокиназу; стрептодорназу; или РНК или ДНК хозяина. Дополнительные иммунодепрессанты включают, но без ограничения, общее облучение тела (TBI), низкая доза TBI и/или цитоксан.

В рамках настоящего изобретения термины «вариант» и «производное» использованы взаимозаменяемо и относятся к встречающимся в природе, синтетическим и полусинтетическим аналогам соединения, пептида, белка или другого вещества, описанного в данном документе. Вариант или производное соединения, пептида, белка или другого вещества, описанного в данном документе, может сохранять или улучшать биологическую активность исходного материала.

В рамках настоящего изобретения фраза «нарушение функции стволовых клеток» в широком смысле относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, которое можно лечить или исцелить путем подготовки тканей-мишеней субъекта и/или путем

удаления популяции эндогенных стволовых клеток в ткани-мишени (например, удаление популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников из ткани костного мозга субъекта) и/или путем приживления или трансплантации стволовых клеток в ткани-мишени субъекта. Например, было показано излечение диабета I типа трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток и возможность получения пользы от подготовки в соответствии с композициями и способами, описанными в данном документе. Дополнительными расстройствами, которые можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в данном документе, являются, без ограничения, серповидноклеточная анемия, талассемии, анемия Фанкони, апластическая анемия, синдром Вискотта-Олдрича, ADA SCID, HIV/AIDS, метахроматическая лейкодистрофия, анемия Даймонда-Блэкфана и синдромом Швахмана-Даймонда. Дополнительными заболеваниями, которые можно лечить с использованием описанных в данном документе способов подготовки пациента и/или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, являются наследственные заболевания крови (например, серповидноклеточная анемия) и аутоиммунные расстройства, такие как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит и болезнь Крона. Дополнительными заболеваниями, которые можно лечить с использованием способов подготовки и/или трансплантации, описанных в данном документе, являются 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 крупноклеточная В-клеточная лимфома или неходжкинская лимфома. Дополнительными заболеваниями, которые можно лечить с использованием способов подготовки и/или трансплантации, описанных в данном документе, являются миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется, или он иным образом страдает от нарушения метаболического накопления. Например, у субъекта может иметься, или он иным образом страдает от нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Херлера, сфинголипидозов, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или расстройств, при которых можно получить пользу от описанных в настоящем документе методов лечения и терапии, и включающих, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулина М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаши, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидно-клеточную 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), раскрытие которого полностью включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к патологиям, которые можно лечить путем лечения с введением трансплантата гемопоэтических

стволовых клеток.

В рамках настоящего изобретения термин «вектор» включает вектор нуклеиновой кислоты, такой как плазида, вектор ДНК, плазида, вектор РНК, вирус или другой подходящий репликон. Векторы экспрессии, описанные в данном документе, могут содержать полинуклеотидную последовательность, а также, например, дополнительные элементы последовательности, использованные для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клетки млекопитающего. Некоторые векторы, которые можно использовать для экспрессии антител и фрагментов антител согласно настоящему раскрытию, включают плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как промоторные и энхансерные области, которые направляют транскрипцию генов. Другие подходящие векторы для экспрессии антител и фрагментов антител содержат полинуклеотидные последовательности, которые увеличивают скорость трансляции этих генов или улучшают стабильность или ядерный экспорт мРНК, которая является результатом транскрипции гена. Эти элементы последовательности могут включать, например, 5' и 3' нетранслируемые области и сайт сигнала полиаденилирования для того, чтобы управлять эффективной транскрипцией гена, переносимого в векторе экспрессии. Векторы экспрессии, описанные в данном документе, могут также содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для отбора клеток, которые содержат такой вектор. Примеры подходящего маркера включают гены, которые кодируют устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин и нурсеотрицин.

В рамках настоящего изобретения термин «конъюгат» или «конъюгат антитело-лекарственное средство» или «ADC» относится к антителу, которое связано с цитотоксином. ADC образуется путем химического связывания реакционноспособной функциональной группы одной молекулы, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с соответствующей реакционноспособной функциональной группой другой молекулы, такой как цитотоксин, описанный в данном документе. Конъюгаты могут содержать линкер между двумя молекулами, связанными друг с другом, например, между антителом и цитотоксином. Примеры линкеров, которые можно использовать для образования конъюгата, включают пептидсодержащие линкеры, такие как линкеры, которые содержат существующие в природе или не существующие в природе аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры можно получить с использованием множества стратегий, описанных в данном документе и известных в данной области. В зависимости от содержащихся в нем реакционноспособных компонентов линкер может быть расщеплен, например, с помощью ферментативного гидролиза, фотолиза, гидролиза в кислых условиях, гидролиза в щелочных условиях, окисления, восстановления дисульфида, нуклеофильного расщепления или металлоорганического расщепления (см., например, Leriche et al. *Bioorg. Med. Chem.* 20:571-582, 2012).

В рамках настоящего изобретения термин «связывающее микротрубочки средство»

относится к соединению, которое действует путем разрушения сети микротрубочек, которая важна для митотической и межфазной клеточной функции в клетке. Примеры связывающих микротрубочки средств включают, но без ограничения, майтазин, майтанзиноиды и их производные, такие как описаны в данном документе или известны в данной области, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винбластин сульфат, винкристин, винкристин сульфат, виндезин и винорелбин, таксаны, такие как доцетаксел и паклитаксел, макролиды, такие как дискодермолиды, кохицин и эпотилоны, и их производные, такие как эпотилон В или его производное.

В рамках настоящего изобретения термин «аматоксин» относится к члену семейства пептидов аматоксинов, продуцируемых грибами *Amanita phalloides*, или его варианту или производному, например, его варианту или производному, способному ингибировать активность РНК-полимеразы II. Аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают соединения, такие как, но без ограничения, соединения формул (III), (IIIА), (IIIВ) и (IIIС), каждая из которых описана ниже (например, α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота или проамануллин). Как описано в данном документе, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, с помощью линкерного фрагмента (L) (таким образом, образуя ADC). Иллюстративные способы конъюгации аматоксина и линкеров, применимых для таких процессов, описаны ниже. Также в данном документе описаны иллюстративные содержащие линкер аматоксины, применимые для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с композициями и способами.

Термин «ацил» в рамках настоящего изобретения относится к $-C(=O)R$, где R представляет водород («альдегид»), алкил, алкенил, алкинил, карбоцикллил, арил, гетероарил или гетероцикллил согласно определению в данном документе. Неограничивающие примеры включают формил, ацетил, пропаноил, бензоил и акрилоил.

В рамках настоящего изобретения термин «алкил» относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 1 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкильных групп включают метил, этил, n-пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, трет-пентил, гексил, изогексил и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри алкильной цепи. Примеры алкилена включают метилен, этилен, пропилен, изопропилен и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкил» относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 1 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов (например, среди прочего, кислород, азот или сера) в цепи.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкилен» относится к двухвалентной гетероалкильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри гетероалкильной цепи. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

В рамках настоящего изобретения термин «алкенил» относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкенильных групп включают винил, пропенил, изопропенил, бутенил, трет-бутиленил, гексенил и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «алкенилен» относится к двухвалентной алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри алкенильной цепи. Примеры алкенилена включают этенилен, пропенилен, изопропенилен, бутенилен и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкенил» относится к алкенильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов в цепи (например, среди прочего, кислород, азот или серу).

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкенилен» относится к двухвалентной гетероалкенильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри гетероалкенильной цепи. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

В рамках настоящего изобретения термин «алкинил» относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи. Примеры алкинильных групп включают пропаргил, бутинил, пентинил, гексинил и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «алкинилен» относится к двухвалентной алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри алкинильной цепи.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкинил» относится к алкинильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей, например, от 2 до 20 атомов углерода в цепи, и дополнительно содержащей один или несколько гетероатомов в цепи (например, среди прочего, кислород, азот или серу).

В рамках настоящего изобретения термин «гетероалкинилен» относится к двухвалентной гетероалкинильной группе с прямой или разветвленной цепью. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри гетероалкинильной цепи. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

В рамках настоящего изобретения термин «циклоалкил» относится к моноциклической или слитой, мостиковой или спирополициклической кольцевой

структуре, которая является насыщенной и имеет, например, от 3 до 12 атомов углерода в кольце. Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, бицикло[3.1.0]гексан и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «циклоалкилен» относится к двухвалентной циклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри кольцевой структуры. Примеры циклоалкилена включают циклопропилен, циклобутилен, цикlopентилен, циклогексилен и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероциклоалкил» относится к моноциклической или слитой, мостиковой или спирополициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и имеет, например, от 3 до 12 кольцевых атомов в кольцевой структуре, выбранных из атомов углерода, и гетероатомов, выбранных, среди прочего, например, из азота, кислорода и серы. Кольцевая структура может содержать, например, одну или несколько оксогрупп на элементах углерода, азота или серы кольца. Примеры гетероциклоалкилов включают в качестве примера, а не для ограничения дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тетрагидротиофенил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, пиперазинил, хинуклидинил и морфолинил.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероциклоалкилен» относится к двухвалентной гетероциклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри кольцевой структуры.

В рамках настоящего изобретения термин «арил» относится к моноциклической или мультициклической ароматической кольцевой системе, содержащей, например, от 6 до 19 атомов углерода. Арильные группы включают, но без ограничения, фенил, флуоренил, нафтил и тому подобное. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

В рамках настоящего изобретения термин «арилен» относится к двухвалентной арильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах.

«Гетероаралкил» в рамках настоящего изобретения относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно концевой или sp^3 атом углерода, замещен гетероарильным радикалом. Обычные гетероарилалкильные группы включают, но без ограничения, 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и тому подобное. Гетероарилалкильная группа содержит 6-20 атомов углерода, например, алкильный фрагмент, содержащий алканильные, алкенильные или алкинильные группы гетероарилалкильной группы содержит 1-6 атомов углерода, а гетероарильный фрагмент содержит 5-14 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных

из N, O, P и S. Гетероарильный фрагмент гетероарилалкильной группы может представлять собой моноцикл, имеющий 3-7 членов кольца (2-6 атомов углерода или бицикл, имеющий 7-10 членов кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: система бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6].

В рамках настоящего изобретения термин «гетероциклоалкил» относится к моноциклической или слитой, мостиковой или спирополициклической кольцевой структуре, которая является насыщенной и имеет, например, от 3 до 12 кольцевых атомов в кольцевой структуре, выбранных из атомов углерода, и гетероатомов, выбранных, среди прочего, например, из азота, кислорода и серы. Кольцевая структура может содержать, например, одну или несколько оксогрупп на элементах углерода, азота или серы кольца. Примеры гетероциклоалкилов включают в качестве примера, а не для ограничения дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тетрагидротиофенил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, пиперазинил, хинуклидинил и морфолинил.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероциклоалкилен» относится к двухвалентной гетероциклоалкильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах внутри кольцевой структуры.

В рамках настоящего изобретения термин «арил» относится к моноциклической или мультициклической ароматической кольцевой системе, содержащей, например, от 6 до 19 атомов углерода. Арильные группы включают, но без ограничения, фенил, флуоренил, нафтил и тому подобное. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

В рамках настоящего изобретения термин «арилен» относится к двухвалентной арильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероарил» относится к моноциклической гетероароматической или бициклической или трициклической слитой кольцевой гетероароматической группе, в которой один или несколько кольцевых атомов представляют собой гетероатом, например, азот, кислород или серу. Гетероарильные группы включают пиридил, пирролил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, пиразолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,3,4-триазилил, 1,2,3-триазилил, бензофурил, [2,3-дигидро]бензофурил, изобензофурил, бензотиенил, бензотриазолил, изобензотиенил, индолил, изоиндолил, 3Н-индолил, бензимидазолил, имидазо[1,2-а]пиридил, бензотиазолил, бензоксазолил, хинолизинил, хиназолинил, фталазинил, хиноксалинил, циннолинил, наптиридинил, пиридо[3,4-*b*]пиридил, пиридо[3,2-*b*]пиридил, пиридо[4,3-*b*]пиридил, хинолил, изохинолил, тетразолил, 5,6,7,8-тетрагидрохинолил, 5,6,7,8-тетрагидроизохинолил, пуринил,

птеридинил, карбазолил, ксантенил, бензохинолил и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероарилен» относится к двухвалентной гетероарильной группе. Двухвалентные положения могут быть на одном и том же или разных атомах. Двухвалентные положения могут составлять один или несколько гетероатомов.

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

В качестве примера, а не для ограничения, связанные с углеродом гетероарилы и гетероциклоалкилы связаны в положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, в положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, в положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, в положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, в положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиюфурана, тиюфена, пиррола или тетрагидропиррола, в положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, в положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, в положении 2 или 3 азиридина, в положении 2, 3 или 4 азетидина, в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или в положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина. Еще более обычно, связанные с углеродом гетероциклы включают 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 5-пиридил, 6-пиридил, 3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил, 6-пиридазинил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил, 2-пиразинил, 3-пиразинил, 5-пиразинил, 6-пиразинил, 2-тиазолил, 4-тиазолил или 5-тиазолил.

В качестве примера, а не для ограничения, связанные с азотом 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, 1H-индазола, в положении 2 изоиндола или изоиндолина, в положении 4 морфолина и в положении 9 карбазола или бета-карболина. Еще более обычно, связанные с азотом гетероциклы включают 1-азиридил, 1-азетедил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиразолил и 1-пиперидинил.

Если иное не предусмотрено определением отдельного заместителя, вышеприведенные химические фрагменты, такие как группы «алкил», «алкилен», «гетероалкил», «гетероалкилен», «алкенил», «алкенилен», «гетероалкенил», «гетероалкенилен», «алкинил», «алкинилен», «гетероалкинил», «гетероалкинилен», «циклоалкил», «циклоалкилен», «гетероциклоалкил», гетероциклоалкилен», «арил», «арилен», «гетероарил» и «гетероарилен», необязательно могут быть замещены, например, 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклоалкила, алкиларила, алкилгетероарила, алкилциклоалкила, алкилгетероциклоалкила, amino, аммония, ацила, ацилокси, ациламино, аминокарбонила, алкоксикарбонила, уреида, карбамата, арила, гетероарила,

сульфинила, сульфонила, алкокси, сульфанила, галогена, карбокси, григалометила, циано, гидроксид, меркапто, нитро и тому подобное. Обычные заместители включают, но без ограничения, $-X$, $-R$, $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-SR$, NH_2 , $-NHR$, $-N(R)_2$, $-N+(R)_3$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-NCO$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $-N_3$, $-NC(=O)H$, $-NC(=O)R$, $-C(=O)H$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(R)_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2N(R)_2$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OH)_2$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3$, $-PO_3H_2$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2H$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(R)_2$, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)N(R)_2$, $-C(=NH)NH_2$ и $-C(=NR)N(R)_2$; причем каждый X независимо выбирают для каждого случая из F , Cl , Br и I ; а каждый R независимо выбирают для каждого случая из алкила, арила, гетероциклоалкила или гетероарила, защитной группы и пролекарственного фрагмента. Всегда, когда группа описана как «необязательно замещенная», независимо для каждого случая эта группа может быть замещена одним или несколькими из приведенных выше заместителей. Замещение может включать ситуации, в которых соседние заместители претерпели замыкание кольца, например, замыкание кольца вицинальных функциональных заместителей, с образованием, например, лактамов, лактонов, циклических ангидридов, ацеталей, гемиацеталей, тиоацеталей, аминалей и гемиаминалей, образованных за счет замыкания кольца, например, для обеспечения защитной группы.

Должно быть понятно, что некоторые соглашения о наименовании радикалов могут включать либо монадикил или дирадикал, в зависимости от контекста. Например, когда для заместителя требуется две места присоединения к остальной части молекулы, понятно, что заместитель представляет собой дирадикал. Например, заместитель идентифицирован как алкил, которому требуется две места присоединения, содержит дирадикалы, такие как $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ и тому подобное. В других соглашениях о наименовании радикалов ясно указано, что радикал представляет собой дирадикал, такой как «алкилен», «алкенилен», «ариллен», «гетероциклоалкилен» и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин «реакция сочетания» относится к химической реакции, в которой два или более заместителя, подходящих для реакции друг с другом, реагируют с образованием химического фрагмента, который соединяет (например, ковалентно) молекулярные фрагменты, связанные с каждым заместителем. Реакции сочетания включают реакции, в которых реакционноспособный заместитель, связанный с фрагментом, который представляет собой цитотоксин, такой как цитотоксин, известный в данной области или описанный в данном документе, реагирует с подходящим реакционноспособным заместителем, связанным с фрагментом, который представляет собой антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антиген или его антигенсвязывающий фрагмент, специфический к CD117 (такому как GNNK+ CD117), известному в данной области или описанному в данном документе. Примеры подходящих реакционноспособных заместителей включают пару нуклеофил/электрофил (например, среди прочего, пару тиол/галоалкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ α,β -

ненасыщенный карбонил), пару диен/диенофил (например, среди прочего, пару азид/алкин) и тому подобное. Реакции сочетания включают среди прочего, без ограничения, алкилирование тиола, гидроксилалкилирование, алкилирование аминов, конденсацию амина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] Циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение по Хьюисгену), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение, и другие методы реакций, известные в данной области или описанные в данном документе.

В рамках настоящего изобретения «CRU (конкурентная единица репопуляции)» относится к единице измерения долгосрочных прививаемых стволовых клеток, которые можно обнаружить после трансплантации *in-vivo*.

В рамках настоящего изобретения соотношение «лекарственного средства и антитела» или «DAR» относится к количеству цитотоксинов, например, аматоксина, связанных с антителом ADC. DAR ADC может находиться в диапазоне от 1 до 8, хотя также возможны более высокие нагрузки в зависимости от количества участков связывания на антителе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ADC, описанный в данном документе, имеет DAR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Всегда, когда заместитель представлен в качестве дирадикала (то есть имеет две места присоединения к остальной части молекулы), должно быть понятно, что, если не указано иное, заместитель может быть связан в любой направленной конфигурации.

Способ лечения

В настоящем документе раскрыты способы истощения популяции клеток CD117+ и/или популяции клеток CD45+ у пациента, нуждающегося в аллогенной трансплантации, например, трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Также в данном документе представлены способы повышения уровня приживления аллогенных клеток у субъекта-реципиента. Способы, представленные в данном документе, можно использовать для лечения множества расстройств, связанных с аллогенной трансплантацией, таких как, среди прочего, заболевания клеточного типа в гемопоэтической клеточной линии, рак, аутоиммунные заболевания, нарушения обмена веществ, болезнь трансплантат против хозяина, отторжение хозяина против трансплантата и нарушение функции стволовых клеток. Композиции и способы, описанные в данном документе, могут (i) прямо истощать популяцию клеток, которые вызывают патологию, такую как популяция раковых клеток (например, лейкозных клеток) и аутоиммунные клетки (например, аутореактивные Т-клетки), и/или (ii) могут истощать популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, чтобы способствовать приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивая нишу, в которую могут попадать трансплантированные клетки. Истощение эндогенных гемопоэтических клеток у субъекта, нуждающегося в трансплантации, например, в трансплантации HSC, можно обеспечивать путем введения ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый эндогенной гемопоэтической

стволовой клеткой. В случае подготовки пациента к лечению трансплантатом, это введение может вызвать избирательное истощение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, создавая тем самым нишу в кроветворной ткани, такой как костный мозг, которая может впоследствии быть заполнена трансплантированными экзогенными гемопоэтическими стволовыми клетками. ADC, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, способные связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117+ (например, GNNK+ CD117) или клетки CD45+), или антиген, экспрессируемый иммунными клетками (например, зрелыми иммунными клетками), такими как Т-клетки (например, CD45), можно вводить пациенту, чтобы вызвать истощение клеток. Таким образом, ADC, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), или антиген, экспрессируемый иммунными клетками (например, зрелыми иммунными клетками), такими как Т-клетки (например, CD45), можно вводить пациенту, имеющему рак или аутоиммунное заболевание, для прямого истощения популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток, а также можно вводить пациенту, нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, для того, чтобы способствовать выживанию и возможности приживления трансплантированных клеток, например, гемопоэтических стволовых клеток.

Пациенты, подлежащие трансплантации, могут получить трансплантат, который является аутологичным, причем трансплантат содержит собственные клетки субъекта. В других вариантах осуществления пациенты, подлежащие трансплантации, могут получить аллогенный трансплантат, причем трансплантат содержит клетки, полученные или происходящие от другого человека. В случае аллогенной трансплантации приживление трансплантированных клеток осложняется возможностью иммунного ответа против трансплантата, опосредованного иммунными клетками хозяина (болезнь хозяина против трансплантата), или возможностью иммунного ответа против клеток хозяина, опосредованного иммунными клетками, присутствующими в трансплантате (болезнь трансплантат против хозяина). Вероятность вышеупомянутых осложнений возрастает с увеличением степени несходства антигенного состава трансплантата по отношению к пациенту-реципиенту трансплантата. Соответственно, аллогенные трансплантации обычно проводят между пациентами, имеющими наивысшую возможную степень сходства между антигенами HLA и минорными антигенами гистосовместимости. Из-за необходимости очень высокой степени антигенного сходства между донором аутологичного трансплантата и реципиентом есть пациенты, нуждающиеся в трансплантации, которые не могут получить это лечение, потому что нет подходящего совместимого донора.

Способы согласно данному документу основаны по меньшей мере частично на открытии, что подготовка пациента, нуждающегося в аллогенной трансплантации, с помощью как (i) ADC, способного связывать CD117 или CD45, так и (ii)

иммунодепрессивного средства, значительно увеличивает приживание аллогенных донорских клеток, в том числе в ситуациях, когда аллогенные клетки имеют высокую степень антигенного несовпадения относительно реципиента трансплантата. Не ограничиваясь теорией, считается, что иммунодепрессивное средство ингибирует активность остаточных иммунных клеток, например, остаточных Т-клеток, присутствующих у пациента после введения АСГ, которая может ограничить приживание аутологичных клеток. Когда АСГ вводят в сочетании с иммунодепрессивным средством, увеличивается приживание аутологичных донорских клеток, что приводит к увеличению донорского химеризма. Соответственно, способы, описанные в данном документе, можно использовать в некоторых вариантах осуществления для увеличения приживания аутологичных гемопоэтических стволовых клеток и увеличения донорского химеризма в костном мозге и периферической крови (включая миелоидный химеризм, В-клеточный химеризм и Т-клеточный химеризм).

Как описано в данном документе, лечение трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, для заселения или репопуляции одного или нескольких типов клеток крови. Гемопоэтические стволовые клетки обычно демонстрируют мультиактивность и, таким образом, могут дифференцироваться в несколько разных линий крови, включая, но без ограничения, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, продуцирующие тромбоциты мегакариоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Гемопоэтические стволовые клетки, кроме того, способны к самообновлению и, таким образом, могут давать дочерние клетки, которые обладают таким же потенциалом, что и материнская клетка, а также обладают способностью повторного введения реципиенту трансплантата, после чего они попадают в нишу гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или дефицитом одного или нескольких типов клеток гемопоэтической клеточной линии для того, чтобы восстановить дефективную или дефицитную популяцию клеток *in vivo*, тем самым лечить патологию, связанную с дефектом или истощением популяции эндогенных клеток крови. Композиции и способы, описанные в данном документе, таким образом, можно использовать для лечения доброкачественной 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 данном документе, можно использовать для лечения иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения

приобретенного иммунодефицита (например, приобретенного иммунодефицита, выбранного из группы, состоящей из HIV и AIDS). Композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения нарушения обмена веществ (например, нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Херлера, сфинголипидозов и метахроматической лейкодистрофии).

Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения злокачественного новообразования или пролиферативного нарушения, такого как гематологический рак, миелопролиферативное заболевание. В случае лечения рака композиции и способы, описанные в данном документе, можно вводить пациенту для истощения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток перед лечением трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут попадать в нишу, созданную на этапе истощения эндогенных клеток и создавать продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, истощенных во время уничтожения раковых клеток, например, во время системной химиотерапии. Иллюстративным гематологическим раком, который можно лечить с использованием композиций и способов, описанных в данном документе, является, без ограничения, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома и неходжкинская лимфома, а также другие раковые заболевания, включая нейробластому.

Дополнительные заболевания, которые можно лечить с композициями и способами, описанными в данном документе, включают, без ограничения, 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.

Антител или их антигенсвязывающих фрагментов и конъюгаты, описанные в данном документе, можно использовать, чтобы вызвать толерантность к трансплантату солидных органов. Например, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для истощения или удаления популяции клеток из ткани-мишени (например, для истощения гемопоэтических стволовых клеток из ниши стволовых клеток костного мозга). После такого истощения клеток из тканей-мишеней реципиенту трансплантата можно вводить популяцию стволовых клеток или клеток-предшественников от донора органа (например, гемопоэтических стволовых клеток от донора органа), а после приживления таких стволовых клеток или клеток-предшественников может быть достигнут временный или стабильный смешанный химеризм, тем самым обеспечивая долговременную толерантность трансплантата без

необходимости в дополнительных иммунодепрессивных средствах. Например, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать, чтобы вызвать толерантность к трансплантату у реципиента трансплантата твердого органа (например, среди прочего, трансплантата почки, трансплантата легкого, трансплантата печени и трансплантата сердца). Композиции и способы, описанные в данном документе, хорошо подходят для использования в связи с обеспечением толерантности к трансплантату солидных органов, например, потому что низкий процент временного или стабильного донорского приживления является достаточным, чтобы вызвать долгосрочную толерантность трансплантированного органа.

Кроме того, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать непосредственно для лечения рака, такого как рак, характеризующийся клетками CD117+ (например, GNNK+ CD117) или CD45+. Например, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения лейкоза, например, у пациентов, у которых обнаруживаются лейкозные клетки CD117+. Путем истощения раковых клеток CD117+, таких как лейкозные клетки, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать непосредственно для лечения разных видов рака. Иллюстративным раком, который можно лечить таким образом, является гематологический рак, такой как острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома и неходжкинская лимфома.

Кроме того, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения аутоиммунных расстройств. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, такому как пациент-человек, имеющий аутоиммунное расстройство, чтобы убить иммунную клетку CD45+. Например, иммунная клетка CD45+ может быть аутореактивным лимфоцитом, таким как Т-клетка, которая экспрессирует рецептор Т-клеток, который специфически связывается с аутоантигеном и вызывает иммунный ответ против него. Путем истощения самореактивных клеток CD45+ композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения аутоиммунных патологий, таких как описаны ниже. Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания путем истощения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток перед лечением трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут попадать в нишу, созданную на этапе истощения эндогенных клеток и создавать продуктивный гемопоэз. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, истощенных во время уничтожения аутоиммунных клеток.

Антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить нуждающемуся в этом пациенту-человеку перед трансплантацией клеток или солидного

органа пациенту. В одном варианте осуществления ADC против CD45 или ADC против CD117 вводят нуждающемуся в этом пациенту-человеку перед (например, приблизительно за 3 дня перед, приблизительно за 2 дня перед, приблизительно за 12 часов перед; приблизительно от 12 часов до 3 дней перед, приблизительно от 1 до 3 дней перед, приблизительно от 1 до 2 дней перед или приблизительно от 12 часов до 2 дней перед) трансплантацией клеток или солидного органа. В одном варианте осуществления трансплантат вводят пациенту после того, как ADC очистил или по существу очистил кровь пациента.

За счет введения иммунодепрессанта способы, описанные в данном документе, также применимы для предотвращения реакций хозяин против трансплантата (HvG). Недостаточность трансплантата или отторжение трансплантата, в том числе недостаточность после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, может проявляться, как правило, либо как отсутствие начального приживления донорских клеток, либо как потеря донорских клеток после начального приживления (для обзора см. Mattsson et al. (2008) *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(Suppl 1): 165-170).

в комбинации с антителом против CD117, антителом против CD45 или их конъюгатом антитело-лекарственное средство можно использовать множество иммунодепрессантов для предотвращения реакций хозяин против трансплантата (HvG), тем самым предотвращая или уменьшая риск недостаточности аллогенного трансплантата. Использование иммунодепрессанта у пациента с риском реакции HvG обеспечивает приживление донорских клеток с большей степенью несоответствия МНС (например, несоответствия HLA) или несоответствия минорного антигена гистосовместимости (miHA).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в комбинации с одним или несколькими иммунодепрессантами (например, одним, двумя или тремя иммунодепрессантами). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в комбинации с двумя или более иммунодепрессантами, такими как иммунодепрессанты, описанные в данном документе.

В одном варианте осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в комбинации со средством иммунного истощения, которое обеспечивает истощение В-клеток и/или Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления средством иммунного истощения является антитело против CD4, антитело против CD8 или и антитело против CD4 и антитело против CD8. Примеры антител против CD4 известны в данной области, включая, например, ибализумаб (также известный как Trogarzo, TMB-355, TNX-355 или Hu5A8; См., например, US9790276 и US9587022B2, которые включены в настоящий документ посредством ссылки), занолимуаb (также, известный как HuMax-CD4 или 6G5.2; См., например, WO1997013852, который включен в настоящий документ посредством ссылки),

трегализумаб (также, известный как BT-061; См., например, US7452981, который включен в настоящий документ посредством ссылки), приликсимаб (также, известный как Centara, сМ-T412, CEN 000029, MT 412), MTRX1011A (см., например, WO2008134046, который включен в настоящий документ посредством ссылки), цеделизумаб (также, известный как ОКТ-4А), кленоликсимаб (также, известный как IDEC-151, BB-217969), келиксимаб (также, известный как IDEC CE9.1, SB210396), M-T413 и TRX1 (см., например, WO2002102853, который включен в настоящий документ посредством ссылки). Примеры антител против CD8 аналогично известны в данной области, включая, например, антитела против CD8, описанные в WO2019033043, WO2017134306, WO2019032661, WO2019023148, WO2014025828, US10414820 и US10377826, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант представляет собой противолимфомное антитело. Например, противолимфомным антителом может быть антитело против CD45, такое как клон 30-F11, голое антитело, которое имитирует ATG на основе эффекторной функции, обеспечивая сильное истощение периферических В- и Т-клеток.

В других вариантах осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в комбинации с циклофосфамидом (цитоксаном, например, цитоксаном в низкой дозе).

В других дополнительных вариантах осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в сочетании с общим облучением тела (TBI, например, низкой дозой TBI). В традиционных протоколах подготовки можно использовать высокие дозы TBI перед получением аллогенного трансплантата. В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, когда TBI используют в комбинации с антителом против CD117, антителом против CD45 или их конъюгатом антитело-лекарственное средство, можно использовать уменьшенную дозу TBI для эффективной подготовки пациента к лечению аллогенным трансплантатом. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в изобретении представлен способ снижения уровня TBI, используемого для подготовки пациента к лечению аллогенным трансплантатом, включающий введение пациенту ADC против CD117 и/или ADC против CD45, как описано в данном документе, в комбинации с низкой дозой TBI. В одном варианте осуществления уровень TBI составляет 5 Гр или менее, например, 4,5 гр или менее, 4 гр или менее, 3,5 гр или менее, 3 гр или менее, 2,5 гр или менее, 2 гр или менее, 1,5 гр или менее, 1 гр или менее, или 0,5 гр или менее. В некоторых вариантах осуществления уровень TBI составляет приблизительно 5 гр, приблизительно 4,5 гр, приблизительно 4 гр, приблизительно 3,5 гр, приблизительно 3 гр, приблизительно 2,5 гр, приблизительно 2 гр, приблизительно 1,5 гр, приблизительно 1 гр, или приблизительно 0,5 гр.

В других вариантах осуществления антитело против CD117, антитело против CD45 или их конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в комбинации с неконъюгированным антителом против CD45, способным истощать клетки CD45+ с

помощью эффекторной функции (то есть комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

В других вариантах осуществления ADC против CD117 и/или ADC против CD45 можно использовать в соответствии со способами, представленными в данном документе, в комбинации с одним или несколькими следующими иммунодепрессантами: ингибиторами кальциневрина/MTOR (такими как такролимус, сиролимус, рапамицин, циклоспорин, эверолимус), молекулами костимулирующей блокады (такими как CTLA4-Ig, антитела против CD40L), средствами истощения NK, антитимоцитарным глобулином (ATG), алкилирующими средствами (такими как азотистый иприт, например, циклофосфамид; нитрозомочевина (например, кармустин); соединения платины), метотрексатом, средствами против TCR (такими как муромонаб-CD3), антителами против CD20 (такими как ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб и велтузумаб), флударабином, кампатором (алемтузумабом), 2-амино-6-арил-5-замещенными пиримидинами (см. патент США № 4665077 выше, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки), азатиоприном (или циклофосфамидом, если есть побочная реакция на азатиоприн); бромокриптином; глутаральдегидом (который маскирует антигены МНС, как описано в патенте США № 4120649 выше); антиидиотипическими антителами к антигенам МНС; циклоспорином А; одним или несколькими стероидами, например, кортикостероидами, например, глюкокортикостероидами, такими как преднизон, метилпреднизолон, гидрокортизон и дексаметазон; антителами против интерферон-γ; антителами против фактора некроза опухолей-α; антителами против фактора некроза опухолей-β; антителами против интерлейкин-2; антителами против рецепторов цитокинов, такими как антителами против рецептора IL-2; гетерологичным антилимфоцитарным глобулином; рап-Т антителами, такими как моноклональные антитела ОКТ-3; антителами против CD4; антителами против CD8, антителами против CD45 (например, 30-F11, YTH24.5 и/или YTH54.12 (например, комбинация YTH24.5 и YTH54.12)); стрептокиназой; стрептодорназой; или РНК или ДНК хозяина.

В одном иллюстративном варианте осуществления пациента готовят с помощью ADC против CD117-PBD в сочетании с TBI, цитоксаном, антителом против CD4, антителом против CD8 или их комбинацией.

В другом иллюстративном варианте осуществления пациента готовят с помощью ADC против CD45-PBD в сочетании с TBI, цитоксаном, антителом против CD4, антителом против CD8 или их комбинацией.

Вышеприведенные иммунодепрессанты (включая, но без ограничения, антитело против CD4, антитело против CD8, цитоксан и/или TBI) можно вводить пациенту перед получением трансплантата, содержащего аллогенные клетки, например, аллогенные HSC. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят субъекту после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят субъекту как перед, так и после трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления антитела или ADC, описанные в данном

документе, используют для лечения субъекта, получающего несовпадающий аллогенный трансплантат. В некоторых вариантах осуществления донор является несоответствующим донором. Несовпадающие донорские клетки, органы или ткани содержат по меньшей мере один несходный (например, неидентичный) антиген главного комплекса гистосовместимости (МНС) (то есть лейкоцитарный антиген человека (HLA) у людей), например, антиген МНС I класса, II класса, III класса или минорный антиген гистосовместимости (miHA), относительно варианта, экспрессируемого реципиентом, при обычно определении с помощью стандартных анализов, используемых в данной области, таких как серологический, геномный или молекулярные анализ определенного количества антигенов МНС или miHA. В иллюстративном варианте осуществления аллогенный трансплантат имеет тот же гаплотип МНС или HLA, что и реципиент трансплантата, но может содержать одно или несколько незначительных несовпадений (например, аллогенный трансплантат с незначительным несовпадением). В другом иллюстративном варианте осуществления аллогенный трансплантат содержит одно или несколько больших несовпадений, отдельно или в дополнение к одному или нескольким незначительным несовпадениям. В другом иллюстративном варианте осуществления аллогенный трансплантат представляет собой аллогенный трансплантат с «полным несовпадением», который содержит одно или несколько больших несовпадений и одно или несколько незначительных несовпадений.

Белки МНС важны для передачи сигналов между лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками или больными клетками в иммунных реакциях, где белки МНС связывают пептиды и представляют их для распознавания рецепторами Т-клеток. Белки, кодируемые генами МНС, экспрессируются на поверхности клеток и представляют Т-клетке как аутоантигены (пептидные фрагменты из самой клетки) и не аутоантигены (например, фрагменты вторгшихся микроорганизмов).

Область МНС делится на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Белки МНС класса I содержат α -цепь и β 2-микроглобулин (то есть B2M) и представляют фрагменты антигена цитотоксическим Т-клеткам. На большинстве клеток иммунной системы, особенно на антигенпрезентирующих клетках, белки МНС класса II содержат α - и β -цепи и представляют фрагменты антигена Т-хелперам. Область МНС класса III кодирует другие иммунные компоненты, такие как компоненты комплемента и некоторые, которые кодируют цитокины. МНС является как полигенным (существует несколько генов МНС класса I и МНС класса II), так и полиморфным (существует несколько аллелей каждого гена).

У людей основной комплекс гистосовместимости также называют комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA). Каждый класс МНС у человека представлен несколькими локусами: например, HLA-A (человеческий лейкоцитарный антиген-A), HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L, HLA-P и HLA-V для класса I и HLA-DRA, HLA-DRB1-9, HLA-, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA и HLA-DOB для класса II.

МНС демонстрируют крайний полиморфизм: в человеческой популяции в каждом генетическом локусе имеется большое количество гаплотипов, содержащих различные аллели. Различные полиморфные аллели МНС, как класса I, так и класса II, обладают различной пептидной специфичностью: каждый аллель кодирует белки, которые связывают пептиды, демонстрирующие определенные схемы последовательностей. Геномные локусы HLA и методы тестирования аллелей или белков HLA у людей описаны в данной области (см., например, Choo et al. (2007). *Yonsei medical journal*. 48.1: 11-23; Shiina et al. (2009). *Journal of Human Genetics*. 54.1: 15; Petersdorf. (2013). *Blood*. 122.11: 1863-1872; и Bertaina and Andreani. (2018). *International Journal of Mathematical Sciences*. 19.2: 621, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антиген главного комплекса гистосовместимости (например, антиген HLA) несовместим у субъекта, получающего трансплантат в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, относительно донора. В некоторых вариантах осуществления антиген МНС представляет собой молекулу МНС класса I или молекулу МНС класса II. В конкретных вариантах осуществления антиген МНС представляет собой любой из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DPA1, HLA-DPA2, HLA-DQA1 и/или HLA-DQB1 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат по меньшей мере одно несоответствие HLA по отношению к антигенам HLA у пациента-человека. Например, в некоторых случаях аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или более девяти несоответствий HLA относительно антигенов HLA у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления аллогенные гемопоэтические стволовые клетки имеют полное несоответствие HLA по отношению к антигенам HLA у пациента-человека.

Альтернативно или дополнительно, по меньшей мере один минорный антиген гистосовместимости является несовместимым у субъекта, получающего трансплантат в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, относительно донора. В некоторых вариантах осуществления трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат по меньшей мере одно несоответствие mIHA относительно антигенов mIHA у пациента-человека. Например, в некоторых случаях аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или более девяти несоответствий mIHA относительно антигенов mIHA у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления минорный антиген гистосовместимости представляет собой белок HA-1, HA-2, HA-8, HA-3, HB-1, HY-A1, HY-A2, HY-B7, HY-B8, HY-B60 или HY-DQ5. Примеры других минорных

антигенов гистосовместимости известны в данной области (например, Perreault et al. (1990). Blood. 76.7: 1269-1280; Martin et al. (2017). Blood. 129.6: 791-798; и патент США № US10414813B2, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

Способы, описанные в данном документе, могут повысить уровень химеризма аллогенных донорских клеток у реципиента трансплантата по сравнению с пациентом, который получает либо ADC против CD117, либо ADC против CD45, либо только иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления способы эффективны для установления по меньшей мере 80% донорского химеризма у реципиента трансплантата (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% донорского химеризма). Уровень донорского химеризма после аллогенной трансплантации HSC может быть, например, общим химеризмом, химеризмом костного мозга, периферическим миелоидным химеризмом, В-клеточным химеризмом или Т-клеточным химеризмом.

Пути Введения и Дозы Введения

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в данном документе, можно вводить пациенту (например, пациенту-человеку, имеющему рак, аутоиммунное заболевание, или нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток) в виде множества лекарственных форм. Например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в данном документе, можно вводить пациенту, имеющему рак, аутоиммунное заболевание, или нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для использования с композициями и способами, описанными в данном документе, включают модифицирующие вязкость средства. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методов, известных в данной области.

Фармацевтические препараты, содержащие антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его конъюгаты (например, ADC, как описано в данном документе), получают путем смешивания 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 препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и содержат, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органических кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммоний хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные полипептиды

(менее чем приблизительно 10 остатков); 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 средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в данном документе, можно вводить множеством путей, например, перорально, через кожу, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, внутриокулярно или парентерально. Наиболее подходящий путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретного вводимого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пациента, способов получения фармацевтического препарата, способов введения (например, времени введения и путей введения), возраста пациента, массы тела, пола, тяжести заболевания, подлежащего лечению, диеты пациента и скорости выведения из организма пациента.

Эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг/кг веса тела на одно (например, болюсное) введение, многократное введение или непрерывное введение, или для достижения оптимальной концентрации в сыворотке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, концентрации в сыворотке от приблизительно 0,0001 до приблизительно 5000 мкг/мл). Дозу можно вводить один или несколько раз (например, 2-10 раз) в день, неделю или месяц субъекту (например, человеку), имеющему рак, аутоиммунное заболевание или получающему подготовительное лечение при подготовке к получению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 0,25 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против

CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет приблизительно 0,1 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет приблизительно 0,2 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45, конъюгированного с помощью линкера с цитотоксином), вводимого пациенту-человеку, составляет приблизительно 0,3 мг/кг.

В одном варианте осуществления доза ADC против НС, описанного в данном документе и вводимого пациенту-человеку, составляет приблизительно от 0,001 мг/кг до 10 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг до 9,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 9 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 8,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 8 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 7,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 7 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 6,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 6 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 5,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 4,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 4 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг до 3,5 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг до 3 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 10 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 9 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 8 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 7 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 6 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 5 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 4 мг/кг или приблизительно от 1 мг/кг до 3 мг/кг.

В одном варианте осуществления ADC против НС, описанный в данном документе, который вводят пациенту-человеку для лечения или подготовки, имеет время полувыведения, равное или менее 24 часов, равное или менее 22 часов, равное или менее 20 часов, равное или менее 18 часов, равное или менее 16 часов, равное или менее 14 часов, равное или менее 13 часов, равное или менее 12 часов, равное или менее 11 часов, равное или менее 10 часов, равное или менее 9 часов, равное или менее 8 часов, равное или менее 7 часов, равное или менее 6 часов или равное или менее 5 часов. В одном варианте осуществления время полувыведения ADC против НС 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; от 12 часов до 22 часов; от 10 часов до 20 часов; от 8 часов до 18 часов; или от 14 часов до 24 часов.

В одном варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, минимизируют токсичность для печени у пациента, получающего ADC для подготовки. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, приводят к тому, что уровень маркера печени остается ниже известного уровня токсичности у пациента в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. В других вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, приводят к тому, что уровень маркера печени остается в пределах контрольного диапазона у пациента в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, приводят к повышению уровня маркера печени не более чем в 1,5 раза выше контрольного диапазона, не более чем в 3 раза выше контрольного диапазона, не более чем в 5 раз выше контрольного диапазона или не более чем в 10 раз выше контрольного диапазона в течение более 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов. Примеры маркеров печени, которые можно использовать для тестирования токсичности, включают аланинаминотрансминазу (ALT), лактатдегидрогеназу (LDH) и аспартатаминотрансминазу (AST). В некоторых вариантах осуществления введение ADC, как описано в данном документе, то есть, когда вместо одной дозы вводят две дозы, приводит к временному увеличению маркера печени, например, AST, LDH и/или ALT. В некоторых случаях может быть достигнут повышенный уровень маркера печени, что указывает на токсичность, но в течение некоторого периода времени, например, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 72 часов, более 3 дней, приблизительно 3,5 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 4,5 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 5,5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 6,5 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 7,5 дней или менее недели, уровень маркера печени возвращается к нормальному уровню, не связанному с токсичностью для печени. Например, у человека (среднего взрослого мужчины), нормальный нетоксичный уровень ALT составляет 7-55 единиц на литр (ЕД/Л); а нормальный нетоксичный 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 введением первой дозы ADC и 14 днями после введения первой дозы пациенту. Например, пациенту можно вводить первую дозу, а затем вторую дозу, третью дозу, четвертую дозу или более доз в течение, например, 5, 10 или 14 дней после введения первой дозы, но по меньшей мере один из уровней AST, ALT или LDH в крови пациента не достигает 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 уровней, не поднимается более чем в 1,5 раза выше нормальных уровней, не поднимается более чем в

3 раза выше нормальных уровней, не поднимается более чем в 5 раз выше нормальных уровней или не поднимается более чем в 10 раз выше нормальных уровней.

В случае подготовительной процедуры перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить пациенту в то время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели (например, приблизительно за 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней) или более перед введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Диапазоны, включающие указанные в данном документе числа, также включены в предполагаемые способы.

диапазоны вводимых доз, описанные выше, можно комбинировать с ADC против НС, имеющими периоды полувыведения, указанные в данном документе.

С использованием способов, раскрытых в данном документе, специалист в данной области может вводить пациенту-человеку, нуждающемуся в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, ADC, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45) или антиген, экспрессируемый зрелыми иммунными клетками, такими как Т-клетки (например, CD45). Таким образом, чтобы способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток можно истощить перед введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток. Антитело может быть ковалентно конъюгировано с таким токсином, как цитотоксическая молекула, описанная в данном документе или известная в данной области. Например, антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином, таким как экзотоксин А синегнойной палочки, дебуганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как γ -аманитин, α -аманитин, сапорин, майтанзин, майтанзиноид, ауристатин, антрациклин, калихимицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепин, димер индолинбензодиазепина или их вариант. Эту конъюгацию можно выполнить с использованием методов образования ковалентной связи, описанных в данном документе

или известных в данной области. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно впоследствии вводить пациенту, например, путем внутривенного введения, перед трансплантацией пациенту экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аутологичные, сингенные или аллогенные гемопоэтические стволовые клетки).

Антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить в количестве, достаточном для уменьшения количества эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или более перед лечением трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Снижение количества гемопоэтических стволовых клеток можно отслеживать с использованием обычных методов, известных в данной области, например, с помощью анализа FACS клеток, экспрессирующих характерные антигены поверхности гемопоэтических стволовых клеток в образце крови, взятом у пациента с различными интервалами во время подготовительного лечения. Например, специалист в данной области может брать образец крови у пациента в различные моменты времени во время подготовительного лечения и определять степень уменьшения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток путем проведения анализа FACS для выяснения относительных концентраций гемопоэтических стволовых клеток в образце с использованием антител, которые связываются с маркерными антигенами гемопоэтических стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда концентрация гемопоэтических стволовых клеток достигла минимального значения в ответ на подготовительное лечение антителом против НС (например, антитело против CD117 или антителом против CD45), его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом лекарственное средство-антитело, врач может завершить подготовительное лечение и может начать подготовку пациента к лечению трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток.

Антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в водном растворе, содержащем одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как модифицирующее вязкость средство. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методов, описанных в данном документе или известных в данной области. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозировке, например, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг до 9,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 9 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 8,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 8 мг/кг,

приблизительно от 0,1 мг/кг до 7,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 7 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 6,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 6 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 5,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 4,5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг до 4 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг до 3,5 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг до 3 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 10 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 9 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 8 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 7 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 6 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 5 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг до 4 мг/кг или приблизительно от 1 мг/кг до 3 мг/кг, перед введением пациенту трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в то время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели (например, приблизительно за 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, или приблизительно 7 дней) или более перед введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Иммуносупрессивное лечение обычно включает введение эффективного количества иммунодепрессивного средства. Композиции иммунодепрессантов нужно составлять и дозировать в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают клиническое состояние конкретного пациента, причину трансплантации, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. эффективное количество в этом контексте, которое определяется такими соображениями, представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения иммунного ответа, который может привести к отторжению трансплантата хозяином. Такое количество предпочтительно ниже количества, которое является токсичным для хозяина или делает хозяина значительно более восприимчивым к инфекциям. Количество иммунодепрессанта, необходимое для раскрытия в настоящем документе, может быть ниже, чем количество, которое обычно требуется для введения трансплантатов, которые не были предварительно обработаны, и зависит от индивидуальных обстоятельств, окружающих трансплантат, и типа применяемого иммунодепрессанта.

Однако, как отмечалось выше, эти предлагаемые количества иммунодепрессанта в

значительной степени зависят от терапевтического усмотрения. Ключевым фактором при выборе подходящей дозы и графика является полученный результат, то есть приживление трансплантата. Например, относительно высокие дозы могут первоначально потребоваться для лечения сверхострого отторжения трансплантата, которое может быть связано с деструкцией опосредованной антителами трансплантата, или на более поздней стадии для лечения острого отторжения, которое характеризуется внезапным снижением функции трансплантата.

Иммунодепрессант вводят любыми подходящими способами, включая парентеральное, и, если желательно для местного иммунодепрессивного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, иммунодепрессант подходящим образом вводят путем импульсной инфузии, особенно с уменьшением доз иммунодепрессивного средства, или путем непрерывной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят перед трансплантацией стволовых клеток (то есть перед трансплантацией). В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят после трансплантации стволовых клеток (то есть после трансплантации). В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант вводят практически одновременно с получением пациентом трансплантата.

После завершения подготовительного лечения пациент может затем получать инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от того же врача, который проводил подготовительное лечение или от другого врача. Врач может провести пациенту инфузию аутологичных, сингенных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозировке от 1×10^3 до 1×10^9 гемопоэтических стволовых клеток/кг. Врач может контролировать приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем взятия образца крови у пациента и определения увеличения концентрации гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической клеточной линии (например, мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглий, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, клеток-натуральных киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов) после введения трансплантата. Этот анализ можно проводить, например, от 1 часа до 6 месяцев или более после лечения трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток (например, приблизительно за 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов,

приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 13 недель, приблизительно 14 недель, приблизительно 15 недель, приблизительно 16 недель, приблизительно 17 недель, приблизительно 18 недель, приблизительно 19 недель, приблизительно 20 недель, приблизительно 21 неделю, приблизительно 22 недели, приблизительно 23 недели, приблизительно 24 недели или более). Показание, что концентрация гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической клеточной линии увеличилась (например, приблизительно на 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 200%, приблизительно 500% или более) после лечения трансплантацией относительно концентрации соответствующего типа клеток до лечения трансплантацией обеспечивает одно указание, что лечение антителом против НС (например, антитело против CD117 или антителом против CD45), его антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом лекарственное средство-антитело успешно способствует приживлению введенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

Приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток из-за введения антитела против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45), их антигенсвязывающих фрагментов или ADC может проявляться в виде множества эмпирических измерений. Например, приживление трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток можно оценивать путем оценки количества единиц конкурентной репопуляции (CRU), присутствующих в костном мозге пациента после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117), или CD45), и последующего введения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, можно наблюдать приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток путем включения репортерного гена, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию, дающую флуоресцентный, хромофорный или люминесцентный продукт, в вектор, с помощью которого были трансфицированы донорские гемопоэтические стволовые клетки, и последующего контроля соответствующего сигнала в ткани, в которую были перемещены гемопоэтические стволовые клетки, такой как костный мозг. Также можно следить за

приживлением гемопоэтических стволовых клеток путем оценки количества и выживания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, например, при определении с помощью методов анализа сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS), известных в данной области. Приживление также можно определить путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в посттрансплантационный период и/или путем измерения восстановления клеток костного мозга с помощью донорских клеток в образце аспирата костного мозга.

Антитела против НС

Настоящее раскрытие частично основано на открытии, что антител или их антигенсвязывающих фрагментов, способные связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими клетками, такими как CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45, можно использовать в качестве терапевтических средств отдельно или в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) для (i) лечения рака и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся гемопоэтическими клетками CD117+ (например, GNNK+ CD117) или CD45+; и (ii) содействия приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в лечении трансплантатом. Эти терапевтические действия могут быть вызваны, например, связыванием антитела против гемопоэтических клеток (НС) (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с антигеном (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессируемым гемопоэтической клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой), лейкоцитом или иммунной клеткой, например, зрелой иммунной клеткой (например, Т-клеткой)), такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или гемопоэтическая стволовая клетка, что впоследствии вызывает гибель клеток. Истощение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может обеспечивать нишу, в которую могут попасть трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки, и впоследствии создавать продуктивный гемопоэз. Таким образом, трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут успешно приживаться у пациента, такого как пациент-человек, имеющий нарушение функции стволовых клеток, описанное в данном документе.

Антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), описанные в данном документе, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифических антител, антител с двумя вариабельными доменами, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфически связывают человеческие CD117 или CD45, включая, но без ограничения, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv), scFv (одноцепочечный Fv), сурротела (включая конструкцию суррогатной легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и тому подобное. Они также могут относиться или быть получены из любого изотипа, содержащего, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3

или IgG4).

Антитела для использования в сочетании со способами, описанными в данном документе, включают варианты тех антител, что описаны выше, такие как фрагменты антител, которые содержат или не содержат Fc-домен, а также гуманизированные варианты нечеловеческих антител, описанных в данном документе, и антителоподобные белковые каркасы (например, домены 10FN3), одну или несколько, или все CDR, или их эквивалентные области антитела или фрагмента антитела, описанных в данном документе. Иллюстративными антигенсвязывающими фрагментами вышеприведенных антител среди прочего являются двойной вариабельный домен иммуноглобулина, одноцепочечная молекула Fv (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, фрагмент Fv, фрагмент Fab, молекула F(ab')₂ и tandemный дисcFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет определенную скорость диссоциации, которая особенно предпочтительна при использовании в виде части конъюгата. Например, антитело против CD117 имеет в некоторых вариантах осуществления константу скорости диссоциации (K_{off}) для человеческого CD117 и/или CD117 макаки-резус 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} при измерении с помощью биослойной интерферометрии (BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD117 (например, человеческий CD117 и/или CD117 макаки-резус) с K_D приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 90 нМ или менее, приблизительно 80 нМ или менее, приблизительно 70 нМ или менее, приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 50 нМ или менее, приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 30 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 8 нМ или менее, приблизительно 6 нМ или менее, приблизительно 4 нМ или менее, приблизительно 2 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее при определении с помощью анализа биослойной интерферометрии (BLI).

В одном варианте осуществления представлены антитела против HC (например, антитела против CD117 или антитела против CD45), содержащие одну или несколько радиоактивно меченых аминокислот. Радиоактивно меченое антитело против CD117 можно использовать как для диагностических, так и для терапевтических целей (еще одна возможная особенность - конъюгация с радиоактивно мечеными молекулами). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают, но без ограничения, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc и ¹²⁵I, ¹³¹I и ¹⁸⁶Re. Способы получения радиоактивно меченных аминокислот и родственных производных пептидов известны в данной области (см., например, Junghans et al. Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds. Lippincott Raven (1996)) и патент США № 4681581, патент США № 4735210, патент США № 5101827, патент США № 5102990 (U.S. RE35500), патент США № 5648471 и патент США № 5697902. Например, радиоизотоп может быть конъюгирован с помощью метода хлорамина T.

Антитела против НС (например, против CD117 или антитела против CD45), связывающие фрагменты или их конъюгаты, описанные в данном документе, также могут содержать модификации и/или мутации, которые изменяют свойства антител и/или фрагментов, например, те, что увеличивают время полувыведения, увеличивают или уменьшают ADCC, и так далее, как известно в данной области.

В одном варианте осуществления антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его связывающий фрагмент содержит модифицированную Fc-область, причем указанная модифицированная Fc-область содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты относительно Fc-области дикого типа, так что указанная молекула имеет измененную аффинность для Fc гамма R (FcγR) или связывание с ней. Из кристаллографических исследований известно, что определенные положения аминокислот в области Fc находятся в прямом контакте с FcγR. В частности, аминокислоты 234-239 (шарнирной области), аминокислоты 265-269 (петли В/С), аминокислоты 297-299 (петли С'/Е) и аминокислоты 327-332 (петли F/G). (см. Sondermann et al. 2000 Nature, 406: 267-273). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, могут содержать вариант Fc-области, содержащий модификацию по меньшей мере одного остатка, который находится в прямом контакте с FcγR, на основании структурного и кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления Fc-область антитела против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену аминокислоты 265 согласно индексу ЕС по Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), явным образом включенную в данный документ посредством ссылки. «Индекс ЕС по Kabat» относится к нумерации антитела IgG1 человека ЕС. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену аминокислоты 234 согласно индексу ЕС по Kabat. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L234A. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену аминокислоты 235 согласно индексу ЕС по Kabat. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L235A.

В еще одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L234A и L235A (также называемую в данном документе «L234A.L235A» или «LALA»). В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L234A и L235A, причем Fc-область не содержит мутацию P329G. В дополнительном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A и L235A (также называемую в данном документе «D265C.L234A.L235A»). В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A и L235A, причем Fc-область не содержит мутацию P329G. В еще одном дополнительном варианте осуществления Fc-область содержит

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

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет модифицированную Fc-область, так что антитело снижает эффекторную функцию в анализе эффекторной функции *in vitro* с уменьшением связывания с рецептором Fc (Fc R) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcR. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет модифицированную Fc-область, так что антитело снижает эффекторную функцию в анализе эффекторной функции *in vitro* с уменьшением связывания с рецептором Fc гамма (FcγR) относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcγR. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет FcγR1. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет FcγR2A. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет FcγR2B. В других вариантах осуществления FcγR представляет FcγR2C. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет FcγR3A. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет FcγR3B. В других вариантах осуществления снижение

связывания составляет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение на 100% связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcγR. В других вариантах осуществления снижение связывания составляет снижение по меньшей мере на 70%-100%, снижение по меньшей мере на 80%-100%, снижение по меньшей мере на 90%-100%, снижение по меньшей мере на 95%-100% или снижение по меньшей мере на 98%-100% связывания антитела с FcγR относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область с FcγR.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет модифицированную Fc-область, так что антитело снижает высвобождение цитокинов в анализе высвобождения цитокинов *in vitro* с уменьшением высвобождения цитокинов по меньшей мере на 50% относительно высвобождения цитокинов идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления снижение высвобождения цитокинов составляет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение высвобождения цитокинов на 100% относительно высвобождения цитокинов идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления снижение высвобождения цитокинов составляет снижение по меньшей мере на 70%-100%, снижение по меньшей мере на 80%-100%, снижение по меньшей мере на 90%-100%, снижение высвобождения цитокинов по меньшей мере на 95%-100% относительно высвобождения цитокинов идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления цитокин высвобождается иммунными клетками.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет модифицированную Fc-область, так что антитело снижает дегрануляцию тучных клеток в анализе дегрануляции тучных клеток *in vitro* с уменьшением дегрануляции тучных клеток по меньшей мере на 50% относительно дегрануляции тучных клеток идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления снижение дегрануляции тучных клеток составляет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение на 100% дегрануляции тучных клеток относительно дегрануляции тучных клеток идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления снижение дегрануляции тучных клеток составляет снижение по меньшей мере на 70%-100%, снижение по меньшей мере на 80%-100%, снижение по меньшей мере на 90%-100% или снижение дегрануляции тучных клеток по меньшей мере на 95%-100% относительно дегрануляции тучных клеток идентичного

антитела, содержащего немодифицированную Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет модифицированную Fc-область, так что антитело снижает или предотвращает антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) в анализе антителозависимого клеточного фагоцитоза *in vitro* с уменьшением ADCP по меньшей мере на 50% относительно ADCP идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления снижение ADCP составляет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение высвобождения цитокинов на 100% относительно высвобождения цитокинов идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления антитело против HC (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), описанное в данном 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 модифицированной Fc-областью и рецептор Fc гамма можно определить с использованием множества методов, известных в данной области, например, но без ограничения, равновесные методы (например, иммуноферментный анализ (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализ (RIA)), или с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса или другого механизма анализа на основе кинетики (например, анализ BIACORE.RTM. Или анализ Octet.RTM. (forteBIO)), и других способов, таких как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания, флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET), гель-электрофореза и хроматографии (например, гель-фильтрации). В этих и других способах можно использовать метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использовать множество методов обнаружения, включая, но без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в Paul, W. E. ed. *Fundamental Immunology*, 4th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), где основное внимание уделено взаимодействиям антитело-иммуноген. Одним из примеров анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого антигена с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого антигена и обнаружение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность представляющего интерес антитела к конкретному антигену и скорости отклонения связывания можно определить из данных с помощью анализа графика Скэтчарда.

Конкуренцию со вторым антителом также можно определить с использованием радиоиммуноанализа. В этом случае антиген инкубируют с представляющим интерес антителом, конъюгированным с меченым соединением в присутствии возрастающих количеств немеченого второго антитела.

В одном варианте осуществления антитело, имеющее Fc-модификации, описанные в данном документе (например, D265C, L234A, L235A и/или H435A), имеет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение связывания с рецептором Fc гамма на 100% относительно связывания с рецептором Fc гамма идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область (например, при определении с помощью биослойной интерферометрии (BLI)).

Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что взаимодействия связывания Fc-области с рецептором Fc гамма важны для множества эффекторных функций и последующих событий передачи сигналов, включая, но без ограничения, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Соответственно, в некоторых аспектах антитело, содержащее модифицированную Fc-область (например, содержащую мутацию L234A, L235A и/или D265C), имеет существенно сниженные или ликвидированные эффекторные функции. Эффекторные функции можно анализировать с использованием множества способов, известных в данной области, например, путем измерения клеточных ответов (например, дегрануляции тучных клеток или высвобождения цитокинов) в ответ на представляющее интерес антитело. Например, с использованием стандартных способов в данной области Fc-модифицированные антитела можно анализировать на их способность запускать дегрануляцию тучных клеток *in vitro* или на их способность запускать высвобождение цитокинов, например, человеческими мононуклеарными клетками периферической крови.

Антитела согласно настоящему раскрытию можно дополнительно сконструировать для дополнительной модуляции времени полувыведения антитела за счет введения дополнительных мутаций Fc, таких как мутации, описанные, например, в (Dall'Acqua et al. (2006) J Biol Chem 281: 23514-24), (Zalevsky et al. (2010) Nat Biotechnol 28: 157-9), (Hinton et al. (2004) J Biol Chem 279: 6213-6), (Hinton et al. (2006) J Immunol 176: 346-56), (Shields et al. (2001) J Biol Chem 276: 6591-604), (Petkova et al. (2006) Int Immunol 18: 1759-69), (Datta-Mannan et al. (2007) Drug Metab Dispos 35: 86-94), (Vaccaro et al. (2005) Nat Biotechnol 23: 1283-8), (Yeung et al. (2010) Cancer Res 70: 3269-77) и (Kim et al. (1999) Eur J Immunol 29: 2819-25), и включают положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Иллюстративными мутациями, которые можно получить отдельно или в комбинации, являются мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R.

Таким образом, в одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию,

приводящую к уменьшению времени полувыведения, (например, относительно антитела, имеющего немодифицированную Fc-область). Антитело, имеющее короткое время полувыведения, может быть предпочтительным в некоторых случаях, когда ожидается, что антитело будет функционировать в качестве краткосрочного терапевтического средства, например, на подготовительном этапе, описанном в данном документе, когда после антитела вводят HSC. В идеале антитело должно быть по существу удалено перед доставкой HSC, которые также обычно экспрессируют антиген-мишень (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), но не являются мишенью для антитела против HC (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию в положении 435 (индекс ЕС согласно Kabat). В одном варианте осуществления мутацией является мутация H435A.

В одном варианте осуществления антитело против HC (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), описанное в данном документе, имеет время полувыведения (например, у людей) равное или меньше приблизительно 24 часов, равное или меньше приблизительно 23 часов, равное или меньше приблизительно 22 часов, равное или меньше приблизительно 21 часа, равное или меньше приблизительно 20 часов, равное или меньше приблизительно 19 часов, равное или меньше приблизительно 18 часов, равное или меньше приблизительно 17 часов, равное или меньше приблизительно 16 часов, равное или меньше приблизительно 15 часов, равное или меньше приблизительно 14 часов, равное или меньше приблизительно 13 часов, равное или меньше приблизительно 12 часов, или равное или меньше приблизительно 11 часов.

В одном варианте осуществления антитело против HC (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), описанное в данном документе, имеет время полувыведения (например, у людей) приблизительно 1-5 часов, приблизительно 5-10 часов, приблизительно 10-15 часов, приблизительно 15-20 часов или приблизительно 20-25 часов. В одном варианте осуществления время полувыведения антитела против HC составляет приблизительно 5-7 часов; приблизительно 5-9 часов; приблизительно 5-11 часов; приблизительно 5-13 часов; приблизительно 5-15 часов; приблизительно 5-20 часов; приблизительно 5-24 часа; приблизительно 7-24 часа; приблизительно 9-24 часа; приблизительно 11-24 часа; приблизительно 12-22 часа; приблизительно 10-20 часов; приблизительно 8-18 часов; или приблизительно 14-24 часа.

В некоторых аспектах Fc-область содержит две или более мутаций, которые приводят к уменьшению времени полувыведения и снижают эффекторную функцию антитела. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутацию, приводящую к уменьшению времени полувыведения, и мутацию по меньшей мере одного остатка, который может обеспечить прямой контакт с FcγR (например, на основании структурного и кристаллографического анализа). В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию H435A, мутацию L234A и мутацию L235A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию H435A и мутацию D265C. В одном

варианте осуществления Fc-область содержит мутацию H435A, мутацию L234A, мутацию L235A и мутацию D265C.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с цитотоксином (например, аматоксином) с помощью цистеинового остатка в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления этих аспектов цистеиновый остаток существует в природе в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, Fc-доменом может быть Fc-домен IgG, такой как Fc-домен IgG1 человека, а цистеиновый остаток можно выбрать из группы, состоящей из Cys261, Cys321, Cys367 и Cys425.

В некоторых вариантах осуществления цистеиновый остаток вводят с помощью мутации в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, цистеиновый остаток можно выбрать из группы, состоящей из Cys118, Cys239 и Cys265. В одном варианте осуществления Fc-область антитела против HC (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену аминокислоты 265 согласно индексу ЕС по Kabat. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C и H435A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A и L235A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A, L235A и H435A. В одном варианте осуществления Fc-область антитела против HC (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную замену аминокислоты 239 согласно индексу ЕС по Kabat. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию S239C. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L234A, мутацию L235A, мутацию S239C и мутацию D265A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутацию S239C и H435A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутацию L234A, мутацию L235A и мутацию S239C. В еще одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию H435A, мутацию L234A, мутацию L235A и мутацию S239C. В еще одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию H435A, мутацию L234A, мутацию L235A, мутацию S239C и мутацию D265A.

Следует заметить, что, если не указано иное, положения аминокислот в Fc относятся к индексу нумерации ЕС.

Вариантные Fc-домены, описанные в данном документе, определены согласно аминокислотным модификациям, которые их составляют. Для всех аминокислотных замен, обсуждаемых в данном документе в связи с Fc-областью, нумерация всегда соответствует индексу ЕС. Таким образом, например, D265C представляет собой вариант Fc с аспарагиновой кислотой (D) в положении 265 ЕС, замещенной цистеином (C) относительно исходного Fc-домена. Аналогичным образом, например, D265C/L234A/L235A определяет вариант Fc с заменами в положениях ЕС 265 (от D к C),

234 (от L к A) и 235 (от L к A) относительно исходного Fc-домена. Вариант также может быть обозначен в соответствии с его конечным аминокислотным составом в мутантных положениях ЕС аминокислот. Например, мутант L234A/L235A может называться LALA. Следует отметить, что порядок, в котором представлены замены, является произвольным. Следует заметить, что, если не указано иное, положения аминокислот в Fc относятся к индексу нумерации ЕС.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или антитело против CD45 согласно данному документу 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 (IgG2*), D265C (IgG2)/H435A, D265C/N297Q/H435A, D265C/N297Q, EPLVLAdelG/H435A, N297A, N297G или N297Q.

Антитела и связывающие их фрагменты, раскрытые в данном документе, можно использовать в конъюгатах, как описано более подробно ниже.

Антитела можно получить с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном варианте осуществления представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против CD117 или антитело против CD45, описанное в данном 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, путем трансформации): (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 хомячка (CHO), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления представлен способ получения антитела против CLL-1, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, которое представлено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно извлечение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения антитела против CD117 или антитела против CD45 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. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, когда не нужны гликозилирование и эффекторная функция Fc. Относительно экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N.J. 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделить из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и можно дополнительно очистить.

В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут быть полезны клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия почек эмбриона человека (клетки 293 или 293, описанные, например, в Graham et al. *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); клетки сертоли мыши (клетки TM4, описанные, например, в 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 печени буйволовой крысы (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); Клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID No, раскрытым в данном документе, (Таблица 3). Альтернативно, антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, содержащие SEQ ID No, раскрытые в

данном документе, причем каркасные области переменных областей, описанных в данном документе, имеют аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID No, раскрытым в данном документе, (Таблица 3).

В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе. В другом варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе. В еще одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе.

В одном варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе. В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе. В еще одном варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе.

Примеры антител против CD117 и против CD45 примеры описаны дальше в данном документе.

Антитела против CD117

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать человеческий CD117 (также называемый c-Kit, референсной последовательностью NCBI мРНК: NM_000222.2, референсной последовательностью NCBI белка: NP_000213.1), включая те, что способны связывать GNNK+ CD117, можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, для подготовки пациента к лечению трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Полиморфизмы, влияющие на кодирующую область или внеклеточный домен CD117 у значительной части популяции в настоящее время малоизвестны при неонкологических показаниях. Идентифицировано по крайней мере четыре изоформы CD117 с потенциалом дополнительных изоформ, экспрессируемых в опухолевых клетках. Две изоформы CD117 расположены во внутриклеточном домене белка, а две присутствуют во внешней

прилегающей к мембране области. Две изоформы CD117 расположены во внутриклеточном домене белка, а две присутствуют во внешней прилегающей к мембране области. Две внеклеточные изоформы, GNNK+ и GNNK-, различаются наличием (GNNK+) или отсутствием (GNNK-) 4 аминокислотной последовательности. Сообщается, что эти изоформы обладают одинаковой аффинностью с лигандом (SCF), но как сообщается, связывание лиганда с изоформой GNNK увеличивает интернализацию и деградацию. Изоформу GNNK+ можно использовать в качестве иммуногена для получения антител, способных связывать CD117, поскольку антитела, получаемые против этой изоформы, будут содержать белки GNNK+ и GNNK-. Аминокислотные последовательности изоформ 1 и 2 CD117 человека описаны в SEQ ID No: 145 и 146, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела против человеческого CD117 (hCD117), раскрытые в настоящем документе, способны связываться как с изоформой 1, так и изоформой 2 человеческого CD117.

Примеры антител против CD117 описаны в US 2019/0153114 A1 и US 2019/0144558 A1, содержание обеих заявок полностью явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Например, в таблице 3 описаны аминокислотные последовательности разных связывающих областей антител Ab54, Ab55, Ab56, Ab57, Ab58, Ab61, Ab66, Ab67, Ab68 и Ab69 против CD117. В настоящее раскрытие включены человеческие антитела против CD117, содержащие CDR, приведенные в таблице 3, а также человеческие антитела против CD117, содержащие переменные области, приведенные в таблице 3.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям антитела 55. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела 55 (то есть Ab55) приведена в SEQ ID NO: 19 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 55 приведены в SEQ ID NO: 21 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 22 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 23 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) антитела 55 описана в SEQ ID NO: 20 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 55 приведены в SEQ ID NO: 24 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 25 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 26 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 55 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 55 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) переменной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 21, 22 и 23, и набор CDR переменной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 24, 25 и 26. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 20, и переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 19.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям антитела 54. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела 54 (то есть Ab54) приведена в SEQ ID NO: 29 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 54 приведены в SEQ ID NO: 31 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 32 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 33 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) антитела 54 описана в SEQ ID NO: 30 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 54 приведены в SEQ ID NO: 34 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 35 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 36 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 54 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 54 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) переменной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 31, 32 и 33, и набор CDR переменной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 34, 35 и 36. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 29.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям антитела 56. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела 56 (то есть Ab56) приведена в SEQ ID NO: 39 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 56 приведены в SEQ ID NO: 41 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 42 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 43 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) антитела 56 описана в SEQ ID NO: 40 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 56 приведены в SEQ ID NO: 44 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 45 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 46 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 56 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 56 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) переменной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 41, 42 и 43, и набор CDR переменной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 44, 45 и 46. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 40, и переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие

области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям антитела 57. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела 57 (то есть Ab57) приведена в SEQ ID NO: 49 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 57 приведены в SEQ ID NO: 51 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 52 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 53 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) антитела 57 описана в SEQ ID NO: 50 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 57 приведены в SEQ ID NO: 54 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 55 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 56 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 57 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 57 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) переменной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 51, 52 и 53, и набор CDR переменной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 54, 55 и 56. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 50, и переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 49.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям антитела 58. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела 58 (то есть Ab58) приведена в SEQ ID NO: 59 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 58 приведены в SEQ ID NO: 61 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 62 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 63 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) антитела 58 описана в SEQ ID NO: 60 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 58 приведены в SEQ ID NO: 64 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 65 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 66 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 58 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 58 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) переменной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 61, 62 и 63, и набор CDR переменной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 64, 65 и 66. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 60, и переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 59.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующее областям антитела 61. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) антитела

61 (то есть Ab61) приведена в SEQ ID NO: 69 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 61 приведены в SEQ ID NO: 71 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 72 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 73 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) антитела 61 описана в SEQ ID NO: 70 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 61 приведены в SEQ ID NO: 74 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 75 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 76 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 61 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 61 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 71, 72 и 73, и набор CDR вариабельной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 74, 75 и 76. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 70, и вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 69.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, вариабельные области, соответствующие областям антитела 66. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела 66 (то есть Ab66) приведена в SEQ ID NO: 79 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 66 приведены в SEQ ID NO: 81 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 82 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 83 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) антитела 66 описана в SEQ ID NO: 80 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 66 приведены в SEQ ID NO: 84 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 85 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 86 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 66 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 66 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 81, 82 и 83, и набор CDR вариабельной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 84, 85 и 86. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 80, и вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 79.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, вариабельные области, соответствующие областям антитела 67. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела 67 приведена в SEQ ID NO: 9 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 67 приведены в SEQ ID NO 11 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 12

(CDR2 VH) и SEQ ID NO: 13 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи (VL) антитела 67 описана в SEQ ID NO: 10 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 67 приведены в SEQ ID NO 14 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 15 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 16 (CDR3 VL). Полноразмерная тяжелая цепь (HC) антитела 67 приведена в SEQ ID NO: 110, а полноразмерная константная область тяжелой цепи антитела 67 приведена в SEQ ID NO: 122. Легкая цепь (LC) антитела 67 приведена в SEQ ID NO: 109. Константная область легкой цепи антитела 67 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) варибельной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 11, 12, и 13, и набор CDR варибельной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 14, 15 и 16. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 9, и варибельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 10. В дополнительных вариантах осуществления антитело против CD117 содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 110, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 109.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, варибельные области, соответствующие областям антитела 68. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела 68 (то есть Ab68) приведена в SEQ ID NO: 89 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 68 приведены в SEQ ID NO: 91 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 92 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 93 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи (VL) антитела 68 описана в SEQ ID NO: 90 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 68 приведены в SEQ ID NO: 94 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 95 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 96 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 68 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 68 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) варибельной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 91, 92 и 93, и набор CDR варибельной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 94, 95 и 96. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 90, и варибельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлено антитело против CD117 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающие области, например, CDR, варибельные области, соответствующие областям антитела 69. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела

69 (то есть Ab69) приведена в SEQ ID NO: 99 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VH антитела 69 приведены в SEQ ID NO: 101 (CDR1 VH); SEQ ID NO: 102 (CDR2 VH) и SEQ ID NO: 103 (CDR3 VH). Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) антитела 69 описана в SEQ ID NO: 100 (см. таблицу 3). Аминокислотные последовательности домена CDR VL антитела 69 приведены в SEQ ID NO: 104 (CDR1 VL); SEQ ID NO: 105 (CDR2 VL) и SEQ ID NO: 106 (CDR3 VL). Константная область тяжелой цепи антитела 69 приведена в SEQ ID NO: 122. Константная область легкой цепи антитела 69 приведена в SEQ ID NO: 121. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи, приведенный в SEQ ID No: 101, 102 и 103, и набор CDR вариабельной области легкой цепи, приведенный в SEQ ID No: 104, 105 и 106. В других вариантах осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 100, и вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 99.

Некоторые антитела против CD117, описанные в данном документе, являются нейтральными антителами, поскольку эти антитела по существу не ингибируют активность CD117 в клетке, экспрессирующей CD117. Нейтральные антитела можно идентифицировать с использованием, например, анализ пролиферации клеток, зависимой от фактора стволовых клеток (SCF) *in vitro*. В анализе пролиферации клеток, зависимой от SCF, нейтральное антитело против CD117 не будет убивать клетки CD34+, которые зависят от SCF, для деления, поскольку нейтральное антитело не будет блокировать связывание SCF с CD117, например, для ингибирования активности CD117.

Нейтральные антитела можно использовать в диагностических целях, учитывая их способность специфически связываться с человеческим CD117, но они также эффективны для уничтожения экспрессирующих CD117 клеток при конъюгации с цитотоксином, таким как цитотоксины, описанные в данном документе. Обычно, антитела, используемые в конъюгатах, обладают агонистической или антагонистической активностью, уникальной для антитела. Однако в данном документе описан уникальный подход к конъюгатам, особенно в контексте, когда конъюгат использован в качестве подготовительного средства перед трансплантацией стволовых клеток. Хотя антагонистические антитела отдельно или в комбинации с цитотоксином в качестве конъюгата могут быть эффективными, учитывая убивающую способность антитела отдельно в дополнение к цитотоксину, подготовка с помощью конъюгата, содержащего нейтральное антитело против CD117, представляет собой альтернативную стратегию, где активность антитела является вторичной по отношению к действию цитотоксина, но для эффективной доставки цитотоксина важны характеристики интернализации и аффинности, например, скорость диссоциации антитела.

Примеры нейтральных антител против CD117 включают Ab58, Ab61, Ab66, Ab67,

Ab68 и Ab69. Сравнение аминокислотных последовательностей CDR нейтральных CDR антител против CD117 выявляет консенсусные последовательности между двумя группами идентифицированных нейтральных антител. Ab58 и Ab61 имеют одинаковые CDR легкой цепи и CDR3 HC с небольшими вариациями в CDR1 HC и CDR2 HC. Консенсусные последовательности для CDR1 и CDR2 HC описаны в SEQ ID Nos: 133 и 134. Ab66, Ab67, Ab68 и Ab69 также являются нейтральными антителами. Хотя Ab66, Ab67, Ab68 и Ab69 имеют одинаковые CDR легкой цепи и одинаковые CDR3 HC, эти антитела обладают вариабельностью в пределах их областей CDR1 HC и CDR2 HC. Консенсусные последовательности для этих антител в областях CDR1 HC и CDR2 HC представлены в SEQ ID No: 139 и 140, соответственно.

Например, в одном варианте осуществления Fc-область антитела 67 модифицирована с включением мутации D265C (например, SEQ ID NO: 111). В другом варианте осуществления Fc-область антитела 67 модифицирована с включением мутации D265C, L234A и L235A (например, SEQ ID NO: 112). В еще одном варианте осуществления Fc-область антитела 67 модифицирована с включением мутации D265C и H435A (например, SEQ ID NO: 113). В дополнительном варианте осуществления Fc-область антитела 67 модифицирована с включением мутации D265C, L234A, L235A и H435A (например, SEQ ID NO: 114).

Что касается антитела 55, в одном варианте осуществления Fc-область антитела 55 модифицирована с включением мутации D265C (например, SEQ ID NO: 117). В другом варианте осуществления Fc-область антитела 55 модифицирована с включением мутации D265C, L234A и L235A (например, SEQ ID NO: 118). В еще одном варианте осуществления Fc-область антитела 55 модифицирована с включением мутации D265C и H435A (например, SEQ ID NO: 119). В дополнительном варианте осуществления Fc-область антитела 55 модифицирована с включением мутации D265C, L234A, L235A и H435A (например, SEQ ID NO: 120).

Fc-области любого из антитела 54, антитела 55, антитела 56, антитела 57, антитела 58, антитела 61, антитела 66, антитела 67, антитела 68 или антитела 69 можно модифицировать с включением мутации D265C (например, как в SEQ ID NO: 123); мутации D265C, L234A и L235A (например, как в SEQ ID NO: 124); мутации D265C и H435A (например, как в SEQ ID NO: 125); или мутации D265C, L234A, L235A и H435A (например, как в SEQ ID NO: 126).

Также в данном документе представлены антагонистические антитела, включая Ab54, Ab55, Ab56 и Ab57. Хотя Ab54, Ab55, Ab56 и Ab57 имеют одинаковые CDR легкой цепи и одинаковые CDR3 HC, эти антитела обладают вариабельностью в пределах их областей CDR1 HC и CDR2 HC. Консенсусные последовательности для этих антител в областях CDR1 HC и CDR2 HC представлены в SEQ ID No: 127 и 128, соответственно.

В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147, и вариабельную область легкой

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

252. В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 238, и переменную область легкой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 239. В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 239. В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 240. В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 238, и переменную область легкой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 241. В одном варианте осуществления антитело против CD117 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 238, и переменную область легкой цепи, приведенную в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 242.

Как описано ниже, провели скрининг человеческих антител с помощью фаг-дисплейной библиотеки scFV для идентификации новых антител против CD117 и их фрагментов, имеющих терапевтическое применение. В этом скрининге среди прочего идентифицировали антитела 85 (Ab85), 86 (Ab86), 87 (Ab87), 88 (Ab88) и 89 (Ab89).

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab85 представлена ниже как SEQ ID NO: 243. Аминокислотные последовательности CDR VH Ab85 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: NYWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 245); IINPRDSDTRYRPSFQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 246); и HGRGYEGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 247).

Последовательность VH Ab85

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMAIINPR
DSDTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYEGYEGAFDI
WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 243)

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab85 представлена ниже как SEQ ID NO 244. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab85 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RSSQGIRSDLG (CDR1 VL; SEQ ID NO: 248); DASNLET (CDR2 VL; SEQ ID NO: 249); и QQANGFPLT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 250).

Последовательность VL Ab85

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIRSDLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:

244)

Антитело HC-86/LC-86 (Ab86)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab86 представлена ниже как SEQ ID NO: 251. Аминокислотные последовательности CDR VH Ab86 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: NYWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 245); IIYPGDSDIRYSPSLQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 253); и HGRGYNGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 3).

Последовательность VH Ab86

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDIRYSPSLQGQVTISVDTSTSTAYLQWNSLKPSDTAMYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 251)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab86 представлена ниже как SEQ ID NO 252. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab86 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RASQGIGDSL (CDR1 VL; SEQ ID NO: 254); DASNLET (CDR2 VL; SEQ ID NO: 249); и QQLNGYPIT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 255).

Последовательность VL Ab86

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDSLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGYPITFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO: 252)

Антитело HC-87/LC-87 (Ab87)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab87 представлена ниже как SEQ ID NO: 243. Аминокислотные последовательности CDR VH Ab87 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: NYWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 245); IINPRDS TRYRPSFQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 246); и HGRGYEGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 247).

Последовательность VH Ab87

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDS TRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 243)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab87 представлена ниже как SEQ ID NO 256. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab87 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RASQGIRNDLG (CDR1 VL; SEQ ID NO: 257); DASSLES (CDR2 VL; SEQ ID NO: 5); и QQLNGYPIT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 255).

Последовательность VL Ab87

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGYPITFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO: 256)

Антитело HC-88/LC-88 (Ab88)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab88 представлена ниже как SEQ ID NO: 258. Аминокислотные последовательности CDR VH Ab88 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: NYWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 245); IIYPGDSLTRYSPSFQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 259); и HGRGYNGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 3).

Последовательность VH Ab88

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
DSLTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYNGYEGAFDIW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 258)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab88 представлена ниже как SEQ ID NO: 256. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab88 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RASQGIRNDLG (CDR1 VL; SEQ ID NO: 257); DASSLES (CDR2 VL; SEQ ID NO: 5); и QQLNGYPIT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 255).

Последовательность VL Ab88

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLE
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGYPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
256)

Антитело HC-89/LC-89 (Ab89)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab89 представлена ниже как SEQ ID NO: 260. Аминокислотные последовательности CDR VH Ab89 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: NYWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 245); IIYPGDS DTRYSPSFQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 2); и HGRGYNGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 3).

Последовательность VH Ab89

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
DSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYNGYEGAFDI
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 260)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab89 представлена ниже как SEQ ID NO: 252. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab89 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RASQGIGDSL (CDR1 VL; SEQ ID NO: 254); DASNLET (CDR2 VL; SEQ ID NO: 249); и QQLNGYPIT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 255).

Последовательность VL Ab89

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDSLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGYPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
252)

Антитело HC-249/LC-249 (Ab249)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab249 представлена ниже как SEQ ID NO: 238. Аминокислотные последовательности

CDR VH Ab249 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: TSWIG (CDR1 VH; SEQ ID NO: 286); IIYPGDS DTRYSPSFQG (CDR2 VH; SEQ ID NO: 2); и HGLGYNGYEGAFDI (CDR3 VH; SEQ ID NO: 287).

Последовательность VH Ab249

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTTSWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPG
DSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGLGYNGYEGAFDI
WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 238)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab249 представлена ниже как SEQ ID NO: 242. Аминокислотные последовательности CDR VL Ab249 подчеркнуты снизу и представлены следующим образом: RASQGIGSALA (CDR1 VL; SEQ ID NO: 288); DASNLET (CDR2 VL; SEQ ID NO: 249); и QQLNGYPLT (CDR3 VL; SEQ ID NO: 289).

Последовательность VL Ab249

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGYPLTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:
242)

Человеческие антитела Ab85 и Ab249 оба получили из антитела СК6, является антагонистическим антителом против CD117. Оба антитела обладают улучшенными свойствами, например, улучшенными характеристиками связывания по сравнению с СК6.

СК6 содержит участок возможного дезамидирования в домене CDR3 вариабельной области тяжелой цепи. Хотя его лучше удалить для будущего получения антитела, положение аспарагина представляет серьезную проблему. Однако в CDR3 тяжелой цепи Ab85 участок возможного дезамидирования был успешно удален, так что антитело (имеющее CDR тяжелой и легкой цепей Ab85) способно сохранять специфичность на высоком уровне аффинности к человеческому CD117 и способность к интернализации. Кроме того, Ab85 имеет улучшенную скорость диссоциации относительно своих предшественников.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD117 содержит тяжелую цепь, содержащую набор CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), приведенных в SEQ ID No: 245, 246 и 247, и легкую цепь, содержащую набор CDR, приведенных в SEQ ID No: 248, 249 и 1250, интернализуется в клетках, экспрессирующих CD117, и имеет скорость диссоциации $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее при измерении с помощью BLI.

Дополнительные антитела против CD117, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают, например, антитела, полученные и выданные из ATCC учетный номер 10716 (депонированные как BA7.3C.9), такие как антитело SR-1, которое описано, например, в патенте США № 5489516, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD117.

В одном варианте осуществления антитело против CD117, описанное в данном документе, содержит Fc-область, содержащую L235A, L235A, D265C и H435A (индекс

ЕС).

Дополнительные антитела против CD117, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают антитела, описанные в патенте США № 7915391, в котором описаны, например, гуманизированные антитела SR-1; в патенте США № 5808002, в котором описано, например, антитело A3C6E2 против CD117, а также антитела, описанные, например, в WO 2015/050959, в которой описаны антитела против CD117, которые связывают эпитопы, содержащие PrO317, Asn320, Glu329, Val331, Asp332, Lus358, Glue360, Glue376, His378 и/или Thr380 CD117 человека; и US 2012/0288506 (также опубликованном как патент США № 8552157), в котором описано, например, антитело СК6 против CD117.

Дополнительные антитела против CD117 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают антитела, описанные в US 2015/0320880, такие как клоны 9P3, NEG024, NEG027, NEG085, NEG086 и 20376.

Антитела против CD45

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать человеческий CD45 (референсная последовательность NCBI мРНК: NM_080921.3, референсная последовательность NCBI белка: NP_563578.2), включая те, что способны связывать изоформу CD45RO, можно использовать в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в данном документе, например, чтобы способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, включают антитело против CD45 или ADC, который связывается с человеческим CD45RO, приведенным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 290. Антитела, которые связываются с различными изоформами CD45, раскрытыми в настоящем документе, также предполагается использовать в способах и композициях, раскрытых в данном документе. В результате альтернативного сплайсинга 34 экзона в первичном транскрипте возникают множество изоформ CD45. Сплайсинг экзона 4, 5, 6 и возможно 7 приводит к множеству вариантов CD45. В изоформах CD45, описанных в таблице 1 ниже, наблюдается избирательная экспрессия экзона.

Таблица 1. Экспрессия экзона в разных изоформах CD45

Изоформа CD45	Схема экспрессии экзона
CD45RA (SEQ ID NO: 291)	Экспрессирует только экзон 4
CD45RB (SEQ ID NO: 292)	Экспрессирует только экзон 5
CD45RC (SEQ ID NO: 293)	Экспрессирует только экзон 6
CD45RO (SEQ ID NO: 290)	Не экспрессирует экзона 4-6

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

CD45RA, CD45RAB, CD45RABC). Напротив, CD45RO лишен экспрессии экзонов 4-6 и получается из комбинации экзонов 1-3 и 7-34. Есть свидетельства того, что экзон 7 также может быть исключен из белка, что приводит к сплайсингу вместе 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 является единственной известной в настоящее время изоформой CD45, экспрессируемой на гемопоэтических стволовых клетках. CD45RA и CD45RABC не были обнаружены или исключены из фенотипа гемопоэтических стволовых клеток. Исследования, проведенные на мышах, свидетельствуют о том, что CD45RB экспрессируется на фетальных гемопоэтических стволовых клетках, но не присутствует на гемопоэтических стволовых клетках взрослого костного мозга. Следует заметить, что CD45RC имеет высокий уровень полиморфизма в экзоне 6, обнаруженный в азиатских популяциях (полиморфизм в экзоне 6 в CD45RC обнаружен примерно у 25% японской популяции). Этот полиморфизм ведет к высокой экспрессии CD45RO и снижению уровней CD45RA, CD45RB и CD45RC. Кроме того, варианты CD45RA (такие как CD45RAB и CD45RAC) проявляют полиморфизм в экзоне 4, связанный 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 подготовительного лечения пациентов, нуждающихся в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток. Поскольку у CD45RO отсутствует только экспрессия экзонов 4, 5 и 6, его использование в качестве иммуногена обеспечивает скрининг пан-CD45 Abs и CD45RO-специфических антител.

Антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают антитела против CD45 и их антигенсвязывающие части. Антигенсвязывающие части антител хорошо известны в данной области и могут быть легко сконструированы на основе антигенсвязывающей области антитела. В иллюстративных вариантах осуществления антителом против CD45, используемым в сочетании с подготовительными способами, описанными в данном документе, может быть моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, поликлональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, двойной вариабельный домен иммуноглобулина, одноцепочечная молекула Fv (scFv), диатело, триатело, нанотело, антителоподобный белковый каркас, фрагмент Fv, фрагмент Fab, молекула F(ab')₂ или тандемный диссСFv. Ниже представлены иллюстративные антитела против CD45, которые можно использовать целиком или частично в ADC или способах, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления антитело против CD45 представляет собой или получено из клона HI30, который поставляет на рынок BIOLEGEND® (San Diego, CA), или его гуманизированного варианта. Гуманизацию антител можно выполнять путем замены каркасных остатков и остатков константной области нечеловеческого антитела на антитело зародышевой линии человека в соответствии с процедурами, известными в данной области (как описано, например, в примере 7 ниже). Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами, описанными в данном документе, включают антитела ab10558, EP322Y, MEM-28, ab10559, 0.N.125, F10-89-4, Hle-1, 2B11, YTH24.5, PD7/26/16, F10-89-4, 1B7, ab154885, B-A11, phosphor S1007, ab170444, EP350, Y321, GA90, D3/9, X1 6/99 и LT45 против CD45, которые поставляет на рынок ABCAM® (Cambridge, MA), а также их гуманизированные варианты. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании с процедурами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают антитело HPA000440 против CD45, которое поставляет на рынок SIGMA-ALDRICH® (St. Louis, MO), и его гуманизированные варианты. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают мышинное моноклональное антитело BC8, которое описано, например, в Matthews et al. Blood 78:1864-1874, 1991, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами, описанными в данном документе, включают моноклональное антитело YAML568, которое описано, например, в Glatting et al. J. Nucl. Med. 8:1335-1341, 2006, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании с процедурами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают моноклональные антитела YTH54,12 и YTH25.4, которые описаны, например, в Brenner et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 996:80-88, 2003, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам. Дополнительные антитела против CD45 для использования со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают UCHL1, 2H4, SN130, MD4,3, MBI и MT2, которые описаны, например, в Brown et al. Immunology 64:331-336, 1998, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами, описанными в данном документе, включают те, что получены и выданы Американской коллекцией типовых культур (ATCC), учетные номера № RA3-6132, RA3-2C2 и TIB122, а также моноклональные антитела C363.16A и 13/2, которые описаны, например, в Johnson et al. J. Exp. Med. 169:1179-1184, 1989, раскрытие которого

включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам. Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном 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, в Harvath et al. *J. Immunol.* 146:949-957, 1991, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45, а также к их гуманизированным вариантам.

Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают те, что описаны, например, в патентах США №№ 7265212 (в котором среди других клонов описаны, например, антитела против CD45 39E11, 16C9 и 1G10); 7160987 (в котором описаны, например, антитела против CD45, полученные и выданные ATCC учетный номер HB-11873, такие как моноклональное антитело 6G3); и 6099838 (в котором описано, например, антитело против CD45 MT3, а также антитела, полученные и выданные ATCC учетный номер № HB220 (также обозначенные MB23G2) и HB223), а также US 2004/0096901 и US 2008/0003224 (в которых описаны, например, антитела против CD45, полученные и выданные ATCC учетный номер PTA-7339, такие как моноклональное антитело 17.1), раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к антителам против CD45.

Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают антитела, полученные и выданные из ATCC, учетные номера № MB4B4, MB23G2, 14.8, GAP 8.3, 74-9-3, I/24.D6, 9.4, 4B2, M1/9.3.4.HL.2, а также гуманизированные варианты и/или их варианты с созревшей аффинностью. Созревание аффинности можно выполнить, например, с использованием методов отображения *in vitro*, описанных в данном документе или известных в данной области, таких как фаговый дисплей.

Дополнительные антитела против CD45, которые можно использовать в сочетании со способами подготовки пациентов, описанными в данном документе, включают антитело T29/33 против CD45, которое описано, например, в Morikawa et al. *Int. J. Hematol.* 54:495-504, 1991, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к антителам против CD45.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 выбирают из апамистамаба (также известного 90Y-BC8, Iomab-B, BC8; описанного, например, в US20170326259, WO2017155937 и Orozco et al. *Blood.* 127,3 (2016): 352-359.) или BC8-B10 (описанного, например, в Li et al. *PloS one* 13.10 (2018): e0205135.), каждый из которых включен посредством ссылки. Другие антитела против CD45 описаны, например, в WO2003/048327, WO2016/016442, US2017/0226209, US2016/0152733, US9,701,756; US2011/0076270 или US7,825,222, каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

Например, в одном варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит связывающие области, например, CDR, переменные области, соответствующие областям апамистамаба. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) апамистамаба приведена в SEQ ID NO: 296 (см. таблицу 3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) апамистамаба описана в SEQ ID NO: 297 (см. таблицу 3). В других вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 296, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 297. В одном варианте осуществления антитело против CD45 содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 апамистамаба, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 апамистамаба.

В одном варианте осуществления антитело против CD45 содержит тяжелую цепь антитела против CD45, описанную в данном документе, и переменную область легкой цепи антитела против CD45, описанную в данном документе. В одном варианте осуществления антитело против CD45 содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела против CD45, описанную в данном документе, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 антитела против CD45, описанные в данном документе.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с антителом против CD45 согласно данному документу, например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с антителом против CD45 согласно данному документу. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит модифицированную переменную область тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC антитела против CD45 согласно данному документу или его вариант, причем вариант (i) отличается от антитела против CD45 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от антитела против CD45 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от антитела против CD45 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична антителу против CD45, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом модифицированная переменная область тяжелой цепи может иметь усиленную биологическую активность относительно переменной области тяжелой цепи антитела против CD45, и в то же время сохранять специфичность связывания CD45 антителом.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в

сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают вышеописанные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также гуманизированные варианты тех нечеловеческих антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые описаны выше, и антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают тот же эпитоп, что и антитела, описанные выше, при оценке, например, с помощью анализа конкурентного связывания CD45.

Способы Идентификации Антител

Способы высокоэффективного скрининга библиотек антител или фрагментов антитела на предмет молекул, способных связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, можно использовать для идентификации антител со зрелой аффинностью, применимых для лечения рака, аутоиммунных заболеваний и подготовки пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии гемопоэтическими стволовыми клетками, как описано в данном документе. Такие способы включают методы отображения *in vitro*, известные в данной области, среди прочего такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, рибосомный дисплей, дисплей мРНК и дисплей кДНК. Использование фагового дисплея для выделения антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают биологически релевантные молекулы, рассмотрено, например, в Felici et al. *Biotechnol. Annual Rev.* 1:149-183, 1995; Katz, *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45, 1997; и Hoogenboom et al. *Immunotechnology* 4:1-20, 1998, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к методам отображения *in vitro*. Созданы рандомизированные комбинаторные пептидные библиотеки для отбора полипептидов, которые связывают антигены клеточной поверхности, как описано в Kay, *Perspect. Drug Discovery Des.* 2:251-268, 1995 and Kay et al. *Mol. Divers.* 1:139-140, 1996, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к обнаружению антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, успешно представлены фагами как функциональные молекулы (см., например, EP 0349578; EP 4527839; и EP 0589877, а также Chiswell и McCafferty, *Trends Biotechnol.* 10:80-84 1992, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к использованию методов отображения *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и scFv, экспрессированный в форматах отображения *in vitro* (см., например, McCafferty et al. *Nature* 348:552-554, 1990; Barbas et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, 1991; и Clackson et al. *Nature* 352:624-628, 1991, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к платформам отображения *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул). Человеческие антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) также можно получать, например, в HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. Эти методы, среди прочего, можно использовать для

идентификации и улучшения аффинности антител, антитела или фрагментов, способных связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, и, в свою очередь, можно использовать для истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в лечении трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток.

В дополнение к методам отображения *in vitro* методы компьютерного моделирования можно использовать для конструирования и идентификации антител, способных связывать антиген (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, или фрагментов антител *in silico*. Например, используя методы компьютерного моделирования, специалист в данной области может провести скрининг библиотеки антител или фрагментов антител *in silico* в отношении молекул, способных связывать конкретные эпитопы на антигене, экспрессируемом гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), такие как внеклеточные эпитопы антигена.

Дополнительные методы можно использовать для идентификации антител или фрагментов антител, способных связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), и которые интернализуются клеткой, например, с помощью опосредованного рецептором эндоцитоза. Например, методы отображения *in vitro*, описанные выше, можно адаптировать к скринингу в отношении антител или фрагментов антител, которые связывают антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), и которые впоследствии интернализуются. Фаговый дисплей представляет один такой метод, который можно использовать в сочетании с этой парадигмой скрининга. Для идентификации антитела против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) или фрагмента антитела и впоследствии интернализации гемопоэтическими стволовыми клетками специалист в данной области может использовать методы фагового дисплея, описанные в Williams et al. *Leukemia* 19:1432-1438, 2005, раскрытие которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. Например, используя методы мутагенеза, известные в данной области, можно получить библиотеку рекомбинантных фагов, которые кодируют антитела, фрагменты антител, такие как, среди прочего, фрагменты scFv, фрагменты Fab, диатела, триатела и домены 10FN3 или лиганды, которые содержат рандомизированные кассеты аминокислот (например, в одной или нескольких, или всех CDR или их эквивалентных областях или антителе, или фрагменте антитела). Каркасные области, шарнир, Fc-домен и другие области антител или фрагментов антител можно сконструировать таким образом, чтобы они были неиммуногенными для человека, например, благодаря наличию последовательности или последовательностей антител зародышевой линии человека, которые демонстрируют лишь незначительные вариации по отношению к антителам зародышевой линии человека.

Используя методы фагового дисплея, описанные в данном документе или известные в данной области, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела или фрагменты антител, ковалентно связанные с фаговыми частицами, можно инкубировать с антигеном (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), например, сначала инкубируя фаговую библиотеку с блокирующими средствами (такими как, например, молочный белок, бычий сывороточный альбумин и/или IgG, чтобы удалить кодирующие фаги антитела или фрагменты антител, которые демонстрируют неспецифическое связывание с белками, и фаг, который кодируют антитела или их фрагменты, которые связывают Fc-домены, а затем инкубируя фаговую библиотеку с популяцией гемопоэтических стволовых клеток или зрелых иммунных клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют, например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45. Фаговую библиотеку можно инкубировать с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы обеспечить связывание антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитела против CD45) или фрагментов антител с родственным антигеном клеточной поверхности (например, CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45), а затем интернализацию гемопоэтическими стволовыми клетками (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C). Фаг, содержащий антитела или фрагменты антител, которые не демонстрируют достаточной аффинности, чтобы обеспечить связывание антигена (CD117 (например, GNNK+ CD117) или CD45) и интернализацию гемопоэтическими стволовыми клетками, впоследствии можно удалить путем промывания клеток, например, холодным (4°C) 0,1 М глицинового буфера с pH 2,8. Фаг, связанный с антителами или фрагментами антител, которые были интернализированы гемопоэтическими стволовыми клетками, можно идентифицировать, например, путем лизирования клеток и выделения интернализированного фага из среды для культивирования клеток. Затем фаг можно амплифицировать в бактериальных клетках, например, путем инкубации бактериальных клеток с выделенным фагом в среде 2xYT с использованием способов, известных в данной области. Фаг, выделенный из этой среды, затем можно охарактеризовать, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты встроенных в геном фага гена (генов), кодирующих антитела или фрагменты антител. Кодированные антитела или фрагменты антител можно впоследствии получить *de novo* с помощью химического синтеза (например, фрагментов антител, таких как фрагменты scFv) или путем рекомбинантной экспрессии (например, полноразмерного антитела).

Способность к интернализации полученных антител или фрагментов антител можно оценить, например, с использованием анализов интернализации радионуклидов, известных в данной области. Например, антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или фрагменты антител, идентифицированные с использованием методов отображения *in vitro*, описанных в данном документе или известных в данной области, можно функционализировать путем включения радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{122}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{67}Ga ,

^{111}In , ^{99}Tc , ^{169}Yb , ^{186}Re , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{77}As , ^{72}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{212}Bi , ^{213}Bi или ^{225}Ac . Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{122}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{211}At можно включить в антитела или фрагменты антител с использованием шариков, таких как полистироловые шарики, содержащие электрофильные галогеновые реагенты (например, Iodination Beads, Thermo Fisher Scientific, Inc. Cambridge, MA). Радиоактивно меченые антитела, их фрагменты или ADC можно инкубировать с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного, чтобы обеспечить интернализацию (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C , например, 1 час при 4°C). Затем клетки можно промыть для удаления неинтернализированных антител или их фрагментов (например, с использованием холодного (4°C) 0,1 М глицинового буфера с pH 2,8). Интернализированные антитела или фрагменты антител можно идентифицировать путем обнаружения испускаемого излучения (например, γ -излучения) полученных гемопоэтических стволовых клеток по сравнению с испускаемым излучением (например, γ -излучением) восстановленного промывочного буфера. Вышеупомянутые анализы интернализации также можно использовать для получения характеристики ADC.

Антитела можно получить с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном варианте осуществления представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45), описанное в данном 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 представлены 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, путем трансформации): (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 хомячка (CHO), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления представлен способ получения антитела против CLL-1, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, которое представлено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно извлечение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения антитела против НС (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) 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. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, когда не нужны гликозилирование и эффекторная функция Fc. Относительно экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N.J. 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделить из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и можно дополнительно очистить.

В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут быть полезны клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия почек эмбриона человека (клетки 293 или 293, описанные, например, в Graham et al. *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); клетки сертоли мыши (клетки TM4, описанные, например, в 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 печени буйволовой крысы (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); Клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003). В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы (связаны) с цитотоксином с помощью линкера. В некоторых

вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с клеткой, интернализирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в данном документе, таким образом, что после поглощения клеткой антитела или его фрагмента цитотоксин может достигать своей внутриклеточной мишени и опосредовать гибель гемопоэтических клеток. Любое количество цитотоксинов может быть конъюгировано с антителом против НС, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Цитотоксины, подходящие для использования с композициями и способами, описанными в данном документе, включают среди прочего средства интеркаляции ДНК, (например, антрациклины), средства, способные нарушать работу аппарата митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтанзин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как α -аманитин и его производные), и средства, способные нарушать биосинтез белка (например, средства, которые демонстрируют активность N-гликозидазы рРНК, такие как сапорин и А-цепь рибина), известные в данной области.

Цитотоксины

Различные цитотоксины могут быть конъюгированы с антителом против НС (например, антителом против CD117, антителом против CD45) с помощью линкера для использования в способах лечения, описанных в данном документе. В частности, ADC против НС (например, ADC против CD117 или ADC против CD45) содержат антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированное (то есть ковалентно связанное линкером) с цитотоксическим фрагментом (или цитотоксином). В различных вариантах осуществления цитотоксический фрагмент проявляет пониженную цитотоксичность или ее отсутствие при связывании с конъюгатом, но возобновляет цитотоксичность после отщепления от линкера. В различных вариантах осуществления цитотоксический фрагмент сохраняет цитотоксичность без отщепления от линкера. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с клеткой, интернализирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в данном документе, таким образом, чтобы после поглощения клеткой антитела или его фрагмента цитотоксин мог достигать своей внутриклеточной мишени и, например, опосредовать гибель Т-клеток.

Таким образом, ADC по настоящему изобретению могут иметь общую формулу $Ab-(Z-L-D)_n$, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) конъюгированы (ковалентно связаны) с линкером (L) посредством химического фрагмента (Z) с цитотоксическим фрагментом («лекарственным средством», D), каждый из которых раскрыт в данном документе.

Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгирован с количеством фрагментов лекарственного средства, которое указано целым числом n, которое представляет среднее количество цитотоксинов на антитело, которое может варьироваться, например, от приблизительно 1 до приблизительно 20. В некоторых вариантах осуществления n составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 1. Характеристику в виде среднего количества фрагментов

лекарственного средства на антитело в препаратах ADC в результате реакции конъюгации можно получить обычными средствами, такими как масс-спектропия, анализ ELISA и HPLC. Также по n можно определить количественное распределение ADC. В некоторых случаях разделение, очистка и получение характеристики гомогенного ADC, где n представляет собой определенное значение из ADC с другими грузами лекарственных средств, можно обеспечить с помощью таких средств, как HPLC с обращенной фазой или электрофорез.

Иногда ADC против НС (например, ADC против CD117 или ADC против CD45) могут быть ограничены количеством участков присоединения на антителе. Например, когда присоединение представляет собой цистеинтиол, антитело может иметь только одну или несколько цистеинтиольных групп или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, через которые может быть присоединен линкер. Обычно, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных цистеинтиольных групп, которые могут быть связаны с фрагментом лекарственного средства; в основном, остатки цистеинтиола в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В некоторых вариантах осуществления антитело можно восстановить с помощью восстанавливающего средства, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в условиях частичного или полного восстановления для образования реакционноспособных цистеинтиольных групп. В некоторых вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственным средством, например, $n > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления с антителом во время реакции конъюгации конъюгирует меньше теоретического максимума фрагментов лекарственного средства. Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным продуктом лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Только наиболее реакционноспособные лизиновые группы могут реагировать с реагирующим с амином линкерным реагентом. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают воздействию условий денатурирования для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) ADC можно регулировать разными способами, например: (i) ограничивая молярный избыток промежуточного продукта лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничивая время или температуру реакции конъюгации, (iii) частичные или ограничивающие восстановительные условия для модификации цистеинтиола, (iv) конструируя с помощью рекомбинантных методов аминокислотную последовательность антитела таким образом, чтобы модифицировать количество и положение цистеиновых остатков для регулирования количества и/или положения присоединения линкера-лекарственного средства.

Цитотоксины, подходящие для использования с композициями и способами,

описанными в данном документе, среди прочего включают средства интеркаляции ДНК, (например, антрациклины), средства, способные нарушать работу аппарата митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтанзин, майтанзиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как α -аманитин и его производные), и средства, способные нарушать биосинтез белка (например, средства, которые демонстрируют активность N-гликозидазы рРНК, такие как сапорин и А-цепь рицина), известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой связывающее микротрубочки средство (например, майтанзин или майтанзиноид), аматоксин, экзотоксин А синегнойной палочки, дебуганин, дифтерийный токсин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихимицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролбензодиазепин, димер пирролбензодиазепина, индолинбензодиазепин, димер индолинбензодиазепина, псевдодимер индолинбензодиазепина или его вариант, или другое цитотоксическое соединение, описанное в данном документе или известное в данной области.

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, раскрытым в данном 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.

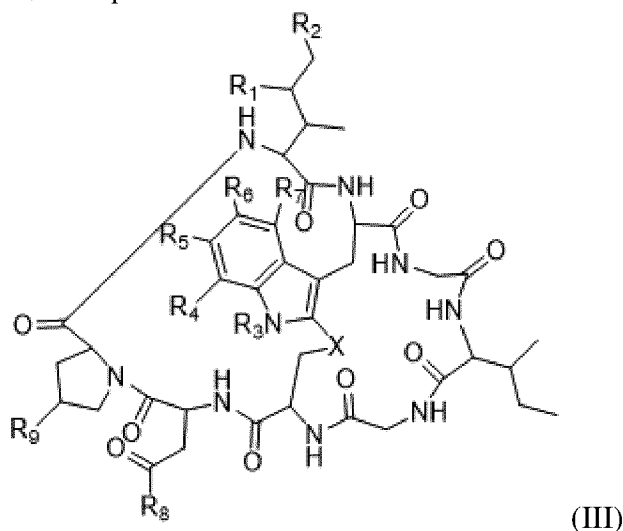
Ниже описаны дополнительные подробности, касающиеся цитотоксинов, которые можно использовать в ADC против НС (например, ADC против CD117 или ADC против CD45), применимых в способах согласно настоящему раскрытию.

Аматоксины

Способы и композиции, раскрытые в данном документе, включают ADC, содержащие ингибитор РНК-полимеразы, например, аматоксин, в качестве цитотоксина, конъюгированного с антителом против НС (например, антителом против CD117). В некоторых вариантах осуществления ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин или его производное. В некоторых вариантах осуществления цитотоксином конъюгата антитело-лекарственное средство, раскрытым в данном 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. Структуры различных существующих в природе аматоксинов раскрыты, например, в Zanotti et al. *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 1987, 450-459.

Аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают соединения согласно, но без ограничения, формуле (III), включая α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту или проамануллин. Формула (III) выглядит

следующим образом:



где R_1 представляет H, OH или OR_A ;

R_2 представляет H, OH или OR_B ;

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

R_3 представляет H или R_D ;

R_4 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_5 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_7 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

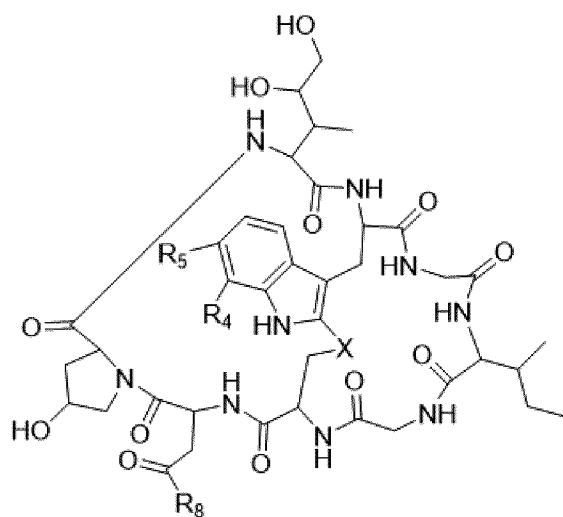
R_8 представляет OH, NH_2 или OR_D ;

R_9 представляет H, OH или OR_D ;

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

R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C_1-C_6 алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C_1-C_6 гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C_2-C_6 алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C_2-C_6 гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C_2-C_6 алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C_2-C_6 гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

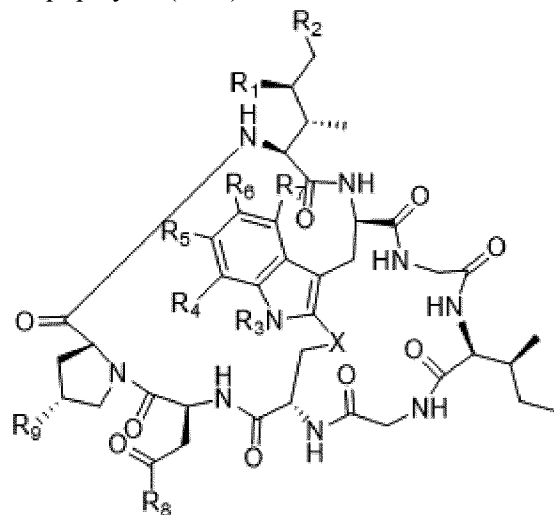
Например, в одном варианте осуществления аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают соединения согласно формуле (IIIА)



(III A),

где R_4 , R_5 , X и R_8 каждый соответствует определению выше.

Например, в одном варианте осуществления аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, включают соединения согласно формуле (III B) ниже:



(III B)

где R_1 представляет H, OH или OR_A ;

R_2 представляет H, OH или OR_B ;

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

R_3 представляет H или R_D ;

R_4 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_5 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_7 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

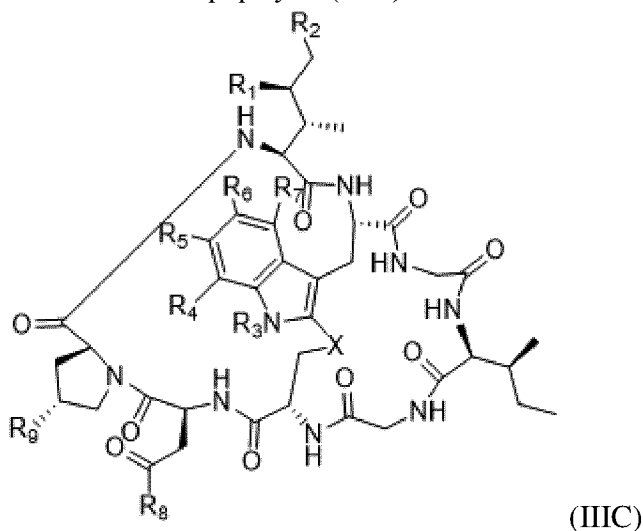
R_8 представляет OH, NH_2 или OR_D ;

R_9 представляет H, OH или OR_D ;

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

R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C_1 - C_6 алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C_1 - C_6 гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C_2 - C_6 алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C_2 - C_6 гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C_2 - C_6 алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C_2 - C_6 гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

В одном варианте осуществления аматоксины, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, также включают соединения согласно формуле (III) ниже:



где R_1 представляет H, OH или OR_A ;

R_2 представляет H, OH или OR_B ;

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

R_3 представляет H или R_D ;

R_4 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_5 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_7 представляет H, OH, OR_D или R_D ;

R_8 представляет OH, NH_2 или OR_D ;

R_9 представляет H, OH или OR_D ;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; а

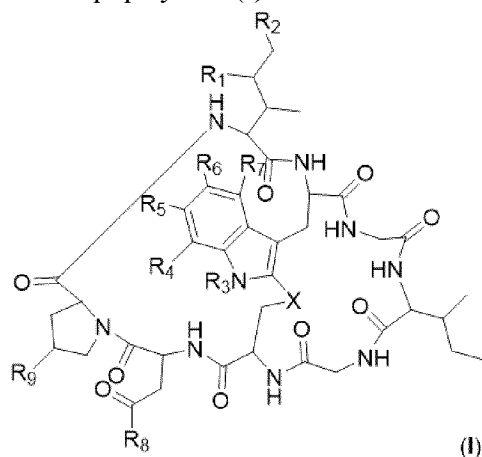
R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C_1 - C_6 алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C_1 - C_6 гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C_2 - C_6 алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C_2 - C_6 гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C_2 - C_6 алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C_2 - C_6

гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой аманитин.

Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть связаны с аматоксином (например, формулы III, IIIA, IIIB или IIIC) с образованием конъюгата, представленного формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет линкер, Z представляет химический фрагмент, а Am представляет аматоксин. Многие положения на аматоксинах или их производных могут служить в качестве положения ковалентного связывания связывающего фрагмента L и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Иллюстративные способы конъюгации аматоксина и линкеров, применимых для таких процессов, описаны ниже. Иллюстративные содержащие линкер аматоксины Am-L-Z, применимые для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в данном документе, показаны в структурных формулах (I), (IA), (IB), (II), (IIA) и (IIB), приведенных в данном документе.

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



где R_1 представляет H, OH, OR_A или OR_C ;

R_2 представляет H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

R₉ представляет H, OH, OR_C или OR_D;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-;

R_C представляет $-L-Z$;

R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C₁-C₆ алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C₁-C₆ гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C₂-C₆ алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C₂-C₆ гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C₂-C₆ алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C₂-C₆ гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

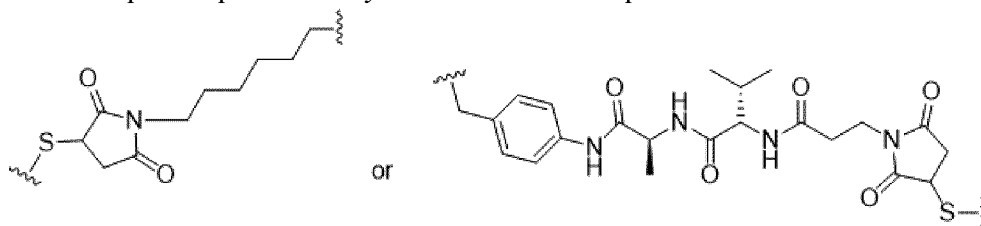
L представляет линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C₁-C₆ алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C₁-C₆ гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C₂-C₆ алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C₂-C₆ гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C₂-C₆ алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C₂-C₆ гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или их комбинацию;

a

Z представляет химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает антиген-мишень (например, CD117).

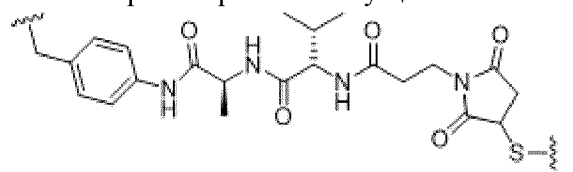
В некоторых вариантах осуществления Am содержит ровно один заместитель R_C.

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет

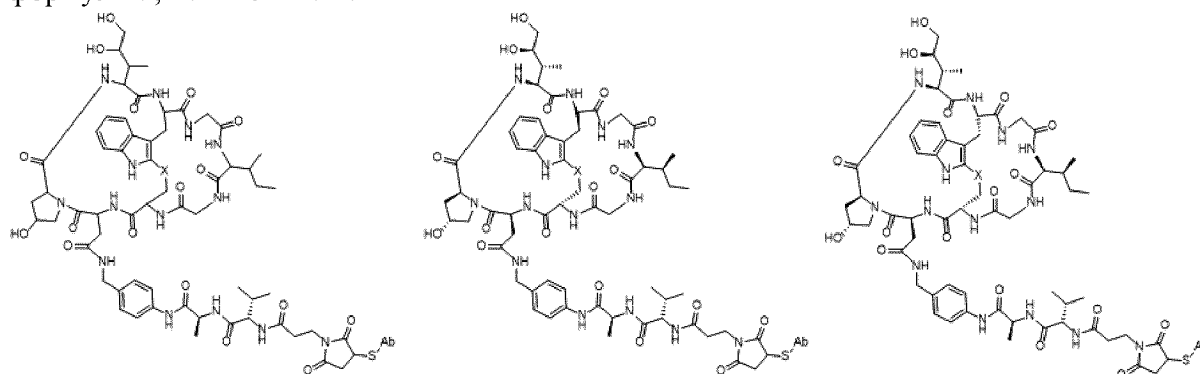


где S представляет атом серы, который представляет собой реакционноспособный заместитель, присутствующий в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает антиген-мишень (например, из группы -SH цистеинового остатка).

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет



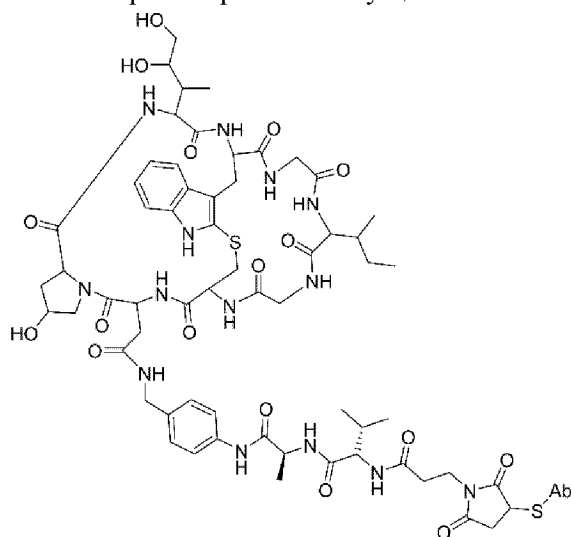
В некоторых вариантах осуществления конъюгат Am-L-Z-Ab представлен одной из формул IV, IVA или IVB:



(IV) (IVA) (IVB)

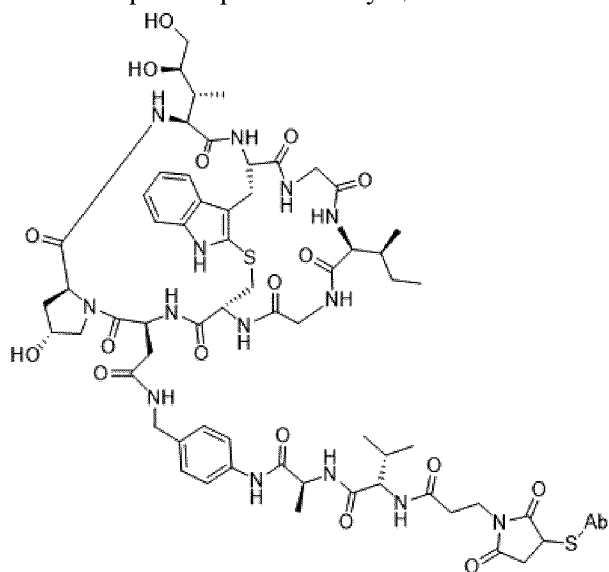
где X представляет S, SO или SO₂, а Ab показано, чтобы обозначить место присоединения Ab.

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



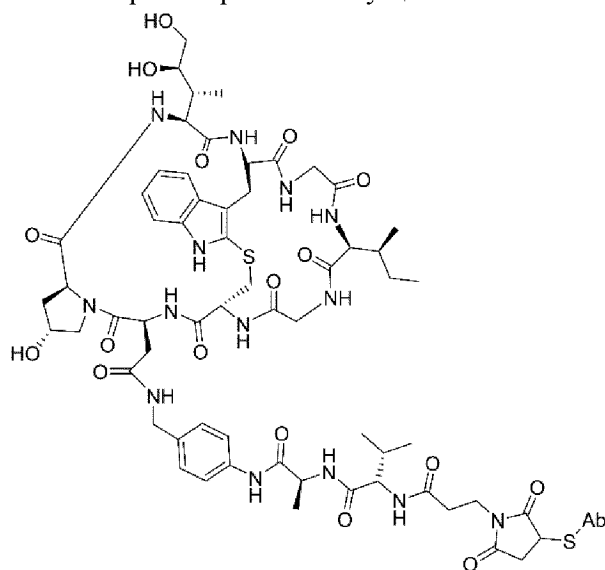
где Ab показано, чтобы обозначить место присоединения Ab.

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



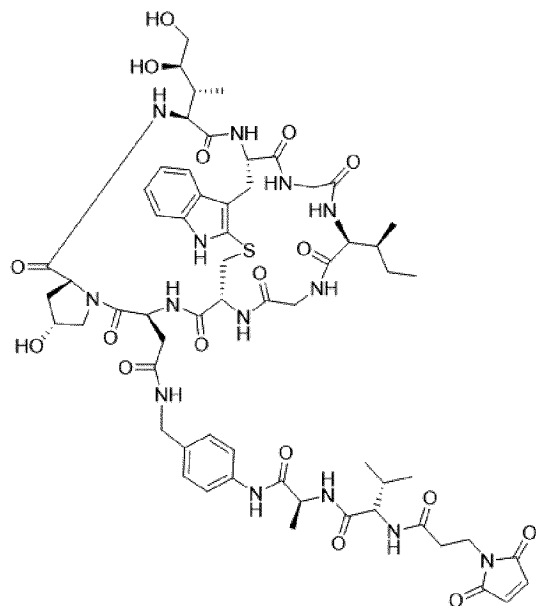
где Ab показано, чтобы обозначить место присоединения Ab.

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



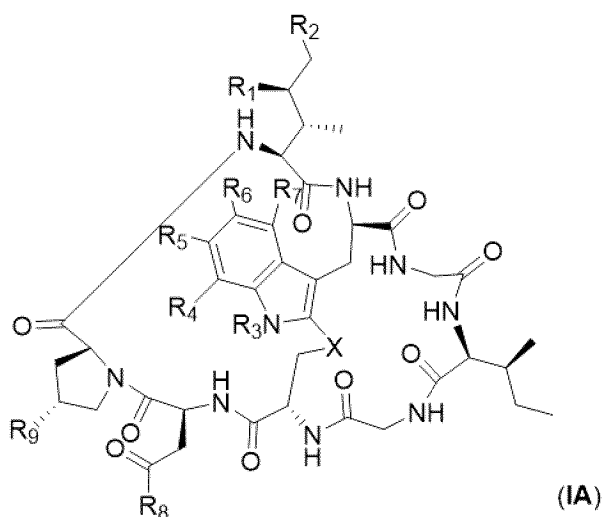
где Ab показано, чтобы обозначить место присоединения Ab.

В некоторых вариантах осуществления прекурсор Am-L-Z-Ab, Am-L-Z', представляет



причем малеймид реагирует с тиольной группой, находящейся на цистеине в антителе.

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



где R_1 представляет H, OH, OR_A или OR_C ;

R_2 представляет H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

R_9 представляет H, OH, OR_C или OR_D ;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-;

R_C представляет -L-Z;

R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C₁-C₆ алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C₁-C₆ гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C₂-C₆ алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C₂-C₆ гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C₂-C₆ алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C₂-C₆ гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

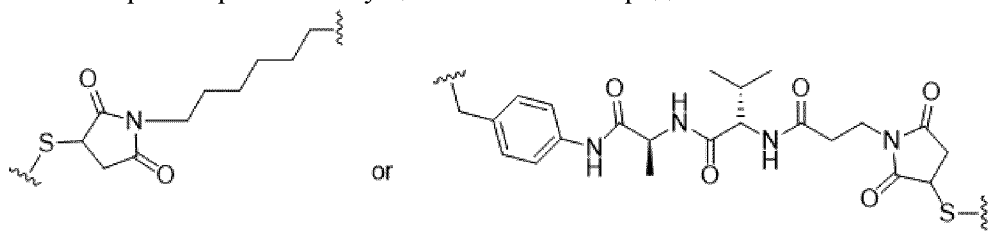
L представляет линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C₁-C₆ алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C₁-C₆ гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C₂-C₆ алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C₂-C₆ гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C₂-C₆ алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C₂-C₆ гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно

замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарил, пептид, дипептид, $-(C=O)-$, дисульфид, гидразон или их комбинацию;

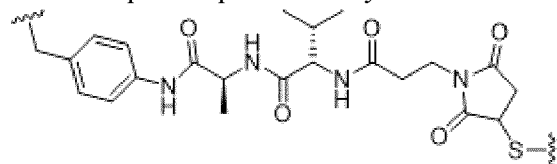
Z представляет химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает антиген HC (то есть антитело против HC, например, антитело против CD117 или антитело против CD45); и

где Am содержит ровно один заместитель R_C .

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет

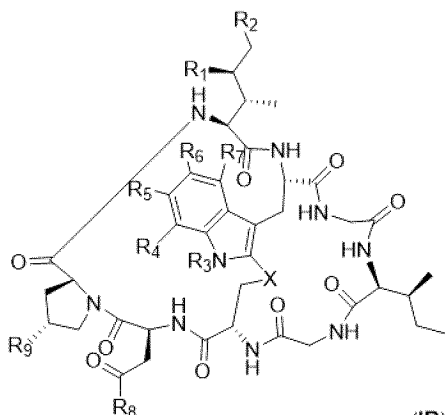


В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет



В некоторых вариантах осуществления

Am-L-Z представлен формулой (IB)



(IB) где R_1 представляет H, OH, OR_A или OR_C ;

R_2 представляет H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

R_9 представляет H, OH, OR_C или OR_D ;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-;

R_C представляет -L-Z;

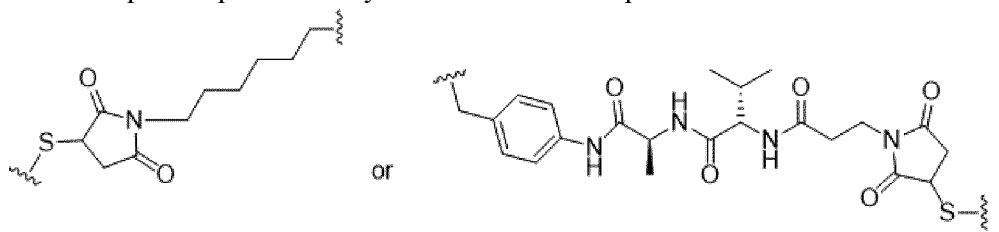
R_D представляет необязательно замещенный алкил (например, C₁-C₆ алкил), необязательно замещенный гетероалкил (например, C₁-C₆ гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C₂-C₆ алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C₂-C₆ гетероалкенил), необязательно замещенный алкинил (например, C₂-C₆ алкинил), необязательно замещенный гетероалкинил (например, C₂-C₆ гетероалкинил), необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L представляет линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C₁-C₆ алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (C₁-C₆ гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C₂-C₆ алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C₂-C₆ гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C₂-C₆ алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C₂-C₆ гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или их комбинацию;

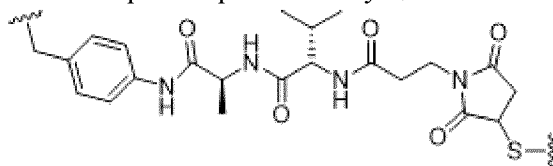
Z представляет химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает антиген HC (то есть антитело против HC, например, антитело против CD117 или антитело против CD45); и

где Am содержит ровно один заместитель R_C .

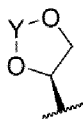
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет



В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет



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



где Y представляет $-(C=O)-$, $-(C=S)-$, $-(C=NR_E)-$ или $-(CR_ER_E')-$; а

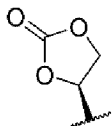
R_E и R_E' каждый независимо представляет необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен- R_C , необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен- R_C , необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен- R_C , необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен- R_C , необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен- R_C , необязательно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

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

где R_1 представляет H, OH, OR_A или OR_C ;

R_2 представляет H, OH, OR_B или OR_C ;

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



R_3 представляет H или R_C ;

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

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

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

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

R_8 представляет OH, NH_2 , OR_C или NHR_C ;

R_9 представляет H или OH;

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

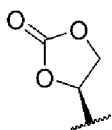
где R_C и R_D каждый соответствует определению выше.

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

где R_1 представляет H, OH, OR_A или OR_C ;

R_2 представляет H, OH, OR_B или OR_C ;

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



R_3 представляет H или R_C ;

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

R_6 и R_7 каждый представляет H;

R_8 представляет OH, NH_2 , OR_C или NHR_C ;

R_9 представляет H или OH;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; и

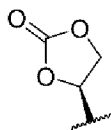
где R_C соответствует определению выше.

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

где R_1 представляет H, OH или OR_A ;

R_2 представляет H, OH или OR_B ;

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



R_3 , R_4 , R_6 и R_7 каждый представляет H;

R_5 представляет OR_C ;

R_8 представляет OH или NH_2 ;

R_9 представляет H или OH;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; и

где R_C соответствует определению выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2016/0002298, раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

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

где R_1 и R_2 каждый независимо представляет H или OH;

R_3 представляет R_C ;

R_4 , R_6 и R_7 каждый представляет H;

R_5 представляет H, OH или OC_1-C_6 алкил;

R_8 представляет OH или NH_2 ;

R_9 представляет H или OH;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; и

где R_C соответствует определению выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0294865, раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

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

где R_1 и R_2 каждый независимо представляет H или OH;

R_3 , R_6 и R_7 каждый представляет H;

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

R_8 представляет OH или NH_2 ;

R₉ представляет Н или ОН;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; и

где R_C соответствует определению выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

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

где R₁ и R₂ каждый независимо представляет Н или ОН;

R₃, R₆ и R₇ каждый представляет Н;

R₄ и R₅ каждый независимо представляет Н или ОН;

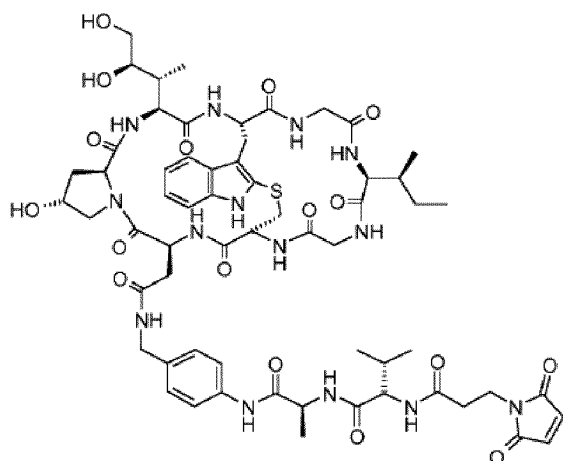
R₈ представляет ОН, NH₂, OR_C или NHR_C;

R₉ представляет Н или ОН;

X представляет -S-, -S(O)- или -SO₂-; и

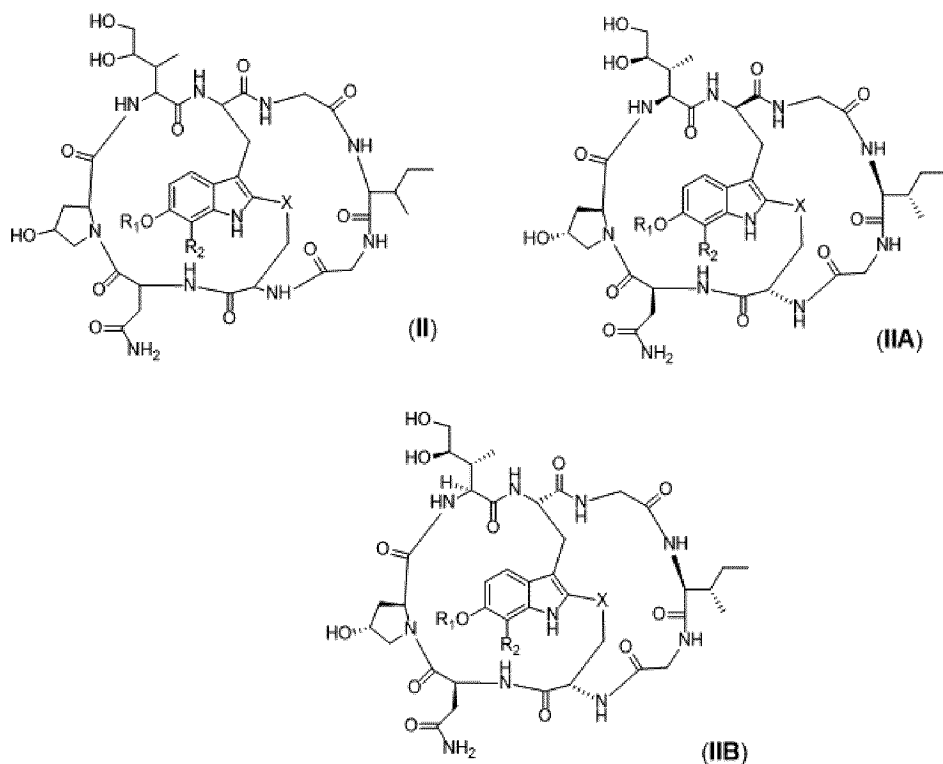
где R_C соответствует определению выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в патентах США №№ 9233173 и 9399681, а также в US 2016/0089450, раскрытия каждого из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z' представляет



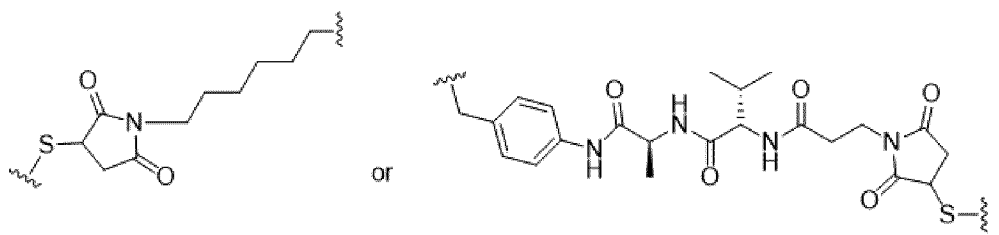
Дополнительные аматоксины, которые можно использовать для конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в данном документе, описаны, например, в WO 2016/142049; WO 2016/071856; WO 2017/149077; WO 2018/115466; и WO 2017/046658, раскрытия каждой из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

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

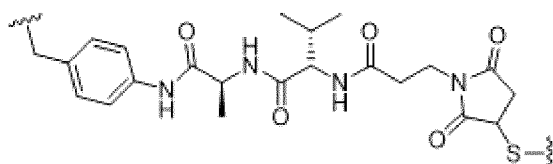


где X

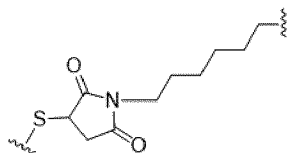
представляет S, SO, или SO₂; R₁ представляет H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством химического фрагмента Z, образованного в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; а R₂ представляет H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством химического фрагмента Z, образованного в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; причем когда R₁ представляет H, R₂ представляет линкер, а когда R₂ представляет H, R₁ представляет линкер. В некоторых вариантах осуществления R₁ представляет линкер, а R₂ представляет H, а линкер и химический фрагмент вместе в виде L-Z представляют



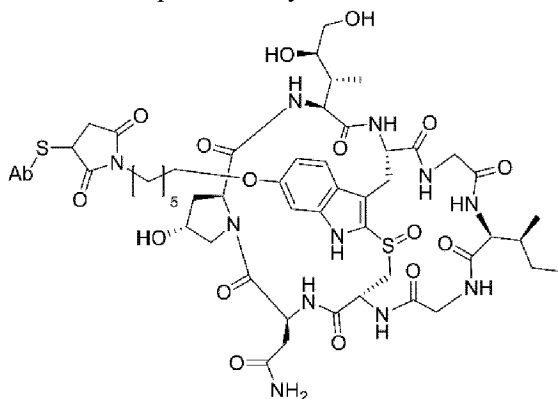
В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет



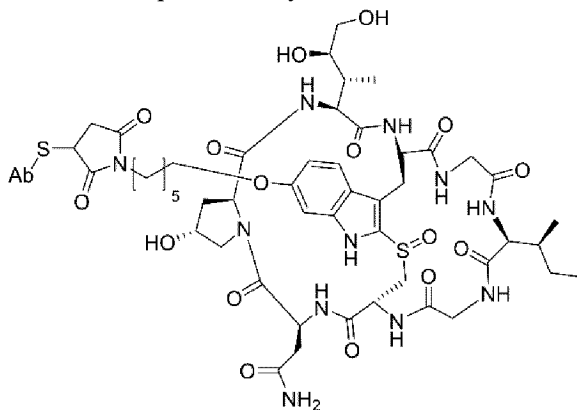
В некоторых вариантах осуществления R_1 представляет линкер, а R_2 представляет H, и линкер и химический фрагмент вместе в виде L-Z представляют



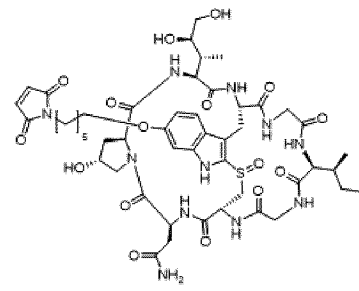
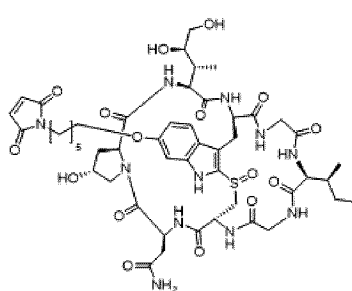
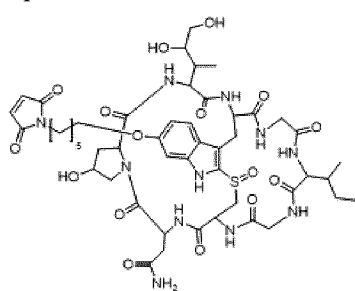
В одном варианте осуществления Am-L-Z-Ab представляет:



В одном варианте осуществления Am-L-Z-Ab представляет:



В некоторых вариантах осуществления прекурсор Am-L-Z-Ab (то есть Am-L-Z') представляет одно из:



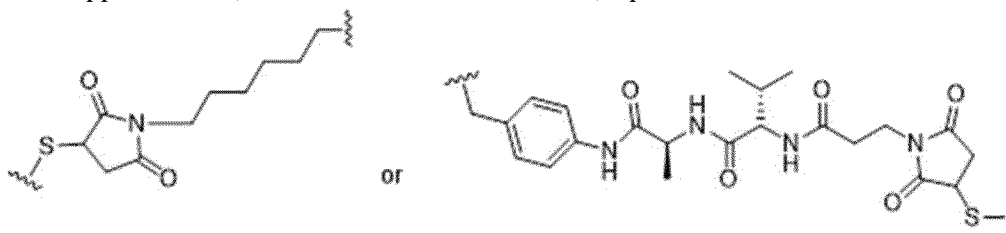
;

причем maleimide реагирует с тиольной группой, находящейся на цистеине в

антителе.

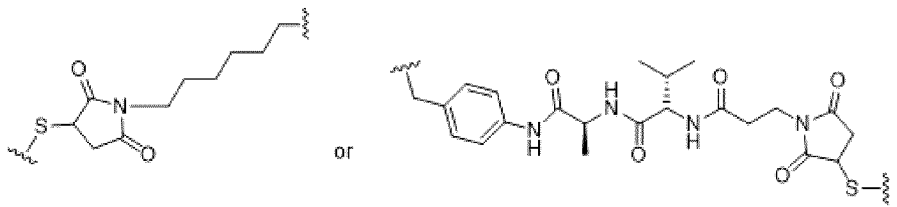
В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой α -аманитин. В некоторых вариантах осуществления α -аманитин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления α -аманитин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с α -аманитином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата α -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



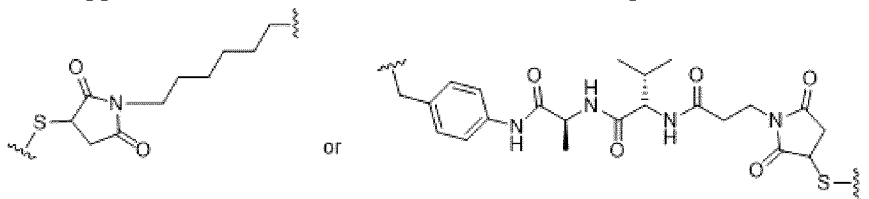
В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой β -аманитин. В некоторых вариантах осуществления β -аманитин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления β -аманитин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с β -аманитином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата β -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой γ -аманитин. В некоторых вариантах осуществления γ -аманитин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления γ -аманитин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с γ -аманитином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1-R_9) для предоставления конъюгата γ -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n)-$ звено, где n представляет целое число из 1-6.

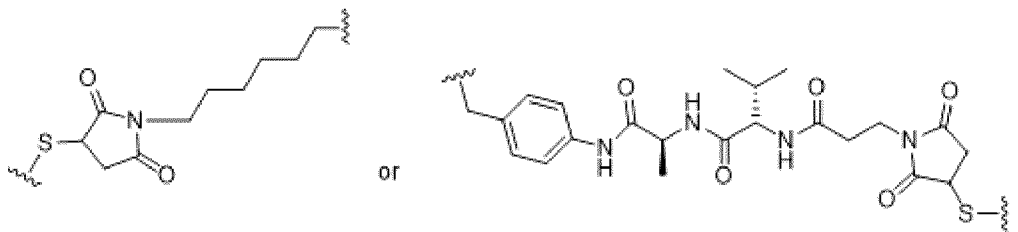
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ϵ -аманитин. В некоторых вариантах осуществления ϵ -аманитин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления ϵ -аманитин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с ϵ -аманитином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1-R_9) для предоставления

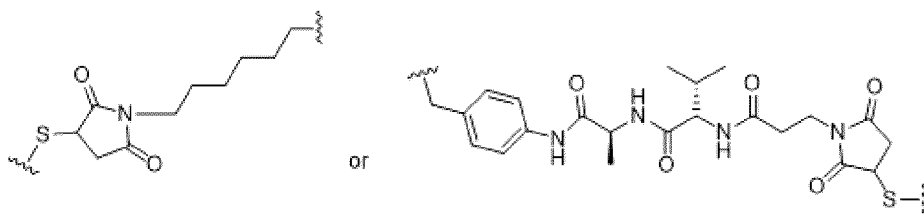
конъюгата ϵ -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



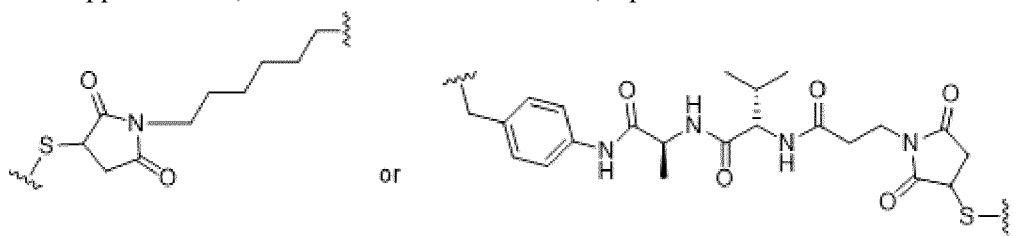
В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аманин. В некоторых вариантах осуществления аманин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления аманин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с аминином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любом из R_1-R_9) для предоставления конъюгата аманин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n-$ звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аминамида. В некоторых вариантах осуществления аминамида связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления аминамида представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с аминамидом формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата аминамида-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит - $((C=O)(CH_2)_n$ - звено, где n представляет целое число из 1-6.

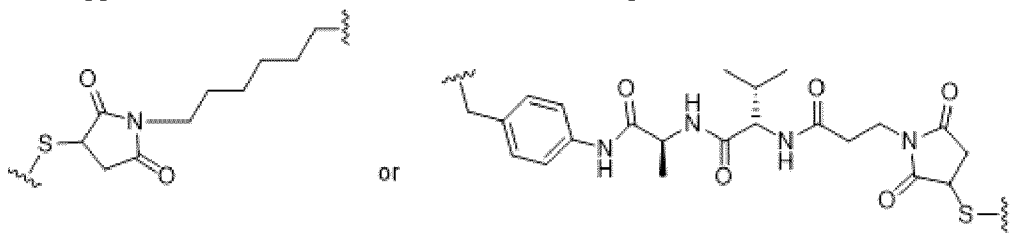
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Cit-Val- $((C=O)(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Ala-Val- $((C=O)(CH_2)_n$ -. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой амануллин. В некоторых вариантах осуществления амануллин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления амануллин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с амануллином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любым из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата амануллин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-

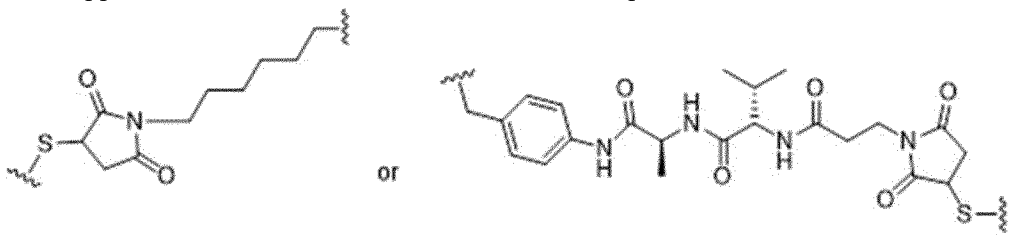
Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ - звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n-$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой амануллиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота связана с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с амануллиновой кислотой формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любом из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата амануллиновая кислота-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-((C=O)(CH_2)_n-$ - звено, где n представляет целое число из 1-6.

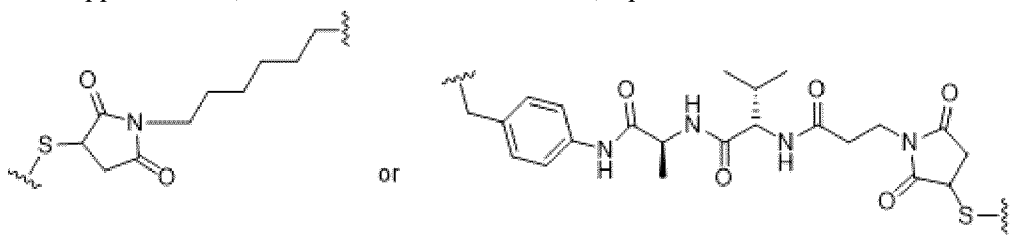
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n-$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является -PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой

проамануллин. В некоторых вариантах осуществления проамануллин связан с антителом против НС (например, антителом против CD117 или антителом против CD45) с помощью линкера L. В некоторых вариантах осуществления проамануллин представляет собой соединение формулы III. Линкер L может быть связан с проамануллином формулы III в любом одном из нескольких возможных положений (например, любом из R_1 - R_9) для предоставления конъюгата проамануллин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIА или IIВ. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $((C=O)(CH_2)_n)$ - звено, где n представляет целое число из 1-6.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $-(CH_2)_n$ - звено, где n представляет целое число из 2-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



Методы получения аматоксина синтезом описаны в патенте США № 9676702, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты для использования с композициями и способами, описанными в данном документе, могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как α -аманитин или его вариант, с использованием методов конъюгации, известных в данной области или описанных в данном документе. Например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают и связывают антиген-мишень (антитело против НС, например, антитело против CD117 или антитело против CD45), могут быть конъюгированы с аматоксином, таким как α -аманитин или его вариант, как описано в US 2015/0218220, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится, например, к аматоксинам, таким как α -аманитин и его варианты, а также к ковалентным линкерам, которые можно использовать для ковалентной конъюгации.

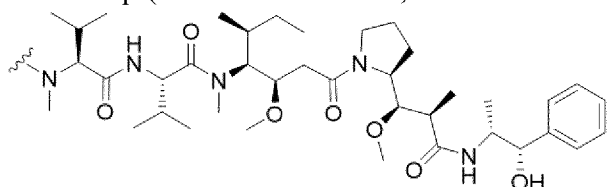
Ауристатины

Антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является ауристатин (патенты США №№

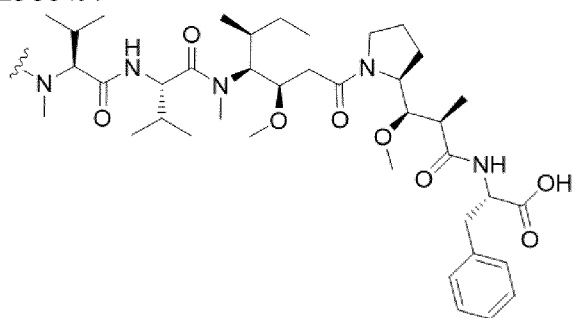
5635483; 5780588). Ауристатинны представляют собой противомитотические средства, которые препятствуют динамике микротрубочек, гидролизу GTP, а также ядерному и клеточному делению (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) и обладают противораковой (патент США № 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). (Патенты США №№ 5635483; 5780588). Фрагмент лекарственного средства ауристатина может быть связан с антителом через N (амино) конец или C (карбоксильный) конец пептидного фрагмента лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связанные с N-концом фрагменты DE и DF лекарственного средства монометилауристатина, раскрытые в Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstrдействуют Number 623, представленном 28 марта 2004 года, раскрытие которого явным образом полностью включено посредством ссылки.

Иллюстративным вариантом осуществления ауристатина является MMAE, где волнистая линия обозначает место ковалентного присоединения к линкеру конъюгата антитело-линкер (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в данном документе).



Другим иллюстративным вариантом осуществления ауристатина является MMAF, где волнистая линия обозначает место ковалентного присоединения к линкеру конъюгата антитело-линкер (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в данном документе), раскрытый в US 2005/0238649:



Ауристатинны могут быть получены согласно способам: патента США № 5635483; патента США № 5780588; 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

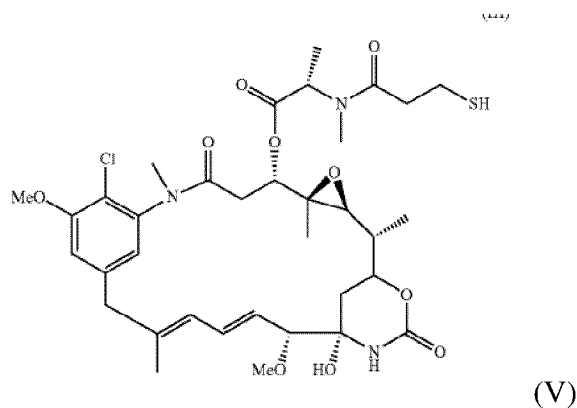
Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой средство связывания микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство связывания

микротрубочек представляет собой майтанзин, майтанзиноид или аналог майтанзиноида. Майтанзиноиды являются ингибиторами митоза, которые связывают микротрубочки и действуют, ингибируя полимеризацию тубулина. Впервые майтанзин был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патенты США № 3896111). Впоследствии, было обнаружено, что некоторые микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры майтанзинола С-3 (патенты США № 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; и 4371533. Фрагменты лекарственного средства майтанзиноида представляют собой привлекательные фрагменты лекарственных средств в конъюгатах антитело-лекарственное средство, потому что они: (i) относительно доступны для получения путем ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов ферментации, (ii) поддаются дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации через недисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества линий опухолевых клеток.

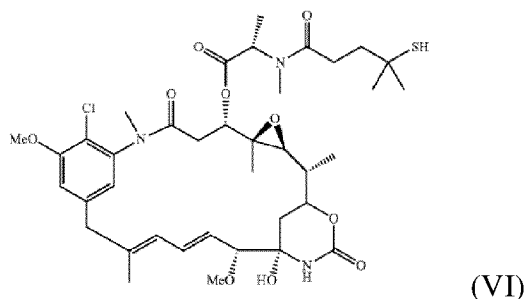
Примеры подходящих майтанзиноидов включают сложные эфиры майтанзинола, синтетического майтанзинола и аналогов и производных майтанзинола. В данный документ включены любые цитотоксины, которые ингибируют образование микротрубочек и которые являются высокотоксичными для клеток млекопитающих, а также майтанзиноиды, майтанзинол и аналоги и производные майтанзинола.

Примеры подходящих сложных эфиров майтанзинола включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо и те, которые имеют модификации в других положениях. Такие подходящие майтанзиноиды раскрыты в патентах США №№ 4137230; 4151042; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4362663; 4364866; 4424219 ;4450254; 4322348; 4362663; 4371533; 5208020; 5416064; 5475092; 5585499; 5846545; 6333410; 7276497; и 7473796, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к майтанзиноидам и их производным.

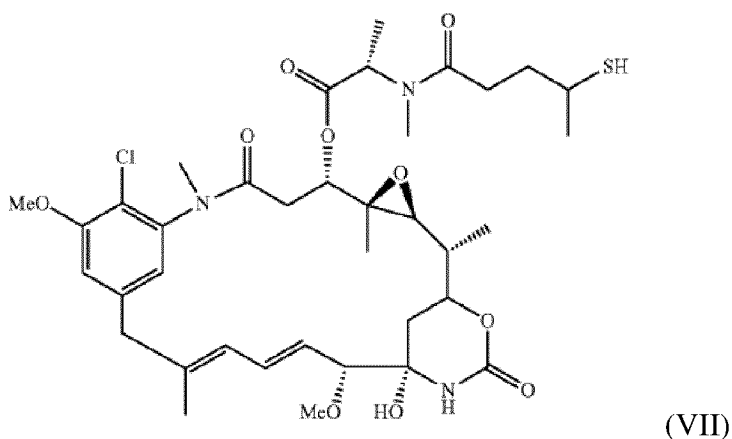
В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему раскрытию в качестве цитотоксического средства использован тиолсодержащий майтанзиноид (DM1), формально называемый N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин. DM1 представлен следующей структурной формулой V:



В другом варианте осуществления в конъюгатах согласно настоящему раскрытию в качестве цитотоксического средства использован тиолсодержащий майтанзиноид N2'-деацетил-N2'(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (например, DM4). DM4 представлен следующей структурной формулой VI:



Другим майтанзиноидом, содержащим боковую цепь, которая содержит стерически затрудненную тиольную связь, является N2'-деацетил-N-2'(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (называется DM3), представленный следующей структурной формулой VII:



Каждый из майтанзиноидов, описанных в патентах США №№ 5208020 и 7276497, также можно использовать в конъюгатах согласно настоящему раскрытию. В связи с этим полное раскрытие 5208020 и 7276697 включено в данный документ посредством ссылки.

Многие положения на майтанзиноидах могут служить в качестве положения ковалентного связывания связывающего фрагмента и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в данном документе). Например, ожидается, что будет полезно все: положение C-3, имеющее гидроксильную

группу, положение C-14, модифицированное гидроксиметилом, положение C-15, модифицированное гидроксильной группой, и положение C-20, имеющее гидроксильную группу. В некоторых вариантах осуществления положение C-3 служит в качестве положения ковалентного связывания линкерного фрагмента, и в некоторых отдельных вариантах осуществления положение C-3 майтанзинола служит в качестве положения ковалентного связывания связывающего фрагмента. Существует множество связывающих групп, известных в данной области для получения конъюгатов антитело-майтаниноид, включая, например, те, что раскрыты в патентах США №№ 5208020, 6441163 и патенте EP № 0425235 B1; Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992); и U.S. 2005/0169933 A1, раскрытия которых явным образом включены в данный документ посредством ссылки. Дополнительные связывающие группы описаны и проиллюстрированы в данном документе.

Настоящее раскрытие также включает различные изомеры и смеси мйтаниноидов и конъюгатов. Некоторые соединения и конъюгаты согласно настоящему раскрытию могут существовать в различных стереоизомерных, энантиомерных и диастереомерных формах. Несколько описаний получения таких конъюгатов антитело-майтаниноид представлены в патентах США №№ 5208020; 5416064; 6333410; 6441163; 6716821; и 7368565, каждое из которых включено в данный документ полностью.

Антрациклины

В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, которым является молекула антрациклина. Антрациклины представляют собой соединения антибиотиков, которые демонстрируют цитотоксическую активность. Исследования показали, что антрациклины могут действовать, убивая клетки с помощью ряда различных механизмов, включая: 1) интеркаляцию молекул лекарственного средства в ДНК клетки, тем самым ингибируя ДНК-зависимый синтез нуклеиновых кислот; 2) получение за счет лекарственного средства свободных радикалов, которые затем реагируют с клеточными макромолекулами, вызывая 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]. Из-за их цитотоксического потенциала антрациклины использовались для лечения множества видов рака, таких как лейкоз, карцинома молочной железы, карцинома легких, карцинома легких [см., например, P.H. Wiernik, in *Anthracycline: Current Status and New Developments* p 11]. Обычно используемые антрациклины включают доксорубин, эпирубин, идарубин и дауномицин.

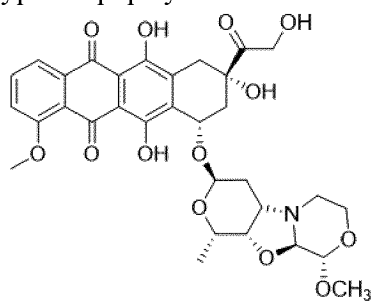
Считается, что аналог антрациклина доксорубин (ADRIAMYCINO) взаимодействует с ДНК путем интеркаляции и ингибирования развития фермента топоизомеразы II, который раскручивает ДНК для транскрипции. Доксорубин стабилизирует комплекс топоизомеразы II после разрыва цепи ДНК для репликации, предотвращая повторное запечатывание двойной спирали ДНК и тем самым останавливая

процесс репликации. Доксорубин и даунорубин (DAUNOMYCIN) являются прототипами цитотоксических природных химиотерапевтических антрациклиновых продуктов (Sessa et al. (2007) *Cardiovasc. Toxicol.* 7:75-79).

Обычно используемые антрациклины включают доксорубин, эпирубин, идарубин и дауномицин. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубина, доксорубина, эпирубина и идарубина

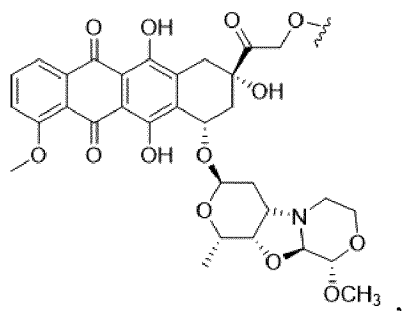
Типовые примеры антрациклинов включают, но без ограничения, даунорубин (Церубидин; Bedford Laboratories), доксорубин (Adriamycin; Bedford Laboratories; также называемый доксорубина гидрохлорид, гидрокси-даунорубина и рубекс), эпирубин (Ellence; Pfizer), и идарубин (идамицин; Pfizer Inc.) Считается, что аналог антрациклина доксорубин (ADRIAMYCINO) взаимодействует с ДНК путем интеркаляции и ингибирования развития фермента топоизомеразы II, который раскручивает ДНК для транскрипции. Доксорубин стабилизирует комплекс топоизомеразы II после разрыва цепи ДНК для репликации, предотвращая повторное запечатывание двойной спирали ДНК и тем самым останавливая процесс репликации. Доксорубин и даунорубин (DAUNOMYCIN) являются прототипами цитотоксических природных химиотерапевтических антрациклиновых продуктов (Sessa et al. (2007) *Cardiovasc. Toxicol.* 7:75-79).

Одним неограничивающим примером подходящего антрациклина для использования в данном документе является PNU-159682 («PNU»). PNU демонстрирует более чем 3000-кратную цитотоксичность по сравнению с исходным неморубицином (Quintieri et al. *Clinical Cancer Research* 2005, 11, 1608-1617). PNU представлен структурной формулой:



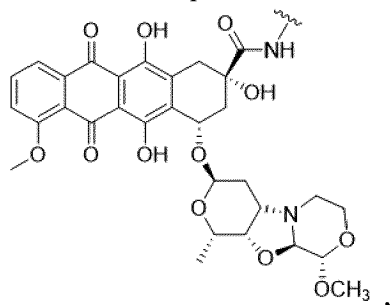
Множество положений на антрациклинах, таких как PNU, могут служить в качестве положение ковалентного связывания связывающего фрагмента и, следовательно, антител против CD117 или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе. Например, линкеры можно вводить через модификации в боковую цепь гидроксиметилкетона.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой производное PNU, представленное структурной формулой:



где волнистая линия обозначает место ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой производное PNU, представленное структурной формулой:

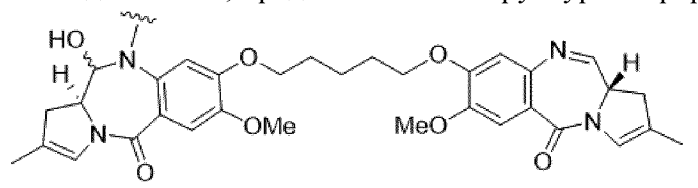


где волнистая линия обозначает место ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в данном документе.

Пирролбензодиазепины (PBD)

В других вариантах осуществления антитела против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой пирролбензодиазепин (PBD) или цитотоксин, который содержит PBD. PBD представляют собой натуральные продукты, продуцируемые некоторыми актиномицетами, и было показано, что они являются соединениями, селективно алкилирующими последовательность ДНК. цитотоксины PBD включают, но без ограничения, антрамицин, димерные PBD и те, что описаны, например, в Hartley, JA (2011) The development of pyrrolobenzodiazepines as antitumour agents. Expert Opin Inv Drug, 20(6), 733-744 and 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 цитотоксин представляет собой димер пирролбензодиазепина, представленный структурной формулой:



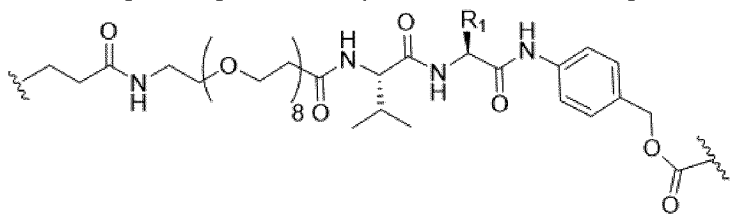
где волнистая линия обозначает место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгирован с антителом или

его антигенсвязывающим фрагментом с помощью малеимидапроильного линкера.

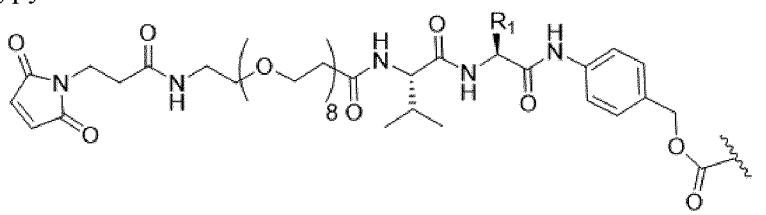
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одно или несколько из пептида, олигосахарида, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_q-$, $-(C=O)(CH_2)_r-$, $-(C=O)(CH_2CH_2O)_t-$, $-(NHCH_2CH_2)_u-$, -PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB, причем каждый из p , q , r , t и u представляет собой целое число из 1-12, выбранное независимо для каждого случая.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет структурную формулу:



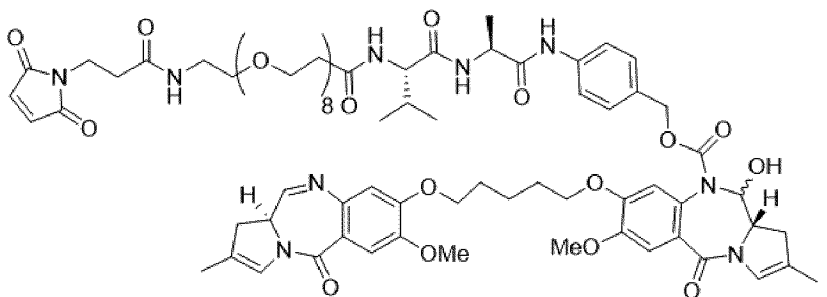
где R_1 представляет CH_3 (Ala) или $(CH_2)_3NH(CO)NH_2$ (Cit).

В некоторых вариантах осуществления линкер, перед конъюгацией с антителом и содержащий реакционноспособный заместитель Z' , показанные вместе как L- Z' , имеет структуру:



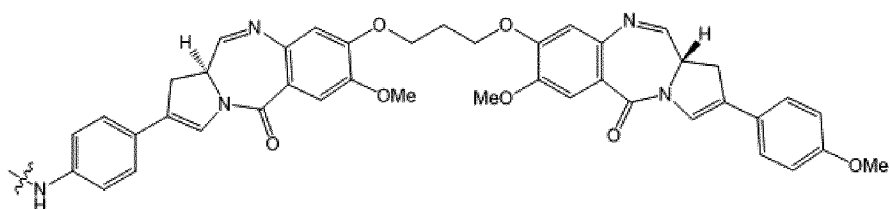
где волнистая линия обозначает место присоединения к цитотоксину (например, PBD). В некоторых вариантах осуществления R_1 представляет CH_3 .

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитотоксин-линкер перед конъюгацией с антителом и содержащий реакционноспособный заместитель Z' , показанные вместе как Cy-L- Z' , имеет структурную формулу:



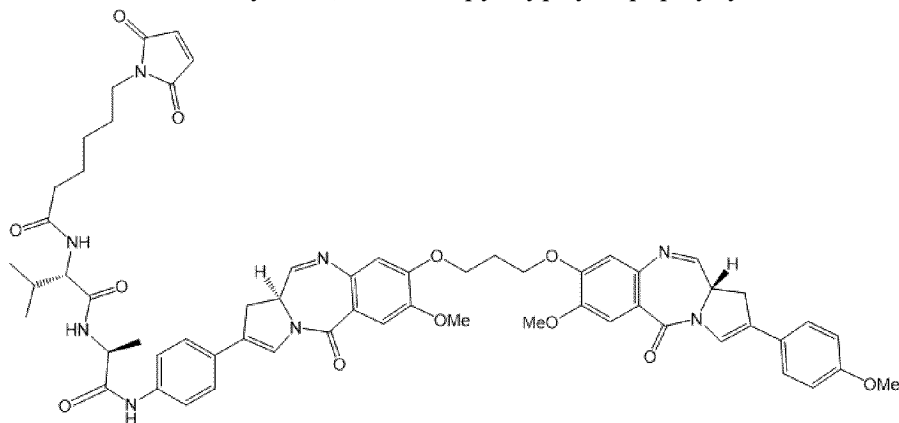
Этот отдельный конъюгат цитотоксин-линкер известен как тезирин (SG3249) и описан, например, в Howard et al. ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7(11), 983-987, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

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



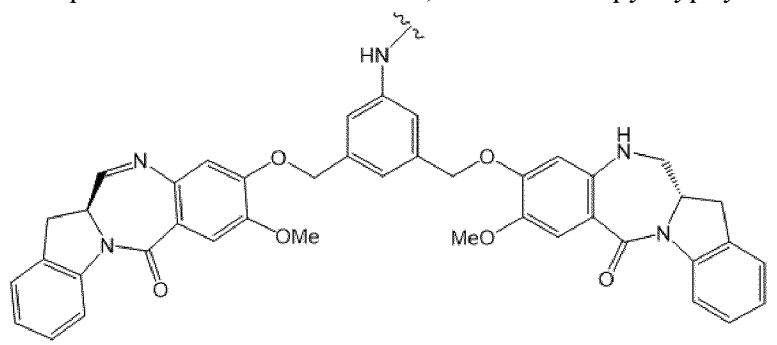
где волнистая линия обозначает место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитотоксин-линкер перед конъюгацией с антителом и содержащий реакционноспособный заместитель Z' , показанные вместе как Су-L- Z' , имеет структурную формулу:



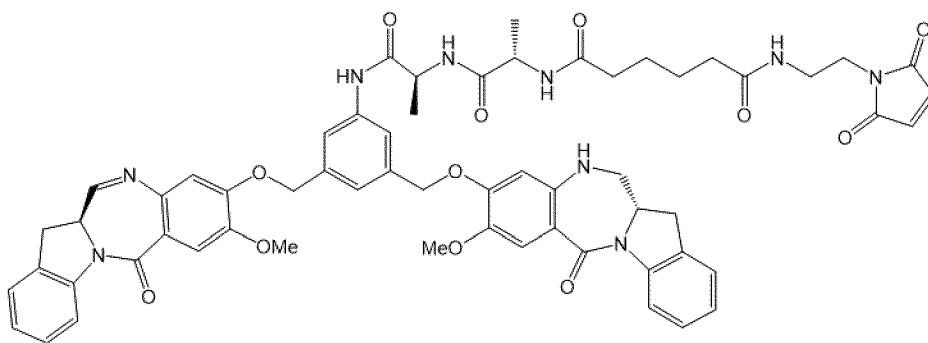
Этот отдельный конъюгат цитотоксин-линкер известен как тарилин и описан, например, в отношении ADC вадастуксимаб тарилин (SGN-CD33A), Mantaj et al. *Angewandte Chemie International Edition English* 2017,56, 462-488, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой псевдодимер индолинбензодиазепина, имеющий структурную формулу:



где волнистая линия обозначает место присоединения линкера.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитотоксин-линкер перед конъюгацией с антителом и содержащий реакционноспособный заместитель Z' , показанные вместе как Су-L- Z' , имеет структурную формулу:

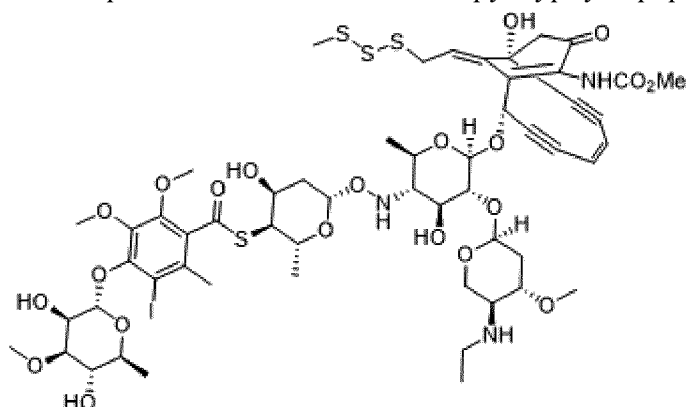


которая содержит ADC IMGN632, раскрытые, например, в публикации международной заявки на патент № WO2017004026, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Калихимицин

В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой ендиновый противоопухолевый антибиотик (например, калихимицины, озогамидин). Семейство антибиотиков калихимицинов способны создавать двухцепочечные разрывы ДНК в субпикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов семейства калихимицинов см. патенты США №№ 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701; 5770710; 5773001; и 5877296 (все от компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихимицина, которые можно использовать, включают, но без ограничения, те, что раскрыты, например, в Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутых патентах США на американский цианамид.

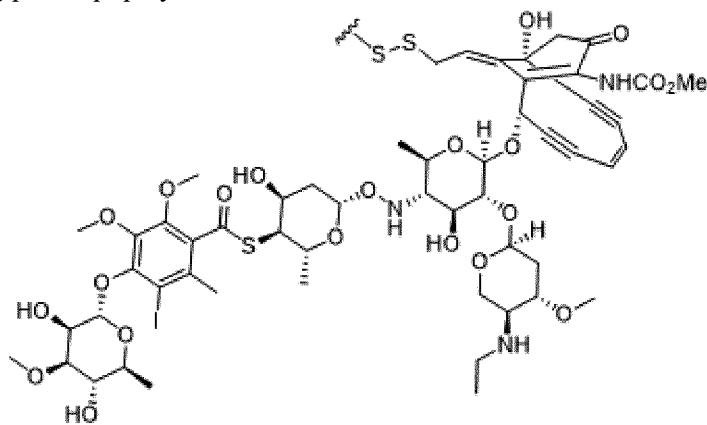
Иллюстративный калихимицин обозначен $\gamma 1$, который в данном документе упоминается просто как гамма и имеет структурную формулу:



В некоторых вариантах осуществления калихимицин представляет собой производное гамма-калихимицина или производное N-ацетил гамма-калихимицина. Структурные аналоги калихимицина, которые можно использовать, включают, но без ограничения, те, что раскрыты, например, в Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутых патентах США. Калихимицины содержат фрагмент метилтрисульфид, который может реагировать с

подходящими тиолами с образованием дисульфидов, вводя в то же время функциональную группу, которая применима для соединения производного калихимицина с антителом против CD117 или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе, с помощью линкера. Для получения конъюгатов семейства калихимицинов, см. патенты США №№ 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701; 5770710; 5773001; и 5877296 (все от компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихимицина, которые можно использовать, включают, но без ограничения, те, что раскрыты, например, в Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутых патентах США на американский цианамид.

В одном варианте осуществления цитотоксин ADC, раскрытый в данном документе, представляет собой производное дисульфида калихимицина, представленного структурной формулой:



где волнистая линия обозначает место присоединения линкера.

Дополнительные Цитотоксины

В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с иным цитотоксином, чем раскрыт в данном документе выше, или в дополнение к тем цитотоксинам. Дополнительными цитотоксинами, подходящими для использования с композициями и способами, описанными в данном документе, являются, без ограничения, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен, адеципенол, адозелесин, альдеслейкин, альтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминоклевулиновая кислота, амрубицин, амсакрин, анагредид, анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антареликс, антидорсализующий морфогенетический белок-1, антиандроген, карцинома предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, глицинат афидиколина, модуляторы гена апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновая кислота, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины, бензоилстауропорин, производные бета-лактама, бета-алетин, бетакламицин В, бетулиновая кислота, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрон, бисазиридирилспермин, биснафид, бистратен А, бизелесин, брефлат,

блеомицин А2, блеомицин В2, бропиримин, будотитан, бутионинсульфоксимин, кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина (например, 10-гидроксикамптотецин), капецитабин, карбоксамидаминотриазол, карбоксиамидотриазол, карзелезин, ингибиторы казеинкиназы, кастаноспермин, кекропин В, цетрореликс, хлорины, хлорохиноксалин сульфонамид, цикапрост, цис-порфирин, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллизмицин А, коллизмицин В, комбретастин А4, аналоги комбретастина, конагенин, крамбесцидин 816, криснатол, криптофицин 8, производные криптофицина, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, окфосфат цитарабина, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, 2'-дезоксикоформицин (DCF), дезлорелин, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиковон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азациитидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенилспиромустин, дискодермолид, докозанол, долазетрон, доксифлуридин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпителины, эпистерид, эстрамустин и его аналоги, этопозид, этопозид 4'-фосфат (также называемый этопофос I), экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, флуастерон, флударабин, гидрохлорид фтордауноруницин, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, гадолиний тексафирин, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомогаррингтонин (ННТ), гиперидин, ибандроновая кислота, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, иобенгуан, йододоксорибицин, ипомеанол, иринотекан, ироплакт, ирсогладин, изобенгазол, ясплакинолид, кахалалид F, ламелларин-N триацетат, ланреотид, лейнамицин, ленограстим, лентинан сульфат, лептолстатин, летрозол, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобоплатин, лометрексол, лонидамин, лозоксантрон, локсорибин, луртотекан, лютетий тексафирин, лизофиллин, мазопрокол, маспин, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, меногарил, рнербарон, метерелин, метиониназа, метоклопрамид, ингибитор MIF, ифепристон, мильтефозин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол, митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротин, молграмостим, микапероксид В, мирапаторн, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамидами, нафарелин, нагрестип, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновая кислота, нилутамид, низамицин, нитруллин, октреотид, окиценон, онапристон, ондансетрон, орацин, ормаплатин, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел и его аналоги, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновая кислота, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргаза, пелдесин, пентозан полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритрексим, подофиллотоксин, порфирамицин, ингибиторы пуриноклеозидфосфорилазы, ралтитрексед, ризоксин, роглетимид, рохитукин, рубигинон 1, рубоксил, сафингол, сайнтопин, саркофитол А,

сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфозовая кислота, спикамицин D, спиromустин, стипиамид, сульфинозин, таллимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин, триметрексат, верамин, винорельбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и зиласкорб и другие.

Линкеры

Множество линкеров можно использовать для конъюгации антител или фрагментов антител, описанных в данном документе (например, антитела против CD117 или антитела против CD45) с цитотоксической молекулой.

Термин «линкер» в рамках настоящего изобретения означает двухвалентный химический фрагмент, содержащий ковалентную связь или цепь атомов, которая ковалентно соединяет конъюгаты (ADC) антитело против HC (например, антитело против CD117 или антитело против CD45)-лекарственное средство согласно настоящему раскрытию (ADC; Ab-Z-L-D, где D представляет собой цитотоксин). Подходящие линкеры имеют два реакционноспособных конца, один для конъюгации с антителом, а другой для конъюгации с цитотоксином. Реакционноспособный конец линкера для конъюгации с антителом (реакционноспособный фрагмент, Z') представляет собой обычный участок, который способен конъюгировать с антителом через цистеинтиольную или лизиновую аминогруппу на антителе и поэтому обычно представляет собой тиол-реактивную группу, такую как двойная связь (как в малеимиде) или замещаемая группа, такая как хлоро, бромо, иодо или R-сульфанильная группа, или амино-реактивная группа, такая как карбоксильная группа; в то время как реакционноспособный конец линкера для конъюгации с антителом обычно представляет собой участок, который способен конъюгировать с цитотоксином через образование амидной связи с основной аминогруппой или карбоксильной группой на цитотоксине и поэтому обычно представляет собой карбоксильную или основную аминогруппу. Когда термин «линкер» используют для описания линкера в конъюгированной форме, один или оба реактивных конца будут отсутствовать (например, реакционноспособный фрагмент Z', преобразованный в химический фрагмент Z) или будут неполными (например, представлять собой только карбонил карбоновой кислоты), из-за образования связей между линкером и/или цитотоксином, а также между линкером и/или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Такие конъюгации реакции описаны дальше в данном документе ниже.

В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться во внутриклеточных условиях таким образом, что расщепление линкера высвобождает лекарственное звено из антитела во внутриклеточной среде. В других вариантах осуществления линкерное звено не расщепляется, а лекарственное средство высвобождается, например, в результате разложения антитела. Линкеры, применимые 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, то есть антитело остается связанным с фрагментом лекарственного средства. Линкеры являются стабильными за пределами клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клетки. эффективный линкер будет: (i) сохранять свойства специфического связывания антитела; (ii) обеспечивать внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного средства; (iii) оставаться стабильным и интактным, то есть не расщепляться, пока конъюгат не будет доставлен или транспортирован в его целевой участок; и (iv) сохранять цитотоксический эффект уничтожения клеток или цитостатический эффект цитотоксического фрагмента. Стабильность ADC можно измерить с помощью стандартных аналитических методов, таких как масс-спектрометрия, HPLC и метод разделения/анализа LC/MS. Ковалентное соединение антитела и фрагмент лекарственного средства требует, чтобы линкер имел две реакционноспособные функциональные группы, то есть бивалентность в смысле реакционной способности. Известны бивалентные линкерные реагенты, которые можно использовать для присоединения двух или более функциональных или биологически активных фрагментов, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, и описаны способы получения их конъюгатов (Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p. 234-242).

Линкеры включают те, что могут расщепляться, например, с помощью ферментативного гидролиза, фотолиза, гидролиз в кислых условиях, гидролиза в щелочных условиях, окисления, восстановления дисульфида, нуклеофильного расщепления или металлоорганического расщепления (см., например, Leriche et al. *Bioorg. Med. Chem.* 20:571-582, 2012, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации). Подходящие расщепляемые линкеры могут включать, например, химические фрагменты, такие как гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид.

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

Линкеры, расщепляемые в восстанавливающих условиях, включают, например, дисульфид. В данной области известно множество дисульфидных линкеров, включая, например, те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-

альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуен), 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 патенты США № 4880935, раскрытие каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

Линкеры, чувствительные к ферментативному гидролизу, могут представлять собой, например, пептидсодержащий линкер, который расщепляется ферментом внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая, но без ограничения, лизосомную или эндосомальную протеазу. Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства является то, что средство обычно ослабляется при конъюгировании, а стабильность конъюгатов в сыворотке обычно высока. В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер состоит по меньшей мере из двух аминокислот или по меньшей мере трех аминокислот. Примеры аминокислотных линкеров включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры подходящих пептидов включают пептиды, содержащие аминокислоты, такие как валин, аланин, цитруллин (Cit), фенилаланин, лизин, лейцин и глицин. Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотный линкерный компонент, включают те, что встречаются в природе, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Примеры дипептидов включают валин-цитруллин (vc или val-cit) и аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примеры трипептидов включают глицин-валин-цитруллин (гли-вал-цит) и глицин-глицин-глицин (гли-гли-гли). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, такой как Val-Cit, Ala-Val или Phe-Lys, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Arg или Trp-Cit. Линкеры, содержащие дипептиды, такие как Val-Cit или Phe-Lys, раскрыты, например, в патенте США № 6214345, описание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit.

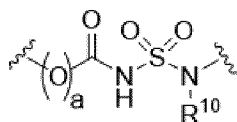
Линкеры, подходящие для конъюгации антител или их фрагментов, описанных в данном документе, с цитотоксической молекулой, включают линкеры, способные высвободить цитотоксин посредством процесса 1,6-элиминации («саморасщепляющаяся» группа). Химические фрагменты, способные к этому процессу расщепления, включают p-аминобензильную (PAB) группу, 6-малеимиโดгексановую кислоту, чувствительные к pH карбонаты и другие реагенты, которые описаны в Jain et al., *Pharm. Res.* 32: 3526-3540, 2015, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит «саморасщепляющуюся» группу, такую как вышеупомянутые PAB или PABC (пара-аминобензилоксикарбонил),

которые раскрыты, например, в Carl et al., J. Med. Chem. (1981) 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; W098/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; W02004/032828). Другие такие химические фрагменты, способные к этому процессу («саморасщепляющиеся линкеры»), включают метиленкарбаматы и гетероарильные группы, такие как аминотиазолы, аминокимидазолы, аминопиримидины и тому подобное. Линкеры, содержащие такие гетероциклические саморасщепляющиеся группы, раскрыты, например, в публикациях патентов США № 20160303254 и 20150079114 и патенте США № 7754681; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237; US 2005/0256030; de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830; и US 7223837. В некоторых вариантах осуществления дипептид используется в комбинации с саморазрушающимся линкером.

Линкеры, подходящие для использования в данном документе, дополнительно могут содержать одну или несколько групп, выбранных из C₁-C₆ алкилена, C₁-C₆ гетероалкилена, C₂-C₆ алкенилена, C₂-C₆ гетероалкенилена, C₂-C₆ алкинилена, C₂-C₆ гетероалкинилена, C₃-C₆ циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена, гетероарилена и их комбинаций, каждая из которых может быть необязательно замещена. Неограничивающие примеры таких групп звенья включают (CH₂)_p, ((CH₂CH₂O))_p и -(C=O)(CH₂)_p -, причем p представляет целое число из 1-6, выбираемое независимо для каждого случая.

Подходящие линкеры могут содержать группы, обладающие свойствами повышения растворимости. Линкеры, содержащие звено ((CH₂CH₂O))_p (полиэтиленгликоль, PEG), например, могут увеличивать растворимость, как и алкильные цепи, замещенные остатками амина, сульфоновой кислоты, фосфоновой кислоты или фосфорной кислоты. Линкеры, содержащие такие фрагменты, раскрыты, например, в патентах США №№ 8236319 и 9504756, раскрытие каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Дополнительные группы, увеличивающие растворимость, включают, например, ацильные и карбамоилсульфамидные группы, имеющие структуру:



где a составляет 0 или 1; a

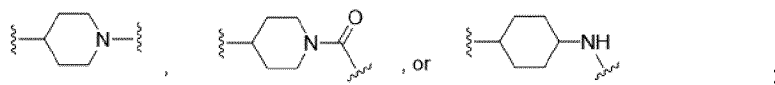
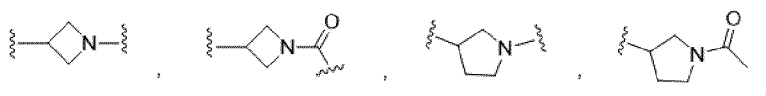
R¹⁰ выбирают из группы, состоящей из водорода, C₁-C₂₄ алкильных групп, C₃-C₂₄ циклоалкильных групп, C₁-C₂₄ (гетеро)арильных групп, C₁-C₂₄ алкил(гетеро)арильных групп и C₁-C₂₄ (гетеро)арилалкильных групп, C₁-C₂₄ алкильных групп, C₃-C₂₄ циклоалкильных групп, C₂-C₂₄ (гетеро)арильных групп, C₃-C₂₄ алкил(гетеро)арильных групп и C₃-C₂₄ (гетеро)арилалкильных групп, каждая из которых может быть необязательно замещена и/или необязательно прерывается одним или несколькими

гетероатомами, выбранными из O, S и $\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, где R^{11} и R^{12} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкильных групп; или R^{10} представляет собой цитотоксин, причем цитотоксин необязательно соединен с N спейсерным фрагментом. Линкеры, содержащие такие группы, описаны, например, в патенте США № 9636421 и публикации заявки на патент США № 2017/0298145, раскрытия которых полностью включены в данный документ посредством ссылки, поскольку они относятся к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации с цитотоксинами и антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать одно или несколько из гидразина, дисульфида, тиоэфира, дипептида, p-аминобензильной (РАВ) группы, гетероциклической саморасщепляющейся группы, необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ гетероалкил, необязательно замещенный $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкенил, необязательно замещенный $\text{C}_2\text{-C}_6$ гетероалкенил, необязательно замещенный $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкинил, необязательно замещенный $\text{C}_2\text{-C}_6$ гетероалкинил, необязательно замещенный $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, увеличивающую растворимость группу, ацил, группу $-(\text{C}=\text{O})-$ или $-((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-$, причем p представляет целое число из 1-6. Специалисту в данной области будет понятно, что одна или несколько из перечисленных групп может присутствовать в форме двухвалентных (бирадикальных) соединений, например, $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкилена и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления линкер L содержит фрагмент *-L1L2-*, где:

L_1 отсутствует или представляет $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$,

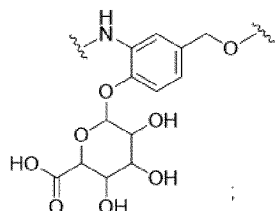
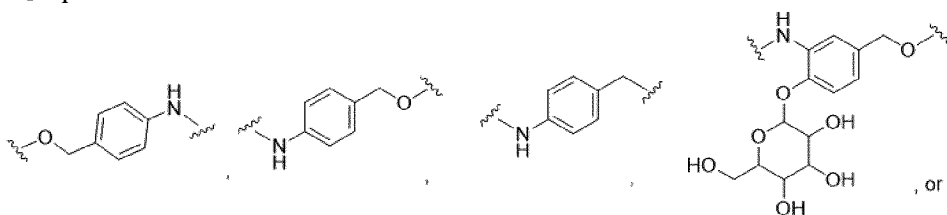


L_2 отсутствует или представляет $-(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{X}_4$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{X}_4$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_n(\text{CH}_2)_m-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{NR}^{13}((\text{CH}_2)_m\text{O})_n\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{NR}^{13}((\text{CH}_2)_m\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{X}_1\text{X}_2\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m-$, $(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{X}_2\text{X}_1\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{X}_2\text{X}_1\text{C}(\text{O})-$, $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m-$, $(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{X}_3(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m-$, $(\text{CH}_2)_m\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n-$, $(\text{CH}_2)_m(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NR}^{13}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})-$,

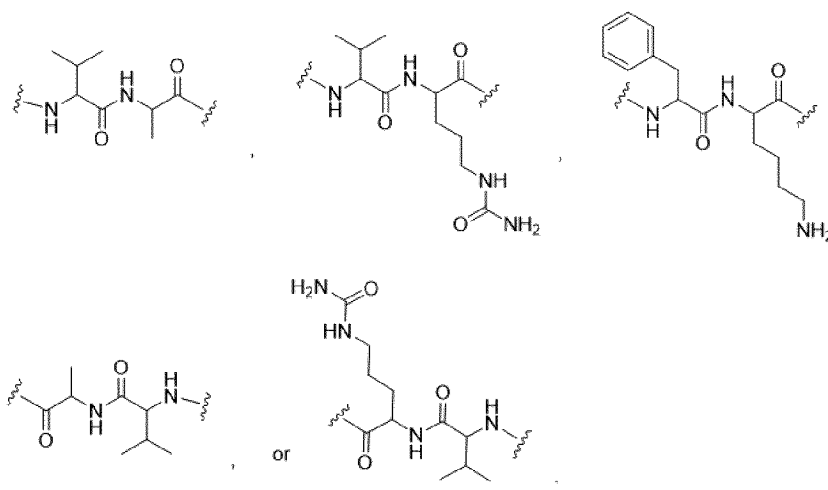
[illegible]

где

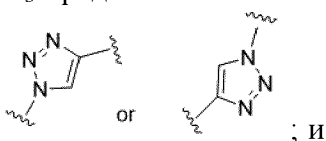
X_1 представляет



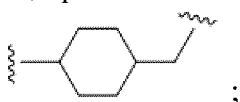
X_2 представляет



X₃ представляет



X₄ представляет



где

R¹³ независимо выбирают для каждого случая из H и C₁-C₆ алкила;

m независимо выбирают для каждого случая из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

n независимо выбирают для каждого случая из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14; и

где одна звездочка (*) обозначает место присоединения к цитотоксину (например, аматоксину), а двойная звездочка (**) обозначает место присоединения к реакционноспособному заместителю Z' или химическому фрагменту Z, при условии, что не отсутствуют и L1 и L2.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит p-аминобензильную группу (PAB). В одном варианте осуществления p-аминобензильная группа расположена между цитотоксическим лекарственным средством и участком расщепления протеазы в линкере. В одном варианте осуществления p-аминобензильная группа является частью p-аминобензилоксикарбонильного звена. В одном варианте осуществления p-аминобензильная группа является частью p-аминобензиламидного звена.

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 из пептида, олигосахарида, -(CH₂)_p-, -((CH₂CH₂O)_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.

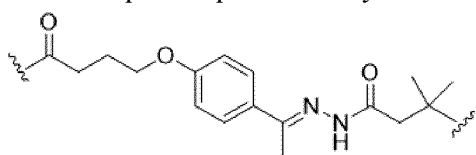
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит звено $-(C=O)(CH_2)_p-$, где p представляет целое число из 1-6.

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

В некоторых вариантах осуществления линкером ADC является малеимидапроил-Val-Ala-параминобензил (mc-Val-Ala-PAB).

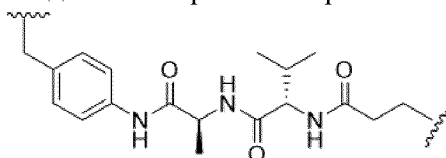
В некоторых вариантах осуществления линкером ADC является малеимидапроил-Val-Cit-параминобензил (mc-vc-PAB).

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит

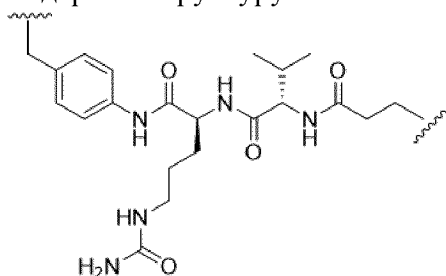


В некоторых вариантах осуществления линкер содержит MCC (4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат).

В одном конкретном варианте осуществления линкер содержит структуру



где волнистые линии указывают точки соединения с цитотоксином и реакционноспособным фрагментом Z'. В другом конкретном варианте осуществления линкер содержит структуру



где волнистые линии указывают точки соединения с цитотоксином и реакционноспособным фрагментом Z'. Такие PAB-дипептид-пропионильные линкеры раскрыты, например, в публикации заявки на патент № WO2017/149077, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, цитотоксины, раскрытые в WO2017/149077, включены в данный документ посредством ссылки. Линкеры, которые можно использовать для конъюгации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с цитотоксическим средством, включают линкеры, которые ковалентно связаны с цитотоксическим средством на одном конце линкера, а на другом конце линкера содержат химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим на

линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает, например, CD117. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает, например, CD117 включают, без ограничения, гидроксильные фрагменты остатков серина, треонина и тирозина; аминокислотные фрагменты остатков лизина; карбоксильные фрагменты остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные фрагменты остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галоарил (например, фторарил), галогетероарил (например, фторгетероарил), галоалкил и галогетероалкильные фрагменты несуществующих в природе аминокислот.

Примеры линкеров, применимых для синтезе конъюгатов лекарственного средства-антитела, включают те, что содержат электрофилы, такие как среди прочего акцепторы Михаэля (например, малеимиды), активированные сложные эфиры, электронодефицитные карбонильные соединения и альдегиды, подходящие для реакции с нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителе или антигенсвязывающих фрагментах, таких как амино- и тиольные фрагменты. Например, линкеры, подходящие для синтеза конъюгатов лекарственного средства-антитела, среди прочего включают, без ограничения, сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидилиодацетат (SIA), сульфо-SMCC, сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидила (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидилиодацетат, описанные, например, в Liu et al. 18:690-697, 1979, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к линкерам для химической конъюгации. Дополнительные линкеры включают нерасщепляемые малеимидокапроильные линкеры, которые особенно подходят для конъюгации средств разрушения микротрубочек, таких как ауристатин, описанные в Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации.

Специалисту в данной области будет понятно, что любая одна или несколько химических групп, фрагментов и признаков, раскрытых в данном документе, могут быть объединены множеством способов с образованием линкеров, применимых для конъюгации антител и цитотоксинов, раскрытых в данном документе. Дополнительные линкеры, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

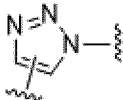
В некоторых вариантах осуществления промежуточный продукт, который является прекурсором линкера, в подходящих условиях вступает в реакцию с фрагментом лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления использованы реакционноспособные группы в лекарственном средстве и/или промежуточном продукте или линкере. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным продуктом, или дериватизированным лекарственным средством, впоследствии в

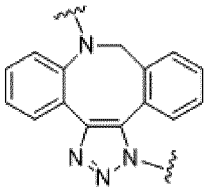
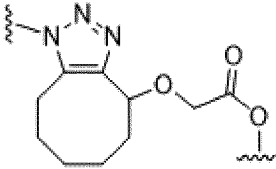
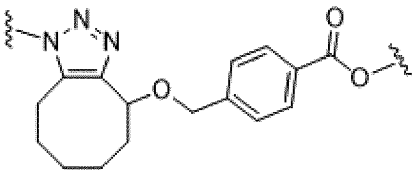
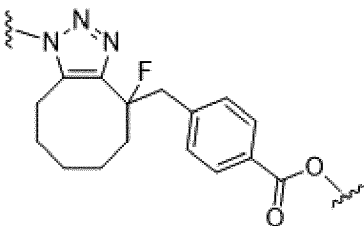
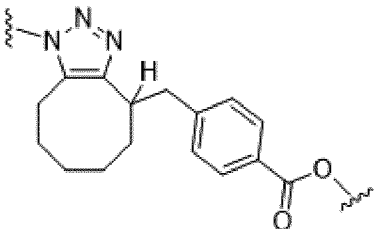
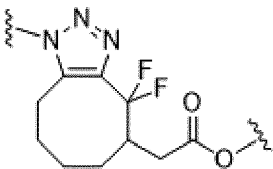
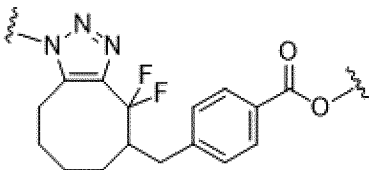
подходящих условиях вступает в реакцию с антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Альтернативно, линкер или промежуточный продукт сперва может вступать в реакцию с антителом или дериватизированным антителом, а затем вступают в реакцию с лекарственным средством или дериватизированным лекарственным средством. Такие реакции конъюгации дальше будут описаны более полно.

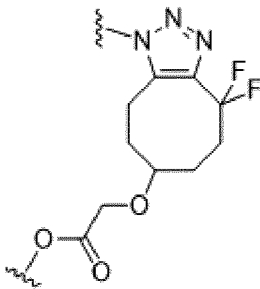
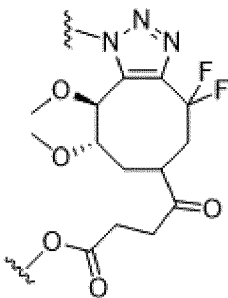
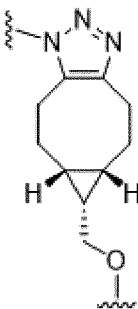
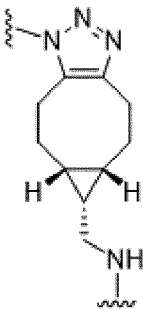
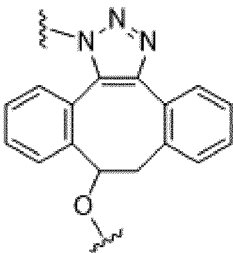
Доступен ряд различных реакций ковалентного присоединения линкеров или конъюгатов лекарственное средство-линкер к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Подходящие места присоединения на молекуле антитела включают аминокислоты лизина, группы свободных карбоновых кислот глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и различные фрагменты ароматических аминокислот. Например, неспецифическое ковалентное присоединение может быть выполнено с использованием карбодиимидной реакции для связывания карбокси (или амино) группы соединения с амино (или карбокси) группой фрагмента антитела. Кроме того, бифункциональные средства, такие как диальдегиды или сложные имидоэфиры, также могут быть использованы для связывания аминокислотной группы соединения с аминокислотной группой фрагмента антитела. Также для присоединения лекарств к связывающим агентам доступна реакция основания Шиффа. Этот метод включает окисление периодатом лекарственного средства, содержащего гликоль или гидроксигруппы, с образованием альдегида, который затем вступает в реакцию со связующим средством. Присоединение происходит за счет образования основания Шиффа с аминокислотными группами связывающего средства. Изотиоцианаты также могут использоваться в качестве связывающих средств для ковалентного связывания лекарственного средства со связующими средствами. Другие методики известны квалифицированному специалисту и находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

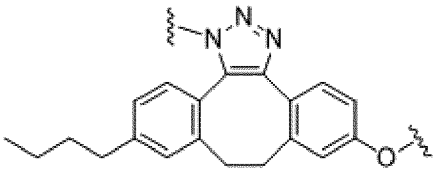
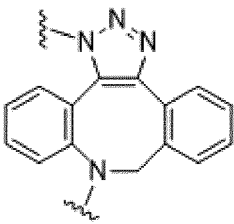
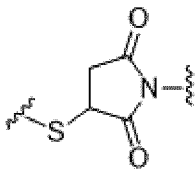
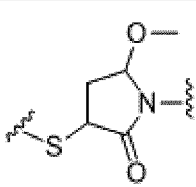
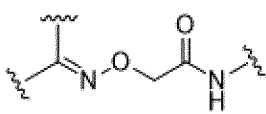
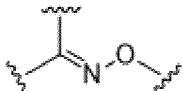
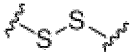
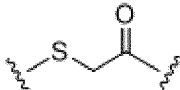
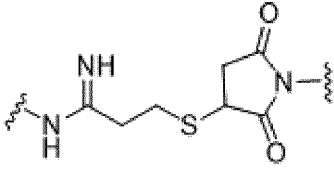
Линкеры, применимые для конъюгации с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, которые описаны в данном документе, включают, без ограничения, линкеры, содержащие химические фрагменты Z, образованные за счет реакции сочетания, которые показаны в таблице 2 ниже. Волнистые линии обозначают места присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту и цитотоксической молекуле, соответственно.

Таблица 2. Иллюстративные химические фрагменты Z, образованные с помощью реакций сочетания при образовании конъюгатов антитело-лекарственное средство

Иллюстративные Реакции сочетания	Химический фрагмент Z, Образованный с помощью реакций сочетания
[3+2] Циклоприсоединение	

[3+2] Циклоприсоединение	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	

[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	

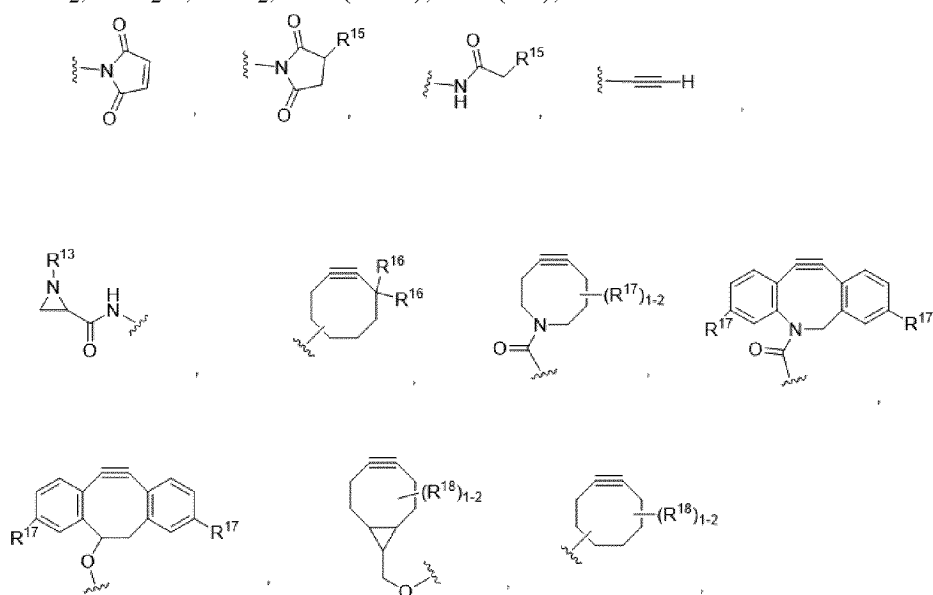
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение	
Присоединение Михаэля	
присоединение Михаэля	
Конденсация иминов, Амидирование	
Конденсация иминов	
Образование дисульфида	
Алкилирование тиола	
Конденсация, Присоединение Михаэля	

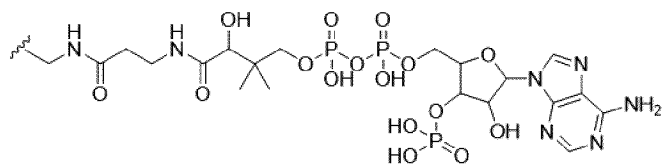
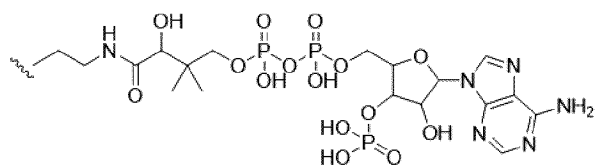
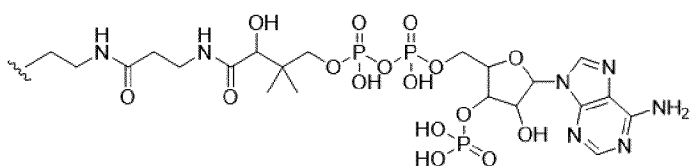
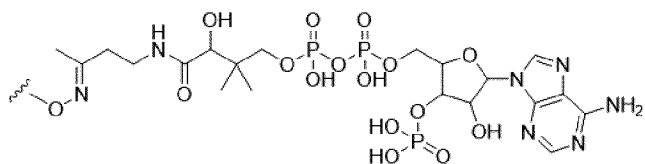
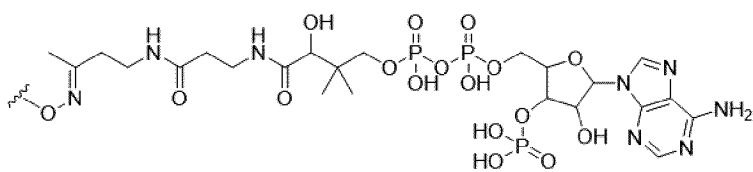
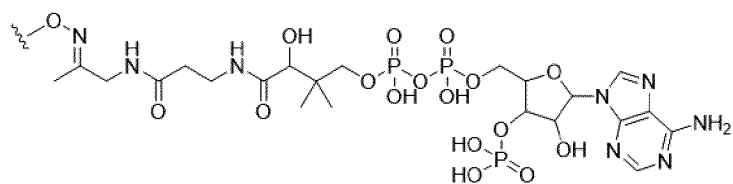
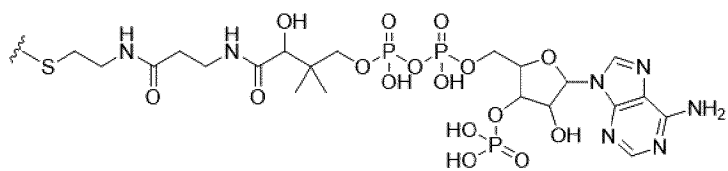
Специалисту в данной области будет понятно, что реакционноспособный заместитель Z' , связанный с линкером, и реакционноспособный заместитель на антители или его антигенсвязывающем фрагменте, входят в зацепление в ковалентной реакции сочетания для получения химического фрагмента Z , и будут распознавать реакционноспособный фрагмент Z' . Поэтому, конъюгаты антители-лекарственное

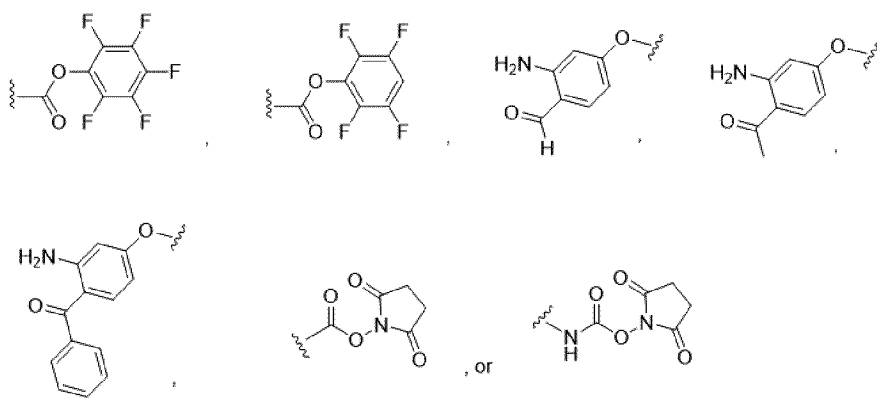
средство, применимые в сочетании со способами, описанными в данном документе, могут быть образованы за счет реакции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, как описано в данном документе, причем линкер или конъюгат цитотоксин-линкер содержит реакционноспособный заместитель Z' , подходящий для реакции с реакционноспособным заместителем на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, с образованием химического фрагмента Z .

Как показано в таблице 2, примеры подходящих реакционноспособных заместителей на линкере и антителе или его антигенсвязывающем фрагменте включают среди прочего пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галоалкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ α,β -ненасыщенной карбонил и тому подобное), пару диен/диенофил (например, пару азид/алкин или пару диен/ α,β -ненасыщенной карбонил) и тому подобное. Реакции сочетания между реакционноспособными заместителями с образованием химического фрагмента Z среди прочего включают, без ограничения, алкилирование тиола, гидроксилалкилирование, алкилирование аминов, конденсацию амина или гидроксилamina, образование гидразина, амидирование, этерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2] циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение по Хьюисгену), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие методы реакций, известные в данной области или описанные в данном документе. Предпочтительно, линкер содержит электрофильную функциональную группу для реакции с нуклеофильной функциональной группой на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

В некоторых вариантах осуществления Z' представляет $-\text{NR}^{13}\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{SH}$, $-\text{S}(=\text{O})_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(=\text{O})_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-\text{NR}^{13}\text{S}(=\text{O})_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-\text{NR}^{13}\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{R}^{14}$, $-\text{NR}^{13}\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{NR}^{13}\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$, $-\text{NC}(=\text{S})$,







где

R^{13} независимо выбирают для каждого случая из H и C_1-C_6 алкила;

R^{14} представляет $-S(CH_2)_nCHR^{15}NHC(=O)R^{13}$;

R^{15} представляет R^{13} или $-C(=O)OR^{13}$;

R^{16} независимо выбирают для каждого случая из H, C_1-C_6 алкила, F, Cl и -OH;

R^{17} независимо выбирают для каждого случая из H, C_1-C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и -OH; а

R^{18} независимо выбирают для каждого случая из H, C_1-C_6 алкила, F, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_1-C_4 алкокси, замещенного $-C(=O)OH$, и C_1-C_4 алкила, замещенного $-C(=O)OH$.

Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, раскрытом в данном документе, включают, без ограничения, нуклеофильные группы, такие как (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковой цепи, например, лизин, (iii) тиольные группы боковой цепи, например, цистеин, и (iv) гидроксильные или аминогруппы сахаров, когда антители гликозилировано. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, раскрытом в данном документе, включают, без ограничения, гидроксильные фрагменты остатков серина, треонина и тирозина; аминокислотные фрагменты остатков лизина; карбоксильные фрагменты остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные фрагменты остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галоарил (например, фторарил), галогетероарил (например, фторгетероарил), галоалкил и галогетероалкильные фрагменты несуществующих в природе аминокислот. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные заместители, присутствующие в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, раскрытом в данном документе, включают амино- или тиольные фрагменты. Некоторые антители имеют восстанавливаемые дисульфиды между цепями, то есть цистеиновые мостики. Антители можно сделать реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстанавливающим средством, таким как DTT (дителиотреитол). Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически образует два реакционноспособных тиольных нуклеофила. В антители можно вводить дополнительные нуклеофильные группы посредством реакции лизинов с

2-иминотиололаном (реагентом Траута), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно вводить в антитело (или его фрагмент) за счет введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, получения мутантных антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатков цистеина). В патенте США № 7521541 описано конструирование антител путем введения реакционноспособных аминокислот цистеина.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный фрагмент Z' , связанный с линкером, представляет собой нуклеофильную группу, которая реагирует с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, но без ограничения, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с антителом. Подходящие нуклеофильные группы включают, но без ограничения, гидразид, оксим, амина, гидроксил, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет продукт реакции между реакционноспособными нуклеофильными заместителями, находящимися внутри антител или их антигенсвязывающих фрагментов, такими как амино- и тиольные фрагменты, и реакционноспособным электрофильным заместителем Z' . Например, Z' может представлять среди прочего акцептор Михаэля (например, малеимид), активированный сложный эфир, электронодефицитное карбонильное соединение и альдегид.

Например, линкеры, подходящие, для синтеза ADC включают, без ограничения, реакционноспособные заместители Z' , такие как малеимидные или галоалкильные группы. Они могут быть связаны с линкером с помощью реагентов, среди прочего таких как сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил иодацетат (SIA), сульфо-SMCC, сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидила (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидил иодацетат, описанных, например, в Liu et al. 18:690-697, 1979, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к линкерам для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель Z' , связанный с линкером L, представляет малеимид, азид или алкин. Примером содержащего малеимид линкера является нерасщепляемый линкер на основе малеимидокапроила, который особенно полезен для конъюгации средств разрушения микротрубочек, таких как ауристатины. Такие линкеры описаны в Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, поскольку он относится к линкерам для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель Z' представляет собой $-(C=O)-$ или $-NH(C=O)-$, так что линкер может быть соединен с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с помощью фрагмента амида или мочевины, соответственно, получаемого в результате реакции группы $-(C=O)-$ или $-NH(C=O)-$ с аминогруппой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособным заместителем является N-малеимидная группа, галогенированная N-алкиламидагруппа, сульфонилокси N-алкиламидагруппа, карбонатная группа, сульфонилгалогенидная группа, тиольная группа или ее производное, алкинильная группа, содержащая внутреннюю углерод-углеродную тройную связь, (гетеро)циклоалкинильная группа, бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил группа, алкенильная группа, содержащая внутреннюю углерод-углеродную двойную связь, циклоалкенильная группа, тетразинильная группа, азидогруппа, фосфиновая группа, нитриоксидная группа, нитронная группа, нитриаминовая группа, диазогруппа, кетоновая группа, (О-алкил)гидроксиламиногруппа, гидразиновая группа, галогенированная N-малеимидная группа, 1,1-бис (сульфонилметил)метилкарбонильная группа или ее производные отщепления, 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 ограничения, 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-карбоксипропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-((4-(малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-

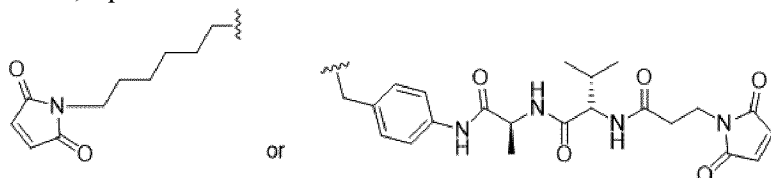
аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-
аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-
аматоксин; 7'C-(4-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-
(4-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин;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

((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)азетидин-1-ил)метил)-
 аматоксин; 7'C-(((2-(6-(малеимидо)-N-метилгексанамидо)этил)(метил)амино)метил)-
 аматоксин; 7'C-(((4-(6-(малеимидо)-N-метилгексанамидо)бутил(метил)амино)метил)-
 аматоксин; 7'C-((2-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)азиридин-1-ил)метил)-аматоксин;
 7'C-((2-(2-(6-(4-
 ((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)азиридин-1-ил)метил)-
 аматоксин; 7'C-((4-(6-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-
 ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(1-(аминоокси)-2-оксо-6,9,12,15-тетраокса-3-азагептадекан-
 17-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-диазаикосил)пиперидин-1-
 ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)-N-
 метилгексанамидо)этил)(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(6-(2-
 (аминоокси)ацетамидо)-N-метилгексанамидо)бутил)(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-
 ((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-
 1-ил)-S-метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-
 ((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)-R-метил)пирролидин-1-
 ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-
 аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-
 (2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин;
 6'О-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'О-(5-(4-
 ((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)-аматоксин; 6'О-(2-((6-
 (малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)-аматоксин; 6'О-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)-
 аматоксин; 6'О-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил)-
 аматоксин; 6'О-(6-(2-бромацетамидо)гексил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-
 (азидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(гекс-5-иноиламино)пиперидин-1-
 ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин;
 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин;
 6'О-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[b,f]азоцин-5-ил)-6-
 оксогексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'О-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)-аматоксин; 6'О-
 (6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)-аматоксин; 6'О-((6-(аминоокси)гексил)-аматоксин;
 и 6'О-(6-(2-иодацетамидо)гексил)-аматоксин.

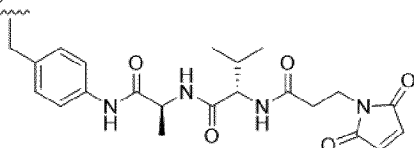
Специалисту в данной области будет понятно, что структура группы заместителей, реагирующих с линкером, перед конъюгацией с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в качестве группы Z' содержит малеимид. Вышеприведенные фрагменты

линкера и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочего, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в данном документе, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220 и публикации заявки на патент № WO2017/149077, раскрытие каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

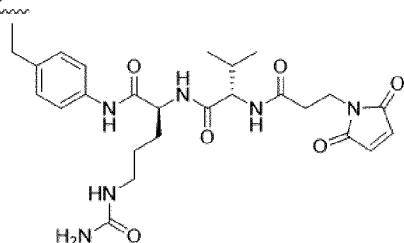
В некоторых вариантах осуществления структура L-Z' группы заместителей, реагирующих с линкером, перед конъюгацией с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления аматоксин, раскрытый в данном документе, конъюгирован с реагирующим с линкером фрагментом -L-Z', имеющим следующую формулу:



В некоторых вариантах осуществления аматоксин, раскрытый в данном документе, конъюгирован с реагирующим с линкером фрагментом -L-Z', имеющим следующую формулу:

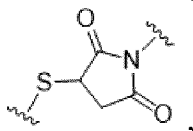


В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело против CD117, конъюгированное с аматоксином любой из формул III, IIIA или IIIB, раскрытых в данном документе, с помощью линкера и химического фрагмента Z. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит параминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит звено $-((C=O)(CH_2)_n)-$, где n представляет целое число из 1-6. В некоторых вариантах осуществления линкером является $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n)-$.

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

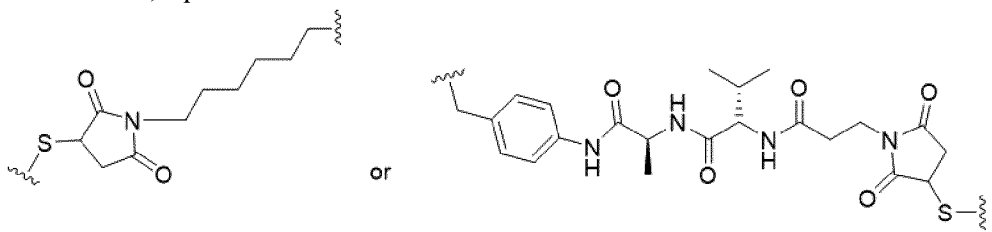
является $\text{-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH}_2)_n\text{-}$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $\text{-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH}_2)_n\text{-}$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $\text{-(CH}_2)_n\text{-}$. В некоторых вариантах осуществления линкером является $\text{-((CH}_2)_n\text{-}$, где n представляет 6.

В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z выбирают из Таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z представляет



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

В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе в виде L-Z, представляют



Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

В ADC формулы I, раскрытых в данном документе, антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими фрагментами (D) лекарственных средств, например, от приблизительно 1 до приблизительно 20 фрагментов лекарственных средств на антитело, через линкер L и химический фрагмент Z, раскрытый в данном документе. ADC согласно настоящему раскрытию могут быть получены несколькими путями с использованием органических химических реакций, условий и реагентов, известных специалистам в данной области, включая: (1) реакцию реакционноспособного заместителя антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с бивалентным линкерным реагентом с образованием Ab-Z-L , как описано в данном документе выше, с последующей реакцией с фрагментом D лекарственного средства; или (2) реакцию реакционноспособного заместителя фрагмента лекарственного средства с бивалентным линкерным реагентом с образованием D-L-Z' с последующей реакцией с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе выше с образованием ADC формулы D-L-Z-Ab , например, Am-Z-L-Ab . Дополнительные способы получения ADC описаны в данном документе.

В другом аспекте антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его антигенсвязывающий фрагмент имеет один или несколько

остатков лизина, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или нескольких сульфидрильных групп. Тогда ADC образуют путем конъюгации через атом серы сульфидрильной группы, как описано в данном документе выше. Реагенты, которые можно использовать, для модификации лизина включают, но без ограничения, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолангидрохлорид (реагент Траута).

В другом аспекте антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь одну или несколько углеводных групп, которые могут быть химически модифицированы, что иметь одну или несколько сульфидрильных групп. Тогда ADC образуют путем конъюгации через атом серы сульфидрильной группы, как описано в данном документе выше.

В еще одном аспекте антитело против НС (например, антитело против CD117 или антитело против CD45) может иметь одну или несколько углеводных групп, которые можно окислить для представления альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al. *J. Med. Chem.* 1989, 32(3), 548-55). Тогда ADC образуют путем конъюгации через соответствующий альдегид, как описано в данном документе выше. Другие протоколы модификации белков для присоединения или ассоциации цитотоксинов описаны в Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), включенном в данный документ посредством ссылки.

Способы конъюгации линкера-фрагментов лекарственных средств с нацеленными на клетки белками, такими как антитела, иммуноглобулины или их фрагменты, находятся, например, в патенте США № 5208020; патентах США № 6441163; WO2005037992; WO2005081711; и WO2006/034488, которые все полностью явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Альтернативно, белок слияния, содержащий антитело и цитотоксическое средство, можно получить, например, с помощью рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Длина ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата либо смежные друг с другом, либо разделенные область, кодирующей линкерный пептид, которая не нарушает нужных свойств конъюгата.

ADC, описанные в данном документе, можно вводить пациенту (например, пациенту-человеку, имеющему иммунное заболевание или рак) в виде множества лекарственных форм. Например, ADC, описанные в данном документе, можно вводить пациенту, имеющему иммунное заболевание или рак, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для использования с композициями и способами, описанными в данном документе, включают модифицирующие вязкость средства. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методов, известных в данной области.

Фармацевтические препараты, содержащие ADC против НС (например, ADC против CD117 или ADC против CD45), как описано в данном документе, получают путем смешивания такого ADC с одним или несколькими необязательными фармацевтически

приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, содержащие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 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 средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Примеры

Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить рядовым специалистам в данной области описание того, как можно использовать, получить и оценить композиции и способы, описанные в данном документе, и предназначены для использования исключительно в качестве иллюстрации изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Конъюгаты лекарственное средство-антитело против CD45 и против CD117 обеспечивают трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Недавно было показано, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленные на мышиный CD45 или мышиный CD117, эффективно готовят иммунокомпетентных мышей к трансплантатам всего костного мозга (Palchoudhuri et al. Nature Biotech 2016 34:738-745; и Czechowicz et al. Blood 2016 128:493). Этот инновационный нацеленный подход к подготовке с использованием ADC может стать терапевтическим прорывом, если его удастся успешно применить на людях. Антитела. Используемые ранее антитела против CD45 или против CD117 соединяли с сапорином (SAP), белком, ингибирующим рибосомы, который после интернализации вызывает цитотоксичность независимо от клеточного цикла. Было показано, что ADC как против CD45-сапорин (CD45-SAP), так и против CD117-сапорин (CD117-SAP) эффективно истощают гемопоэтические стволовые клетки костного мозга (HSC) в виде монопрепаратов, создавая нишу, которая обеспечивает эффективное приживание аутологичных HSC (>95% долгосрочный донорский химеризм).

Антителом против CD117, используемым в ADC в следующем примере, является

2B8, а антителом против CD45, используемым в ADC, является 104. Для дальнейшего исследования и расширения применимости этих инструментальных ADC на моделях трансплантата мышей CD45-SAP (1,9 мг/кг, в/в) и CD117-SAP (1 мг/кг, в/в) тестировали на модели аллогенного трансплантата с незначительными несовпадениями (донор Balb/c реципиентам DBA/2). Мышам DBA/2 CD45.2 трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, собранных у объединенных конгенных доноров Balb/c CD45.1. Как показано на схеме дизайна исследования на фиг. 1A и 1B, мыши DBA/2 получали предтрансплантационную подготовку перед трансплантацией цельных донорских клеток костного мозга CD45.1 Balb/c. Подготовительное лечение, включающее CD45-SAP (1.9 мг/кг, в/в) или CD117-SAP (1 мг/кг, в/в), оценивали в сочетании с дополнительными иммуномодулирующими средствами: клоном 30F11 (25 мг/кг, IP), голым антителом против CD45, которое имитирует ATG на основе эффекторной функции, обеспечивая сильное истощение периферических В- и Т-клеток; цитоксаном перед трансплантацией (PreT-Cy, 200 мг/кг, IP); общим облучением тела (TBI) 2 гр; или цитоксаном после трансплантации (PTCy, 200 мг/кг, IP) для предотвращения болезни трансплантат против хозяина, а также для блокировки отторжения хозяина против трансплантата. TBI 9 гр использовали в качестве обычного подготовительного положительного контроля. Подготовленным мышам трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, и уровень истощения HSC и донорского клеточного химеризма оценивали в течение 12 недель.

На фиг. 1C-1E показаны результаты анализ приживления, которые показывают количество долгосрочных гемопоэтических стволовых клеток (LT-HSC)/бедро (фиг. 1C), процент донорского химеризма (фиг. 1D) и процент миелоидного химеризма, процент В-клеточного химеризма и процент Т-клеточного химеризма (фиг. 1E) после подготовки указанным ADC и иммунодепрессантом.

CD45-SAP или CD117-SAP в комбинации с иммунодепрессантами (30F11 и цитоксаном после трансплантации) обеспечили истощение костного мозга у мышей C57Bl/6 (фиг. 1C; через 7 дней после введения) и обеспечили полный донорский химеризм (>85% донорского химеризма (CD45.1+)) в периферической крови на 12 неделе после трансплантации (фиг. 1D). Многолинейное восстановление наблюдалось в компартментах Т-, В- и миелоидных клеток с >80%, >90% и >90% донорским химеризмом, соответственно, в группах CD45-SAP и CD117-SAP (фиг. 1E). Напротив, TBI 2 гр в комбинации с иммунодепрессантами (30F11 и цитоксаном после трансплантации) приводили только к 5% донорскому приживлению. Многодозовое введение 30F11 (QDx3) плюс TBI 2 гр и цитоксан после трансплантации повышали периферический донорский химеризм до 40%. Цитоксан перед трансплантацией плюс 30F11 (QDx3) и цитоксан после трансплантации давали 20% донорский химеризм. Для всех групп химеризм стволовых клеток в костном мозге соответствовал периферическому химеризму.

Эти результаты показывают, что ADC против CD45 и против CD117 можно использовать в комбинации с иммуносупрессией, обеспечивая высокоэффективные

аллогенные трансплантации на модели с незначительным несовпадением (85% донорский химеризм). CD45-SAP и CD117-SAP в комбинации с 30F11 и посттрансплантационным цитоксаном были более эффективны с подготовкой по сравнению с TBI 2 гр или цитоксаном перед трансплантацией.

Пример 2. Конъюгата нацеленное на CD45 антитело-лекарственное средство Плюс Посттрансплантационный цитоксан достаточно для обеспечения Аллогенного Трансплантата Костного Мозга в Мышиной Модели с Незначительным Несовпадением

Трансплантат костного мозга (BMT) представляет собой потенциально действующее лечение злокачественных и доброкачественных заболеваний крови. Существующие режимы препаратов или подготовки пациентов перед BMT ограничивают применение этой лечебной методики из-за связанной с режимом смертности и заболеваемости, включая риски токсичности для органов, бесплодия и вторичных злокачественных новообразований. Было показано, что целевой подготовки с использованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) против мышинных CD45 достаточно, чтобы обеспечить трансплантацию костного мозга (BMT) у сингенных иммунокомпетентных мышей (Palchaudhuri et al. Nature Biotech 2016 34:738-745), и этот подход к подготовке может расширить возможности BMT, если можно будет успешно проводить трансплантацию пациентам. Для дальнейшего исследования применимости ADC против CD45 (антитела 104 против CD45, конъюгированного с сапорином) на моделях трансплантата мышей, исследовали антитела против CD45-сапорины (CD45-SAP) на модели аллогенного трансплантата с незначительными несовпадениями (донор Balb/c реципиентам DBA/2). Цель работы состояла в том, чтобы определить уровень подавления иммунитета, если таковой имеется, который необходимо использовать в сочетании с CD45-SAP, чтобы обеспечить высокий донорский химеризм в аллогенных условиях. (CD45-SAP альтернативно называется CD45-SAB-SAP, указывая, что сапорин конъюгирован с моноклональным антителом 104 с использованием связывания стрептавидин/биотин (SAB)).

CD45-SAP (1,9 мг/кг, в/в) оценивали отдельно или в комбинации с дополнительными иммуномодулирующими средствами: клон 30F11 (25 мг/кг, IP), голое антитело против CD45, которое имитирует ATG на основе эффекторной функции, обеспечивая сильное истощение периферических В- и Т-клеток; цитоксан перед трансплантацией (PreTCy, 200 мг/кг, IP), общее облучение тела (TBI) 2 гр и цитоксан после трансплантации (PTCy, 200 мг/кг, IP) для предотвращения болезни трансплантат против хозяина, а также для блокировки отторжения хозяина против трансплантата. TBI 9 гр использовали в качестве обычного подготовительного положительного контроля. Подготовленным мышам трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, и химеризм оценивали в течение 12 недель.

CD45-SAP в комбинации с PTCy обеспечивал значительный донорский химеризм на 8 неделе после трансплантации (фиг. 2A), включая уровень периферического

миелоидного химеризма, считывание приживления стволовых клеток, сравнимое с показателем, достигнутым при TBI 9 гр (>90%) (фиг. 2B-2C). Добавление 30F11 к протоколу CD45-SAP/PTCy не повлияло на периферический донорский химеризм (59% против 61%), подтверждая отсутствие необходимости в дополнительном лимфодеплеции. Напротив, только отдельные средства, 2 гр TBI в комбинации с 30F11 и PTCy, приводили к <5% приживлению донорского трансплантата. Другие тестируемые условия, которые обеспечивали низкий уровень донорского миелоидного химеризма были многодозовое введения 30F11 (QDx3) плюс 2 гр TBI с PTCy (40% донорский химеризм) и PreTCy плюс 30F11 (QDx3) с PTCy (20% донорский химеризм). Для всех групп химеризм стволовых клеток в костном мозге соответствовал периферическому химеризму.

Полученные у донора долгосрочные HSC присутствовали в костном мозге мышей-реципиентов через 12 недель после трансплантации у животных, подготовленных с помощью CD45-SAP и цитоксана (фиг. 2D). На фиг. 2D представлены результаты животных, получавших антитело изотипического контроля, соединенное с сапорином (изотип-SAB-SAP), отдельно (слева) или в комбинации с цитоксаном (справа); животные получали CD45 mAb 104, соединенное с сапорином (104-SAB-SAP), отдельно (слева) или в комбинации с цитоксаном (справа); и TBI 9 гр (IRR) без цитоксана.

Эти результаты показывают, что CD45-SAP в комбинации с PTCy достаточно, чтобы обеспечить высокие уровни донорского химеризма в условиях незначительного несовпадения без необходимости в дополнительном подавлении иммунитета. CD45-SAP был более эффективным для подготовки, чем TBI 2 гр или PreTCy.

Пример 3. Конъюгаты лекарственное средство-антитело против CD45 и против CD117 обеспечивают трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток на животных моделях

Трансплантация костного мозга (BMT) представляет собой потенциально действенное лечение злокачественных и доброкачественных заболеваний крови, которое продемонстрировало впечатляющие результаты при аутоиммунных заболеваниях. Перед BMT пациенты получают химиотерапию в высоких дозах отдельно или с общим облучением тела, и оба варианта связаны с ранними и поздними заболеваниями, токсичностью для органов, бесплодием, вторичными злокачественными новообразованиями и значительным риском смерти. Это значительно ограничивает использование BMT при злокачественных и доброкачественных заболеваниях. Для решения этих проблем разработаны конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленные на гемопоэтические стволовые клетки (HSC) и иммунные клетки, для безопасной подготовки пациентов для аллогенной BMT (35% всех трансплантатов, CIBMTR) и аутологичной BMT (для аутоиммунного заболевания).

Недавно было показано, что ADC, нацеленные на мышинные CD45 или мышинные CD117, эффективно готовят иммунокомпетентных мышей к BMT (Palchaudhuri et al. Nature Biotech 2016 34:738-745; и Czechowicz et al. Blood 2016 128:493). Эти ADC созданы с использованием сапорина (SAP), белка, ингибирующего рибосомы, который после

интернализации вызывает цитотоксичность независимо от клеточного цикла. И ADC против CD45-сапорин (CD45-SAP) и ADC против CD117-сапорин (CD117-SAP) эффективно истощали HSC костного мозга в качестве однократных средств и обеспечивали эффективное приживание аутологичных HSC (>95% долгосрочный донорский химеризм). Эти ADC также обеспечивали BMT в мышинных моделях анемии Фанкони.

Для дальнейшего исследования применимости этих мышинных ADC исследовали CD45-SAP и CD117-SAP в контексте аллогенной трансплантации с незначительным несовпадением. Используя доноров Balb/c в модели трансплантации DBA/2 была попытка определить, может ли CD45-SAP или CD117-SAP обеспечить аллогенную трансплантацию в виде монопрепаратов или их необходимо комбинировать с дополнительными иммунодепрессивными средствами (например, цитоксаном, миметиком ATG).

Способы

Иммунотоксины на основе сапорина (SAP)

Имеющиеся на рынке биотинилированные mAb против CD45.2 (клон 104) комбинировали со стрептавидин-сапорином (ATS Bio, Catalog IT-27) в молярном соотношении 1: 1 непосредственно перед инъекцией. Аналогично, для создания CD117-SAP биотинилированное mAb против CD117 (клон 2B8) комбинировали со стрептавидин-сапорином). Дозировку рассчитывали на основании количества антител, используемых для создания иммунотоксина. Изотип-SAP создали с использованием биотинилированного mAb изотипа mIgG2a.

Иммунодепрессанты

Для имитации ATG использовали голое mAb против CD45 (клон 30F11, 25 мг/кг IP), которое, благодаря эффекторной функции, сильно истощает периферические лимфоциты без воздействия на HSC костного мозга. цитоксан вводили в дозе 200 мг/кг IP через 3 дня после трансплантации для предотвращения GvHD от донорских Т-клеток, как показано на схемах. Общее облучение тела (2 Гр или 9 гр) проводили с использованием Рентгеновского излучателя.

Исследования на животных

Мышей C57Bl6, DBA/2 и CD45.1 Balb/c приобрели в Jackson Laboratories. Мышам DBA/2 трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, собранных у объединенных конгенных доноров Balb/c CD45.1. Все исследования *in vivo* проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным Национальным исследовательским советом национальных академий, и с одобрения Институционального комитета по уходу и использованию животных.

Истощение мышинных HSC с помощью CD45-SAP

Как показано на схеме дизайна исследования на фиг. 3А, мышам C57 в 0 день вводили однократную дозу CD45-SAP или контроля (например, PBS или изотипа-SAP IgG1). Периферическую кровь и костный мозг собирали на 7 день и исследованы с

помощью общего анализа крови (CBC) и проточной цитометрии. На фиг. 3B показана стратегия гейтирования костного мозга с помощью проточной цитометрии и истощение LT-HSC с помощью CD45-SAP. На фиг. 3C показана количественная оценка уровня LT-HSC в костном мозге подготовленных мышей через семь дней после введения дозы PBS, изотипа-SAP или CD45-SAP. Эти результаты показывают, что введение CD45-SAP приводило к истощению долгосрочных HSC (LT-HSCs) в костном мозге (фиг. 3B и 3C). Как показано на фиг. 3D, периферические лимфоциты через семь дней после введения дозы также показали эффективное истощение с помощью CD45-SAP. Таким образом, CD45-SAP ADC эффективно истощает мышинные HSC и лимфоциты.

Пример 4. Подготовка с помощью конъюгата антитело-лекарственное средство, Нацеленного на CD45, Обеспечивает Трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у мышей

Следующее исследование провели для проверки того, можно ли использовать ADC против мышинных CD45 (антитело 104 против CD45, конъюгированного с PBD («CD45-PBD»)), чтобы обеспечить аллогенное-BMT с полным несовпадением у мышей.

Способы

ADC против мышинового CD45, содержащий mAb 104, соединенное с PBD (CD45-PBD), сконструировали так, чтобы иметь быстрый клиренс (2-часовой период полувыведения), чтобы обеспечить трансплантацию костного мозга. На модели конгенного аутологичного мышинового трансплантата определили оптимальную дозу CD45-PBD, чтобы определить, можно ли с помощью ADC успешно подготовить реципиентов к полной аллогенной BMT, CD45-PBD оценивали отдельно или в комбинации с антителами, истощающими Т-клетки (против CD4 и против CD8, 0,25 мг/кг IP) на модели аллогенной BMT с полным несовпадением (донор Balb/c (H-2d, CD45.1+) реципиентам C57Bl/6 (H-2b, CD45.2+). TBI 9 гр использовали в качестве обычного подготовительного положительного контроля. Подготовленным мышам трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, и химеризм периферической крови оценивали в течение 16 недель. На 16 неделе определяли химеризм стволовых клеток костного мозга.

Результаты

В конгенной аутологичной мышиной модели однократная доза CD45-PBD в дозе 3 мг/кг была полностью миелоаблативной, что через 11 дней привело к недостаточности костного мозга. Трансплантация конгенного костного мозга мышам, подготовленным с помощью CD45-PBD, привела к полному донорскому химеризму на уровне, который был сопоставим с животными, которых готовили с помощью миелоаблативной дозой облучения (9 гр TBI). Затем оценивали CD45-PBD в модели аллогенной BMT Balb/c с полным несовпадением C57Bl/6, в которой мыши доноры и реципиенты имели разные антигены MHC. Однократная доза CD45-ADC в дозе 3 мг/кг в качестве единственного средства обеспечила временный смешанный миелоидный химеризм на срок до 3 недель (фиг. 4A). Добавление CD45-PBD с истощением Т-клеток (с использованием антитела

против CD4 и против CD8) обеспечивает продолжительный полный донорский химеризм (>90% периферический донорский химеризм) на 3 неделе и 8 неделе после трансплантации (фиг. 4A), который сохраняется до 16 недели. Многолинейное восстановление наблюдалось в компартментах Т-, В- и миелоидных клеток с >90% донорским химеризмом на 8 неделе после трансплантации, если смотреть в каждом компартменте, что свидетельствует о приживлении гемопоэтических стволовых клеток (фиг. 4B). Эти результаты были сопоставимы с химеризмом, наблюдаемым в положительном контроле 9 Гр TBI для миелоаблативной подготовки (фиг. 4A и 4B). Лечение ADC (Iso-PBD), не подходящего по изотипу, было неэффективным. Для всех групп химеризм стволовых клеток в костном мозге соответствовал периферическому химеризму. Как показано на фиг. 4C и 4D, CD45-PBD в комбинации с истощением Т-клеток (с использованием антитела против CD4 и против CD8) обеспечил истощение клеток CD45⁺ из периферической крови и селезенки через два дня после введения.

Эти результаты демонстрируют, что однократная доза CD45-PBD является полностью миелоаблативной и обеспечивает продолжительный и полный донорский химеризм в модели аллогеной BMT с полным несовпадением с дополнительным истощением Т-клеток. Этот целевой, легко транслируемый подход к более безопасной подготовке может улучшить профиль риска и пользы аллогенной и гаплоидентичной BMT и может расширить лечебный потенциал этого терапевтического метода на большее количество пациентов, страдающих раком крови и другими заболеваниями, которым может помочь BMT.

Пример 5. Истощение костного мозга и аллогенный донорский химеризм после подготовки с помощью ADC против CD45 и низкой дозой TBI

CD45-ADC, содержащий mAb 104 против CD45 и PBD (CD45-PBD, также называемый 104-PBD), оценивали отдельно или в комбинации с общим облучением тела (TBI) низкой дозой (0,5-2 гр) на модели трансплантата с полным несовпадением аллогенных HSC (доноры Balb/c (H-2d, CD45.1+) реципиентам C57Bl/6 (H-2b, CD45.2+)). Дозы TBI ниже TBI 9 гр (5 гр, 4 гр, 3 гр, 2 гр, 1 гр, 0,5 гр и 0 гр) оценивали в комбинации с CD45-PBD. TBI 9 гр служило в качестве обычного подготовительного положительного контроля. Подготовленным реципиентным мышам C57Bl/6 трансплантировали 2×10^7 цельных клеток костного мозга, полученных у доноров Balb/c, и более 16 недель оценивали химеризм периферической крови.

В комбинации с низкой дозой TBI CD45-PBD обеспечили истощение клеток LT-HSC (фиг. 5A) и истощение клеток CD45⁺ (фиг. 5B), миелоидных клеток (фиг. 5C), В-клеток (фиг. 5D) и Т-клеток (фиг. 5E) в костном мозге через два дня после введения ADC. CD45-PBD в комбинации с низкой дозой TBI обеспечили полный аллогенный донорский химеризм (>90% донорский химеризм в периферической крови) за 4 недели после трансплантации (фиг. 5F). Наблюдалось многолинейное восстановление компартментов В- и миелоидных клеток (>90% донорский химеризм; на фиг. 5G) после подготовки с помощью CD45-PBD в комбинации с низкой дозой TBI (0,5 гр) и было сопоставимо с

химеризмом, наблюдаемым в группе положительного контроля ТВІ 9 гр (фиг. 5F и 5G).
Лечение нецелевым изотипом ADC было не эффективным (фиг. 5F, 5G).

Таблица 3: КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Идентификатор Последовательности	Описание	Последовательность
SEQ ID NO: 1	CK6 CDR-H1	SYWIG
SEQ ID NO: 2	CK6 CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG
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	вариабельный домен тяжелой цепи консенсусного человеческого Ab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YAMSWVRQAPGKGLEWVAVISENGSDTY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDRGGAVSYFDVWGQGTLLTVS S
SEQ ID NO: 8	вариабельный домен легкой цепи консенсусного человеческого Ab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSS YLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNLS PYTFGGGTKVEIKRT
SEQ ID NO: 9	Вариабельная область тяжелой цепи Ab67 (например, находящаяся в HC- 67) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLTVS S
SEQ ID NO: 10	Вариабельная область легкой цепи Ab67 (например, находящаяся в LC- 67)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYIAP YTFGGGTKVEIK

	остов hКаппа (CDR жирным шрифтом)	
SEQ ID NO: 11	Ab67 CDR-H1	FTFSDADMD
SEQ ID NO: 12	Ab67 CDR-H2	RTRNKAGSYTTEYAASVKG
SEQ ID NO: 13	Ab67 CDR-H3	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO: 14	Ab67 CDR-L1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 15	Ab67 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 16	Ab67 CDR-L3	QQSYIAPYT
SEQ ID NO: 17	Вариабельная область тяжелой цепи Ab67 (ядро)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCA GTGACGCCGACATGGACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CCGTACTAGAAACAAAGCAGGAAGTTACA CCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAA GAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGAGCCTAAATACTGGATCGA CTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGG TCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 18	Вариабельная область легкой цепи Ab67 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA GCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAAGCTACATCGCCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 19	Вариабельная	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR

	область тяжелой цепи Ab55 (например, находящаяся в HC- 55) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	IYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSS
SEQ ID NO: 20	Вариабельная область легкой цепи Ab55 (например, находящаяся в LC- 55) остов hКаппа (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSDI TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 21	Ab55 CDR-H1	GTFRIYAI
SEQ ID NO: 22	Ab55 CDR-H2	GIIPDFGVANYAQKFQG
SEQ ID NO: 23	Ab55 CDR-H3	ARGGLDTDEFDL
SEQ ID NO: 24	Ab55 CDR-L1	RASQSINSYLN
SEQ ID NO: 25	Ab55 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 26	Ab55 CDR-L3	QQGVSDIT
SEQ ID NO: 27	Вариабельная область тяжелой цепи Ab55 (ядро)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCC GAATCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG AGGGATCATCCCTGACTTCGGTGTAGCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCAC AGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AGAGGTGGATTGGACACAGACGAGTTCGA CCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCG

		TCTCCTCA
SEQ ID NO: 28	Варибельная область легкой цепи Ab55 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA ACAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAGGAGTCAGTGACATCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 29	Варибельная область тяжелой цепи Ab54 (например, находящаяся в HC- 54) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID NO: 30	Варибельная область легкой цепи Ab54 (например, находящаяся в LC- 54) остов hКарра (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSINSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGVSDI TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	Ab54 CDR-H1	GTFSSY AIS
SEQ ID NO: 32	Ab54 CDR-H2	GIPIFGTANYA QKFQG
SEQ ID NO: 33	Ab54 CDR-H3	ARGGLDTDEFDL
SEQ ID NO: 34	Ab54 CDR-L1	RASQSINSYLN
SEQ ID NO: 35	Ab54 CDR-L2	AASSLQS

SEQ ID NO: 36	Ab54 CDR-L3	QQGVSDIT
SEQ ID NO: 37	Варибельная область тяжелой цепи Ab54 (ядро)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGG TTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCA GCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG AGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCAC AGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AGAGGTGGATTGGACACAGACGAGTTCGA CCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCG TCTCCTCA
SEQ ID NO: 38	Варибельная область легкой цепи Ab54 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA ACAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAGGAGTCAGTGACATCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 39	Варибельная область тяжелой цепи Ab56 (например, находящаяся в HC- 56) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS LYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPAFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSS
SEQ ID NO: 40	Варибельная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSY

	область легкой цепи Ab56 (например, находящаяся в LC- 56) остов hКарра (CDR жирным шрифтом)	LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSDI TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 41	Ab56 CDR-H1	GTFSLYAIS
SEQ ID NO: 42	Ab56 CDR-H2	GIIPAFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 43	Ab56 CDR-H3	ARGGLDTDEFDL
SEQ ID NO: 44	Ab56 CDR-L1	RASQSINSYLN
SEQ ID NO: 45	Ab56 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 46	Ab56 CDR-L3	QQGVSDIT
SEQ ID NO: 47	Вариабельная область тяжелой цепи Ab56 (ядро)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCA GCCTCTATGCTATCTCCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA GGGATCATCCCTGCCTTCGGTACCGCAAA CTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCA GAGGTGGATTGGACACAGACGAGTTCGAC CTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGT CTCCTCA
SEQ ID NO: 48	Вариабельная область легкой цепи Ab56 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA ACAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC

		AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAGGAGTCAGTGACATCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 49	Варибельная область тяжелой цепи Ab57 (например, находящаяся в HC- 57) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS LYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPHFGLANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID NO: 50	Варибельная область легкой цепи Ab57 (например, находящаяся в LC- 57) остов hКарра (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSY LNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSDI TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 51	Ab57 CDR-H1	GTFSLYAIS
SEQ ID NO: 52	Ab57 CDR-H2	GIIPHFGLANYAQKFQG
SEQ ID NO: 53	Ab57 CDR-H3	ARGGLDTDEFDL
SEQ ID NO: 54	Ab57 CDR-L1	RASQSINSYLN
SEQ ID NO: 55	Ab57 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	Ab57 CDR-L3	QQGVSDIT
SEQ ID NO: 57	Варибельная область тяжелой цепи Ab57 (ядро)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCT CCCTCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG AGGGATCATCCCTCACTTCGGTCTCGCAAA CTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACA

		GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCA GAGGTGGATTGGACACAGACGAGTTCGAC CTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGT CTCCTCA
SEQ ID NO: 58	Варибельная область легкой цепи Ab57 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA ACAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAGGAGTCAGTGACATCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 59	Варибельная область тяжелой цепи Ab58 (например, находящаяся в HC- 58) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGPPTYHTNYYYMDVWGKGT VTVSS
SEQ ID NO: 60	Варибельная область легкой цепи Ab58 (например, находящаяся в LC- 58) остов hКарра (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQTNSFP YTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 61	Ab58 CDR-H1	FTFSNYAMS
SEQ ID NO: 62	Ab58 CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 63	Ab58 CDR-H3	AKGPPTYHTNYYYMDV
SEQ ID NO: 64	Ab58 CDR-L1	RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 65	Ab58 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 66	Ab58 CDR-L3	QQTNSFPYT
SEQ ID NO: 67	Варибельная область тяжелой цепи Ab58 (ядро)	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTA GCAATTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AAGGGCCCTCCTACATACCACACAACTA CTACTACATGGACGTATGGGGCAAGGGTA CAACTGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 68	Варибельная область легкой цепи Ab58 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCC GTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTA GCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC AGCAAACAAATAGTTTCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 69	Варибельная область тяжелой цепи Ab61 (например, находящаяся в HC-61) остов hIgG1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YVMIWVRQAPGKGLEWVSSISGDSVTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGPPTYHTNYYYMDVWGKGT TV TVSS

	(CDR жирным шрифтом)	
SEQ ID NO: 70	Вариабельная область легкой цепи Ab61 (например, находящаяся в LC-61) остров hКаппа (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQTNSFP YTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 71	Ab61 CDR-H1	FTFSSYVMI
SEQ ID NO: 72	Ab61 CDR-H2	SISGDSVTITYYADSVKG
SEQ ID NO: 73	Ab61 CDR-H3	AKGPPTYHTNYYMDV
SEQ ID NO: 74	Ab61 CDR-L1	RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 75	Ab61 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 76	Ab61 CDR-L3	QQTNSFPYT
SEQ ID NO: 77	Вариабельная область тяжелой цепи Ab61 (ядро)	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTA GCAGCTATGTCATGATCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC AAGCATTAGTGGTGACAGCGTAACAACAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AAGGGCCCTCCTACATACCACACAACTA CTACTACATGGACGTATGGGGCAAGGGTA CAACTGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 78	Вариабельная область легкой цепи Ab61 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCC GTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTA GCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA

		TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC AGCAAACAAATAGTTTCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 79	Вариабельная область тяжелой цепи Ab66 (например, находящаяся в HC- 66) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD HYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKASSYTT EYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID NO: 80	Вариабельная область легкой цепи Ab66 (например, находящаяся в LC- 66) остов hКаппа (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYIAP YTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 81	Ab66 CDR-H1	FTFSDHYMD
SEQ ID NO: 82	Ab66 CDR-H2	RTRNKASSYTTEYAASVKG
SEQ ID NO: 83	Ab66 CDR-H3	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO: 84	Ab66 CDR-L1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 85	Ab66 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 86	Ab66 CDR-L3	QQSYIAPYT
SEQ ID NO: 87	Вариабельная область тяжелой цепи Ab66 (ядро)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCA GTGACCACTACATGGACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG

		CCGTACTAGAAACAAAGCTAGTAGTTACA CCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAA GAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGAGCCTAAATACTGGATCGA CTTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGG TCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 88	Варибельная область легкой цепи Ab66 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA GCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAAGCTACATCGCCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 89	Варибельная область тяжелой цепи Ab68 (например, находящаяся в HC- 68) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSD HDMNWVRQAPGKGLEWVGRTRNAAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS S
SEQ ID NO: 90	Варибельная область легкой цепи Ab68 (например, находящаяся в LC- 68) остов hКарра (CDR жирным	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYIAP YTFGGGTKVEIK

	шрифтом)	
SEQ ID NO: 91	Ab68 CDR-H1	FTFSDHDMN
SEQ ID NO: 92	Ab68 CDR-H2	RTRNAAGSYTTEYAASVKG
SEQ ID NO: 93	Ab68 CDR-H3	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO: 94	Ab68 CDR-L1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 95	Ab68 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 96	Ab68 CDR-L3	QQSYIAPYT
SEQ ID NO: 97	Варибельная область тяжелой цепи Ab68 (ядро)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTACAGCTTCTGGATTCACCTTCA GTGACCACGACATGAACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTG CCGTACTAGAAACGCCGCTGGAAGTTACA CCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAA GAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGAGCCTAAATACTGGATCGA CTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGG TCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 98	Варибельная область легкой цепи Ab68 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTA GCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAAGCTACATCGCCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 99	Варибельная область тяжелой цепи Ab69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVD HDMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKLGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT

	(например, находящаяся в HC-69) остов hIgG1 (CDR жирным шрифтом)	EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS S
SEQ ID NO: 100	Вариабельная область легкой цепи Ab69 (например, находящаяся в LC-69) остов hКарра (CDR жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYIAP YTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 101	Ab69 CDR-H1	FTFVDHDMD
SEQ ID NO: 102	Ab69 CDR-H2	RTRNKLGSYTTEYAASVKG
SEQ ID NO: 103	Ab69 CDR-H3	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO: 104	Ab69 CDR-L1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 105	Ab69 CDR-L2	AASSLQS
SEQ ID NO: 106	Ab69 CDR-L3	QQSYIAPYT
SEQ ID NO: 107	Вариабельная область тяжелой цепи Ab69 (ядро)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCG TAGACCACGACATGGACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CCGTACTAGAAACAACTAGGAAGTTACA CCACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGC AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAA GAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGAGCCTAAATACTGGATCGA CTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGG TCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 108	Вариабельная область легкой цепи Ab69 (ядро)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATT GCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTC AGCAAAGCTACATCGCCCCTTACACTTTTG GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
SEQ ID NO: 109	Легкая цепь Ab67 константная область LC подчеркнуто	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYIAP YTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 110	Тяжелая цепь Ab67 константная область HC подчеркнуто	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 111	Тяжелая цепь Ab67 (D265C)*	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT

	константная область HC подчеркнуто	TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 112	Тяжелая цепь Ab67 (L234A/L235A/D265 C)* Константная область HC подчеркнуто	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 113	Тяжелая цепь Ab67 (D265C/H435A)* Константная область HC подчеркнуто	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT

		KVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 114	Тяжелая цепь Ab67 (L234A/L235A/D265 C/H435A)* Константная область подчеркнуто	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYT TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 115	Легкая цепь Ab55 Константная область подчеркнуто	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGVSDI TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 116	Тяжелая цепь Ab55 Константная область подчеркнуто	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR IYAIISWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

		PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 117	Тяжелая цепь Ab55 (D265C)* Константная область подчеркнуто	HC QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR IYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 118	Тяжелая цепь Ab55 (L234A/L235A/D265 C)* Константная область подчеркнуто	HC QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR IYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

		SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 119	Тяжелая цепь Ab55 (D265C/H435A)* Константная область HC подчеркнуто	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR IYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 120	Тяжелая цепь Ab55 (L234A/L235A/D265 C/H435A)* Константная область HC подчеркнуто	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFR IYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPDFGVANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGGLDTDEFDLWGRGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVCVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 121	Константная область легкой цепи LC-54, LC-55, LC-56, LC-57, LC-58, LC-61, LC-66, LC-67, LC-68, LC-69	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 122	Константная область тяжелой цепи WT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 123	Константная область тяжелой цепи (D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 124	Константная область тяжелой цепи (L234A/L235A/D265 C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

		PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 125	Константная область тяжелой цепи (H435A/D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 126	Константная область тяжелой цепи (L234A/L235A/H435 A/D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 127	Консенсусная последовательность вариабельной CDR1 тяжелой цепи (Abs 54-57)	GTF(S/R)(S/I/L)Y AIS
SEQ ID NO: 128	Консенсусная последовательность вариабельной CDR2 тяжелой цепи (Abs	GIIP(I/D/A/H)FG(T/V/L)ANYAQKFQG

	54-57)	
SEQ ID NO: 129	Варибельная CDR3 тяжелой цепи (Abs 54-57)	ARGGLDTDEFDL
SEQ ID NO: 130	Варибельная CDR1 легкой цепи (Abs 54-57)	RASQSINSYLN
SEQ ID NO: 131	Варибельная CDR2 легкой цепи (Abs 54-57)	AASSLQS
SEQ ID NO: 132	Варибельная CDR3 легкой цепи (Abs 54-57)	QQGVSDIT
SEQ ID NO: 133	Консенсусная последовательность варибельной CDR1 тяжелой цепи (Abs 58, 61)	FTFS(N/S)Y(A/V)M(S/I)
SEQ ID NO: 134	Консенсусная последовательность варибельной CDR2 тяжелой цепи (Abs 58, 61)	(A/S)ISG(S/D)(G/S)(G/V)(S/T)TYYADSVKG
SEQ ID NO: 135	Варибельная CDR3 тяжелой цепи (Abs 58, 61)	AKGPPTYHTNYYYMDV
SEQ ID NO: 136	Варибельная CDR1 легкой цепи (Abs 58, 61)	RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 137	Варибельная CDR2 легкой цепи (Abs 58, 61)	AASSLQS
SEQ ID NO: 138	Варибельная CDR3 легкой цепи (Abs 58,	QQTNSFPYT

	61)	
SEQ ID NO: 139	Консенсусная последовательность вариабельной CDR1 тяжелой цепи (Abs 66-69)	FTF(S/V)D(H/A)(Y/D)M(D/N)
SEQ ID NO: 140	Консенсусная последовательность вариабельной CDR2 тяжелой цепи (Abs 66-69)	RTRN(K/A)(A/L)(S/G)SYTTEYAASVKG
SEQ ID NO: 141	Вариабельная CDR3 тяжелой цепи (Abs 66-69)	AREPKYWIDFDL
SEQ ID NO: 142	Вариабельная CDR1 легкой цепи (Abs 66-69)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 143	Вариабельная CDR2 легкой цепи (Abs 66-69)	AASSLQS
SEQ ID NO: 144	Вариабельная CDR3 легкой цепи (Abs 66-69)	QQSYIAPYT
SEQ ID NO: 145	(прекурсор изоформы 1 набора рецепторов фактора роста тучных/стволовых клеток) Человеческого CD117 референсной последовательность ю NCBI белка:	MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVS PGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGF VKWTFEILDETENKQNEWITEKAEATNTG KYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSL YGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSKGCQGK PLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLH CSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSV SKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWK RENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTI SSARVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTITLEV VDKGFNIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYE

	NP_000213.1	AFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENE SNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVNSNDV NAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCV AAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQ TLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVEC KAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTL FTPLLIGFVIVAGMMCIIVMILTYKYLQKPM YEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHK WEFPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVEATAYGL IKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSEL KVL SYLGNHNMNIVNLLGACTIGGPTLVITEY CCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALY KNLLHSKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVP TKADKRRSVRIGSYIERDVTPTAIMEDDELAL DLEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLA ARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVV KGNARLPVKWMAPEIFNCVYTFESDVWSY GIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEG FRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPT FKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQK PVVDHSVRINSVGSTASSSQPLL VHDDV
SEQ ID NO: 146	(прекурсор изоформы 2 набора рецепторов фактора роста тучных/стволовых клеток) Человеческого CD117 референсной последовательность ю NCBI белка: NP_001087241,1	MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVS PGESPSPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGF VKWTFEILDETENENKQNEWITEKAEATNTG KYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSL YGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGK PLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLH CSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFAKAVPVVSV SKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWK RENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTI SSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTITLEV VDKGFIFIPMINTTVFVNDGENVDLIVEYE AFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENE SNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVNSNDV NAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCV

		AAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQ TLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVEC KAYNDVGKTSAYFNFAFKEQIHPHTLFTPLL IGFVIVAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQ WKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPR NRLSFGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDA AMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVL SY LGNHMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGD LLNFLRRKRDSFICKQEDHAEAAALYKNLLH SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVP TKADK RRSVRIGSYIERDVT PAIMEDDELALDLEDLL SFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLT HGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVKGNARLP VKWMAPE SIFNCVYTFESDVWSYGIFLWEL FSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPE HAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQL IEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQKPVVDHSV RINSVGSTASSSQPLL VHDDV
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-1	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 148	Варибельная область легкой цепи LC-1	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGVSSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQFN SYP LTFGGGT KVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-2	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 149	Варибельная область легкой цепи LC-2	DIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIRTD LGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQFN SYP

		LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-3	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 150	Варибельная область легкой цепи LC-3	AIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LAWYQQKPGKTPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-4	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 151	Варибельная область легкой цепи LC-4	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTP LTFGGGKVDIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-5	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 152	Варибельная область легкой цепи LC-5	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAISDY LAWFQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSTP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-6	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS

SEQ ID NO: 153	Варибельная область легкой цепи LC-6	AIRMTQSPSSLSASVGDRVIIACRASQGIGGA LAWYQQKPGNAPKVLVYDASTLESGVPSRF SGGGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-7	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 154	Варибельная область легкой цепи LC-7	DIAMTQSPSSLSAFVGDRVITTCRASQGISSL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTIRSLQPEDFATYYCQQFNSYPL TFGGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-8	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 155	Варибельная область легкой цепи LC-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSA LAWYQQKAGKAPKVLISDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLSISLQPEDFATYYCQQFN GYP LTFGGGGTKVDIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи аминокислотной последовательности HC-9	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 156	Варибельная область легкой цепи LC-9	AIRMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQFN SYP LTFGGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY

	цепи HC-10	SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 157	Варибельная область легкой цепи LC-10	NIQMTQSPSSLSTSVGDRVITICRASQGIGTS LAWYQQKPGKPPKLLIYDASSLESGVPSRLS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNSYP ITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-11	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 158	Варибельная область легкой цепи LC-11	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGDY LTWYQQKPGKAPKVLIIYGASSLQSGVPPRFS GSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQLNSY PLTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-12	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 159	Варибельная область легкой цепи LC-12	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGVRRS LAWYQQKPGKAPKLLIYDASILESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNQY PLTFQGTRLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-13	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 160	Варибельная область легкой цепи LC-13	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNQY LTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-14	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTVT VSS
SEQ ID NO: 161	Варибельная область легкой цепи LC-14	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSFL AWYQQKPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFS GSASGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGY PLTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-15	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTVT VSS
SEQ ID NO: 162	Варибельная область легкой цепи LC-15	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIGSA LAWYQQKPGIGPKLLIYDASTLES GVPARFS GSGSRDFTLTETGOLQPEDFATYYCQQFN GY PLTFGGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-16	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTVT VSS
SEQ ID NO: 163	Варибельная область легкой цепи LC-16	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGE GOA LAWYQEKPGKAPNLLIYDASSLES GVP SRFS GSGYGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSY PLTFGGGGTKVDIK
SEQ ID NO: 164	Варибельная область тяжелой цепи HC-17	QIQLVQSGPELRKPGESVKISCKASGYTFTD YAMYWVKQAPGKGLKWMGWINTYT GKPT YADDFKGRFVFSLEASANTANLQISNLK NED TATYFCARARGLVDDYVMDAWGQGT SVTVSS
SEQ ID NO: 165	Варибельная область легкой цепи	SYELIQPPSASVTLGNTVSLTCVGDELSKRY AQWYQQKPKDKTIVSVIYKDSERPSGISDRFS

	LC-17	GSSSGTTATLTIHGTLAEDEADYYCLSTYSD DNLPVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 166	Вариабельная область тяжелой цепи HC-18	EVQLQQYGAELGKPGTSVRLSCKVSGYNIR NTYIHWVNQRPGEGLEWIGRIDPTNGNTISA EKFKTKATLTADTSSHTAYLQFSQLKSDDTA IYFCALNYEGYADYWGQGVMVTGSS
SEQ ID NO: 167	Вариабельная область легкой цепи LC-18	DIQMTQSPSFLSASVGDRV TINCKASQNINK YLNWYQQKVGEAPKRLIFKTNLSLQTGIPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQTEDVATYFCFQYNIG YTFGAGTKVELK
SEQ ID NO: 168	Вариабельная область тяжелой цепи HC-19	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSISSN YRWNWIRKFPGNKVEWMGYINSAGSTNYN PSLKSRISMTRDTSKNQFFLQVNSVTTEDTA TYYCARSLRGYITDYSGFFDYWGQGVMVT VSS
SEQ ID NO: 169	Вариабельная область легкой цепи LC-19	DIRMTQSPASLSASLGETVNIECLASEDIFSD LAWYQQKPGKSPQLLIYNANSLQNGVPSRF SGSGSGTRYSLKINSLQSEDVATYFCQQYKN YPLTFGSGTKLEIK
SEQ ID NO: 170	Вариабельная область тяжелой цепи HC-20	EVQLQQYGAELGKPGTSVRLSCKLSGYKIR NTYIHWVNQRPGKGLEWIGRIDPANGNTIY AEKFKSKVTLTADTSSNTAYMQLSQLKSDD TALYFCAMNYEGYEDYWGQGVMVTVSS
SEQ ID NO: 171	Вариабельная область легкой цепи LC-20	DIQMTQSPSFLSASVGDSVTINCKASQNINK YLNWYQQKLGEAPKRLIHKTDLSLQTGIPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCFQYKS GFMFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 172	Вариабельная область тяжелой цепи HC-21	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTD YAVYWVIQAPGKGLKWMGWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLETSASTANLQISNLKNEDT ATYFCARGAGMTKDYVMDAWGRGVLVTV S

SEQ ID NO: 173	Вариабельная область легкой цепи LC-21	SYELIQPPSASVTLGNTVSLTCVGDLSKRY AQWYQQKPKDTIVSVIYKDSERPSDISDRFS GSSSGTTATLTIHGTLAEDEADYYCLSTYSD DNLPVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 174	Вариабельная область тяжелой цепи HC-22	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTS YLVHWVRQPPGKTLEWVGLMWNDGDTSY NSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMHSLQAEDT ATYYCARESNLGFTYWGHGTLVTVSS
SEQ ID NO: 175	Вариабельная область легкой цепи LC-22	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCKASQGIDDD LSWYQQKPGKSPQLLIYDVTRLADGVPSRFS GSRSGTQYSLKISRPQVADSGIYYCLQSYSTP YTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 176	Вариабельная область тяжелой цепи HC-23	EVQLQQYGAELGKPGTSVRLSCKVSGYNIR NTYIHWVHQRPGEGLEWIGRIDPTNGNTISA EKFKSKATLTADTSSNTAYMQFSQLKSDDT AIYFCAMNYEGYADYWGQGVMVTVSS
SEQ ID NO: 177	Вариабельная область легкой цепи LC-23	DIQMTQSPSFLSASVGDRLTINCKASQNINK YLNWYQQKLGEAPKRLIFKTNSLQTGIPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCFQYNIG FTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 178	Вариабельная область тяжелой цепи HC-24	EVQLVESGGGLVQSGRSLKLSCAASGFTVSD YYMAWVRQAPTKGLEWVATINYDGSTTYH RDSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRS EDT ATYYCARHGDYGYHYGAYYFDYWGQGVM VTVSS
SEQ ID NO: 179	Вариабельная область легкой цепи LC-24	DIVLTQSPALAVSLGQKPYCAISCRASQTVS LSGYNLHWHYQQRTGQQPKLLIYRASNLAP GIPARFSGSGSGTDFTLTISPVSDDIATYYC QQSRESWTFGGGTNLEMK
SEQ ID NO: 180	Вариабельная область тяжелой цепи HC-25	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTD YAIHWVKQAPGQGLRWMAWINTETGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTAHLQISNLKNEDT ATFFCAGGSHWFAYWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO: 181	Варибельная область легкой цепи LC-25	SYELIQPPSASVTLENTVSITCSGDELSNKYA HWYQQKPKDKTILEVIYNDSEPSGISDRFSGS SSGTTAILTIRDAQAEDADYYCLSTFSDDD LPIFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 172	Варибельная область тяжелой цепи HC-26	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTD YAVYWVIQAPGKGLKWMGWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLETSASTANLQISNLKNEDT ATYFCARGAGMTKDYVMDAWGRGVLVTV S
SEQ ID NO: 182	Варибельная область легкой цепи LC-26	SYELIQPPSTSVTLGNTVSLTCVGNELPKRYA YWFQQKPDQSIVRLIYDDDRRPSGISDRFSGS SSGTTATLTIRDAQAEDAEAYYCHSTYTDD KVPIFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 183	Варибельная область тяжелой цепи HC-27	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLCKASGFTFS NYDMAWVRQAPTRGLEWVASISYDGITAY YRDSVKGRFTISRENAKSTLYLQLVSLRSED TATYYCTTEGGYVYSGPHYFDYWGQGVMTV TVSS
SEQ ID NO: 184	Варибельная область легкой цепи LC-27	DIQMTQSPSSMSVSLGDTVTITCRASQDVGIF VNWFQQKPGRSPRRMIYKPYCANLADGVPS RFGSGRSGSDYSLTISSLESEDVADYHCLQY DEFPRTFGGGKLELK
SEQ ID NO: 185	Варибельная область тяжелой цепи HC-28	EVQLQQYGAELGKPGTSLVRLCKVSGYKIR NTYIHWVNQRPGKGLEWIGRIDPANGNTIY AEKFKSKVTLTADTSSNTAYMQLSQLKSDD TALYFCAMNYEGYEDYWGQGVMTVTVSS
SEQ ID NO: 186	Варибельная область легкой цепи LC-28	DIQMTQSPSFLSASVGDSVTINCKASQNINK YLNWYQQKLGEAPKRLIHKTNSLQPGFSPRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAAYFCFQYNS GFTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 187	Варибельная область тяжелой цепи HC-29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT DYIHWVRQAPGQGLEWMGMNPHSGDT GYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGT

		LVTVSSAS
SEQ ID NO: 188	Вариабельная область легкой цепи LC-29	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIGNE LGWYQQKPKGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDN LPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 189	Вариабельная область тяжелой цепи HC-30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYLHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDT NYAQNLFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGT LVTVSSAS
SEQ ID NO: 190	Вариабельная область легкой цепи LC-30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRND LGWYQQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 191	Вариабельная область тяжелой цепи HC-31	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYLHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVTVSSAS
SEQ ID NO: 192	Вариабельная область легкой цепи LC-31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRND LGWYQQKPKGKAPKLLIYDASELETGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGY PITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 193	Вариабельная область тяжелой цепи HC-32	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYIHWVRQAPGQGLEWMGWLNPSSGGGTS YAKKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARHGRGYDGYEGAFDIWGQGT LVTVSSAS
SEQ ID NO: 194	Вариабельная область легкой цепи LC-32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRND LGWYQQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGY PLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 195	Вариабельная область тяжелой цепи HC-33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS TYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMKLSSLRSED TAVYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGLV TVSSAS
SEQ ID NO: 196	Вариабельная область легкой цепи LC-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDD LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGF PLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 197	Вариабельная область тяжелой цепи HC-34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGNTNY AQNFGGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARHGRGYNAYEGAFDIWGQGLV TVSSAS
SEQ ID NO: 198	Вариабельная область легкой цепи LC-3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVNGY PLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 199	Вариабельная область тяжелой цепи HC-35	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGVINPTVGGAN YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCARHGRGYNEYEGAFDIWGQGL VTVSSAS
SEQ ID NO: 200	Вариабельная область легкой цепи LC-35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISDY LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSFP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 201	Вариабельная область тяжелой цепи HC-36	QVQLVQSGAEVKKLGASVKVSCKASGYTFS SYMHWRQAPGQGLEWMGVINPAGT NFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRS EDTAVYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LTVSSAS
SEQ ID NO: 190	Вариабельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS

	LC-36	GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 202	Вариабельная область тяжелой цепи HC-37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPTGGGT NYAQNFGGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVTVSSAS
SEQ ID NO: 203	Вариабельная область легкой цепи LC-37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND VSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLSGYP ITFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO: 204	Вариабельная область тяжелой цепи HC-38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYYIHWVRQAPGQGLEWMGMINPSGGSTN YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARHGRGYNDYEGAFDIWGQGTL VTVSSAS
SEQ ID NO: 205	Вариабельная область легкой цепи LC-38	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDW LAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLEGGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP YTFGQGGTKVEIK
SEQ ID NO: 206	Вариабельная область тяжелой цепи HC-39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFS AYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTRY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARHGRGYGGYEGAFDIWDQGT LVTSSAS
SEQ ID NO: 207	Вариабельная область легкой цепи LC-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDY VAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNG YPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 208	Вариабельная область тяжелой цепи HC-40	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPDDSDTRY SPSFQGQVTISVDKSNSTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLVT VSSAS

SEQ ID NO: 209	Варибельная область легкой цепи LC-40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSY LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTYFTLTISLQPEDFATYYCQQGASFP ITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 210	Варибельная область тяжелой цепи HC-41	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGSSFPN SWIAWVRQMPGKGLEWMGIYPSDSDTRY PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLEASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLLTV SSAS
SEQ ID NO: 211	Варибельная область легкой цепи LC-41	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNY LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYP LTFGGGKTKVEIK
SEQ ID NO: 212	Варибельная область тяжелой цепи HC-42	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIMYPGDSDR YSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYNAYEGAFDIWGQGTLLTV VSSAS
SEQ ID NO: 213	Варибельная область легкой цепи LC-42	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINN WLAWYQQKPGKAPKLLIYDAFILQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLNS YPLTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 214	Варибельная область тяжелой цепи HC-43	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN WIAWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSETRYSP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARHGRGYGYEGAFDIWGQGTLLTVS SAS
SEQ ID NO: 215	Варибельная область легкой цепи LC-43	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISDN LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAISFP LTFQGQTKVEIK
SEQ ID NO: 216	Варибельная область тяжелой цепи HC-44	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGVIYPDDSETRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA

		MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLLTV SSAS
SEQ ID NO: 217	Варибельная область легкой цепи LC-44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASRDIRD LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 218	Варибельная область тяжелой цепи HC-45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFNT YIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSGTRYSP SFQGQVTISADKAISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARHSGRYNGYEGAFDIWGQGTLLTVSS AS
SEQ ID NO: 219	Варибельная область легкой цепи LC-45	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISNY LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP VTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 220	Варибельная область тяжелой цепи HC-46	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTT YIWGVRQMPGKGLEWMGIHPADSDTRY NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLLT VSSAS
SEQ ID NO: 221	Варибельная область легкой цепи LC-46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRVSQGISY LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 222	Варибельная область тяжелой цепи HC-47	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSN YWIWVRQMPGKGLEWMGIIPDNSDTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYDGYEGAFDIWGQGTLLTV SSAS
SEQ ID NO: 223	Варибельная область легкой цепи LC-47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRSD LAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP LSFGGTKEIK

SEQ ID NO: 224	Вариабельная область тяжелой цепи HC-48	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFAS YWIGWVRQMPGKGLEWMGITYPGDSETRY NPSQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYGGYEGAFDIWGQGTLLTV SSAS
SEQ ID NO: 225	Вариабельная область легкой цепи LC-48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 226	Вариабельная область тяжелой цепи HC-49	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDFTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLLTV SSAS
SEQ ID NO: 227	Вариабельная область легкой цепи LC-49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNW LAWYQQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNSFP LTFGGGTLEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-74	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDFTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 228	Вариабельная область легкой цепи LC-74	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGVISA LAWYQQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-75	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDFTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 229	Вариабельная область легкой цепи	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRA LAWYQQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS

	LC-75	GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-76	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 230	Вариабельная область легкой цепи LC-76	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGVGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-77	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 231	Вариабельная область легкой цепи LC-77	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGVISA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASILESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-78	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 232	Вариабельная область легкой цепи LC-78	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASILESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYP LTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 147	Вариабельная область тяжелой цепи HC-79	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS

SEQ ID NO: 233	Варибельная область легкой цепи LC-79	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGVGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASILESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-80	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 234	Варибельная область легкой цепи LC-80	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASILESGVPSRFSG SFGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPL TFTGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-81	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 235	Варибельная область легкой цепи LC-81	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGVISA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-82	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 236	Варибельная область легкой цепи LC-82	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-83	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA

		MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 237	Варибельная область легкой цепи LC-83	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGVGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-84	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGGVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 237	Варибельная область легкой цепи LC-84	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGVGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 238	Варибельная область тяжелой цепи HC-245	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY PSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGTLLV SS
SEQ ID NO: 239	Варибельная область легкой цепи LC-245	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTP PLTFGGGTREIK
SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-246	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRY SPSFQGGVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMT VSS
SEQ ID NO: 239	Варибельная область легкой цепи LC-246	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTP PLTFGGGTREIK

SEQ ID NO: 147	Варибельная область тяжелой цепи HC-247	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTT YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 240	Варибельная область легкой цепи LC-247	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASRGISDY LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQANSFP ITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 238	Варибельная область тяжелой цепи HC-248	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SS
SEQ ID NO: 241	Варибельная область легкой цепи LC-248	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPSRFS GSGSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQ LNGY PLTFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 238	Варибельная область тяжелой цепи HC-249	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SS
SEQ ID NO: 242	Варибельная область легкой цепи LC-249	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQ LNGY PLTFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 243	Варибельная область тяжелой цепи Ab 85	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAIINPRDS DTRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO: 244	Варибельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRSSQGIRSD LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS

	Ab 85	GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGF PLTFGGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 245	Ab85 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO: 246	Ab85 CDR-H2	IINPRDSDTRYRPSFQG
SEQ ID NO: 247	Ab85 CDR-H3	HGRGYEGYEGAFDI
SEQ ID NO: 248	Ab85 CDR-L1	RSSQGIRSDLG
SEQ ID NO: 249	Ab85 CDR-L2 Ab249 CDR-L2	DASNLET
SEQ ID NO: 250	Ab85 CDR-L3	QQANGFPLT
SEQ ID NO: 251	Вариабельная область тяжелой цепи Ab 86	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDIRYS PSLQGQVTISVDTSTSTAYLQWNSLKPSDTA MYYCARHGGRGYNGYEGAFDIWGQGTLVTV SS
SEQ ID NO: 252	Вариабельная область легкой цепи Ab 86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDS LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGY PITFGQGGTKVEIK
SEQ ID NO: 245	Ab86 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO: 253	Ab86 CDR-H2	IYPGDSDIRYSPSLQG

SEQ ID NO:3	Ab86 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 254	Ab86 CDR-L1	RASQGIGDSLA
SEQ ID NO: 249	Ab86 CDR-L2	DASNLET
SEQ ID NO: 255	Ab86 CDR-L3	QQLNGYPIT
SEQ ID NO: 243	Варибельная область тяжелой цепи Ab 87	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAINPRDS TRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGLVT VSS
SEQ ID NO: 256	Варибельная область легкой цепи Ab 87	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGY PITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 245	Ab87 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO: 246	Ab87 CDR-H2	IINPRDS TRYRPSFQG
SEQ ID NO: 247	Ab87 CDR-H3	HGRGYEGYEGAFDI
SEQ ID NO: 257	Ab87 CDR-L1	RASQGIRNDLG
SEQ ID NO:5	Ab87 CDR-L2	DASSLES

SEQ ID NO: 255	Ab87 CDR-L3	QQLNGYPIT
SEQ ID NO: 258	Вариабельная область тяжелой цепи Ab 88	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSLTRY PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLVTV SS
SEQ ID NO: 256	Вариабельная область легкой цепи Ab 88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNGY PITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 245	Ab88 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO: 259	Ab88 CDR-H2	IIYPGDSLTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	Ab88 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 257	Ab88 CDR-L1	RASQGIRNDLG
SEQ ID NO:5	Ab88 CDR-L2	DASSLES
SEQ ID NO: 255	Ab88 CDR-L3	QQLNGYPIT
SEQ ID NO: 260	Вариабельная область тяжелой цепи Ab89	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTLVTV SS

SEQ ID NO: 252	Вариабельная область легкой цепи Ab89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDS LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNGY PITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 245	Ab89 CDR-H1	NYWIG
SEQ ID NO:2	Ab89 CDR-H2	IYPGDS DTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	Ab89 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 254	Ab89 CDR-L1	RASQGIGDSLA
SEQ ID NO: 249	Ab89 CDR-L2	DASNLET
SEQ ID NO: 255	Ab89 CDR-L3	QQLNGYPIT
SEQ ID NO: 261	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи CK6	QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRY SPSFQGQVTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID NO: 262	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи CK6	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPL TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 263	Ab77 CDR-H1	TYWIG

SEQ ID NO:2	Ab77 CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	Ab77 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 264	Ab77 CDR-L1	RASQGVISALA
SEQ ID NO: 265	Ab77 CDR-L2	DASILES
SEQ ID NO: 266	Ab77 CDR-L3	QQFNSYPLT
SEQ ID NO: 263	Ab79 CDR-H1	TYWIG
SEQ ID NO:2	Ab79 CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	Ab79 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 267	Ab79 CDR-L1	RASQGVGSALA
SEQ ID NO: 265	Ab79 CDR-L2	DASILES
SEQ ID NO: 266	Ab79 CDR-L3	QQFNSYPLT
SEQ ID NO: 263	Ab81 CDR-H1	TYWIG

SEQ ID NO:2	Ab81 CDR-H2	IYPGDS DTRYSPSFQG
SEQ ID NO:3	Ab81 CDR-H3	HGRGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 264	Ab81 CDR-L1	RASQGVISALA
SEQ ID NO: 268	Ab81 CDR-L2	DASTLES
SEQ ID NO: 266	Ab81 CDR-L3	QQFNSYPLT
SEQ ID NO: 269	Константная область тяжелой цепи (Дикого типа (WT))	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 270	Константная область тяжелой цепи с мутациями L234A, L235A (LALA) (мутации жирным шрифтом)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 271	Константная область тяжелой цепи с мутацией D265C (мутация жирным шрифтом)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 272	Константная область тяжелой цепи с мутацией H435A (мутация жирным шрифтом)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 273	Константная область тяжелой цепи: модифицированная Fc-область с мутациями L234A, L235A, D265C (мутации жирным шрифтом)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 274	Константная область тяжелой цепи: модифицированная Fc-область с мутациями L234A, L235A, D265C, H435A (мутации жирным шрифтом)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVCVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 275	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab85; константная область подчеркнута	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAINPRDS DTRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 276	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab85; константная область подчеркнута; модифицированная	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAINPRDS DTRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

	Fc-область с мутациями L234A, L235A (мутации жирным шрифтом)*	SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 277	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab85: константная область подчеркнута; модифицированная Fc-область с мутациями L234A, L235A, D265C (мутации жирным шрифтом)*	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAINPRDS TRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 278	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab85 (мутант LALA - D265C - H435A); константная область подчеркнута	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTN YWIGWVRQMPGKGLEWMAINPRDS TRY RPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARHGRGYEGYEGAFDIWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA

		LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 279	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab249; константная область подчеркнута	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 280	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab249; константная область подчеркнута (мутации LALA)*	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 281	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab249; константная область подчеркнута (мутации LALA - D265C)*	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVCVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 282	Последовательность полноразмерной тяжелой цепи Ab249; константная область подчеркнута; (мутации LALA - D265C - H435A)*	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTT SWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARHGLGYNGYEGAFDIWGQGT LVT V SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVCVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 283	Константная область легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 284	Полноразмерная легкая цепь Ab85; константная область подчеркнута	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQGIRSD LGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGF PLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 285	Легкая цепь Ab249; константная область подчеркнута	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIGSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNLGY PLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 286	Ab249 HC-CDR1	TSWIG
SEQ ID NO: 287	Ab249 HC-CDR3	HGLGYNGYEGAFDI
SEQ ID NO: 288	Ab249 LC-CDR1	RASQGIGSALA
SEQ ID NO: 289	Ab249 LC-CDR3	QQNLGYPLT
SEQ ID NO: 290	CD45RO (Изоформа человеческого CD45)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTP SPTDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPS KPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNV NENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSIS HNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVE KADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGN MIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHK FTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVI TWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNL IKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGS

		AAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSM TSDNSM HVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRN ESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDY PGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIAL VVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEK QLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAE FQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILP YDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEP RKYIAAQGPRDETVD DFWRMIWEQKATVIV MVTRCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGD VVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGR EVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNA FSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAMLE GLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEA QYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHN MKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHI GNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESEHDSDESSDDSDCM.PSKYINASFIM SYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRK VKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTY GDIEVDLKD TDKSSTYTLRVFELRH SKRKDS RTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVV KQKLPQKNSSEG NKHHKSTPLLIHCRDGSQQ TGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRK ARPGMVSTFEQYQFLYDVIAS TYPAQNGQV KKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANC VNPL GAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNG PASPALNQGS
SEQ ID NO: 291	CD45RA (Изоформа человеческого CD45)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTP SPTGLTTAKMPSVPLSSDPLPHTTAFSPAST FERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLNAS AFNTTDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIAT TPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKL NVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVS ISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQ

		VEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQC GNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNN HKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQ GVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLD KNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQR NGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMUSD NSMHVKCRPPDRNGPHERYHLEVEAGNTL VRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHN GDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSI ALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERD DEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLF LAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVD ILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFK EPRKYIAAQGPRDETVDDEFWRMIWEQKATV IVMVTRCEEGRNRNKA EYWPSMEEGTRAFG DVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATG REVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVN AFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAML EGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVE AQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLH NMKKRDPSPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQH IGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESEHDSDESSDDSDCM.PSKYINASFIM SYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRK VKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTY GDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDS RTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVV KQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQ TGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRK ARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQV KKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPL GAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNG PASPALNQGS
--	--	--

SEQ ID NO: 292	CD45RB (Изоформа человеческого CD45)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTP SPTGVSSVQTPHLPTHADSQTPSAGTDTQTF SGSAANAKLNPTPGSNAISDAYLNASETTTL SPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVD YLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNN EVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVP PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETF TCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPE HEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGE PQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCY IKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVL SLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQV WNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHER YHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYS TDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKA LIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCN LDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETY KRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARK PFNQNKNRVYVDILPYDYNRVELSEINGDAGS NYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDE WRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNRNKCAEY WPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQ KLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPE DPHLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGV GRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVK LRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGE TEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEF QRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIP YDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDS DCM.PSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLK ETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEI CAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDSTDKSSTYTL RVFELRHSHKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLP AEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKS TPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEV
----------------	--	---

		VDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDV IASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDK VKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPT SGTEGPEHSVNGPASPALNQGS
SEQ ID NO: 293	CD45RC (Изоформа человеческого CD45)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTP SPTDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTSLAHH SSAALЧАСТЪSNTTITANTSDAYLNASETTTL SPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVD YLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNN EVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVP PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETF TCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPE HEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGE PQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCY IKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVL SLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQV WNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHER YHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYS TDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKA LIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCN LDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETY KRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPKEARK PFNQNKNRVVDILPYDYNRVELSEINGDAGS NYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDE WRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNPKCAEY WPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQ KLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPE DPHLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGV GRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVK LRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGE TEVNLSELHPYLHNMKKRDPPEPSPLEAEF QRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIP YDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDS DCM.PSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLK ETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEI

		CAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTL RVFELRHSSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLP AEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKS TPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEV VDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDV IASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDK VKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPT SGTEGPEHSVNGPASPALNQGS
SEQ ID NO: 294	Тяжелая Цепь Апамистамаба	evkllesggglvqpggslklcaasgdfdsrywmswvrqapgkl ewigeinptsstinfpslkdvifisrdnakntlylqmskvrse dalyycargnyyrygdamdywgqgtsvtvssaktppsvylapgsa aqtnsmvtlgclvkgypvptvtwnsgslssgvhtfpavlqsdlyt lsssvtvpsswpsetvtcnvahpasstkvdckivprdcgckpcict vpevssvfifppkpkdvlitltpkvtcvvddiskddpevqfswfv ddvevhtaqtqpreeqfnstersvselpimhqdwlngkefkervn saafpapiektisktkgrpkapqvtytipppkeqmakdkvsltcmi tdffpeditvewqwnqpaenykntqpimtdgisyfvykslnvq ksnweagntftcsvlheglhnhhtekslshspgk
SEQ ID NO: 295	Легкая Цепь Апамистамаба	dialtqspaslavslgqкрыcaiscrasksvstsgysylhwyqqkp gqppkliylaslesgvparfsgsgsgtdftlnihpveeedaatyyc qhsrelpftfgsgtkleikradaaptvsifppsseqltsggasvvcfln neypkдинvkwkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstltlt kdeyerhnsytceathktstspivksfnrec
SEQ ID NO: 296	Варибельная область тяжелой цепи Апамистамаба	evkllesggglvqpggslklcaasgdfdsrywmswvrqapgkl ewigeinptsstinfpslkdvifisrdnakntlylqmskvrse dalyycargnyyrygdamdywgqgtsvtvssa
SEQ ID NO: 297	Варибельная область легкой цепи Апамистамаба	dialtqspaslavslgqкрыcaiscrasksvstsgysylhwyqqkp gqppkliylaslesgvparfsgsgsgtdftlnihpveeedaatyyc qhsrelpftfgsgtkleikr
SEQ ID NO: 298	Варибельная область тяжелой цепи 104 mAb	EVQLVESGGDLVQPGGSLKLSCTASGFTFSN YGMSSWIRQTPDKRLEWVATIVGNDYTYFPD SMKGRFTVSRDNAKSILYLQMNSLASADTA MYYCTRHDWVFDYWGQGTPLTVSSAKTTA PSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYPPEP VTLTWNSGSLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSS

		VTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIE PRVPITQNPCPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIF PPKIKDVLMISSLPMVTCVVVDVSEDDPDVQ ISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKT ISKPRGPVRAPQVYVLPPPAEEMTKKEFSLT CMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTAT VLDSGSGSYFMYSKLRVQKSTWERSLFACTS VVHEGLHNHLTTKTISRSLGK
SEQ ID NO:299	Варибельная область легкой цепи 104 mAb	DIVLTQSPASLA VSLGQRAILSCKASQSVSFA GSSLMHWYQQKPGQPKLLIYRASDLETGIP TRFSGGGSGTDFTLNHPVEEDDAATYYCQQ SREYPYTFGGGTRLEIKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPRДИHVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE C
SEQ ID NO:300	Варибельная область тяжелой цепи 2B8 mAb	EVKLVESGGGLLKPGGSLKLSAASGFTFSK YWMHWVRQAPGKGLEWIGEIEYDGTETNY APSMKDRFTISRDNKNTLYLQMSSVRSED ATYFCTTLQIYNNYLFDYWGQGVMVTVSSA QTTAPSVYPLAPGCGDTSSTVTLGCLVKGY FPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYT LTSSVTSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKK VERRNGGIGHKCPTCPTCHKCPVPELLGGPS VFIFPPKPKDILLISQNAKVTCVVVDVCM.EP DVQFSWVNNVEVHTAQTQPREEQYNSTFR VVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKALPSP IEKTISKPKGLVRKPQVYVMGPPTEQLTEQT VSLTCLTSGFLPNDIGVEWTSNGHIEKNYKN TEPVMDSDGSFFMYSKLNVERSRWDSRAPF VCSVVHEGLHNHHVEKSISRPPGK
SEQ ID NO:301	Варибельная область легкой цепи 2B8 mAb	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITINCKPSQNINKY LNWYQQKLGEAPKRLIYNTNSLQTGIPSRFS GSGSGTDYTLTEGOLQPEDVATYFCLQHNR

		GVTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSMEQLT SGGATVVCVNNFYPRDISVKWKIDGSEQR DGVLDSTVDQDSKDYMSSTLSLTKVEY ERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC
--	--	---

Другие Варианты осуществления

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы включение каждой независимой публикации или заявки на патент было конкретно и отдельно указано посредством ссылки.

Хотя изобретение было описано в сочетании с конкретными вариантами его осуществления, будет понятно, что допускаются его дальнейшие модификации, и настоящая заявка предназначена охватывать любые варианты, способы применения или адаптации изобретения, следующие, в общем, принципам изобретения и содержащие такие отклонения от изобретения, которые попадают в пределы известной или общепринятой практики в области, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным в данном документе, и следуют в объеме формулы изобретения.

Другие варианты осуществления приведены в формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ истощения популяции клеток CD117+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство и иммунодепрессанта перед получением пациентом трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

2. Способ, включающий:

введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство и иммунодепрессанта в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD117+ у пациента; и

впоследствии введение пациенту трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

3. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки при этом пациенту ранее вводили конъюгат антитело против CD117-лекарственное средство и иммунодепрессант в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором CD117 является GNNK+ CD117.

5. Способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессанта перед получением пациентом трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

6. Способ, включающий:

введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессанта в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента; и

впоследствии введение пациенту трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки.

7. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки при этом пациенту ранее вводили конъюгат антитело против CD45-лекарственное средство и иммунодепрессант в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

8. Способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки при этом пациенту ранее вводили конъюгат антитело против CD45-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий введение пациенту иммунодепрессанта после получения пациентом трансплантата.

10. Способ истощения популяции клеток CD117+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает

введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD117-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD117+ у пациента;

введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки; и

впоследствии введение пациенту иммунодепрессанта.

11. Способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантате гемопоэтических стволовых клеток, причем способ включает

введение пациенту-человеку конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента;

введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего аллогенные гемопоэтические стволовые клетки; и

впоследствии введение пациенту иммунодепрессанта.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, в которых все антигены HLA совместимы с HLA-антигенами у пациента-человека.

13. Способ по любому из пп. 1-11, в котором трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат по меньшей мере одно несовпадение HLA относительно HLA-антигенов у пациента.

14. Способ по п. 13, в котором аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере два несовпадения HLA относительно HLA-антигенов у пациента.

15. Способ по п. 14, в котором аллогенные гемопоэтические стволовые клетки содержат по меньшей мере пять несовпадений HLA относительно HLA-антигенов у пациента.

16. Способ по п. 15, в котором аллогенные гемопоэтические стволовые клетки имеют полное несоответствие HLA относительно HLA-антигенов у пациента.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором трансплантат содержит аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, которые содержат несовпадение по меньшей мере одного минорного антигена гистосовместимости (miHA) относительно минорных антигенов гистосовместимости у пациента.

18. Способ по любому из пп. 1-17, причем способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 80% донорского химеризма.

19. Способ по п. 18, причем способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 85% донорского химеризма.

20. Способ по п. 19, причем способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 90% донорского химеризма.

21. Способ по п. 20, причем способ является эффективным для обеспечения по меньшей мере 95% донорского химеризма.

22. Способ по любому из пп. 18-21, в котором донорский химеризм оценивают по меньшей мере 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель или 10 недель после трансплантации.

23. Способ по любому из пп. 18-22, в котором донорский химеризм представляет собой периферический миелоидный химеризм.

24. Способ по любому из пп. 18-22, в котором донорский химеризм представляет собой Т-клеточный химеризм.

25. Способ по любому из пп. 1-24, в котором иммунодепрессантом является циклофосфамид.

26. Способ по любому из пп. 1-24, в котором иммунодепрессантом является общее облучение тела (TBI).

27. Способ по любому из пп. 1-24, в котором иммунодепрессантом является низкая доза TBI.

28. Способ по любому из пп. 1-24, в котором иммунодепрессантом является антитело против CD8, антитело против CD4 или как антитело против CD8, так и антитело против CD4.

29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором иммунодепрессант вводят после трансплантации.

30. Способ по любому из пп. 1-28, в котором иммунодепрессант вводят перед трансплантатом.

31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором конъюгат поглощается раковой клеткой, аутоиммунной клеткой или гемопоэтической стволовой клеткой после введения пациенту.

32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как в крови пациента существенно упадет концентрация конъюгата.

33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство сохраняют функциональный потенциал гемопоэтических стволовых клеток через два или более дней после трансплантации пациенту гемопоэтических стволовых клеток.

34. Способ по любому из пп. 1-33, в котором гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливать гемопоэз после трансплантации пациенту гемопоэтических стволовых клеток.

35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором при трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранной из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, кровяных пластинок, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглий, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток,

макрофагов, дендритных клеток, клеток-натуральных киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

36. Способ по любому из пп. 1-35, в котором у пациента имеется нарушение функции стволовых клеток.

37. Способ по любому из пп. 1-35, в котором у пациента имеется гемоглобинопатическое расстройство, аутоиммунное расстройство, миелодиспластическое расстройство, иммунодефицитное состояние или нарушение обмена веществ.

38. Способ по любому из пп. 1-36, в котором у пациента имеется рак.

39. Способ по любому из пп. 1-4 и 14-38, в котором ADC содержит антитело против CD117, содержащее набор CDR (CDR1, CDR2 или CDR3) тяжелой цепи/легкой цепи (HC/LC) или набор переменных областей HC/LC, как описано в таблице 3.

40. Способ по любому из пп. 1-39, в котором антитело конъюгата имеет скорость диссоциации (K_{OFF}) 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} при измерении с помощью биослойной интерферометрии (BLI).

41. Способ по любому из пп. 1-40, в котором антитело конъюгата связывает CD117 с KD приблизительно 100 NM или менее, приблизительно 90 NM или менее, приблизительно 80 NM или менее, приблизительно 70 NM или менее, приблизительно 60 NM или менее, приблизительно 50 NM или менее, приблизительно 40 NM или менее, приблизительно 30 NM или менее, приблизительно 20 NM или менее, приблизительно 10 NM или менее, приблизительно 8 NM или менее, приблизительно 6 NM или менее, приблизительно 4 NM или менее, приблизительно 2 NM или менее, приблизительно 1 NM или менее при определении с помощью анализа биослойной интерферометрии (BLI).

42. Способ по любому из пп. 1-40, в котором антитело конъюгата представляет собой человеческое антитело.

43. Способ по любому из пп. 1-40, в котором антитело конъюгата представляет собой интактное антитело.

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором антитело конъюгата представляет собой IgG.

45. Способ по п. 44, в котором IgG представляет собой изотип IgG1, изотип IgG2, изотип IgG3 или изотип IgG4.

46. Способ по любому из пп. 1-45, в котором антитело конъюгировано с цитотоксином с помощью линкера.

47. Способ по п. 46, в котором цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

48. Способ по п. 47, в котором ингибитором РНК-полимеразы является аматоксин.

49. Способ по п. 47, в котором ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аманидин.

50. Способ по п. 49, в котором аманидин выбирают из группы, состоящей из α -

аманитина, β -аманитина, γ -аманитина, ε -аманитина, аанина, аанинамида, амануллиина, амануллиновой кислоты и проамануллиина.

51. Способ по п. 46, в котором цитотоксин выбирают из группы, состоящей из экзотоксина А синегнойной палочки, дебуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтанзина, майтанзиноида, ауристатина, антрациклина, калихимицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролбензоDIAзепина, димера пирролбензоDIAзепина, индолинбензоDIAзепина, димера индолинбензоDIAзепина и псевдодимера индолинбензоDIAзепина.

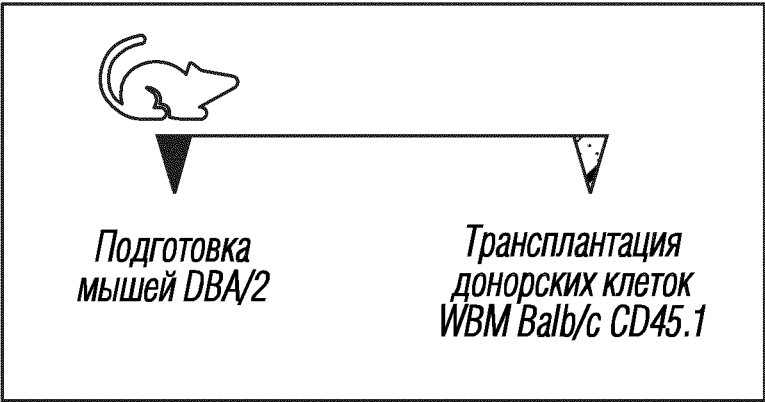
52. Способ по п. 51, в котором ауристатин представляет собой MMAE или MMAF.

53. Способ по любому из пп. 46-52, в котором антитело конъюгировано с токсином с помощью цистеинового остатка в Fc-домене антитела.

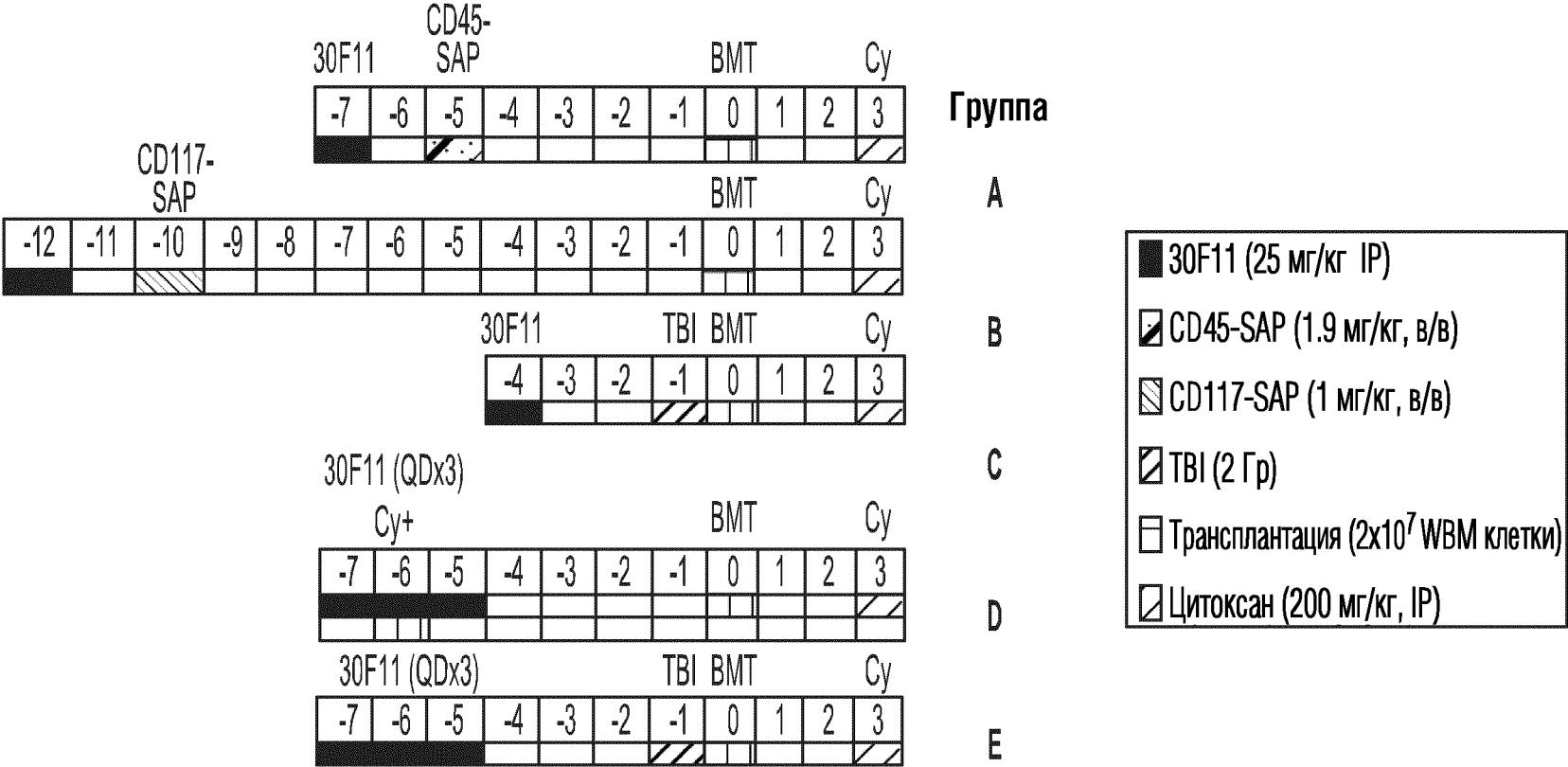
54. Способ по п. 53, в котором цистеиновый остаток вводят с помощью аминокислотной замены в Fc-домене антитела.

55. Способ по п. 54, в котором аминокислотной заменой является D265C.

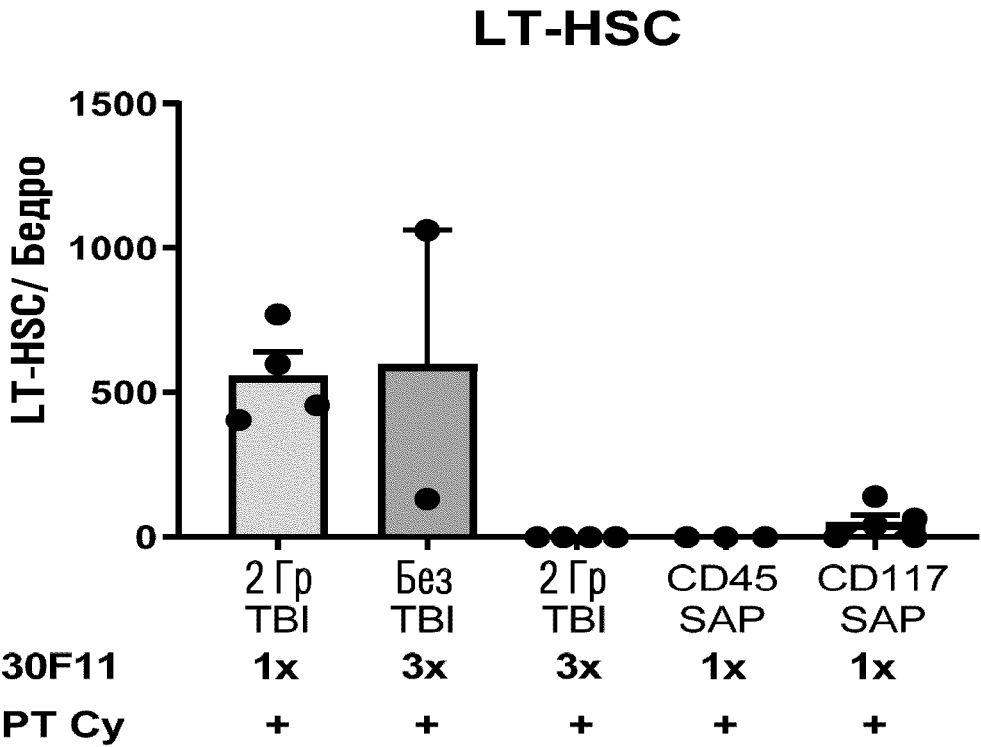
ФИГ.1А



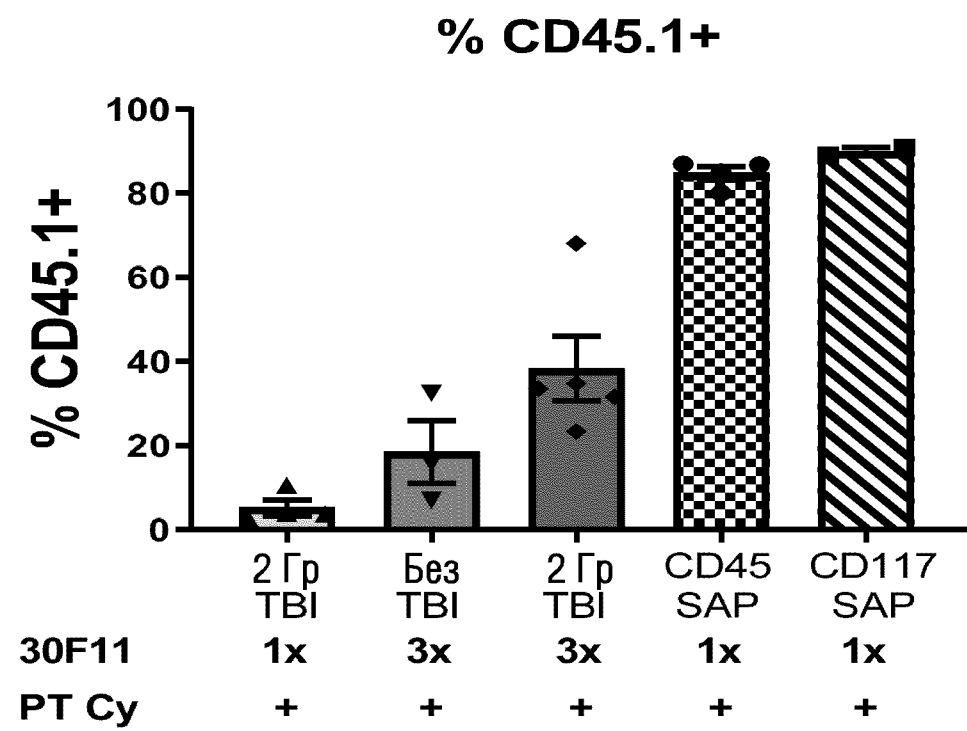
ФИГ.1В



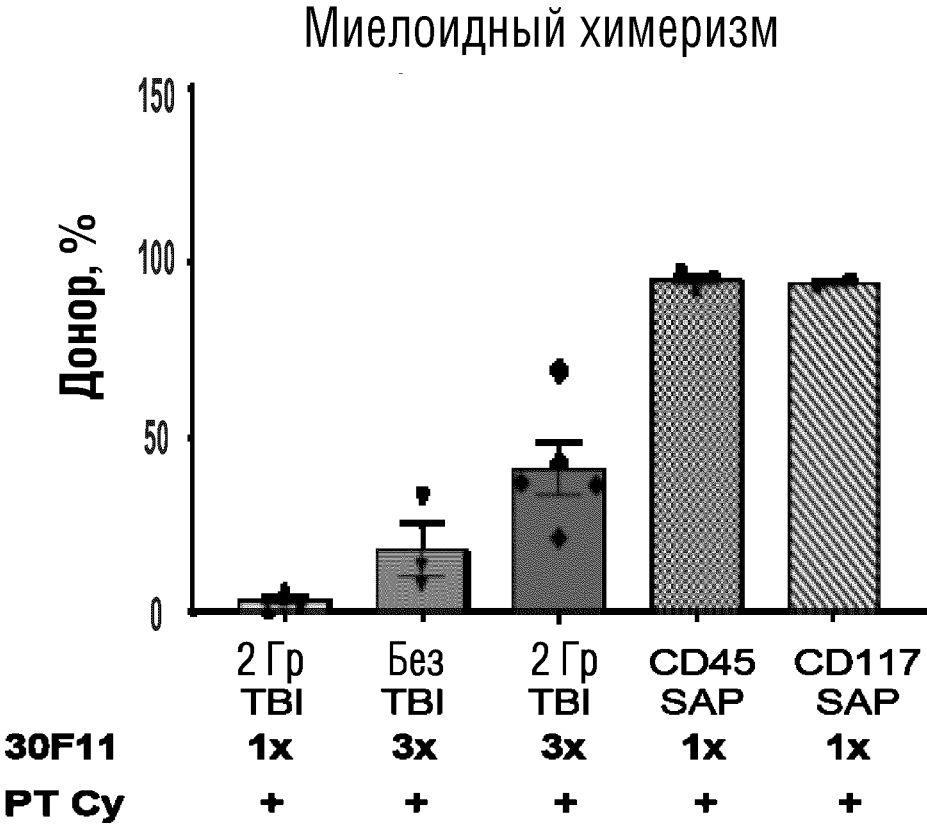
ФИГ.1С



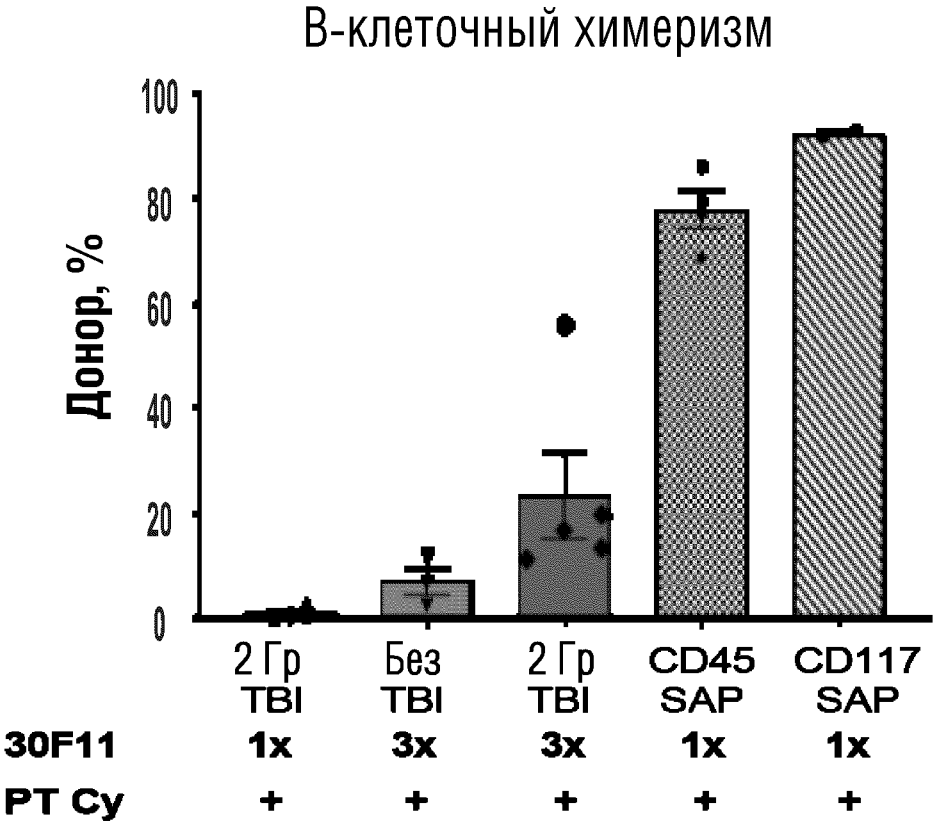
ФИГ.1D



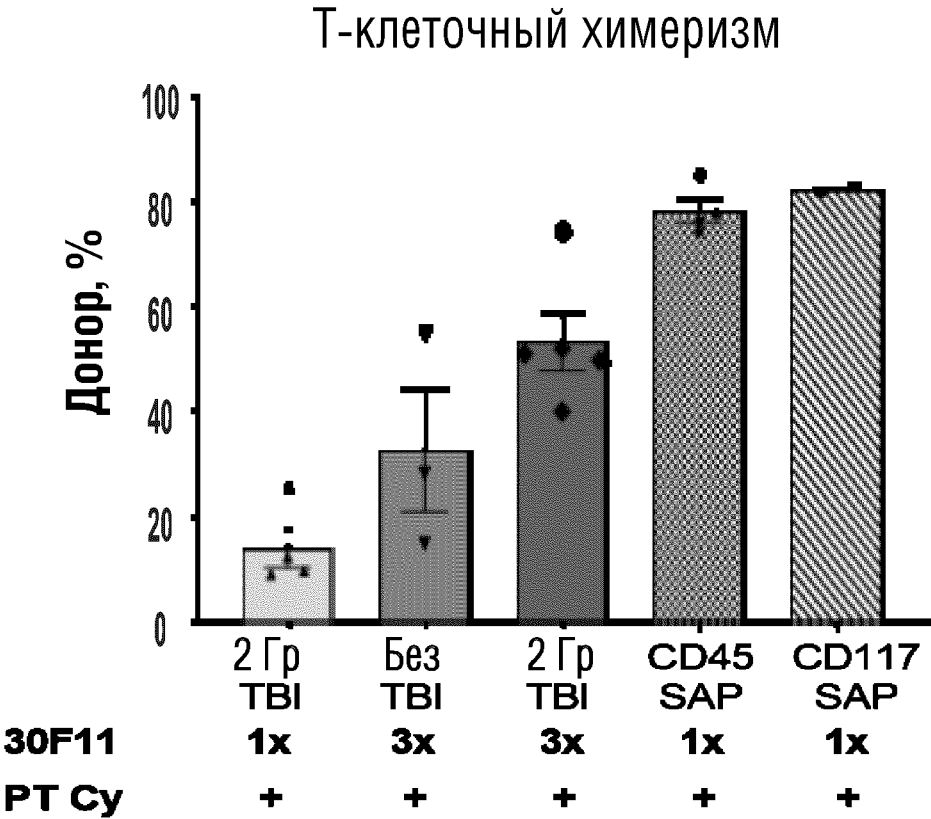
ФИГ.1Е



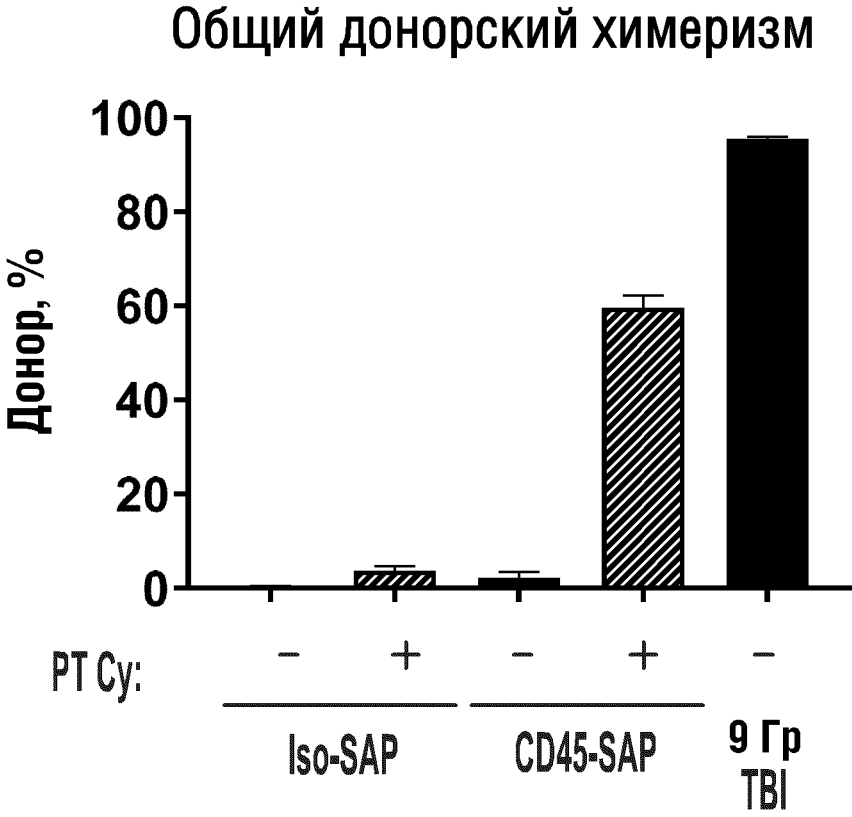
ФИГ.1Е (продолжение)



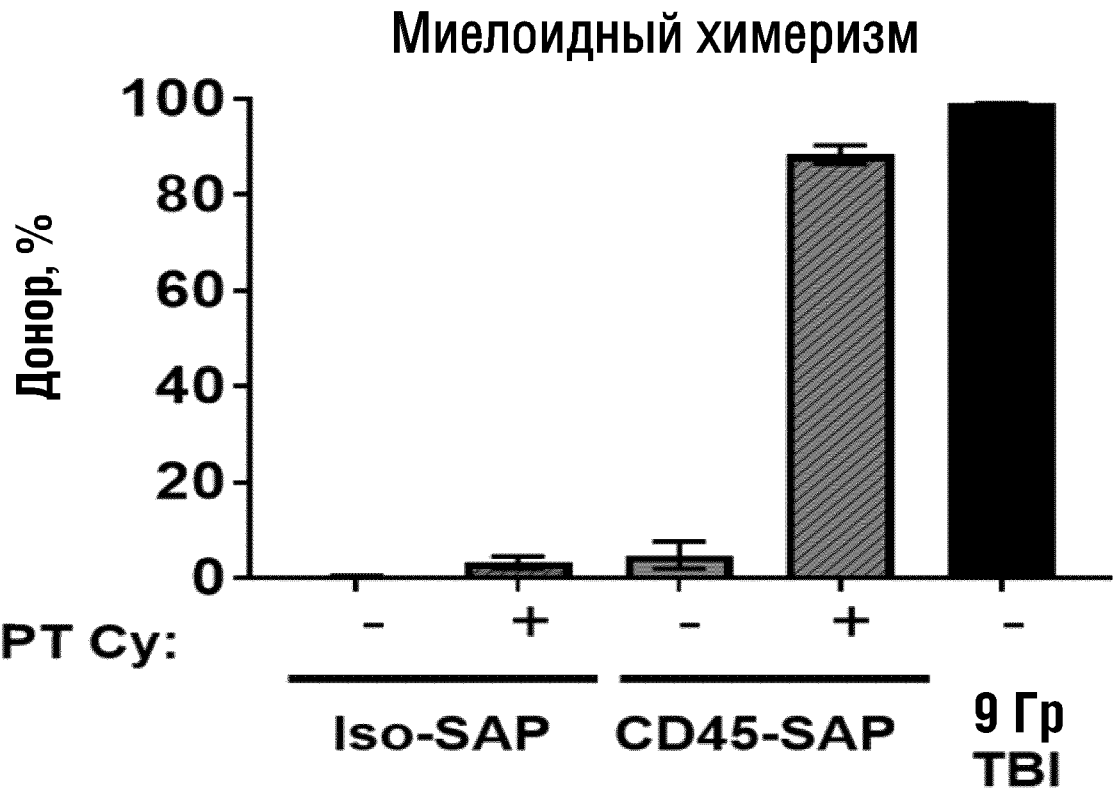
ФИГ.1Е (продолжение)



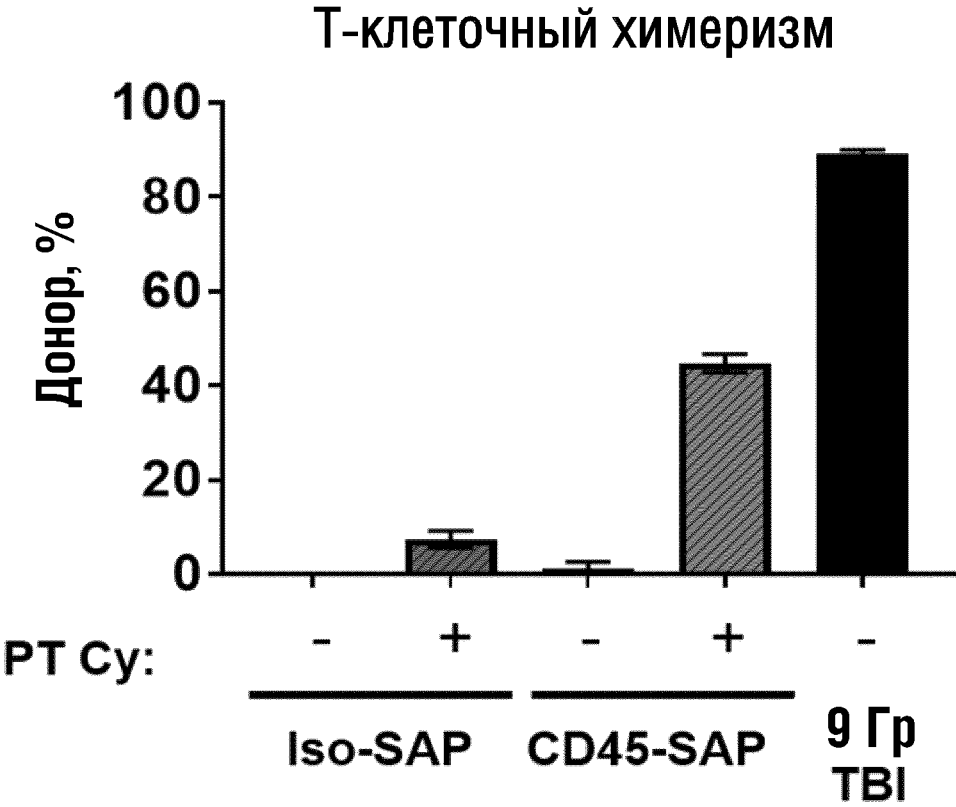
ФИГ.2А



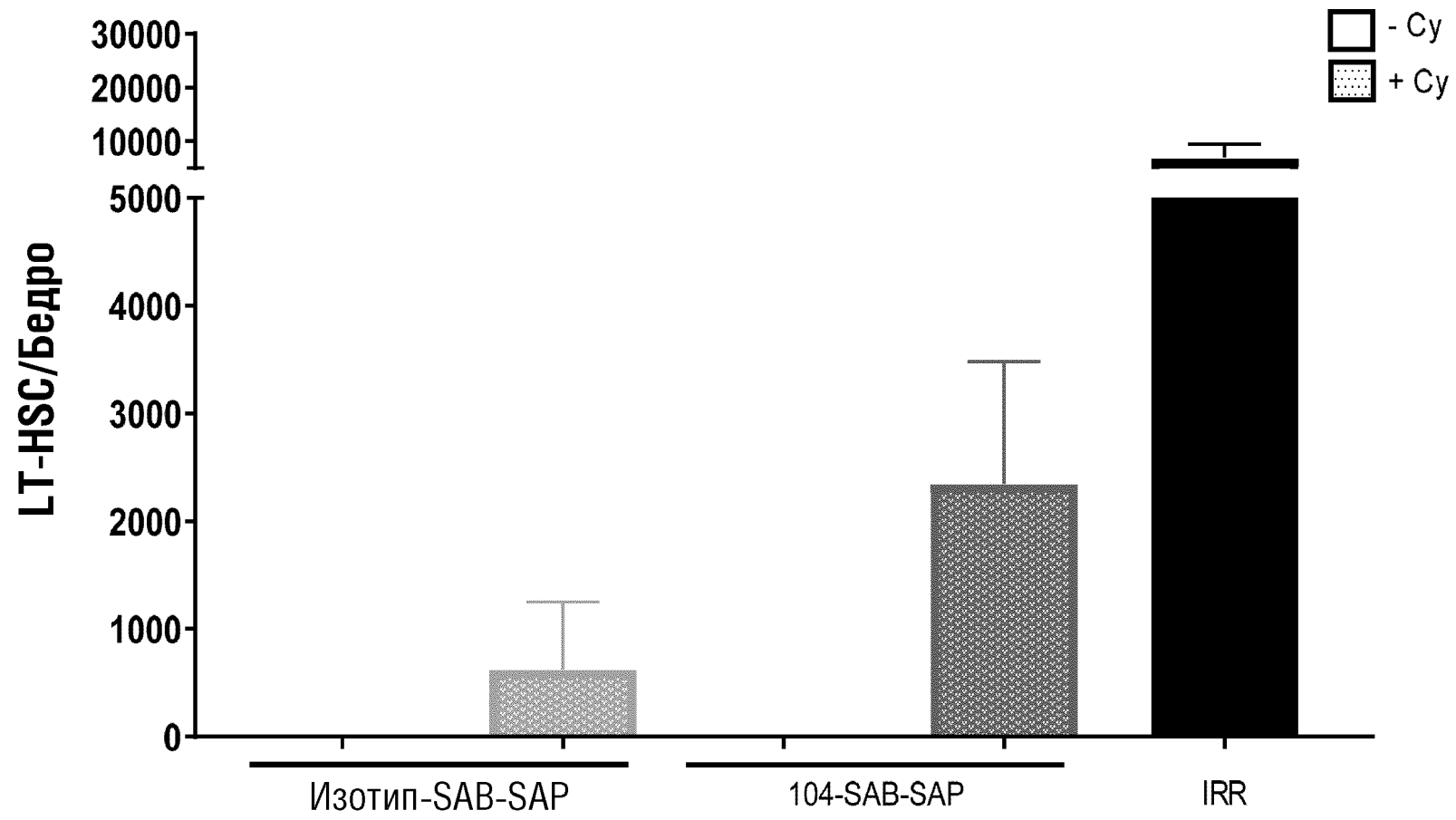
ФИГ.2В



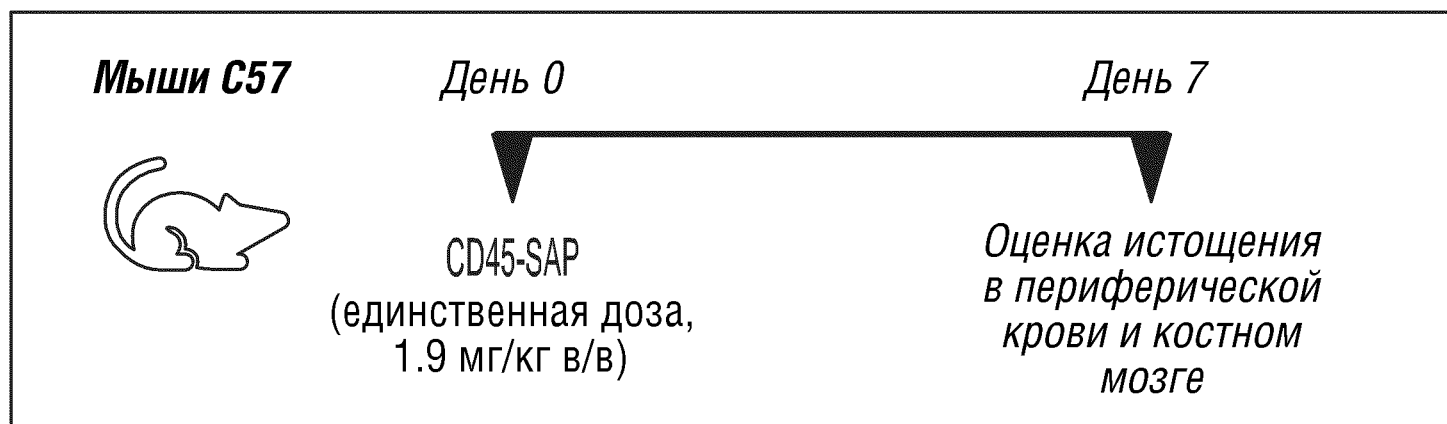
ФИГ.2С



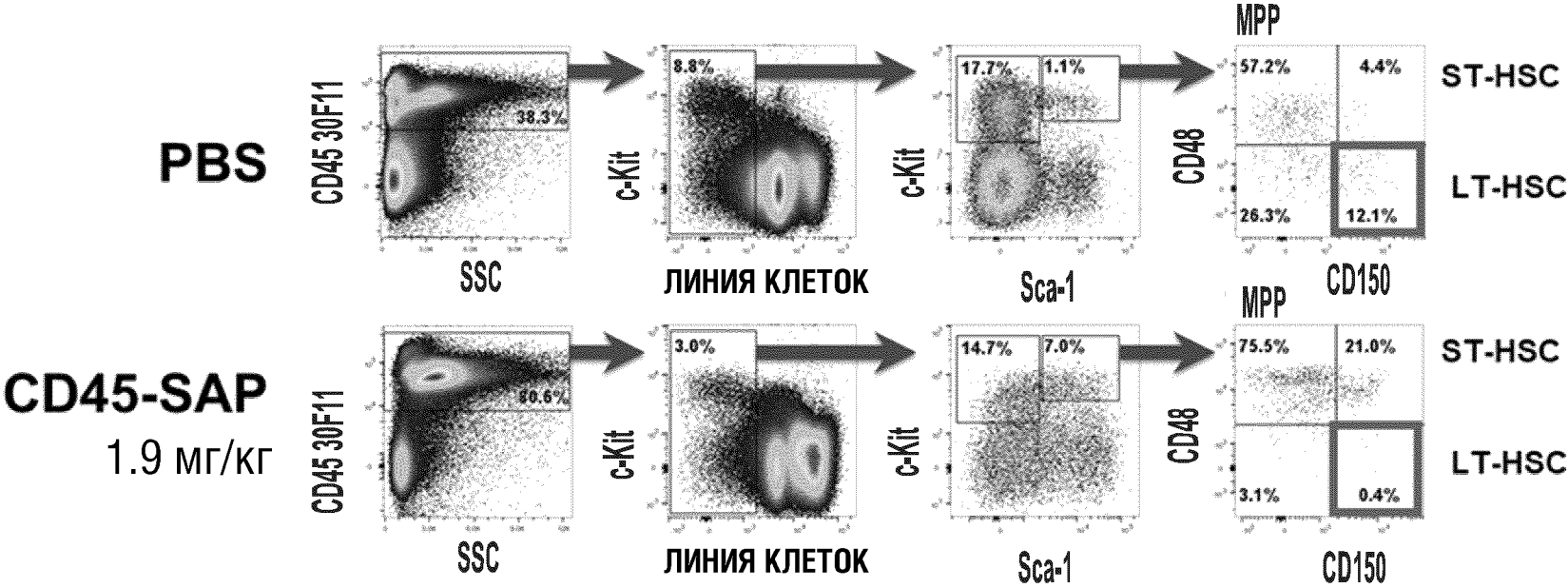
ФИГ.2D



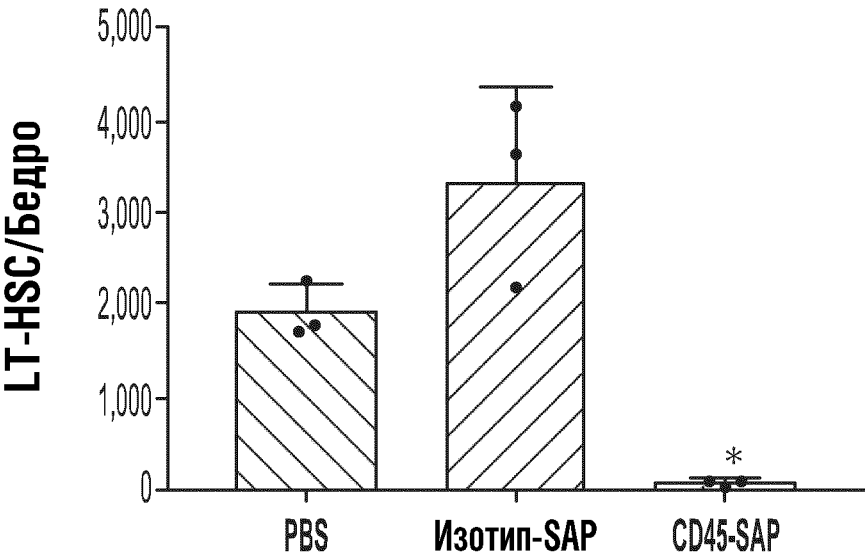
ФИГ.3А



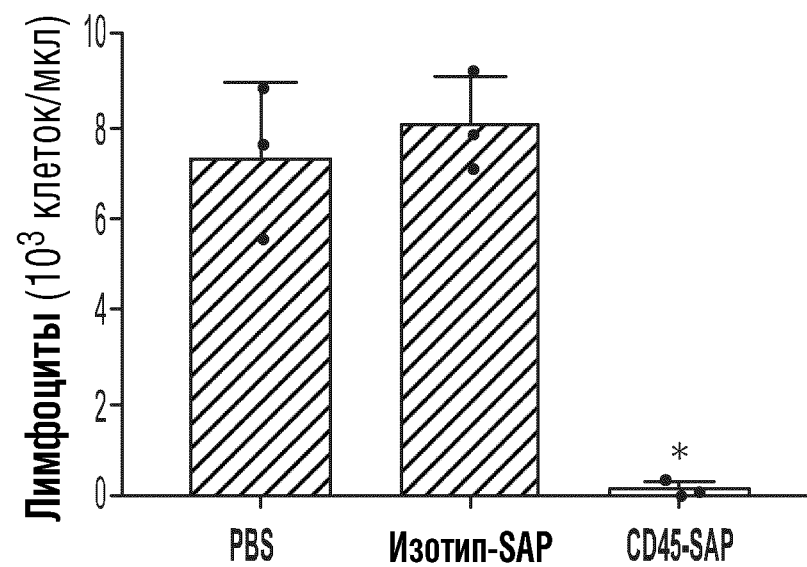
ФИГ.3В



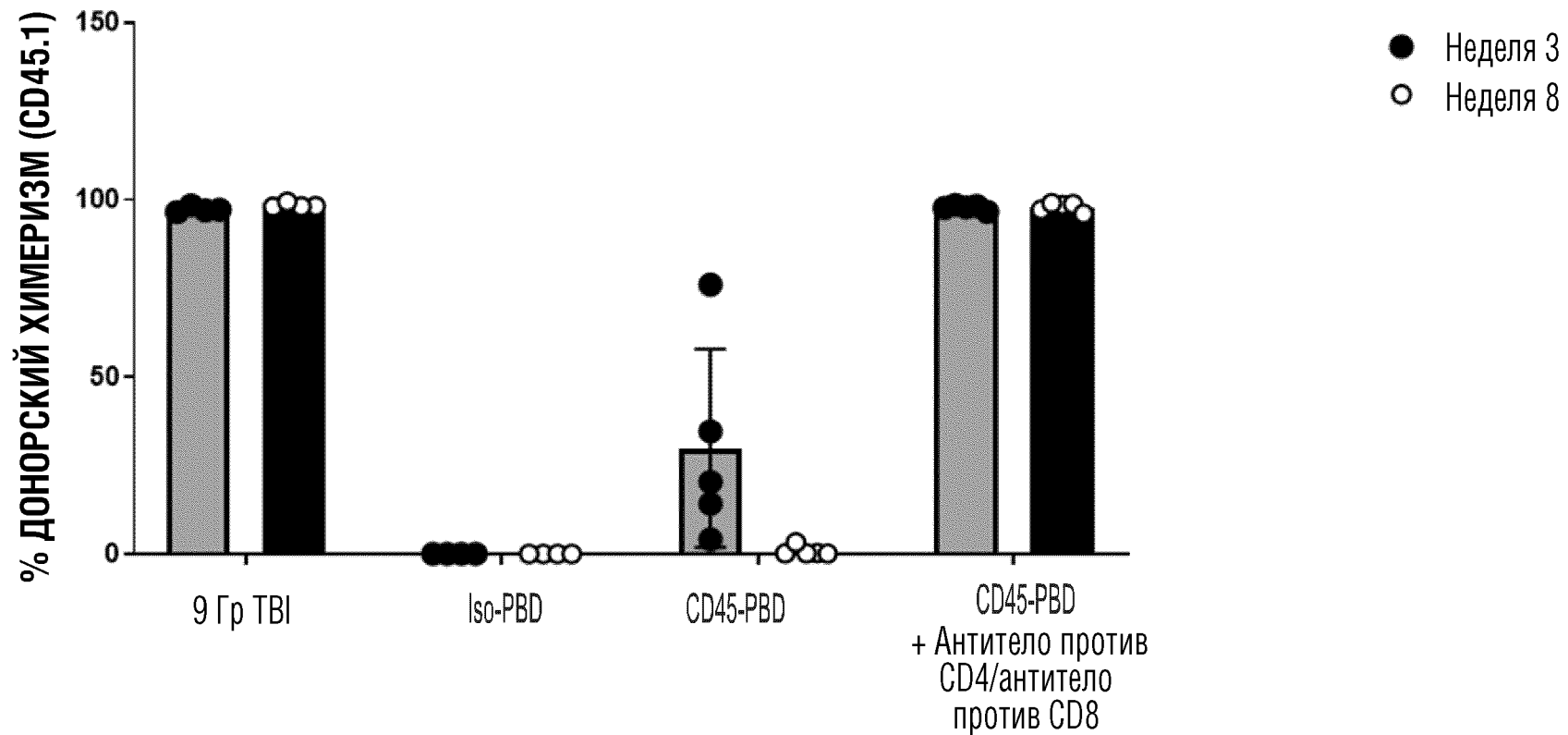
ФИГ.3С



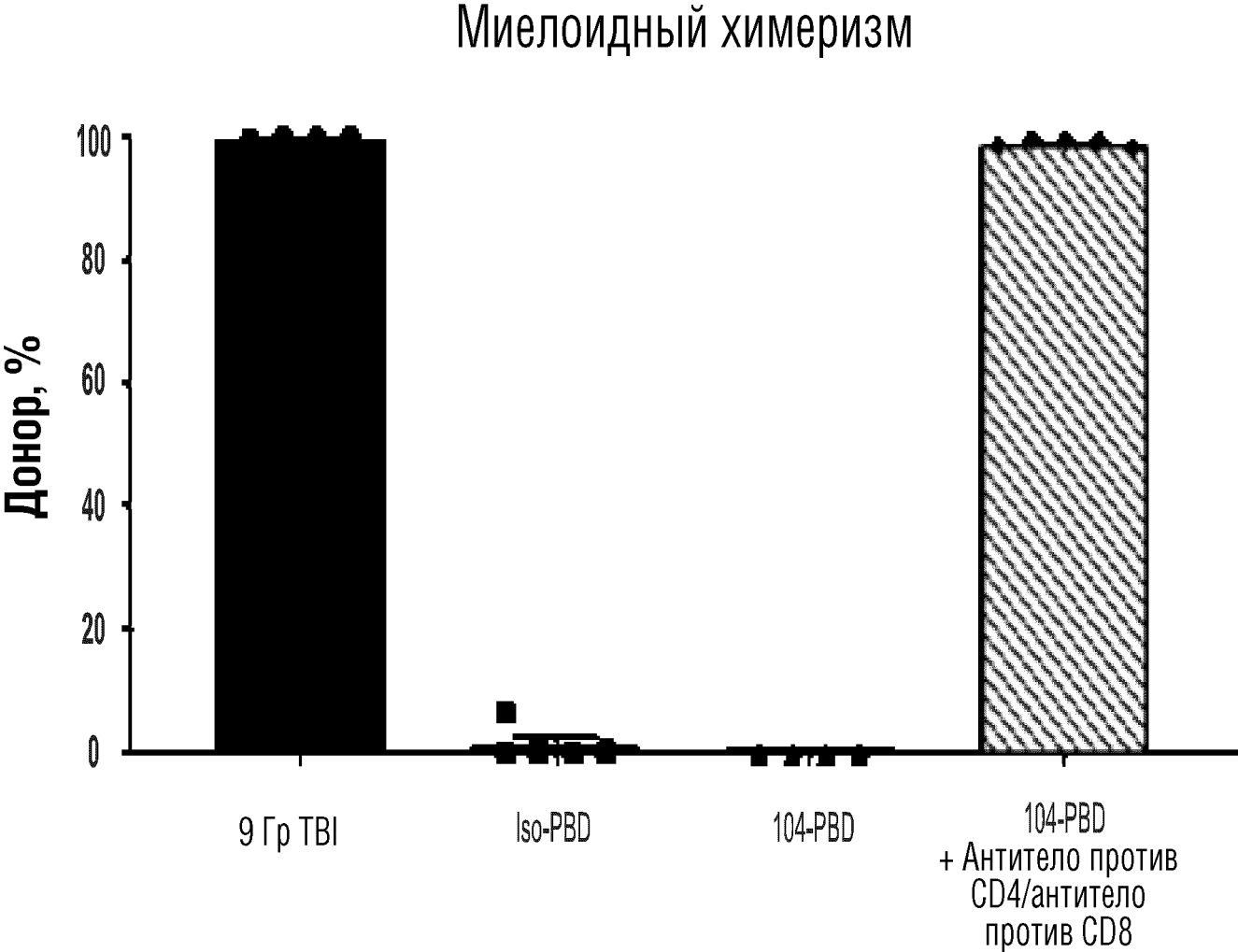
ФИГ.3D



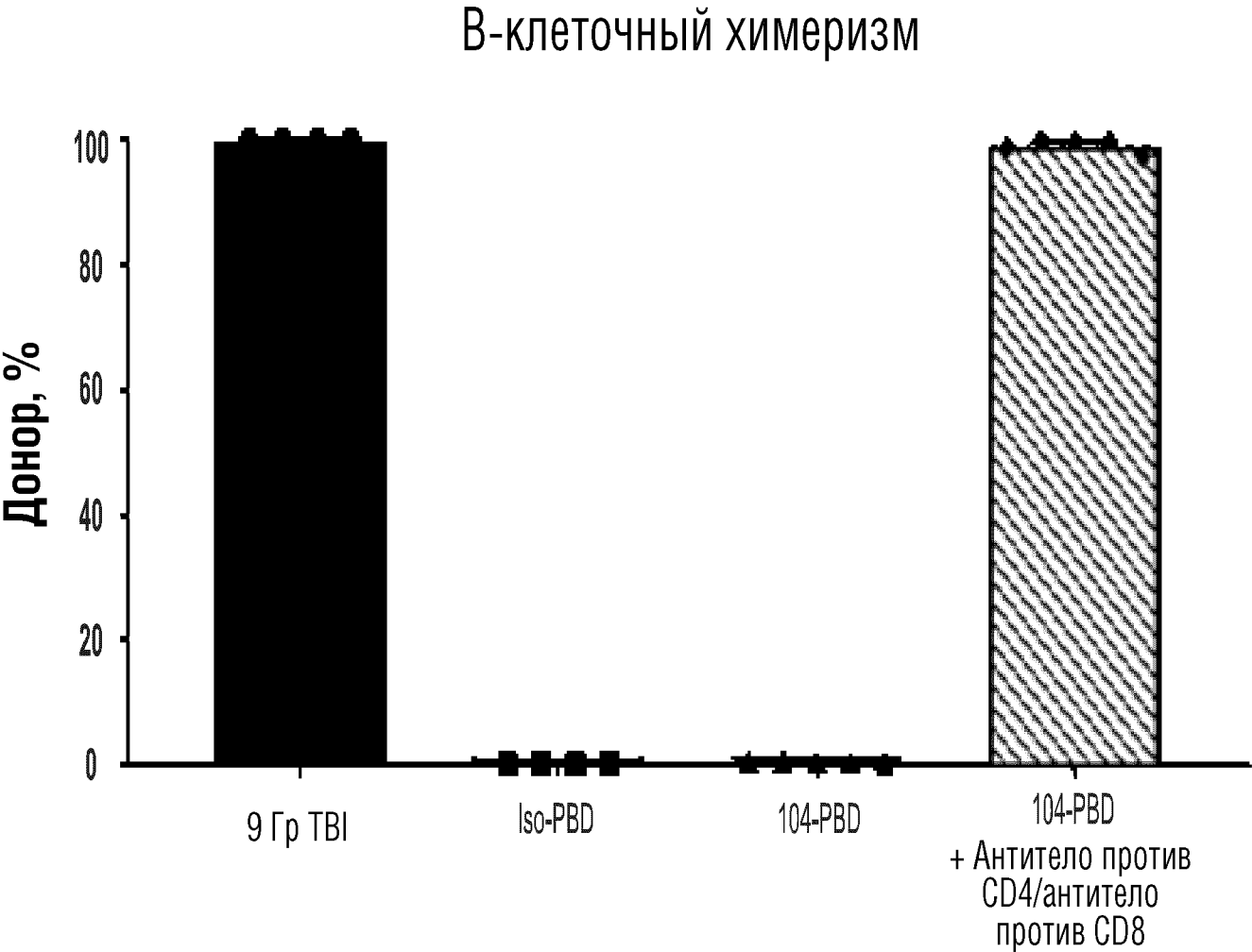
ФИГ.4А



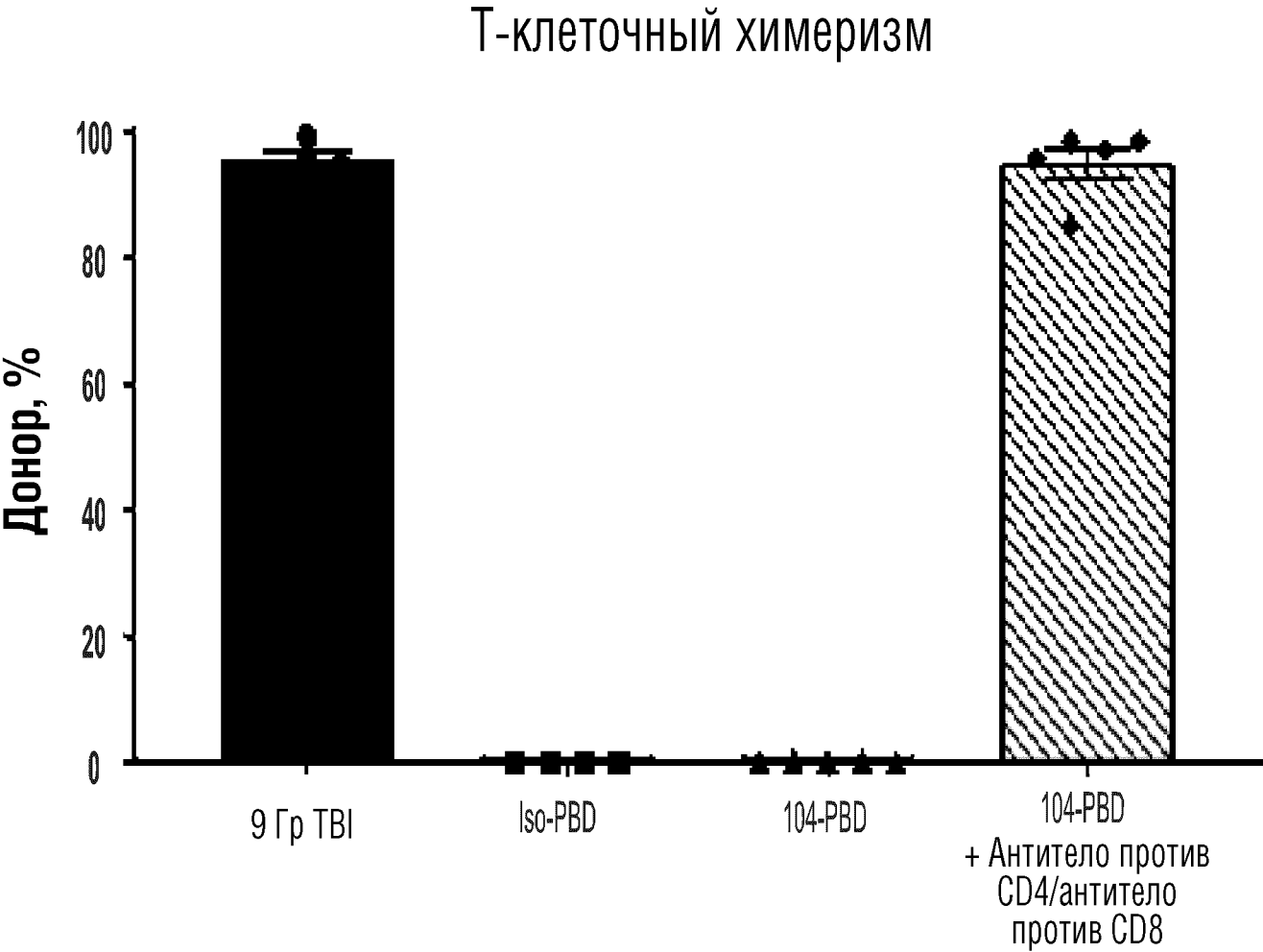
ФИГ.4В



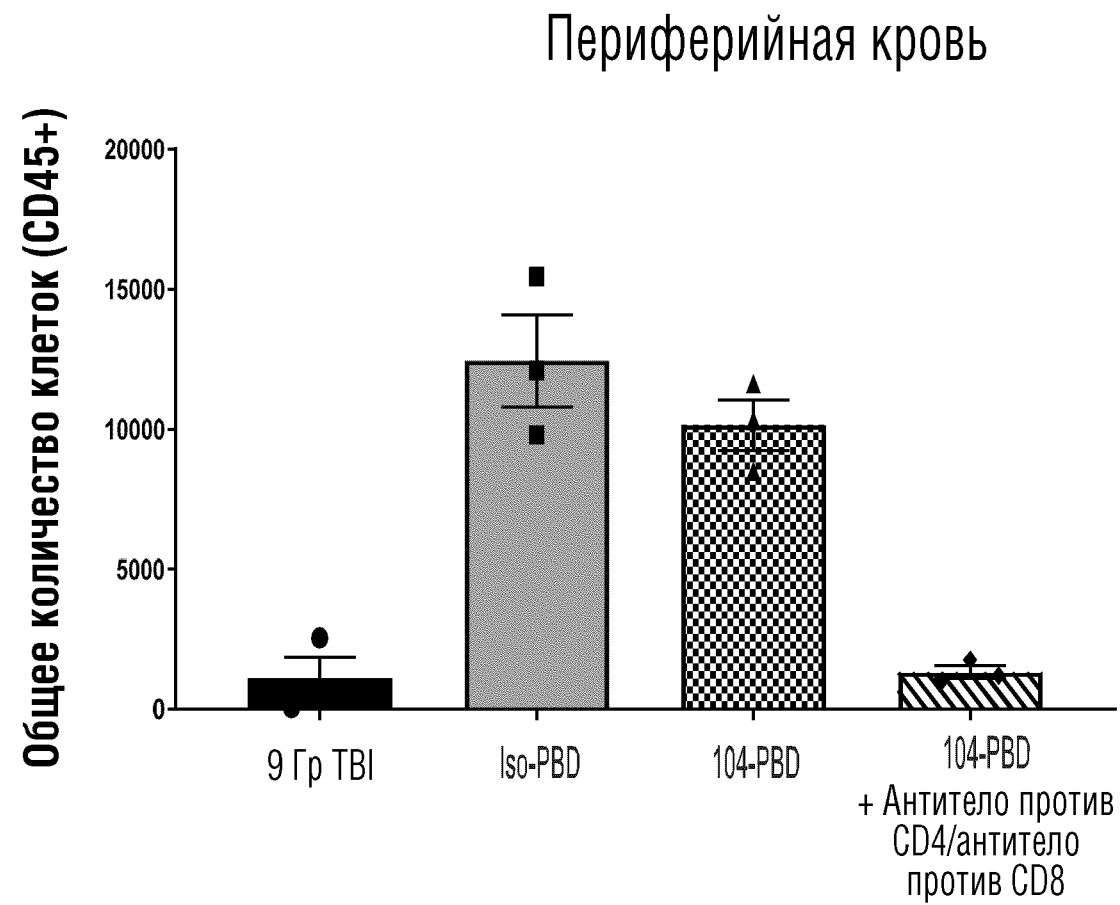
ФИГ.4В (продолжение)



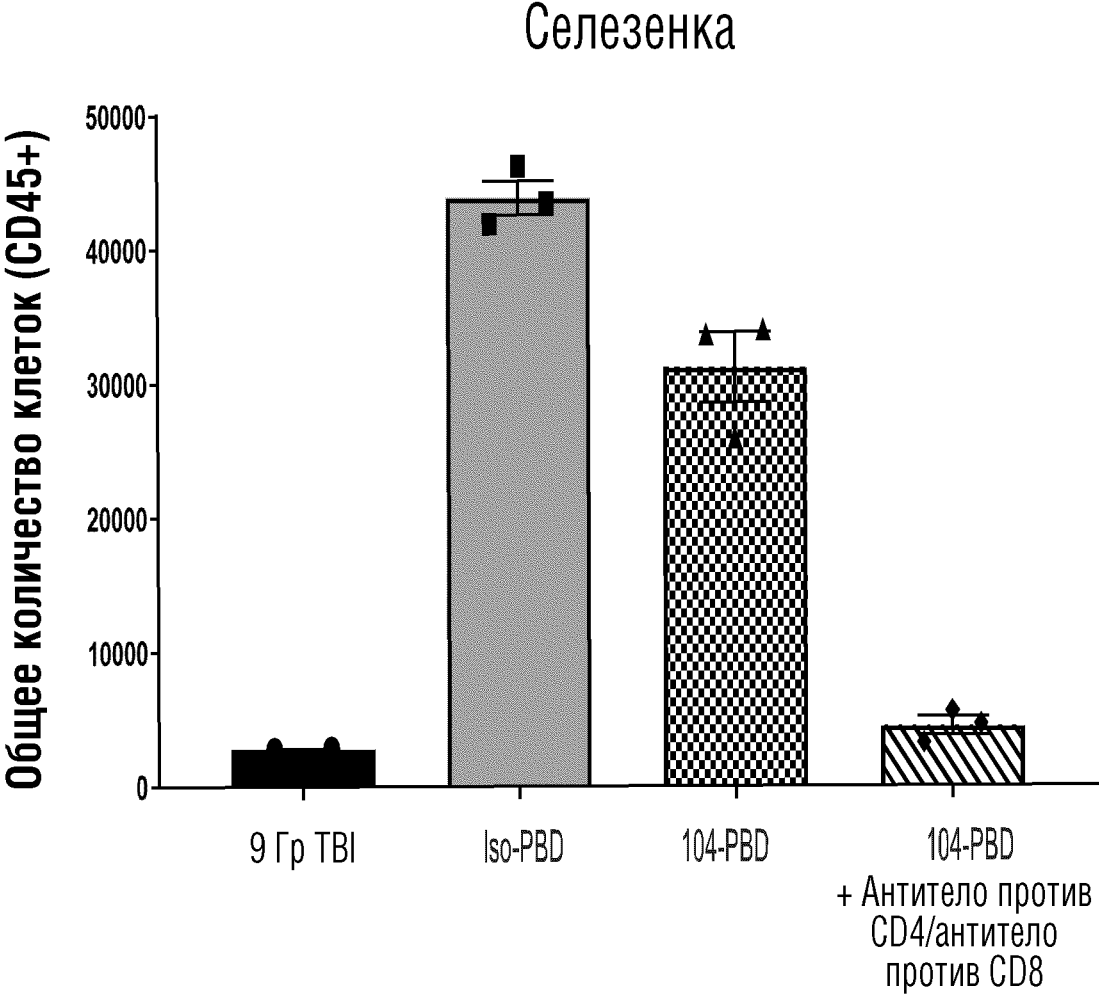
ФИГ.4В (продолжение)



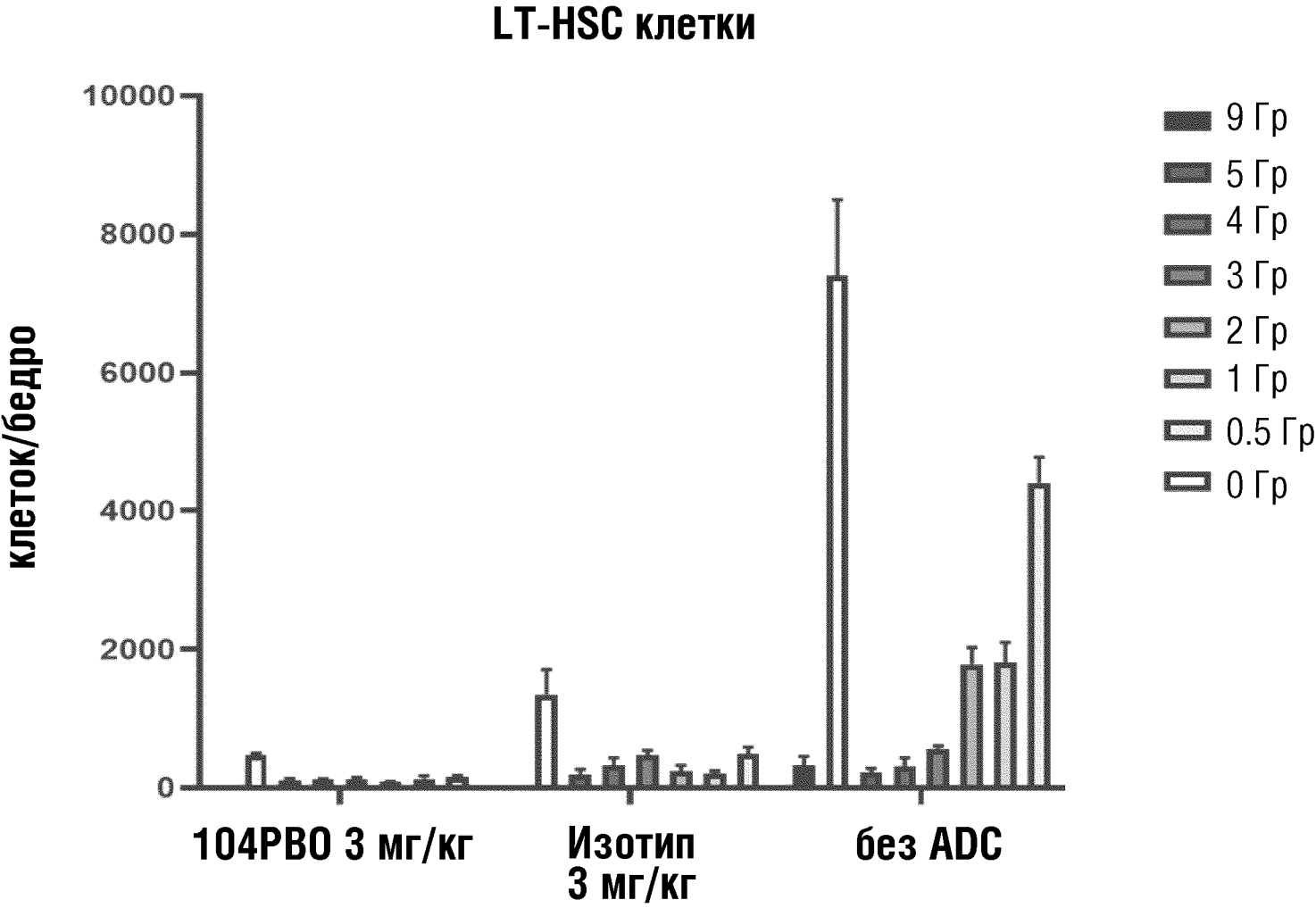
ФИГ.4С



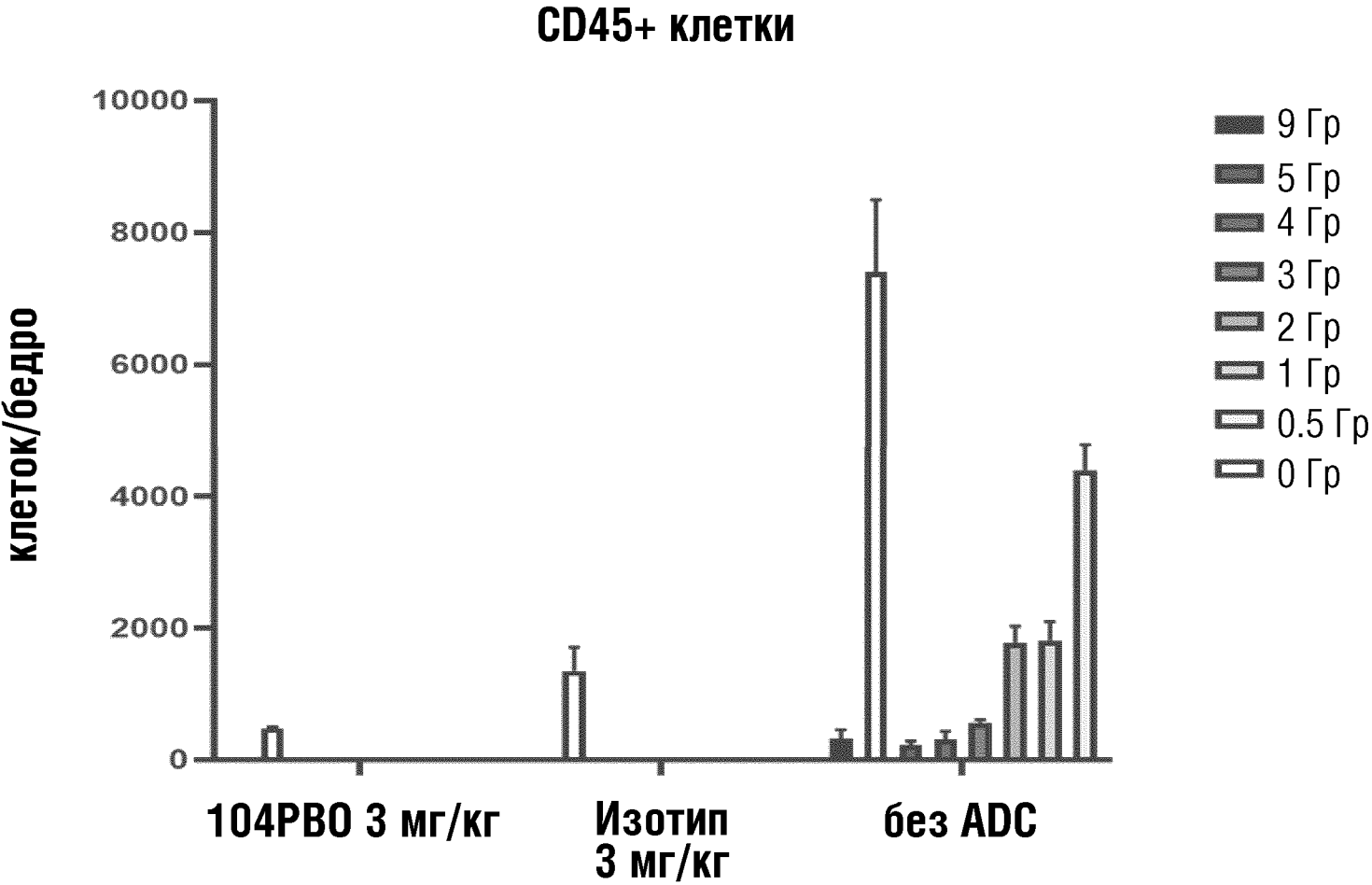
ФИГ.4D



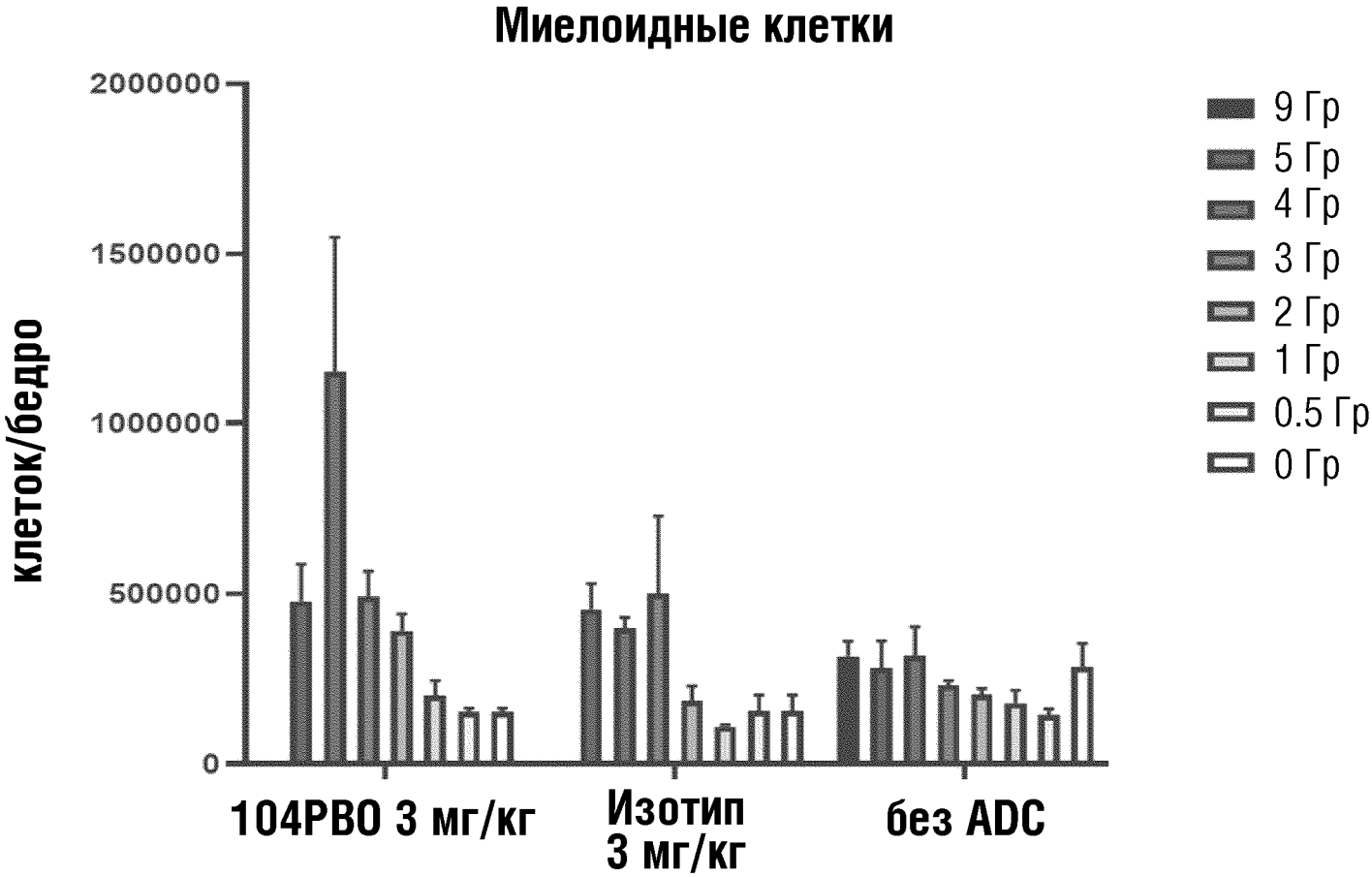
ФИГ.5А



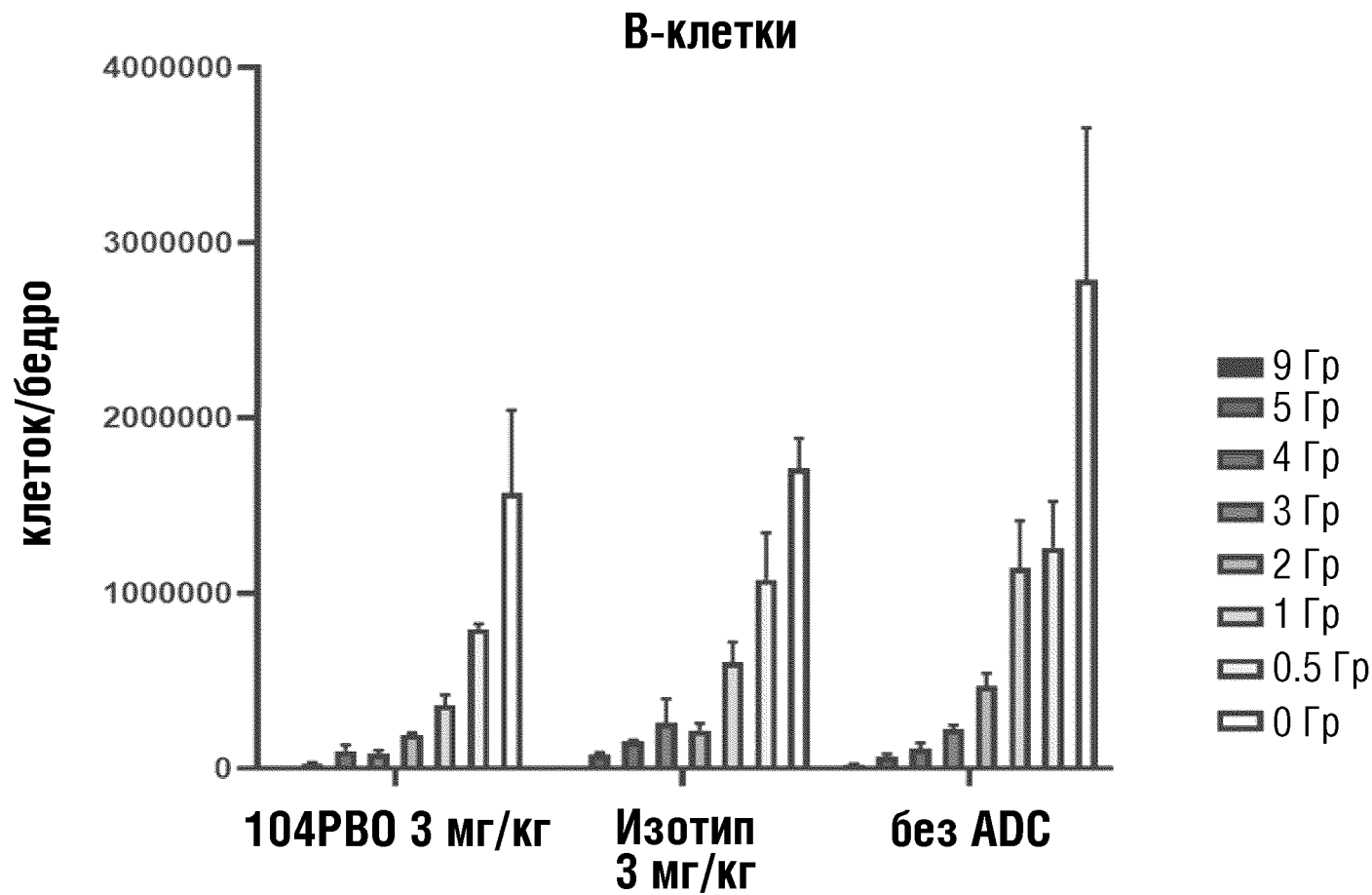
ФИГ.5В



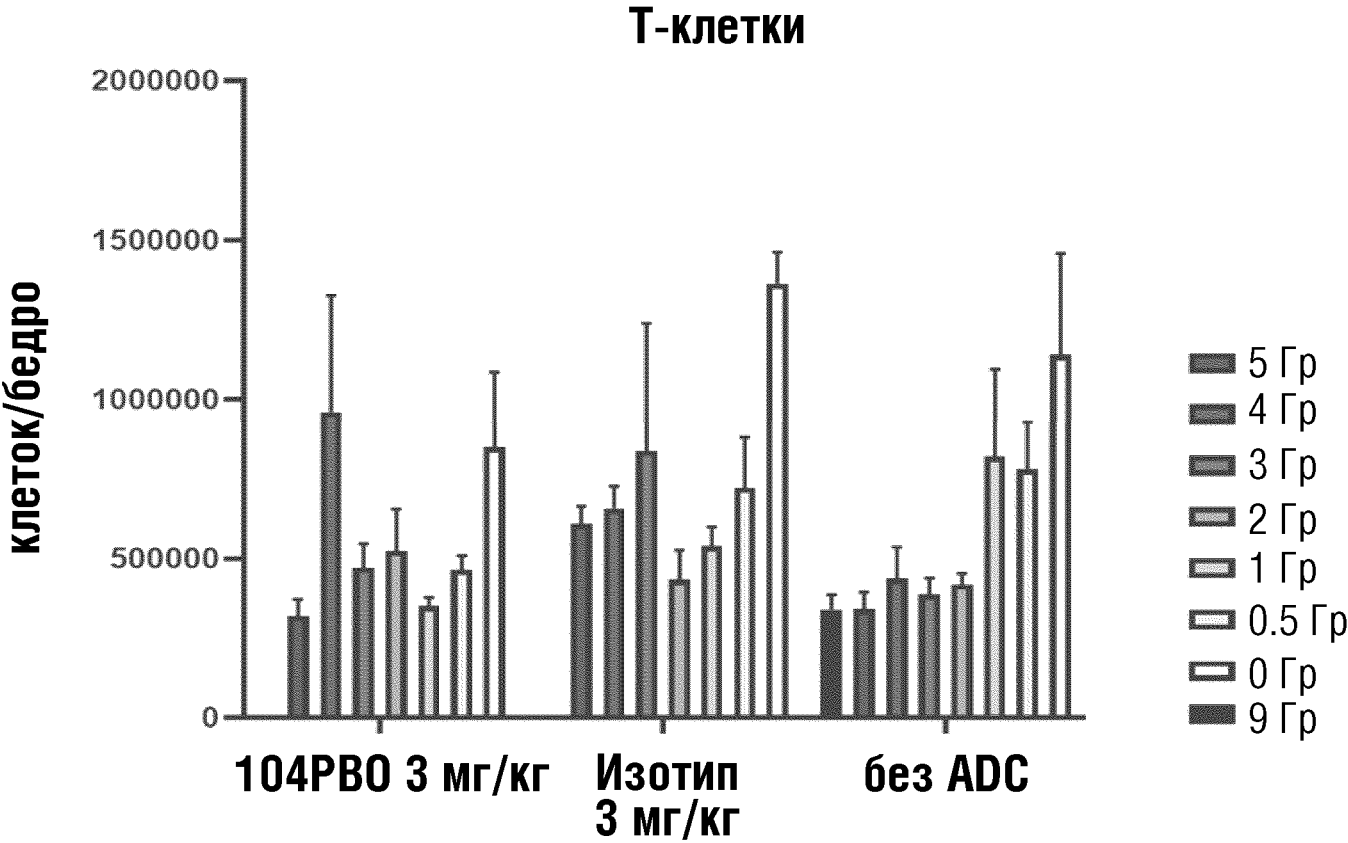
ФИГ.5С



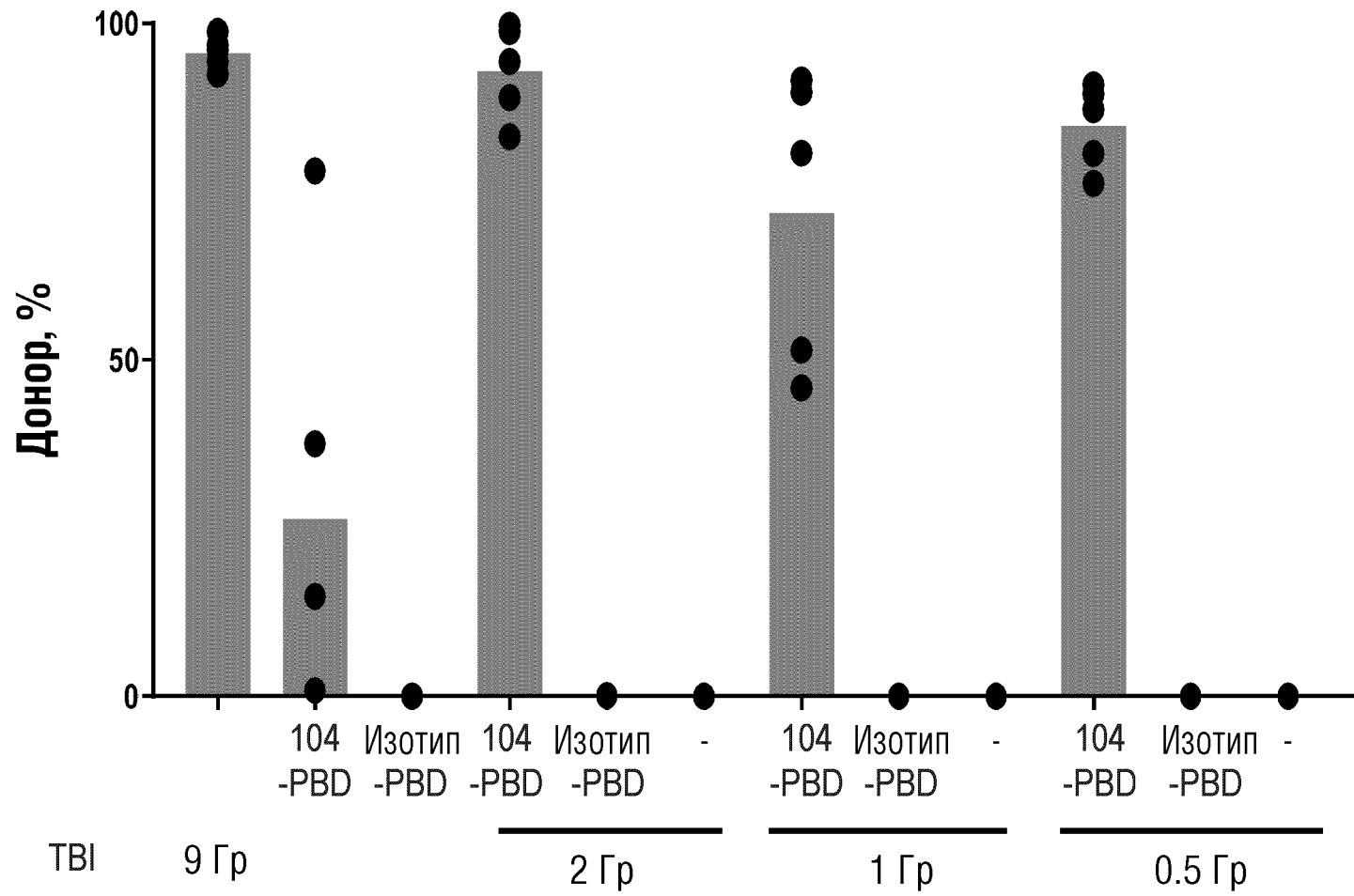
ФИГ.5D



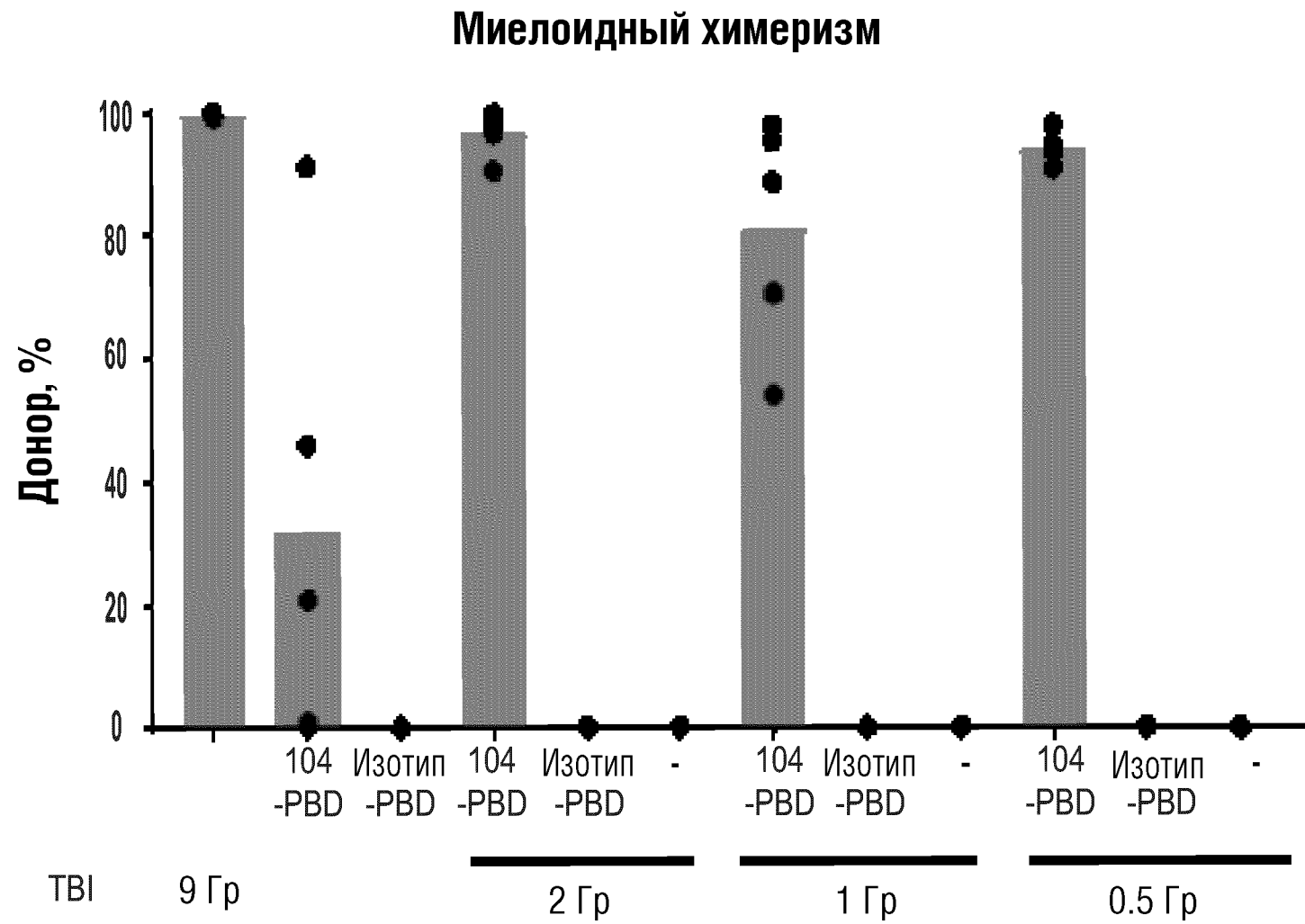
ФИГ.5Е



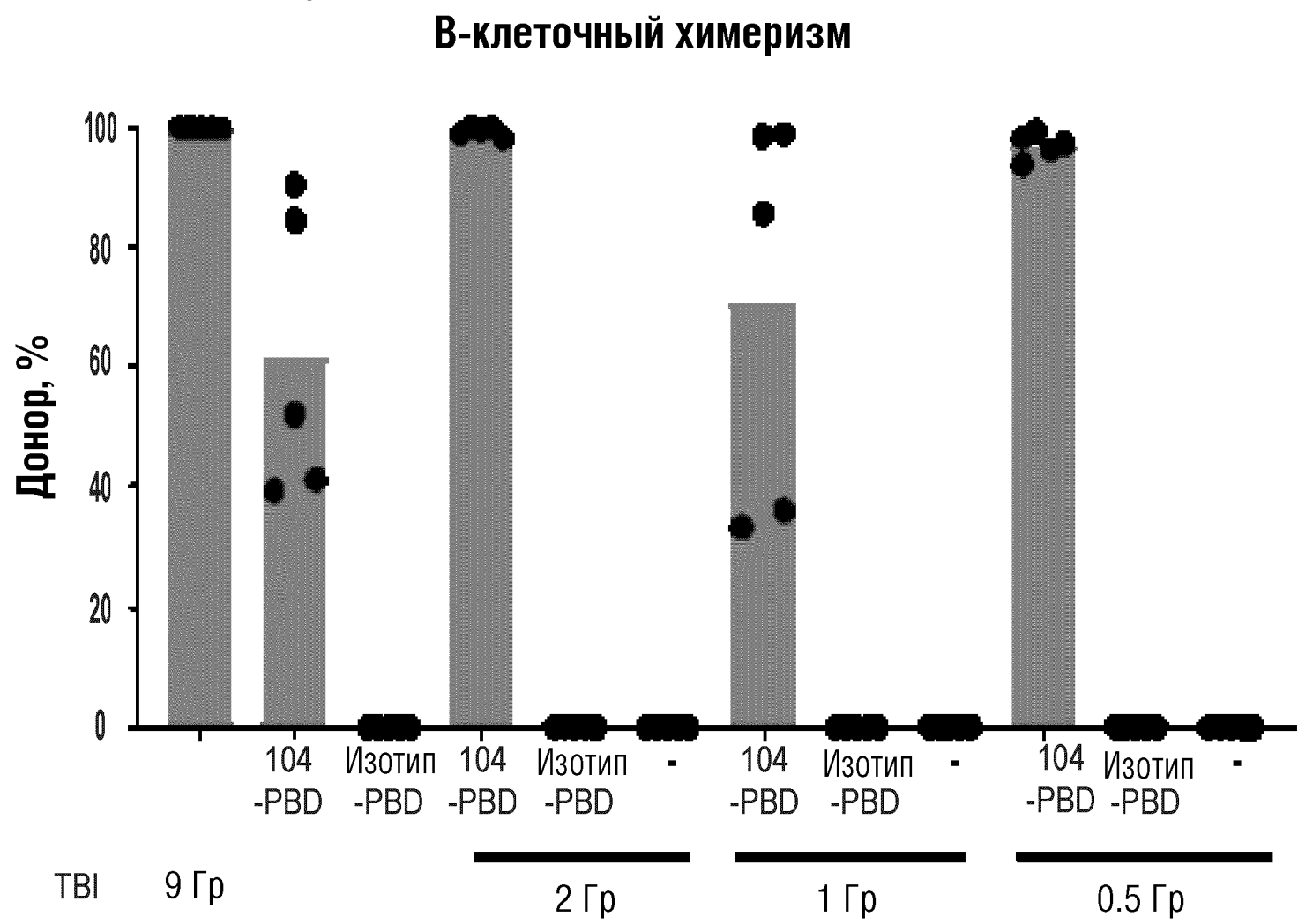
ФИГ.5F



ФИГ.5G



ФИГ.5G (продолжение)



ФИГ.5G (продолжение)

