

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039364**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.01.18**

**(21)** Номер заявки  
**201792211**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.06**

**(51)** Int. Cl. **C07K 4/04** (2006.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)  
**C12R 1/07** (2006.01)  
**C12R 1/16** (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ НЕМИЕЛОАБЛАТИВНОГО  
КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

---

**(31)** 62/143,642; 62/220,204; 62/221,595;  
62/239,573

**(32)** 2015.04.06; 2015.09.17; 2015.09.21;  
2015.10.09

**(33)** US

**(43)** 2018.06.29

**(86)** PCT/US2016/026276

**(87)** WO 2016/164502 2016.10.13

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУС  
ОФ ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ;  
ЗЕ ДЖЕНЕРАЛ ХОСПИТАЛ  
КОРПОРЕЙШН; ЗЕ ЧИЛДРЕН'С  
МЕДИКАЛ СЕНТЕР КОРПОРЕЙШН  
(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Скадден Дэвид Т., Палчаудхури  
Рахул, Росси Деррик Дж., Чекович  
Агнешка Д. (US)**

**(74)** Представитель:  
**Угрюмов В.М. (RU)**

**(56)** US-A1-20100226927  
US-A1-20110189209  
WO-A1-2013126690  
WO-A1-1999024078  
PALCHAUDHURI et al.: "Non-genotoxic  
conditioning for hematopoietic stem cell  
transplantation using a hematopoietic-cell-specific  
internalizing immunotoxin," Nature Biotechnology,  
06 June 2016 (06.06.2016), Abstract only, Pgs.  
1-4. Retrieved from the Internet: <[http://  
www.nature.com/nbt/journal/vaop/ncurrent/full/nbt.  
3584.html](http://www.nature.com/nbt/journal/vaop/ncurrent/full/nbt.3584.html)> on 08 June 2016 (08.06.2016), entire  
document

---

**(57)** В изобретении раскрываются немиелоаблативные конъюгаты антитело-токсин и композиции, которые нацеливаются на маркеры клеточной поверхности, такие как рецепторы CD34, CD45 или CD117, и связанные с ними способы применения их для эффективного кондиционирования тканей субъекта (например, ткани костного мозга) перед приживлением или трансплантацией. Композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для кондиционирования тканей субъекта, например, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и предпочтительно такие композиции и способы не вызывают токсичности, которые обычно ассоциируются с традиционными способами кондиционирования.

---

**039364 B1**

**039364 B1**

### **Ссылка на родственные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/143642, поданной 6 апреля 2015 г., предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/220204, поданной 17 сентября 2015 г., предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/221595, поданной 21 сентября 2015 г., предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/239573, поданной 9 октября 2015 г., полные раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) в основном показана для лечения злокачественных новообразований и требует кондиционирования тканей субъекта (например, ткани костного мозга) перед приживлением. Показания для HSCT и гемоглобинопатии включают в себя, например, серповидно-клеточную анемию, бета-талассемию, анемию Фанкони, синдрома Вискотта-Олдрича, связанный с недостатком аденозиндезаминазы SCID (ADA SCID), метахроматическую лейкодистрофию и HIV/AIDS; при этом перечень показаний будет продолжаться расширяться с улучшением технологий редактирования генов. В некоторых случаях 20% приживление трансплантированных клеток может облегчить или вылечить заболевание.

Имеющиеся способы нецелевого кондиционирования, которые предусматривают, например, облучение (например, облучение всего организма или TBI) и средства, алкилирующие/модифицирующие ДНК, являются высоко токсичными для многих систем органов, гемопоэтических и негемопоэтических клеток и гемопоэтического микроокружения. Такие жесткие схемы кондиционирования эффективно убивают иммунные и клетки ниши субъекта-хозяина, а также неблагоприятно влияют на многие системы органов, что зачастую приводит к опасным для жизни осложнениям.

Чтобы полностью реализовать лечебный потенциал HSCT, необходимо разработать схемы умеренного кондиционирования, которые предотвратят нежелательную токсичность. Необходимы новые, предпочтительно немиелоаблативные, композиции и способы, которые могут быть использованы для кондиционирования тканей субъекта (например, тканей костного мозга), с уменьшением при этом нежелательной токсичности и минимизацией частоты тяжелых побочных реакций. Также необходимы новые методы терапии, которые могут селективно уничтожать популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток в целевой ткани, минимизируя или устраняя эффекты таких методов терапии на нецелевые клетки и ткани, такие как тромбоциты, лейкоциты и эритроциты. Также необходимы анализы и способы идентификации средств, которые могут селективно истощать или уничтожать эндогенную популяцию гемопоэтических стволовых клеток.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

В настоящем документе раскрываются способы и композиции, которые применимы для уничтожения выбранных популяций клеток и кондиционирования тканей субъекта с целью приживления или трансплантации, а также анализы и способы идентификации кандидатных средств, которые применимы для кондиционирования тканей субъекта с целью приживления или трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, являются немиелоаблативными. Также раскрываются способы доставки токсина в клетку, например, путем нацеливания на один или несколько маркеров (например, маркеров клеточной поверхности CD45 или CD117), так, что токсин интернализируется; такие способы применимы для эффективного кондиционирования субъекта с целью приживления или трансплантации (например, кондиционирования субъекта-человека для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток).

Предпочтительно, способы, анализы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не вызывают токсичностей, которые, как правило, были ассоциированы с традиционными способами кондиционирования, такими как облучение. Например, в отличие от традиционных схем кондиционирования согласно некоторым вариантам осуществления композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, не индуцируют нейтропению, тромбоцитопению и/или анемию, но при этом обеспечивают стабильный, смешанный химеризм, который является терапевтически релевантным. Такие композиции и способы могут быть использованы, например, для устранения, излечения или облегчения иным путем одного или нескольких заболеваний у пораженного субъекта (например, способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для устранения или излечения HIV, AIDS или гемоглобинопатии, например, серповидно-клеточной анемии и анемии Фанкони).

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрываются способы кондиционирования субъекта или целевых тканей субъекта для приживления, такие способы предусматривают селективное истощение или уничтожение эндогенной стволовой клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки) или популяция клеток-предшественников в целевой ткани субъекта путем введения субъекту эффективного количества средства, связанного (например, функционально связанного) с токсином; при этом токсин интернализируется популяцией эндогенных стволовых клеток с истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани и кондиционированию субъекта для приживления трансплантированной клетки или популяции клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления средство выбрано из группы, состоящей из антитела и лиганда.

Также в настоящем документе раскрываются способы пересаживания стволовых клеток субъекту, при этом такие способы предусматривают: (а) введение субъекту эффективного количества средства, связанного с токсином, при этом токсин интернализируется эндогенной стволовой клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой) или популяцией клеток-предшественников с селективным истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани субъекта; и (b) введение популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевой ткани субъекта.

В некоторых аспектах также в настоящем документе раскрываются способы лечения нарушения стволовых клеток у субъекта, при этом такие способы предусматривают: (а) введение субъекту эффективного количества средства, связанного (например, функционально связанного) с токсином, при этом токсин интернализируется эндогенной стволовой клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой) или популяцией клеток-предшественников в целевой ткани субъекта с истощением или уничтожением тем самым эндогенной стволовой клетки или популяции клеток-предшественников в целевой ткани субъекта; и (b) введение популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевой ткани субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевые ткани субъекта после того, как иммунотоксин вывелся или рассеялся из целевых тканей субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к способам селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта, при этом способы предусматривают введение субъекту эффективного количества (например, 1,5 мг/кг) средства, связанного с токсином; при этом средство селективно связывается с CD45, и токсин интернализируется эндогенной HSC или популяцией клеток-предшественников, с истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к способам селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта, при этом способы предусматривают введение субъекту эффективного количества средства, связанного (например, функционально связанного) с токсином; при этом средство селективно связывается с CD117, и токсин интернализируется эндогенной HSC или популяцией клеток-предшественников с истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани.

Также в настоящем документе раскрываются способы селективного уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток (например, гемопоэтических стволовых клеток) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта, при этом способы предусматривают введение субъекту эффективного количества интернализирующегося антитела, которое специфически или селективно связывается с CD45 и соединяется с токсином с уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрываются способы трансплантации стволовых клеток (например, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток), при этом такие способы предусматривают введение субъекту эффективного количества интернализирующегося антитела, которое специфически или селективно связывается с CD117 и соединяется с токсином с уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани; и введение популяции экзогенных стволовых клеток в целевую ткань субъекта.

В некоторых аспектах также раскрываются способы лечения или излечения гемоглобинопатии (например, серповидно-клеточной анемии) у субъекта, при этом способы предусматривают введение субъекту эффективного количества интернализирующегося антитела, которое специфически или селективно связывается с CD45 или CD117 и соединяется с токсином с уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток (например, гемопоэтических стволовых клеток) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта; с последующей стадией введения популяции экзогенных стволовых клеток в целевую ткань субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию экзогенных стволовых клеток вводят в целевые ткани субъекта после того, как иммунотоксин (например, иммунотоксин антитело против CD45-SAP или антитело против CD117-SAP) вывелся или рассеялся из целевых тканей субъекта.

В некоторых аспектах средства, раскрываемые в настоящем документе, селективно нацеливаются на популяцию клеток целевых тканей. Например, согласно некоторым вариантам осуществления такое средство (например, антитело или лиганд) может быть интернализировано целевой гемопоэтической стволовой клеткой при связывании такого средства с белком клеточной поверхности, экспрессируемым гемопоэтической стволовой клеткой. Белки клеточной поверхности, экспрессируемые клетками целевой ткани (например, гемопоэтическими стволовыми клетками, находящимися в нише стволовых клеток костного мозга), таким образом обеспечивают средство нацеливания, в некоторых случаях дискриминантного, иммунотоксинов, раскрываемых в настоящем документе, на популяцию клеток, экспрессирующих этот белок. В некоторых случаях экспрессия белка ограничивается определенной популяцией

клеток и белок может быть использован в качестве цели для селективной доставки иммунотоксина в эту популяцию клеток при отсутствии поражения или при минимальном поражении популяций клеток, которые не экспрессируют этот белок (например, в нецелевых тканях или во внецелевых тканях субъекта). В качестве альтернативы, экспрессия белка клеточной поверхности, являющегося целью иммунотоксина, не ограничивается определенной популяцией клеток; в этих случаях возможно применение другого фрагмента для ограничения доставки иммунотоксина только подгруппой популяции клеток, экспрессирующей целевой белок клеточной поверхности. Например, в контексте биспецифического антитела одна специфичность может быть для целевого белка клеточной поверхности, а другая специфичность может быть для маркера с экспрессией, ограниченной выбранной популяцией клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетки целевых тканей субъекта включают в себя популяцию эндогенных стволовых клеток, таких как, например, эндогенные гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники, сохранившиеся в целевой ткани. В некоторых аспектах гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют один или несколько маркеров, которые могут быть использованы для селективного нацеливания средств, содержащих композиции иммунотоксина, раскрываемые в настоящем документе, на клетки целевых тканей субъекта.

Любые маркеры, которые могут быть использованы для отличия популяции целевых клеток от популяции нецелевых клеток, в том числе любой из маркеров, описываемых в настоящем документе, могут служить целями средств, которые содержат иммунотоксины, описываемые в настоящем документе, для доставки токсина в популяцию клеток. Например, в некоторых аспектах настоящего изобретения средство, которое содержит композицию иммунотоксина, может селективно связываться с одним или несколькими маркерами клеточной поверхности, экспрессируемыми клетками целевых тканей (например, иммунотоксин CD45-SAP может селективно связываться с гемопоэтическими стволовыми клетками, характеризующимися экспрессией на клеточной поверхности маркера CD45). Согласно некоторым вариантам осуществления целевые гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют один или несколько маркеров, которые могут служить целями и с которыми селективно или преимущественно связывается иммунотоксин, такие маркеры выбраны из группы маркеров, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD49d (VLA-4), CD49f (VLA-6), CD51, CD58, CD71, CD84, CD90, CD97, CD117 (c-kit), CD133, CD134, CD162, CD166, CD184 (CXCR4), CD205 и CD361. Согласно некоторым вариантам осуществления целевые клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники) в целевой ткани экспрессируют один или несколько маркеров, которые могут служить целями, и с которыми селективно или преимущественно связывается иммунотоксин, при этом такие маркеры выбраны из группы маркеров, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thyl, CD93, CD105: эндоглина, CD117: рецептора cKit/SCF, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоциты, рецептора онкостатина M, эмбигина и IL-18R. Согласно следующим вариантам осуществления целевые клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники) в целевой ткани экспрессируют один или несколько маркеров, которые могут служить целями, и с которыми селективно или преимущественно связывается средство, которое содержит иммунотоксин, при этом такие маркеры выбраны из группы маркеров, состоящей из CD150, CD27 и CD201. Например, согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют CD45. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют CD117. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют CD34.

Согласно некоторым вариантам осуществления маркер выбран из группы, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD47, CD58, CD71, CD84, CD97, CD117 (c-kit), CD133, CD162, CD166, CD205 и CD361. Согласно некоторым вариантам осуществления целевые клетки включают в себя человеческие гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие один или несколько маркеров, которые могут служить целями и с которыми связывается средство, которое содержит иммунотоксин, при этом такие маркеры выбраны из группы, состоящей из CD7, CDw12, CD13, CD15, CD19, CD21, CD22, CD29, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD48, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD55, CD64a, CD68, CD71, CD72, CD73, CD81, CD82, CD85A, CD85K, CD90, CD99, CD104, CD105, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD117, CD123, CD124, CD126, CD127, CD130, CD131, CD133, CD135, CD138, CD151, CD157, CD162, CD164, CD168, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD183, CD191, CD200, CD201, CD205, CD217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD240, CD242, CD243, CD277, CD292, CDw293, CD295, CD298, CD309, CD318, CD324, CD325, CD338, CD344, CD349 и CD350.

Согласно некоторым вариантам осуществления целевые клетки включают в себя человеческие гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие один или несколько маркеров, которые могут слу-

жить целями и с которыми связывается средство, которое содержит иммунотоксин, при этом такие маркеры выбраны из группы, состоящей из CD11a, CD18, CD37, CD47, CD52, CD58, CD62L, CD69, CD74, CD97, CD103, CD132, CD156a, CD179a, CD179b, CD184, CD232, CD244, CD252, CD302, CD305, CD317 и CD361.

Согласно некоторым вариантам осуществления эндогенные клетки (например, HSC или клетки-предшественники) экспрессируют один или несколько маркеров и введенное средство (например, конъюгат антитело-токсин) селективно связывается с одним или несколькими маркерами или их фрагментом или эпитопом. В некоторых аспектах способы, раскрываемые в настоящем документе, специфически или дискриминантно нацелены или направлены на целевые ткани субъекта при отсутствии поражения или при минимальном поражении нецелевых тканей или внецелевых тканей (например, вилочковой железы) субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не истощают или не уничтожают эндогенные нейтрофилы или миелоидные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, вызывают повышение эндогенных нейтрофилов. В некоторых аспектах способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не истощают или не уничтожают эндогенные тромбоциты. Согласно следующим вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не индуцируют анемию у субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления маркеры являются интернализирующимися. Например, при связывании средства с интернализирующимся маркером (например, рецептором клеточной поверхности) композиция интернализируется клеткой, экспрессирующей такой маркер.

Согласно некоторым вариантам осуществления маркер не является интернализирующимся. Например, согласно таким вариантам осуществления первый маркер может быть использован в качестве средства дискриминантного нацеливания на популяцию клеток, тогда как второй маркер может служить целью осуществления интернализации композиции иммунотоксина внутриклеточно.

Композиции иммунотоксина, раскрываемые в настоящем документе, содержат средство для облегчения селективной доставки таких композиций в популяцию клеток в целевых тканях (например, в гемопозитические стволовые клетки ниши стволовых клеток костного мозга). Согласно некоторым вариантам осуществления средства, раскрываемые в настоящем документе, содержат антитело (например, моноклональное антитело). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело является блокирующим антителом или антагонистическим антителом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело не является блокирующим антителом или антагонистическим антителом. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрываемые средства содержат лиганд. В некоторых аспектах средство селективно связывается с CD45. В некоторых аспектах средство является антагонистом CD45. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления средство не является антагонистом CD45. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин интернализируется клеткой, экспрессирующей CD45, после связывания средства с эпитопом маркера клеточной поверхности CD45.

Согласно некоторым вариантам осуществления средства, раскрываемые в настоящем документе, селективно связываются с CD117. В некоторых аспектах средство является антагонистом CD117. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах средство не является антагонистом CD117. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин интернализируется клеткой, экспрессирующей CD117, после связывания средства с эпитопом маркера клеточной поверхности CD117.

В некоторых аспектах средством является клон 104 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон 30F11 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон АСК2 антитела. В некоторых аспектах средством является антитело, которое не является клоном АСК2. В некоторых аспектах средством является клон АСК2 антитела, и токсин непосредственно не соединяется с антителом. В следующих аспектах средством является клон 2В8 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, которое не является клоном 2В8. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, которое не является клоном 2В8, и токсин непосредственно не соединяется с антителом. В некоторых аспектах средством является клон 3С11 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон МЕМ-28 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон Н130 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон 581 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является клон 4Н11 антитела. В некоторых аспектах средством является антитело, выбранное из группы, состоящей из клона L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb 12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона 3а6, клона HD83 и клона МЕМ-216. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, содержащее определяющую комплементарность область, которая является такой же, как и определяющая комплементарность область для одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2,

клона ЕМК08, клонa ТМР4, клонa КРL-1, клонa Заб, клонa HD83 и клонa МЕМ-216. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и одно или несколько антител, выбранных из группы, состоящей из L243, клонa TS2/4, клонa TS1/18, клонa 581, клонa 4Н11, клонa А2А9/6, клонa CD43-10G7, клонa ВНРТ-1, клонa orb12060, клонa 2D1, клонa СС2С6, клонa TS2/9, клонa СУ1G4, клонa ОКТ9, клонa CD84.1.21, клонa VIM3b, клонa АЗС6Е2, клонa ЕМК08, клонa ТМР4, клонa КРL-1, клонa Заб, клонa HD83 и клонa МЕМ-216. В некоторых аспектах средство содержит антитело, которое селективно распознает маркер CD34 и/или связывается с ним (например, клон 581 или клон 4Н11). В некоторых аспектах средство содержит антитело, которое селективно распознает маркер CD45 и/или связывается с ним (например, клон МЕМ-28 или клон Н130). В некоторых аспектах средством является гуманизованное антитело.

Согласно некоторым вариантам осуществления средством является лиганд. Например, согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть выбран из группы лигандов, состоящей из фактора стволовых клеток (SCF) или лиганда cKit, CXCL12: фактора стромы 1 (SDF1), ангиопоэтина 1-4 (Ang1, Ang2, Ang3, Ang4), ТРО (тромбопоэтина), эритропоэтина, FLT3L, VLA4, VLA6, IL-1, IL-3, IL-6, IL-18, G-CSF, онкостатина М и LIF.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство соединяется с токсином (например, сапорином). В некоторых аспектах средства (например, антитела), раскрываемые в настоящем документе, характеризуются как интернализирующиеся. В некоторых аспектах такие средства интернализованы клеткой, экспрессирующей маркер или фрагмент (например, маркер клеточной поверхности или антиген), с которым средство связывается (в том числе без ограничения CD45 и/или CD117) после связывания такого средства (например, антитела или лиганда).

Согласно некоторым вариантам осуществления токсин интернализуется опосредованной рецептором интернализацией. В некоторых аспектах токсины, раскрываемые в настоящем документе, интернализируются популяцией эндогенных стволовых клеток со степенью по меньшей мере приблизительно 10% (например, за приблизительно 24 ч). В некоторых аспектах токсины, раскрываемые в настоящем документе, интернализируются популяцией эндогенных стволовых клеток со степенью по меньшей мере приблизительно 50% (например, за приблизительно 24 ч). Согласно следующим вариантам осуществления токсины, раскрываемые в настоящем документе, интернализируются популяцией эндогенных стволовых клеток со степенью по меньшей мере приблизительно 90% (например, за приблизительно 24 ч).

Способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть осуществлены с использованием любого подходящего токсина. В некоторых аспектах токсин выбран из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки А, цепных производных рицина А, низкомолекулярных токсинов и их комбинаций. В некоторых аспектах токсином является сапорин. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин инактивирует рибосомы. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин ингибирует синтез белка. В некоторых аспектах токсин не является радиоиммунотоксином. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин оказывает свои эффекты при проникновении во внутриклеточный компартмент одной или нескольких клеток в целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не индуцируют клеточную смерть посредством повреждения ДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин индуцирует клеточную смерть независимо от стадии клеточного цикла клетки.

В некоторых аспектах токсин выбран из группы токсинов, состоящей из токсина абрина, токсина модессина, токсина гелонина, токсина момордина, токсина трихосантина, токсина люффина и их комбинаций.

Согласно различным вариантам осуществления любого аспекта настоящего изобретения токсины, применимые в композициях иммунотоксинов и способах в соответствии с настоящим изобретением, содержат одну или несколько повреждающих ДНК молекул. Например, выбранный токсин может содержать одно или несколько антитубулиновых средств (например, майтансинов) или ингибиторов тубулина, сшивающих ДНК средств, алкилирующих ДНК средств и дезинтеграторов клеточного цикла или митоза.

Согласно некоторым вариантам осуществления любого аспекта настоящего изобретения токсин ингибирует РНК-полимеразу II и/или III (например, РНК-полимеразу II млекопитающего). В некоторых аспектах такой токсин, ингибирующий РНК-полимеразу II и/или III, представляет собой один или несколько аматоксинов или их функциональный фрагмент, производное или аналог, или содержит таковые. Например, предполагаемые токсины для применения согласно каким-либо из способов или композиций, раскрываемых в настоящем документе, могут включать в себя или содержать один или несколько аматоксинов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha$ -аманитина,  $\beta$ -аманитина,  $\gamma$ -аманитина,  $\xi$ -аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и их функциональных фрагментов, производных или аналогов.

Настоящий документ относится к средству (например, антителу), соединяющемуся или конъюгирующемуся с токсином (например, сапорином), для облегчения целевой доставки таких средств в клетки целевой ткани. В некоторых аспектах средство непосредственно связывается с токсином, например, как химерный белок слияния. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах средство опосредованно свя-

зывается с токсином (например, с использованием химеры со стрептавидином). Согласно некоторым вариантам осуществления соединение средства и токсин облегчается взаимодействием стрептавидин-биотин (пример непрямого связывания). Согласно некоторым вариантам осуществления средство является биотинилированным. В некоторых аспектах токсин является биотинилированным. Согласно некоторым вариантам осуществления средство связывается с химерой стрептавидин-токсин. В некоторых аспектах токсин является связанным с химерой стрептавидин-токсин.

В некоторых аспектах отношение средства (например, антитела) к стрептавидин-токсину составляет приблизительно 1:1, приблизительно 1:4, приблизительно 2:1 или приблизительно 4:1.

В некоторых аспектах отношение средства (например, антитела) к токсину составляет приблизительно 1:2, приблизительно 1:2,5, приблизительно 1:2,8, приблизительно 1:3, приблизительно 1:3,5, приблизительно 1:4, приблизительно 1:4,5, приблизительно 1:5, 1:6 или приблизительно 1:8.

В некоторых аспектах способы, раскрываемые в настоящем документе, дополнительно предусматривают стадию введения популяции стволовых клеток в целевые ткани субъекта, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевых тканях субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления стадию введения или трансплантации популяции стволовых клеток выполняют после истощения или уничтожения эндогенных стволовых клеток (например, гемопоэтических стволовых клеток) или клеток-предшественников из целевых тканей, либо частично, либо полностью. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такую стадию введения выполняют после того как целевая ткань субъекта (например, ткань костного мозга) была кондиционирована согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевые ткани субъекта после того, как иммунотоксин (например, иммунотоксин антитело против CD45-SAP или антитело против CD117-SAP) вывелся или рассеялся из целевых тканей субъекта так, что уровень иммунотоксина, оставшегося в целевой ткани субъекта, не индуцирует значительную клеточную смерть в трансплантированной популяции клеток. Например, согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевую ткань субъекта через приблизительно два - приблизительно восемнадцать дней после введения иммунотоксина. Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевую ткань субъекта по меньшей мере через один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, двенадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, восемнадцать, двадцать один, тридцать шесть, сорок два, пятьдесят шесть, шестьдесят три, семьдесят, восемьдесят, девяносто, сто, сто и двадцать дней или больше после того, как иммунотоксин вывелся или распределился из целевых тканей субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы, раскрываемые в настоящем документе, повышают эффективность приживания введенной популяции стволовых клеток в целевой ткани по сравнению со способом, выполняемым с использованием только стадии введение популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта. Например, согласно некоторым вариантам осуществления эффективность приживания повышается по меньшей мере на приблизительно 5-100%, например 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100% или больше.

Способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для кондиционирования тканей субъекта (например, костного мозга) с целью приживания или трансплантации, и после такого кондиционирования популяцию стволовых клеток вводят в целевые ткани субъекта. В некоторых аспектах популяция стволовых клеток включает в себя популяцию экзогенных стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления популяция стволовых клеток включает в себя эндогенные стволовые клетки субъекта (например, эндогенные стволовые клетки, которые были генетически модифицированы для устранения заболевания или генетического дефекта).

Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, вызывают повышение колониестимулирующего фактора гранулоцитов (GCSF). В некоторых аспектах способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, вызывают повышение колониестимулирующего фактора макрофагов (MCSF). Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, вызывают повышение эндогенных миелоидных клеток. Без углубления в конкретную теорию или механизм действия, может происходить повышение эндогенных миелоидных клеток, которое наблюдается после введения средств, токсинов и родственных конъюгатов, раскрываемых в настоящем документе, как результат повышения у субъекта эндогенного GCSF и/или MCSF. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления такое повышение эндогенных миелоидных клеток происходит в результате повышения колониестимулирующего фактора гранулоцитов (GCSF) и/или колониестимулирующего фактора макрофагов (MCSF), что может быть вторичным по отношению к способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе. В некоторых аспектах способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не истощают или не уничтожают эндогенные лимфоидные клетки.

В некоторых аспектах после кондиционирования целевых тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе врожденный иммунитет субъекта сохраняется. В некоторых аспектах после кондиционирования тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе, приобретенный иммунитет субъекта сохраняется. Согласно некото-

рым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, сохраняют целостность вилочковой железы субъекта. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, сохраняют целостность сосудов субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления кондиционирование целевых тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе, обеспечивает по меньшей мере приблизительно 5-90% приживление популяции экзогенных стволовых клеток. Например, кондиционирование тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе, обеспечивает по меньшей мере приблизительно 5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97,5, 99% или больше приживление популяции экзогенных стволовых клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления кондиционирование тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе, обеспечивает по меньшей мере приблизительно 5-90% донорский химеризм (например, 20% донорский химеризм) в целевой ткани субъекта (например, в костном мозге) через четыре месяца после введения популяции экзогенных стволовых клеток субъекту. Например, согласно некоторым вариантам осуществления кондиционирование тканей субъекта согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе, обеспечивает по меньшей мере приблизительно 5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97,5, 99 или больше донорский химеризм в целевых тканях субъекта через четыре месяца после введения популяции экзогенных стволовых клеток субъекту.

Способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для кондиционирования ткани костного мозга. В некоторых аспектах средства (например, конъюгат антитела против CD45-токсин), раскрываемые в настоящем документе, применимы для немиелоаблативного кондиционирования, например, кондиционирования костного мозга, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения, излечения или устранения ряда заболеваний, в том числе, например, заболевания, выбранного из группы, состоящей из серповидно-клеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, синдрома Вискотта-Олдрича, связанного с недостатком аденозиндезаминазы SCID (ADA SCID), HIV/AIDS, метахроматической лейкоцистозии, анемии Даймонда-Блэкфана и синдрома Швахмана-Даймонда. Предпочтительно такие способы и композиции применимы для лечения таких заболеваний без обеспечения токсичностей, которые наблюдаются в ответ на традиционные терапевтические методы кондиционирования, такие как облучение.

В некоторых аспектах субъект имеет доброкачественную гемоглобинопатию (например, гемоглобинопатию, выбранную из группы, состоящей из серповидно-клеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони и синдрома Вискотта-Олдрича). В некоторых аспектах субъект имеет иммунодефицит. Например, согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет врожденный иммунодефицит. В качестве альтернативы, в других аспектах субъект имеет приобретенный иммунодефицит (например, приобретенный иммунодефицит, выбранный из группы, состоящей из HIV и AIDS). Согласно следующему вариантам осуществления субъект имеет нарушение стволовых клеток, выбранное из группы нарушений, состоящей из доброкачественной гемоглобинопатии, иммунодефицита и злокачественной опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет, страдает или иным образом поражен метаболическим нарушением (например, метаболическим нарушением, выбранным из группы, состоящей из заболеваний накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза и метахроматической лейкоцистозии). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет, страдает или иным образом поражен злокачественным новообразованием. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет, страдает или иным образом поражен заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома Вискотта-Олдрича, гипер-IgM-синдрома, болезни Чедиака-Хигаши, наследственного лимфоцитарного гистиоцитоза, остеопороза, несовершенного остеогенеза, болезней накопления, большой талассемии, серповидно-клеточного заболевания, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза и ювенильного ревматоидного артрита. Например, согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает злокачественным новообразованием, выбранным из группы, состоящей из гематологических злокачественных опухолей (например, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и миелодиспластического синдрома) и нейробластомы.

В некоторых аспектах композиции иммунотоксина, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для индуцирования переносимости трансплантата солидного органа (например, индуцирования иммуногенной переносимости в связи с трансплантацией почки). Согласно таким вариантам осуществления композиции иммунотоксина и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для истощения или уничтожения популяции клеток из целевой ткани (например, для истощения HSC в нише стволовых клеток костного мозга). После такого истощения клеток из целевых тканей популяция стволовых или клеток-предшественников от донора органа (например, HSC от донора органа) может быть введена реципиенту трансплантата, и после приживления таких стволовых или кле-



ток-предшественников временно достигается стабильный смешанный химеризм, что тем самым обеспечивает длительную переносимость трансплантированного органа без потребности дополнительных иммуносупрессивных средств.

В некоторых аспектах субъектом является млекопитающее (например, субъектом является человек). В некоторых аспектах субъект является иммунокомпетентным. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет ослабленный иммунитет.

Также в настоящем документе раскрываются способы идентификации кандидатного средства для селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток, при этом такие способы предусматривают стадии: (а) введения образца, содержащего популяцию стволовых клеток, в контакт с тестируемым средством, связанным (например, функционально связанным) с токсином; и (b) выявления истощения или уничтожения одной или нескольких клеток популяции стволовых клеток из образца; при этом истощение или уничтожение одной или нескольких клеток популяции стволовых клеток после стадии введения в контакт идентифицирует тестируемое средство как кандидатное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления клетку вводят в контакт с тестируемым средством по меньшей мере в течение приблизительно 2-24 ч.

Согласно некоторым вариантам осуществления клеткой является человеческая клетка. Согласно некоторым вариантам осуществления клеткой является мышьяная клетка. Согласно некоторым вариантам осуществления клеткой является стволовая клетка. В некоторых аспектах такие клетки включают в себя гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники. Согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы маркеров, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD49d (VLA-4), CD49f (VLA-6), CD51, CD58, CD71, CD84, CD90, CD97, CD117 (c-kit), CD133, CD134, CD162, CD166, CD184 (CXCR4), CD205 и CD361. Согласно некоторым вариантам осуществления человеческие гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют CD34.

Согласно некоторым вариантам осуществления целевые клетки включают в себя человеческие гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие один или несколько маркеров, которые могут служить целями и с которыми средства, содержащие иммунотоксин, селективно связываются, при этом такие маркеры выбраны из группы, состоящей из CD7, CDw12, CD13, CD15, CD19, CD21, CD22, CD29, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD48, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD55, CD64a, CD68, CD71, CD72, CD73, CD81, CD82, CD85A, CD85K, CD90, CD99, CD104, CD105, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD117, CD123, CD124, CD126, CD127, CD130, CD131, CD133, CD135, CD138, CD151, CD157, CD162, CD164, CD168, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD183, CD191, CD200, CD201, CD205, CD217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD240, CD242, CD243, CD277, CD292, CDw293, CD295, CD298, CD309, CD318, CD324, CD325, CD338, CD344, CD349 и CD350.

Согласно некоторым вариантам осуществления целевые клетки включают в себя человеческие гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие один или несколько маркеров, которые могут служить целями, и с которыми средства, содержащие иммунотоксин, селективно связываются, при этом такие маркеры выбраны из группы, состоящей из CD11a, CD18, CD37, CD47, CD52, CD58, CD62L, CD69, CD74, CD97, CD103, CD132, CD156a, CD179a, CD179b, CD184, CD232, CD244, CD252, CD302, CD305, CD317 и CD361.

Согласно некоторым вариантам осуществления тестируемым средством является антитело. В некоторых аспектах тестируемым средством является лиганд. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин интернализируется одной или несколькими клетками популяции HSC или клеток-предшественников. Согласно некоторым вариантам осуществления интернализация предусматривает опосредованную рецептором интернализацию. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин выбран из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки A, цепных производных рицина A, низкомолекулярного токсина и их комбинаций. В некоторых аспектах токсин выбран из группы токсинов, состоящей из токсина абрина, токсина модессина, токсина гелонина, токсина момордина, токсина трихосантина, токсина люффина и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин представляет собой или содержит аматоксин (например,  $\alpha$ -аманитин).

Тогда как некоторые варианты осуществления, раскрываемые в настоящем документе, предусматривают применение, например, конъюгата средство-токсин для истощения или кондиционирования ткани (например, ткани костного мозга) или с целью опосредованной рецептором интернализации токсина, настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, не ограничивается такими вариантами осуществления. Скорее, настоящий документ относится к любым способам, которые могут быть использованы для селективной доставки токсина внутриклеточно в клетки целевой ткани. Например, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрываются способы доставки токсинов внутриклеточно с использованием опосредованной порами интернализации.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрываются способы кондиционирования субъекта для приживления, при этом такие способы предусматривают селективное истощение или уничтожение популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани (например, ткани костного мозга) субъекта путем (а) введения субъекту эффективного количества образующей поры химеры, содержащей мутантный протективный антиген (mut-PA), связанный (например, функционально связанный) со средством, и формирования тем самым одной или нескольких пор в клеточной мембране популяции эндогенных стволовых клеток; и (b) введения субъекту эффективного количества второй химеры, при этом вторая химера содержит фактор (например, ферментативный фактор), связанный с токсином, при этом фактор выбран из группы, состоящей из N-концевого домена летального фактора (LFN), N-концевого домена вызывающего отек фактора (EFN) или их фрагментов, и при этом токсин интернализируется популяцией эндогенных стволовых клеток с селективным истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани и кондиционированием субъекта для приживления.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам пересаживания стволовых клеток субъекту, при этом такие способы предусматривают стадии (а) введения субъекту эффективного количества (например, 1,5 мг/кг) образующей поры химеры, содержащей мутантный протективный антиген (mut-PA), связанный со средством, и формирования тем самым одной или нескольких пор в клеточной мембране популяции эндогенных стволовых клеток; (b) введения субъекту эффективного количества второй химеры, при этом вторая химера содержит фактор (например, ферментативный фактор), связанный с токсином, при этом фактор выбран из группы, состоящей из N-концевого домена летального фактора (LFN), N-концевого домена вызывающего отек фактора (EFN) или их фрагментов, и при этом токсин интернализируется популяцией эндогенных стволовых клеток с истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани (например, ткани костного мозга); и (с) введения популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевой ткани субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевые ткани субъекта после того, как токсин (например, слияние химерной А-цепи дифтерийного токсина с LFN (LFN-DTA)) вывелся или рассеялся из целевых тканей субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство выбрано из группы, состоящей из scFv, Fab, discFv, biseFvs, triscFv, тандемного scFv, аптамера, антитела и лиганда. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является одноцепочечный вариативный фрагмент (scFv). В некоторых аспектах средством является биспецифическое антитело.

Согласно следующим вариантам осуществления средством является лиганд. Например, такой лиганд может быть выбран из группы лигандов, состоящей из фактора стволовых клеток (SCF), CXCL12: фактора стромы 1 (SDF1), ангиопоэтина 1-4 (Ang1, Ang2, Ang3, Ang4), TPO (тромбопоэтина), эритропоэтина, FLT3L, VLA4, VLA6, IL-1, IL-3, IL-6, IL-18, G-CSF, онкостатина M, LIF и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления способом, раскрываемых в настоящем документе, токсин интернализируется путем опосредованной порами интернализации. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин является сапорин. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин инактивирует рибосомы. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин ингибирует синтез белка. В некоторых аспектах токсин выбран из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки A, цепных производных рицина A, низкомолекулярных токсинов и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин представляет собой или содержит аматоксин (например,  $\alpha$ -аманитин). Согласно некоторым вариантам осуществления токсин выбран из группы, состоящей из токсина абрина, токсина модессина, токсина елонина, токсина момордина, токсина трихосантина, токсина люффина и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция эндогенных стволовых клеток содержит гемопоэтические стволовые клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники содержат или экспрессируют один или несколько маркеров. Например, согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы маркеров, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thy1, CD93, CD105: эндоглина, CD117: рецептора cKit/SCF, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоз, рецептора онкостатина M, эмбигина и IL-18R. Согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD47, CD58, CD71, CD84, CD97, CD117 (c-kit), CD133, CD162, CD166, CD205 и CD361. В некоторых аспектах средство селективно связывается с маркером. В некоторых аспектах при связывании средства с маркером иммунотоксин интернализируется клетками, экспрессирующими такой маркер.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающим является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения, излечения или облегчения иным образом заболевания или состояния у субъекта, пораженного таковым. Следовательно, в некоторых аспектах субъект имеет доброкачественную гемоглобинопатию. Например, такой субъект может быть поражен гемоглобинопатией, выбранной из группы, состоящей из серповидно-клеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони и синдрома Вискотта-Олдрича.

В некоторых аспектах субъект имеет иммунодефицит. Например, согласно некоторым вариантам осуществления иммунодефицит является врожденным иммунодефицитом. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах иммунодефицит является приобретенным иммунодефицитом. Например, приобретенный иммунодефицит выбран из группы, состоящей из HIV и AIDS.

Согласно следующим вариантам осуществления субъект имеет или иным образом поражен нарушением стволовых клеток, выбранным из группы нарушений, состоящей из доброкачественной гемоглобинопатии, иммунодефицита и злокачественной опухоли.

Согласно различным вариантам осуществления любого аспекта настоящего изобретения композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, дополнительно предусматривают введение субъекту одного или нескольких мобилизирующих средств (например, комбинации агониста CXCR2 и антагониста CXCR4). Например, композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть введены совместно с одним или несколькими мобилизирующими средствами и/или могут быть введены после введения одного или нескольких мобилизирующих средств (например, через 15 мин после введения мобилизирующего средства). В некоторых аспектах мобилизирующее средство представляет собой или содержит филграстим (G-CSF). В некоторых аспектах мобилизирующее средство выбрано из группы, состоящей из агониста CXCR2 (например, Gro-beta), антагониста CXCR4 (например, плериксафора) и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления мобилизирующее средство содержит Gro-beta. В некоторых аспектах мобилизирующее средство содержит Gro-betaA4. Согласно некоторым вариантам осуществления мобилизирующее средство содержит плериксафор. В некоторых аспектах мобилизирующие средства содержат Gro-beta и плериксафор. В некоторых аспектах мобилизирующие средства содержат Gro-betaA4 и плериксафор. В некоторых аспектах мобилизирующее средство содержит ингибитор гепарансульфата.

Вышеизложенное, а также многие другие признаки и соответствующие преимущества настоящего изобретения станут более понятными со ссылкой на следующее подробное описание настоящего изобретения.

### **Краткое описание графических материалов**

Файл настоящего патента или заявки содержит по меньшей мере одно графическое изображение, выполненное в цвете. Копии публикации настоящего патента или заявки на выдачу патента с цветными графическими материалами будут предоставлены Ведомством по запросу и с оплатой необходимой пошлины.

На фиг. 1 иллюстрируется моноклональное антитело CD45 вместе с конъюгатом стрептавидин-сапорин с образованием иммунотоксина к CD45 (CD45-SAP). Также изображается механизм, с помощью которого такой CD45-SAP вызывает клеточную смерть гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников, экспрессирующих CD45.

На фиг. 2A-2G показаны результаты некоторых исследований, оценивающих эффекты мышинового моноклонального антитела против CD45 вместе с конъюгатом стрептавидин-сапорин с образованием иммунотоксина к CD45 (CD45-SAP). На фиг. 2A показана частота встречаемости гемопоэтических стволовых клеток (HSC) в костном мозге, собранном через 8 дней после кондиционирования, и демонстрируется 98% истощение HSC в группе CD45-SAP, но истощение не наблюдали в группе немеченного биотинного антитела плюс сапорин. На фиг. 2B показана кратковременная активность клеток-предшественников, оцениваемая путем подсчета колониеобразующих единиц фракции костного мозга, собранной через 8 дней после кондиционирования. На фиг. 2C показана суммарная клеточность костного мозга через 8 дней после кондиционирования. На фиг. 2D показан анализ зависимости от времени донорского химеризма периферической крови подвергнутых трансплантации мышей. На фиг. 2E показан донорский химеризм через 2 месяца после трансплантации, выполненной в разные дни после введения CD45-SAP. На фиг. 2F изображено полное трехлинейное распределение через 8 месяцев после трансплантации у некондиционированного контроля и у кондиционированных с CD45-SAP мышей. На фиг. 2G показан донорский химеризм в каждой из 3 линий через 8 месяцев после трансплантации как у контрольных некондиционированных мышей, так и у кондиционированных с CD45-SAP мышей. \* означает  $p < 0,05$ ; N.S. означает статистически незначимый.

На фиг. 3A-3D показано восстановление некоторых гематологических параметров, оцениваемых на протяжении 100-дневного периода у мышей, которые кондиционированы с CD45-SAP и которые не получили трансплантат донорских клеток. В частности, на фиг. 3A показаны количества эритроцитов, на фиг. 3B показаны количества нейтрофилов (количества в серой рамке будут представлять нейтропению), на фиг. 3C показаны количества тромбоцитов (количества в серой рамке будут представлять тромбоцитопе-

нию), и на фиг. 3D показаны количества лимфоцитов (В- и Т-клеток), оцениваемые на протяжении 100-дневного периода у мышей, кондиционированных с CD45-SAP. Представленные результаты показывают, что кондиционирование с CD45-SAP характеризуется как немиелоаблативное. \* обозначает р-значение < 0,05; N.S. обозначает "статистически незначимый".

На фиг. 4A-4C показана активность клеточного киллинга иммунотоксина CD45-SAP *in vitro* и подтверждается, что иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, могут быть интернализированы путем нацеливания на CD45. На фиг. 4A показана смерть клеток EL4 и EML, которую индуцировали с помощью группы CD45-SAP (треугольники), тогда как это не наблюдали в группе немеченного биотинном антитела плюс сапорин (кружочки). На фиг. 4B показана IC<sub>50</sub>, наблюдаемая с CD45-SAP по сравнению с наблюдаемой в группе немеченного биотинном антитела плюс сапорин. На фиг. 4C показана 24-часовая интернализация, наблюдаемая с меченым с помощью Alexa-Fluor 488 (AF488) антителом против CD45.

На фиг. 5A-5E показано, что иммунотоксин CD45-SAP истощает гемопоэтические стволовые клетки (HSC) *in vivo*. На фиг. 5A-5C показано процентное отношение частоты встречаемости HSC (фиг. 5A), колонии на бедренную кость (фиг. 5B) и суммарные клетки на бедренную кость (фиг. 5C) у животных, которым вводили иммунотоксин CD45-SAP. Как показано на фиг. 5D, через восемь дней после обработки однократной *i.v.* дозой иммунотоксина CD45-SAP HSC истощались в ткани костного мозга по сравнению с контролем. Подобным образом, фиг. 5E подтверждает функциональную потерю HSC при выполненной трансплантации.

На фиг. 6A-6D показаны результаты приживления после введения CD45-SAP у мышей. На фиг. 6A в общем показан один вариант осуществления настоящего изобретения, при котором иммунотоксин CD45-SAP вводят мыши с последующим приживлением однократной дозой экзогенных клеток. На фиг. 6B показан химеризм в процентах через 4 месяца после трансплантации. На фиг. 6C и 6D сравнивается донорский химеризм в процентах как у кондиционированных, так и у некондиционированных мышей.

На фиг. 7A-7F сравнивается токсичность средства иммунотоксин CD45-SAP с традиционной схемой кондиционирования путем облучения (5 Gy). В частности, изображены сравнения такого иммунотоксина CD45-SAP с традиционным облучением на Т-клетках (фиг. 7A), В-клетках (фиг. 7B), миелоидных клетках (фиг. 7C), клеточности (фиг. 7D), стволовых клетках (фиг. 7E) и активности CFC (фиг. 7F).

На фиг. 8 показано, что не наблюдали поражение вилочковой железы у мышей, которым вводили иммунотоксин CD45-SAP, по сравнению с облучением через 2 дня после кондиционирования. Напротив, атрофию вилочковой железы наблюдали у мышей после кондиционирования с облучением.

На фиг. 9 показана гистология костного мозга и подтверждается, что целостность кровеносных сосудов сохранялась интактной у мышей с CD45-SAP через 2 дня после кондиционирования. Напротив, целостность кровеносных сосудов нарушалась у мышей после облучения через 2 дня после кондиционирования.

На фиг. 10 показано, что целостность сосудов сохранялась через 2 дня после кондиционирования со средством CD45-SAP. Напротив, целостность кровеносных сосудов нарушалась у мышей после облучения через 2 дня после кондиционирования.

На фиг. 11A-11D показано, что приживление с использованием кондиционирования с CD45-SAP способно устранять серповидно-клеточную анемию на мышинной модели. На фиг. 11A показан донорский миелоидный химеризм в процентах в каждом из трех оцениваемых состояниях. Как показано на фиг. 11B-11D, уровни эритроцитов, гемоглобина и ретикулоцитов возвращались к нормальным.

На фиг. 12A-12B показана коррекция серповидной клетки на мышинной модели и показано, что серповидный белок гемоглобин больше не наблюдали в крови кондиционированных мышей. На фиг. 12A представлены результаты анализа нативного электрофореза в геле серповидного гемоглобина (Hbs) и нормального гемоглобина (Hba) у животных, которых кондиционировали с CD45-SAP с последующей трансплантацией, и доказательства коррекции серповидной клетки. На фиг. 12B представлены результаты мазков крови и окрашивания у животных, которых кондиционировали с CD45-SAP с последующей трансплантацией, а также дополнительные доказательства устранения серповидно-клеточного заболевания у животных.

На фиг. 13A-13B показана коррекция размеров селезенок у животных, которых кондиционировали с CD45-SAP с последующей трансплантацией. В частности, на фиг. 13A и 13B, соответственно, показано, что массы селезенок и размеры селезенок на мышинной модели серповидных клеток корректировались у тех мышей, которых кондиционировали с CD45-SAP. N.S. обозначает "статистически незначимый".

На фиг. 14A-14E показано, что CD45-SAP демонстрирует мощную активность истощения клеток. На фиг. 14A изображена экспериментальная схема для оценивания способности иммунотоксинов истощать HSC у иммунокомпетентных мышей. На фиг. 14B показаны зависимые от дозы эффекты CD45-SAP на истощение колониеобразующей клетки-предшественника (CFC) и HSC, оцениваемое через 8 дней после введения. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 14C показано, что CD45-SAP истощает HSC, тогда как небитинилированное антитело против CD45 в присутствии стрептавидин-сапорина не истощает HSC. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг.

14D показано, что клон 104 CD45-SAP убивает клетки-предшественники EML *in vitro*, тогда как небитинилированное антитело в присутствии стрептавидин-сапорина не влияет на жизнеспособность. На фиг. 14E показано количественное определение интернализации рецептора CD45 в клетках EL4 с использованием клона 104. Данные представляют среднее  $\pm$  SD типичного эксперимента. \* указывает на  $p$ -значение  $<0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $<0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $<0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 15A-15G показана активность истощения клеток иммунотоксинов. На фиг. 15A показано, что активность истощения HSC кандидатных иммунотоксинов оценивали в костном мозге через 6 дней после введения. Данные представляют среднее  $\pm$  диапазон ( $n = 2$  мышей/группа). На фиг. 15B показано изучение влияния различных отношений антитела против CD45 к стрептавидин-сапорину на активность истощения HSC. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 15C показано, что периферический химеризм через 4 месяца после конкурентной трансплантации костного мозга, собранного у контрольных или кондиционированных с CD45-SAP мышей, демонстрирует истощение функциональных HSC с помощью CD45-SAP. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 15D показано, что клон 104 CD45-SAP не истощает HSC у мышей CD45.1. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 15E представлены *in vitro* значения  $IC_{50}$  по клеточным линиям EL4 и EML после 72 часов инкубации с клонами 104 и 30-F11 CD45-SAP. Данные представляют среднее  $\pm$  SD 3 независимых экспериментов. На фиг. 15F показано истощение HSC с помощью CD45-SAP, полученного от клонов 104 и 30-F11. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 15G показана *in vivo* персистенция клонов 104 и 30-F11 AF488-меченных антител против CD45 в периферических лейкоцитах, спленocyтах и клетках-предшественниках костного мозга LKS через 24 ч после введения. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 3$  мышей/группа). \* указывает на  $p$ -значение  $<0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 16A-16F показано, что CD45-SAP обеспечивает эффективное приживание донорских клеток. На фиг. 16A изображена экспериментальная схема для оценивания трансплантационного интервала после кондиционирования с CD45-SAP и трансплантации цельных клеток костного мозга либо CD45.1, либо CD45.2-GFP. На фиг. 16B показан донорский химеризм (через 4 месяца после трансплантации) клеток CD45.2 GFP или CD45.1, введенных в разные дни после кондиционирования с CD45-SAP. Контроль представляет собой некондиционированных мышей, получающих трансплантацию. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 16C показаны типичные графики проточной цитометрии, иллюстрирующие донорские клетки в периферической крови после трансплантации у контрольных или кондиционированных с CD45-SAP мышей. На фиг. 16D показано длительное оценивание химеризма периферической крови после трансплантации клеток CD45.2-GFP через 8 дней после кондиционирования с CD45-SAP. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 16E изображен вклад донорских клеток в миелоидные, В- и Т-клетки у кондиционированных с CD45-SAP мышей по сравнению с полным распределением у необработанных контрольных мышей. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 16F показан донорский миелоидный химеризм через 4 месяца после трансплантации 2000 очищенных HSC (LKS CD48-CD150+ или LKS CD34-CD150+) у некондиционированного контроля и кондиционированных с CD45-SAP мышей. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 17A-17E показано приживание донорских клеток после введения CD45-SAP. На фиг. 17A показан химеризм в периферической крови и в популяции HSC костного мозга через 4 месяца после трансплантации. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 17B показано длительное оценивание химеризма периферической крови после трансплантации клеток CD45.1 через 8 дней после кондиционирования с CD45-SAP. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 17C показан химеризм крови через 4 месяца после серийной трансплантации костного мозга от кондиционированных с CD45-SAP мышей с трансплантированными клетками либо CD45.2-GFP, либо CD45.1. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). На фиг. 17D сравниваются CD45-SAP и облучение всего организма (TBI) 5 Gy, достигающие подобных уровней химеризма (70-80%) через 4 месяца после трансплантации клеток CD45.1, тогда как кондиционирование с ACK2 не обеспечивает приживание ( $<5\%$ ). Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа), за исключением ACK2 ( $n = 2$  мышей). На фиг. 17E показан химеризм через 4 месяца после трансплантации низкой дозы клеток (1 миллион клеток костного мозга) у мышей, кондиционированных с CD45-SAP, TBI (5 Gy) или комбинацией. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 5$  мышей/группа). \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 18A-18D изображены дифференциальные эффекты CD45-SAP по сравнению с облучением в отношении костного мозга. На фиг. 18A показана относительная клеточность костного мозга в различ-

ные временные точки после CD45-SAP или облучения всего организма (TBI) 5 Gy. Данные представляют среднее процентное отношение относительно необработанных мышей  $\pm$  SEM ( $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 18B показана относительная активность колониеобразующих клеток (CFC) костного мозга, собранных в разные моменты времени после CD45-SAP или облучения всего организма (TBI) 5 Gy. Данные представляют среднее процентное отношение относительно необработанных мышей  $\pm$  SEM ( $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 18C показано относительное иммунофенотипическое количественное определение HSC в костном мозге, собранном в разные моменты времени после CD45-SAP или TBI 5 Gy. Данные представляют среднее процентное отношение относительно необработанных мышей  $\pm$  SEM ( $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 18D показана *in vivo* микроскопия черепной кости для оценивания целостности сосудов. Контрольным мышам или мышам, обработанным с CD45-SAP или TBI 5 Gy (через 2 дня после кондиционирования), *i.v.* вводили высокомолекулярный (2 МДа) декстран-родамин для оценивания целостности сосудов (красный канал). Изображения получали через 20 мин после введения декстрана, и поверхность кости показана в голубом канале. \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 19 показаны эффекты CD45-SAP и облучения в отношении гистологии костного мозга. Типичное окрашивание гематоксилином и эозином костного мозга бедренной кости у контрольных, кондиционированных с CD45-SAP или TBI 5 Gy мышей через 2 дня после кондиционирования. Масштабные линейки на верхних и нижних изображениях представляют 500 и 20 мкм соответственно.

На фиг. 20A-20E показаны дифференциальные эффекты CD45-SAP по сравнению с облучением в отношении крови и вилочковой железы. На фиг. 20A показаны относительные уровни периферических миелоидных клеток после CD45-SAP или TBI 5 Gy. На фиг. 20B показана кривая выживания по методу Каплана-Мейера после системной провокации *Candida albicans* через 2 дня после кондиционирования и в некондиционированном контроле ( $n = 10$  мышей/группа). На фиг. 20C показаны относительные уровни CD3+ Т-клеток после CD45-SAP или TBI 5 Gy. Данные на фиг. 20A и 20C представляют среднее процентное отношение относительно необработанного контроля  $\pm$  SEM ( $n = 4$  мышей/временная точка). На фиг. 20D показано окрашивание гематоксилином и эозином вилочковой железы (500 микронная масштабная линейка) и кортикального слоя вилочковой железы (50-микронная масштабная линейка) от контрольных, кондиционированных с CD45-SAP или TBI 5 Gy мышей, собранного через 2 дня после кондиционирования. На фиг. 20E показано абсолютное число Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) на мг ткани вилочковой железы через 3 дня после кондиционирования ( $n = 4$  мышей/группа). \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 21A-21G показаны эффекты CD45-SAP и облучения в отношении крови и вилочковой железы. На фиг. 21A показано окрашивание по Райту-Гимзе и подтверждается присутствие зрелых нейтрофилов (обозначено стрелками) в периферической крови мышей через 6 дней после введения CD45-SAP (20-микронная масштабная линейка). На фиг. 21B показаны относительные уровни В-клеток после CD45-SAP или TBI 5 Gy (среднее  $\pm$  SEM,  $n = 4$  мышей/группа). На фиг. 21C показана масса вилочковой железы контрольных, кондиционированных с CD45-SAP или TBI 5 Gy мышей, собранной через 3 дня после обработки. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 4$  мышей/группа). Относительные уровни (фиг. 21D) эритроцитов (RBC), (фиг. 21E) гемоглобина, (фиг. 21F) гематокрита и (фиг. 21G) тромбоцитов в различные временные точки после CD45-SAP или TBI 5 Gy. Данные представляют среднее процентное отношение относительно необработанного контроля  $\pm$  SEM ( $n = 4$  мышей/временная точка). \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 22A-22F показано устранение серповидно-клеточного заболевания. На фиг. 22A изображена экспериментальная схема для кондиционирования с CD45-SAP и трансплантации у мышей с серповидными клетками (6 мышей/группа, 3 группы). На фиг. 22B показан донорский миелоидный химеризм через 4 месяца после трансплантации в трех группах мышей с серповидными клетками, подвергнутых трансплантации при условиях фиг. 22A. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 6$  мышей/группа). На фиг. 22C показано оценивание количества эритроцитов (RBC), гемоглобина, гематокрита и ретикулоцитов в контроле дикого типа, контроле с серповидными клетками и группе А (получивших коррекцию мышей с серповидными клетками) через 4 месяца после трансплантации. Данные представляют среднее  $\pm$  SEM ( $n = 6$  мышей/группа). На фиг. 22D показаны результаты анализа нативного PAGE нормального (Hba) и серповидного (Hbs) гемоглобинового белка в крови от контрольных мышей дикого типа, мышей с серповидными клетками и мышей группы А (по 2 типичных мыши из каждой группы). На фиг. 22E показаны типичные мазки периферической крови мышей дикого типа, с серповидными клетками и группы А, при этом серповидные клетки обозначены стрелками. На фиг. 22F показаны типичные селезенки от контрольных мышей дикого типа, мышей с серповидными клетками и мышей группы А. \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указы-

вает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 23A-23F показана коррекция серповидно-клеточного заболевания с помощью HSCT после кондиционирования с CD45-SAP. На фиг. 23A показано, что истощение HSC у мышей с серповидными клетками через 8 дней после введения различных доз CD45-SAP. Данные представляют среднее  $\pm$  SEM ( $n = 3$  мышей/группа). На фиг. 23B показана подробная экспериментальная схема для кондиционирования с CD45-SAP и трансплантацией у мышей с серповидными клетками (3 группы с  $n = 6$  мышей/группа) с указанными дозами иммунотоксина и количествами цельных трансплантированных клеток костного мозга. На фиг. 23C показаны количества эритроцитов, (фиг. 23D) уровни гемоглобина, (фиг. 23E) частота встречаемости ретикулоцитов для контрольных мышей дикого типа, контрольных мышей с серповидными клетками и 3 групп кондиционированных с CD45-SAP и подвергнутых трансплантации мышей с серповидными клетками. Данные на фиг. 23C-23E представляют среднее  $\pm$  SEM ( $n = 6$  мышей/группа). На фиг. 23F показана масса селезенки через 4 месяца после трансплантации для контрольных мышей дикого типа, контрольных мышей с серповидными клетками и 3 групп кондиционированных с CD45-SAP и подвергнутых трансплантации мышей с серповидными клетками. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 3$  мышей/группа). \* указывает на  $p$ -значение  $< 0,05$ ; \*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,01$ ; \*\*\* указывает на  $p$ -значение  $< 0,001$ ; n.s. указывает на отсутствие значимости ( $p$ -значение  $> 0,05$ ).

На фиг. 24 показан *in vitro* киллинг разных антител и конъюгатов антитело-иммунотоксин, в том числе 2B8-SAP, против линии клеток-предшественников EML. Как показано, антитела 2B8 (CD117) и 104 (CD45) являются неактивными, если они не объединены с сапорином с образованием интернализирующегося конъюгата антитело-токсин. Кроме того, антитело ACK2 (CD117) продемонстрировало существенную активность истощения клеток в отсутствие сапорина из-за антагонизирующего взаимодействия фактора стволовых клеток (SCF) с CD117. Клетки, для которых необходим SCF, являются чувствительными к антагонизму.

На фиг. 25A и 25B изображены результаты пилотного исследования сапорина, при котором оценивали различные моноклональные антитела против известных антигенов на HSC. На фиг. 25A показано количество фенотипических HSC через 6 дней после введения конъюгата антитело-токсин. На фиг. 25B показано истощение HSC *in vivo* различными конъюгатами антитело-токсин через 6-8 дней после введения.

На фиг. 26 показано истощение стволовых клеток как антителами ACK2-SAP, так и 2B8-SAP с достижением, как показано, обоими истощения фенотипических HSC, однако, только 2B8-SAP обеспечивает приживление.

На фиг. 27 представлены результаты пилотного исследования усиленного приживления HSC. Как показано, ACK2-SAP превосходит только ACK2, но 2B8-SAP значительно более эффективный, чем любой из двух, и сравним с CD45-SAP.

На фиг. 28 показаны результаты 16-недельного пилотного исследования приживления в периферической крови и в LKS-SLAM (HSC) в костном мозге. Трансплантировали 10 миллионов цельных клеток костного мозга GFP через 8 дней после введения конъюгата антитело-токсин и оценивали химеризм через 16 недель после трансплантации в клетках крови и HSC костного мозга. Как показано, конъюгат CD117 ACK2-SAP не способствовал приживлению, тогда как конъюгат CD117 2B8-SAP обеспечивал эффективное приживление (80-98%) донорских клеток GFP.

На фиг. 29 показаны результаты *in vivo* исследования по оптимизации дозы 2B8-SAP ( $n = 4$  мышей на группу) через 8 дней после введения.

На фиг. 30 показано, что конъюгат 2B8-SAP оставляет периферическую кровь интактной, подтверждая, что 2B8-SAP является немиелоаблативным и нелимфоаблативным, как определяли через 8 дней после введения. Как показано, конъюгат CD45-SAP истощает B- и T-клетки, тогда как конъюгат 2B8-SAP не истощает B- и T-клетки.

На фиг. 31 сравнивается *in vivo* эффективность различных клонов CD117-SAP в ткани костного мозга по сравнению с клоном CD45-SAP клон и облучением всего организма 5 Gy ( $n = 5$  мышей на группу). Число стволовых клеток в ткани костного мозга субъектов-животных оценивали через 8 дней после введения конъюгата антитело-токсин. Как показано, конъюгат ACK2-SAP не смог значительно истощить HSC, тогда как два неантагонистических конъюгата антитело против CD117-токсин (2B8-SAP и 3C11-SAP) являются более эффективными при истощении HSC в качестве иммунотоксинов.

На фиг. 32 изображены результаты 16-недельного исследования приживления ( $n = 5$  мышей на группу), выполняемого с использованием показанного конъюгата CD117 2B8-SAP. Для выполнения исследования 10 миллионов цельных клеток костного мозга CD45.1 трансплантировали через 8 дней после введения конъюгата CD117 SAP-2B8 и химеризм оценивали через 16 недель после трансплантации. Как показано на фиг. 32, неантагонистический конъюгат 2B8-SAP достигал эффективного приживления донорских клеток у полностью иммунокомпетентных животных, тем самым значительно расширяя диапазон заболеваний, в том числе состояний, отличных от SCID.

На фиг. 33 показана *in vitro* активность конъюгатов антитело против CD45 человека-SAP в отношении человеческих гематопозитических клеток. Человеческие CD45+ гематопозитические клетки Jurkat об-

рабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксинов антитело против CD45 человека-SAP (созданных с использованием антител против человеческих антител) в течение 72 ч и жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано, значения  $IC_{50}$  для клеточного киллинга составляли 130 нМ и 200 нМ для клонов MEM-28 и HI30, соответственно. Данные представляют среднее  $\pm$  SD ( $n = 3$  технических повторностей) типичного эксперимента.

На фиг. 34 представлена активность антитело против CD34 человека-SAP в отношении человеческих гемопоэтических стволовых клеток (HSC) *in vitro*. Человеческие мобилизованные в периферической крови CD34+ HSC обрабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксинов антитело против CD34 человека-SAP в течение 96 ч и жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано, значение  $IC_{50}$  для клеточного киллинга составляет приблизительно 100 нМ для обоих тестируемых клонов.

На фиг. 35 показан механизм транслокации с использованием летального фактора (LF), вызывающего отек фактора (EF) и защитного антигена для истощения HSC или клеток-предшественников.

На фиг. 36 представлена *in vitro* активность LFN-DTA в отношении человеческих гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Человеческие мобилизованные в периферической крови CD34+ HSC обрабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксина LFN-DTA в присутствии 10 нМ WT-PA в течение 96 часов и жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано, 100% клеточную смерть наблюдали при концентрации 1 фемтомоль LFN-DTA, что показывает, что LFN-DTA может быть использован для обеспечения эффективного киллинга человеческих HSC.

На фиг. 37 показана активность LFN-DTA в отношении различных линий гемопоэтических клеток с помощью обработки таких клеток *in vitro* разными концентрациями иммунотоксина LFN-DTA в течение 48 часов и оценивания жизнеспособности клеток с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано, LFN-DTA демонстрировал активность в отношении обработанных линий гемопоэтических клеток.

На фиг. 38 представлены некоторые цели или маркеры кондиционирования. 30000 цельных клеток костного мозга в 50 мкл среды IMDM с цитокином обрабатывали разными концентрациями иммунотоксинов или сапорина отдельно в течение 24 ч. Затем клетки высевали на метилцеллюлозу M3434 и колонии, возникающие из гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), подсчитывали спустя 7 дней. Установили, что все иммунотоксины были активными и истощали HSPC со значениями  $IC_{50}$  1-10 нМ. Сапорин отдельно (без антитела) не был активным, даже при высоких концентрациях (100 нМ).

На фиг. 39 представлены результаты анализа киллинга человеческих CD34+ гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Иммунотоксины создавали из сапорина и моноклональных антител (mAb) против антитела человека, нацеленных на различные рецепторы клеточной поверхности, и тестировали на предмет их способности убивать полученные из костного мозга человека CD34+ HSC в течение 5 дней и жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа. Показаны иммунотоксины, которые убивали более 20% CD34+ клеток.

На фиг. 40A-40B показано исследование трансплантации, выполненное на иммунокомпетентных мышах Balb/c. Иммунокомпетентным мышам Balb/c возрастом 8-недель вводили инъекцией 3 мг/кг CD45-SAP (клона 104) или 1,5 мг/кг CD117-SAP (клона 2B8) и трансплантировали 10 млн цельных донорских клеток костного мозга через 6 дней после иммунотоксина, как показано на фиг. 40A. Суммарный и миелоидспецифический донорский химеризм оценивали в периферической крови животных через 16 недель после трансплантации. Как показано на фиг. 40B, CD45-SAP и CD117-SAP обеспечивали эффективное приживание донорских клеток по сравнению с некондиционированными контрольными мышами (по меньшей мере  $n = 3$  мышей/группа).

На фиг. 41A-41B показано выполненное исследование, предусматривающее трансплантацию человеческих CD34+ донорских клеток мышам NSG с ослабленным иммунитетом. Как показано на фиг. 41A, мышам NSG с ослабленным иммунитетом возрастом 8 недель кондиционировали с облучением 2 Gy, 3 мг/кг CD45.1-SAP или 1,5 мг/кг CD117-SAP и трансплантировали CD34+ донорские клетки человеческой пуповинной крови через 6 дней после иммунотоксина. Суммарный человеческий донорский химеризм оценивался в периферической крови через 16 недель после трансплантации ( $n = 5$  мышей/группа) и изображен на фиг. 41B.

На фиг. 42A-42C представлены результаты химеризм NSG костного мозга человека после кондиционирования с облучением 2 Gy, CD117-SAP или CD45.1-SAP. Кондиционирование с облучением 2 Gy, CD117-SAP или CD45.1-SAP обеспечивало высокие уровни у человека приживания в костном мозге через 16 недель после трансплантации, как показано на фиг. 42A и 42B. Как показано на фиг. 42C, донорские клетки человека в костном мозге главным образом представлены В-клетками с некоторым количеством миелоидных клеток и небольшим количеством Т-клеток.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, как правило, относятся к композициям, способам, методам терапии и схемам, которые применимы для кондиционирования тканей субъекта с целью приживания или трансплантации (например, трансплантации гемопоэтических стволовых



клеток). В частности, такие композиции и способы селективно нацеливаются на маркер (например, маркер клеточной поверхности, такой как рецептор CD45 или CD117) и облегчают внутриклеточную доставку иммунотоксина в одну или несколько клеток (например, в CD45+ или CD117+ клетки) целевой ткани, например гемопоэтических стволовых клеток (HSC) и/или клеток-предшественников в ткань костного мозга субъекта. Путем селективного нацеливания на клетки, экспрессирующие селектируемый маркер (например, CD45 или CD117), композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут осуществлять свой цитотоксичный эффект в отношении этих целевых клеток, при предотвращении, минимизации, а в некоторых случаях, устранении, неблагоприятных эффектов в отношении нецелевых клеток и тканей. Например, в некоторых случаях, композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, селективно уничтожают или истощают нишу эндогенных стволовых клеток целевой ткани (например, ткани костного мозга); однако, в отличие от традиционных схем кондиционирования (например, сокращенной схемы кондиционирования для серповидно-клеточной анемии, раскрытой в Bolanos-Meade, et al., *Кровь* (2012), 120(22): 4286), такие композиции и способы не индуцируют опасную для жизни нейтропению, тромбоцитопению и/или анемию у субъекта.

В некоторых аспектах композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, относятся к нацеливанию, уничтожению и/или истощению гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников (HSPC), сохранившихся в целевых тканях субъекта, например гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников в нише стволовых клеток (например, костного мозга субъекта). Используемый в настоящем документе термин "гемопоэтические стволовые клетки" относится к стволовым клеткам, которые могут дифференцироваться в гемопоэтической линии и давать начало всем типам клеток крови, таким как лейкоциты и эритроциты, в том числе миелоидным (например, моноцитам и макрофагам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, эритроцитам, мегакариоцитам/тромбоцитам, дендритным клеткам) и лимфоидным линиям (например, Т-клеткам, В-клеткам, НК-клеткам). Стволовые клетки определяют по их способности образовывать несколько типов клеток (мультипотентности) и по их способности к самообновлению. Человеческие гемопоэтические стволовые клетки могут быть идентифицированы, например, с помощью маркеров клеточной поверхности, таких как CD34+, CD90+, CD49f+, CD38- и CD45RA-. Мышиные гемопоэтические стволовые клетки могут быть идентифицированы, например, с помощью маркеров клеточной поверхности, таких как CD34-, CD133+, CD48-, CD150+, CD244-, cKit+, Scal+, и по отсутствию маркеров линий (отрицательных по B220, CD3, CD4, CD8, Mac1, Gr1 и Ter119, среди прочих). Композиции и способы, описываемые в настоящем документе, могут быть применимы для истощения или уничтожения любой стволовой клетки, в том числе, без ограничения стволовых клеток периферической крови, стволовых клеток костного мозга, стволовых клеток крови пуповины, генетически модифицированных стволовых клеток и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "гемопоэтические клетки-предшественники" охватывает плюрипотентные клетки, которые относятся к линии гемопоэтических клеток, как правило, не способны к самообновлению, но способны к дифференцировке в несколько типов клеток гемопоэтической системы, таких как гранулоциты, моноциты, эритроциты, мегакариоциты, В-клетки и Т-клетки, в том числе без ограничения кратковременные гемопоэтические стволовые клетки (ST-HSC), мультипотентные клетки-предшественники (MPP), общие миелоидные клетки-предшественники (CMP), гранулоцитарно-моноцитарные клетки-предшественники (GMP), мегакариоцитарно-эритроцитарные клетки-предшественники (MEP) и общие лимфоидные клетки-предшественники (CLP). Присутствие гемопоэтических клеток-предшественников может быть определено функционально как клеткоколониобразующих единиц (CFU-C) в полных анализах с использованием метилцеллюлозы или фенотипически путем выявления маркеров клеточной поверхности (например, CD45, CD34+, Ter119-, CD16/32, CD127, cKit, Seal) с использованием анализов, известных специалистам в данной области.

Настоящее изобретение относится к уничтожению или истощению гемопоэтических стволовых клеток и/или клеток-предшественников для любой цели, которая может потребоваться специалисту. Согласно некоторым вариантам осуществления гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники уничтожают или истощают из целевых тканей субъекта (например, из ниши стволовых клеток) для кондиционирования субъекта с целью приживления трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток и/или клеток-предшественников, например, путем снижения числа или устранения гемопоэтических стволовых клеток и/или клеток-предшественников в нише стволовых клеток (например, в костном мозге), в которую можно пересаживать трансплантируемые клетки.

Хотя некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к уничтожению или истощению, например, гемопоэтических стволовых клеток из ниши стволовых клеток, настоящее изобретение также может быть применимо для уничтожения или истощения не являющихся гемопоэтическими стволовых клеток, которые вовлекаются в поддержание ниши стволовых клеток. Например, соединения и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для нацеливания на не являющиеся HSC, гемопоэтические подгруппы, которые участвуют в поддержании ниши гемопоэтических стволовых клеток. Такие гемопоэтические подгруппы, которые могут служить целями, уничтожаемые или истощаемые с использованием композиций и способов, раскрываемых в настоящем документе, включают в себя, например, Т-клетки, экспрессирующие CD4, CD3 или CD8, В-клетки, экспрессирующие B220

или CD19, и миелоидные клетки экспрессирующие Gr-1 или Mac-1 (CD11b).

Используемые в настоящем документе термины "уничтожать" и "уничтожение", как правило, относятся к частичному или полному уничтожению популяции клеток (например, гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников) из целевых тканей (например, тканей костного мозга субъекта). В некоторых аспектах такое уничтожение предусматривает полное уничтожение или истощение таких клеток из целевой ткани. В качестве альтернативы, в других аспектах таким уничтожением является частичное уничтожение или истощение таких клеток (например, HSC или клеток-предшественников) в целевой ткани. Например, в некоторых аспектах способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, дают по меньшей мере приблизительно 5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92,5, 95, 97,5, 98 или 99% истощение клеток (например, HSC или клеток-предшественников) в целевой ткани.

Рецептор CD45 является уникальным и убиквитарным мембранным гликопротеином, который экспрессируется почти во всех гемопоэтических клетках. Подобным образом, CD117 представляет собой цитокиновый рецептор, который экспрессируется на поверхности гемопоэтических стволовых клеток, клеток-предшественников, а также других типов клеток. Настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, основывается отчасти на открытии того, что некоторые маркеры (например, маркеры клеточной поверхности, такие как CD45 и CD117) обладают свойствами интернализации, что может быть использовано для облегчения внутриклеточной доставки токсина (например, токсина, такого как сапорин) в клетки целевой ткани с индуцированием тем самым клеточной смерти, как в общих чертах показано на фиг. 1. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления средства (например, антитела и/или лиганды) и композиции, раскрываемые в настоящем документе, характеризуются как интернализирующиеся и, таким образом, могут вызывать или иным образом облегчать внутриклеточную доставку одного или нескольких иммунотоксинов в клетки целевой ткани, которые экспрессируют целевой маркер (например, целевой маркер клеточной поверхности).

В некоторых аспектах настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к выбору одного или нескольких маркеров (например, маркера клеточной поверхности) для облегчения селективного нацеливания средств на клетки целевой ткани. Используемый в настоящем документе термин "селективно" означает, что средство (например, антитело) преимущественно или дискриминантно распознает и/или связывается с маркером, или фрагментом, или эпитопом такого маркера (например, маркера клеточной поверхности). Типичные средства на основе антител, которые селективно распознают и/или связывают маркер клеточной поверхности (например, CD45, CD117 и CD34) и которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя, клон 104, клон 30F11, клон АСК2, клон 2В8, клон 3С11, клон МЕМ-28, клон Н130, клон 581 и клон 4Н11. В некоторых аспектах средство содержит антитело, которое селективно распознает и/или связывается с маркером CD34 (например, клон 581 или клон 4Н11). В некоторых аспектах средство содержит антитело, которое селективно распознает и/или связывается с маркером CD45 (например, клон МЕМ-28 или клон Н130). В некоторых аспектах средством является антитело, выбранное из группы, состоящей из клона L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона 3а6, клона HD83 и клона МЕМ-216. С помощью селективного нацеливания на клетки целевых тканей способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут снижать, ограничивать или иным образом устранять токсичности, которые исторически являются проблемой традиционных схем кондиционирования и которые приводят к опасным для жизни осложнениям.

Используемый в настоящем документе термин "маркер", как правило, относится к любому белку, рецептору, антигену, углеводам, липидам или другим фрагментам, которые могут быть расположены или экспрессированы на поверхности клеток целевой ткани и которые могут быть использованы для отличия популяции клеток. В частности, такие маркеры могут быть использованы для селективно нацеленных средств, которые содержат композиции иммуноксина, раскрываемые в настоящем документе, на клетки целевой ткани. Хотя некоторые варианты осуществления, раскрываемые в настоящем документе, относятся к селективному нацеливанию на клетку с использованием, например, маркеров CD34, CD45 и/или CD117, настоящее изобретение не ограничивается такими маркерами. Скорее, настоящее изобретение относится к выбору и применению любых маркеров (например, маркеров клеточной поверхности), которые могут быть применимы или подходят для селективного нацеливания на популяцию клеток, включая любые еще не обнаруженные маркеры. Предпочтительно, выбранный маркер селективно экспрессируется на поверхности популяции целевых клеток, облегчая тем самым селективное или отличительное нацеливание на такую популяцию клеток с использованием средств (например, антител и/или лигандов), раскрываемых в настоящем документе. Например, в некоторых аспектах выбранный маркер экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках или клетках-предшественниках. Типичные маркеры могут быть выбраны из группы маркеров, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD49d (VLA-4), CD49f (VLA-6), CD51, CD58, CD71, CD84, CD90, CD97, CD117 (c-kit), CD133, CD134, CD162, CD166, CD184 (CXCR4), CD205 и CD361. Согласно некоторым вариантам осу-

ществления выбранный маркер экспрессируется только в целевой популяции клеток (например, целевой популяции HSC), что тем самым ограничивает "нецелевые" эффекты или устраняет "нецелевые" эффекты, которые ограничивали использование традиционных схем кондиционирования.

Согласно некоторым вариантам осуществления выбор маркера может быть осуществлен на основании сравнения выявленной экспрессии такого маркера (например, маркера клеточной поверхности) в целевой клетке с экспрессией такого маркера в контрольной популяции клеток. Например, экспрессию маркера в HSC или клетке-предшественнике можно сравнивать со средней экспрессией того же маркера в других клетках.

Согласно некоторым вариантам осуществления маркером является рецептор. Типичные человеческие рецепторы, которые могут быть использованы или выбраны в качестве маркеров в соответствии с настоящим изобретением, раскрываемым в настоящем документе, могут быть выбраны из группы маркеров, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thy1, CD93, CD105: эндоглина, CD117: рецептора cKit/SCF, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD 184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоз, рецептора онкостатина M, эмбигина и IL-18R.

В некоторых аспектах типичные маркеры, которые экспрессируются в человеческих гемопоэтических стволовых клетках, которые могут служить целями и с которыми средства, содержащие иммунотоксин, селективно связываются, могут быть выбраны из группы, состоящей из CD7, CDw12, CD13, CD15, CD19, CD21, CD22, CD29, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD48, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD55, CD64a, CD68, CD71, CD72, CD73, CD81, CD82, CD85A, CD85K, CD90, CD99, CD104, CD105, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD117, CD123, CD124, CD126, CD127, CD130, CD131, CD133, CD135, CD138, CD151, CD157, CD162, CD164, CD168, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD183, CD191, CD200, CD201, CD205, CD217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD240, CD242, CD243, CD277, CD292, CDw293, CD295, CD298, CD309, CD318, CD324, CD325, CD338, CD344, CD349 и CD350.

Согласно некоторым вариантам осуществления типичные маркеры, которые экспрессируются на человеческих гемопоэтических стволовых клетках, которые могут быть целями и с которыми средства, содержащие иммунотоксин, селективно связываются, могут быть выбраны из группы, состоящей из CD11a, CD18, CD37, CD47, CD52, CD58, CD62L, CD69, CD74, CD97, CD103, CD132, CD156a, CD179a, CD179b, CD184, CD232, CD244, CD252, CD302, CD305, CD317 и CD361.

Типичные мышинные рецепторы, которые могут быть использованы или выбраны в качестве маркеров в соответствии с настоящим изобретением, раскрываемым в настоящем документе, могут быть выбраны из группы, состоящей из Sca-1, CD150, CD27 и CD201.

Типичные лиганды, которые могут быть использованы или выбраны в качестве маркеров в соответствии с настоящим изобретением, раскрываемым в настоящем документе, могут быть выбраны из группы маркеров, состоящей из фактора стволовых клеток (SCF) или лиганда cKit, CXCL12: фактора стромы 1 (SDF1), ангиопоэтина 1-4 (Ang1, Ang2, Ang3, Ang4), TPO (тромбопоэтина), эритропоэтина, FLT3L, VLA-4, VLA-6, IL-1, IL-3, IL-6, IL-18, G-CSF, онкостатина M и LIF.

Композиции, раскрываемые в настоящем документе, содержат средство для облегчения нацеливания такой композиции, например, на популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта. Используемый в настоящем документе термин "средство" относится к любому веществу, молекуле, соединению или фрагменту, таким как антитело, или лиганд, или аптамер, которые могут быть использованы для нацеливания или направления или которые иным образом облегчают нацеливание или направление фрагмента, такого как токсин, связанного с таким средством, на одну или несколько клеток (например, на одну или несколько гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта). В некоторых аспектах средство селективно нацеливается на клетки в целевой ткани (например, ткани костного мозга), вызывая интернализацию фрагмента (например, токсина), связанного с ним, такими клетками, и тем самым уничтожает или истощает такие клетки из целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления средство селективно распознает и/или связывается с маркером или с фрагментом или эпитопом такого маркера (например, маркера клеточной поверхности, такого как рецептор).

Средства, раскрываемые в настоящем документе, включают в себя без ограничения любые средства, которые могут селективно нацеливаться, связывать или распознавать маркер или эпитоп, который может быть дифференциально экспрессирован на клеточной поверхности клеток целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления такие средства направляют или нацеливают иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, на клетки целевой ткани (например, раковые стволовые клетки) с истощением или уничтожением тем самым таких клеток из целевой ткани и с кондиционированием такой целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления средство представляет собой или содержит лиганд (например, лиганд, такой как фактор стволовых клеток). Согласно некоторым вариантам

осуществления средство представляет собой или содержит аптамер. Средства в соответствии с настоящим изобретением не ограничиваются вышеупомянутыми иллюстративными примерами; скорее, может быть использовано любое средство, которое может селективно нацеливаться, связывать или распознавать маркер или эпитоп, экспрессированный на клеточной поверхности клеток целевых тканей. Согласно некоторым вариантам осуществления средство получают рекомбинантным путем.

В некоторых аспектах средство представляет собой или содержит антитело (например, моноклональное или поликлональное антитело). Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть поликлональными или моноклональными, и термин "антитело" охватывает как поликлональные, так и моноклональные антитела. Например, в некоторых аспектах антитело выбрано из группы, состоящей из клона 104, клона 30F11, клона АСК2, клона 2В8, клона 3С11, клона МЕМ-28, клона Н130, клона 581 и клона 4Н11. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, содержащее определяющую комплементарную область, которая является такой же, как и определяющая комплементарная область для одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из клона 104, клона 30F11, клона АСК2, клона 2В8, клона 3С11, клона МЕМ-28, клона Н130, клона 581 и клона 4Н11. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и одно или несколько антител, выбранных из группы, состоящей из 104, клона 30F11, клона АСК2, клона 2В8, клона 3С11, клона МЕМ-28, клона Н130, клона 581 и клона 4Н11.

В некоторых аспектах антитело выбрано из группы, состоящей из клона L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона 3а6, клона HD83 и клона МЕМ-216. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, содержащее определяющую комплементарную область, которая является такой же, как и определяющая комплементарная область для одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона 3а6, клона HD83 и клона МЕМ-216. Согласно некоторым вариантам осуществления средством является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и одно или несколько антител, выбранных из группы, состоящей из L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4Н11, клона А2А9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона СС2С6, клона TS2/9, клона СУ1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона 3а6, клона HD83 и клона МЕМ-216. Кроме того, следует учитывать, что в способах, описываемых в настоящем документе, при которых используют антитела в качестве средства для облегчения доставки иммунотоксинов в клетки целевой ткани, также можно использовать функциональные фрагменты (например, антиген-связывающие фрагменты) таких антител.

Могут быть получены антитела в соответствии с настоящим изобретением против подходящего маркера или антигена, такого как, например, выделенный и/или рекомбинантный CD34, CD45 или CD117 млекопитающего: рецептор cKit/SCF или их части или эпитопы. Могут быть получены антитела против выбранного маркера (например, маркера клеточной поверхности) или антигена с помощью способов, известных специалистам в данной области. Такие способы получения поликлональных антител хорошо известны в уровне техники и подробно описываются, например, Harlow et al., 1988 в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.

Как правило, такие антитела получают путем иммунизации животного (например, кролика, крысы, мыши, обезьяны и т.д.) несколькими подкожными или внутриперитонеальными инъекциями релевантного антигена (например, CD34, CD45, или CD117: рецептора cKit/SCF), необязательно конъюгированного с гемоцианином лимфы улитки (KLH), сывороточным альбумином, другим иммуногенным носителем, растворенного в стерильном солевом растворе и объединенного с адъювантом (например, полным или неполным адъювантом Фрейнда) с образованием стабильной эмульсии. Поликлональное антитело затем извлекают из крови или асцитов иммунизированного животного. Собранную кровь сворачивают, а сыворотку декантируют, осветляют путем центрифугирования и анализируют на предмет титра антитела. Поликлональные антитела могут быть очищены из сыворотки или асцитов согласно стандартным способам из уровня техники, в том числе аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, электрофорезу в геле, диализу и т.д. Поликлональная антисыворотка также может быть выполнена моноспецифической с использованием стандартных процедур (см., например, Agaton et al., "Selective Enrichment of Monospecific Polyclonal Antibodies for Antibody-Based Proteomics Efforts," *J Chromatography A* 1043(1):33-40 (2004), которая тем самым включена посредством ссылки во всей своей полноте).

Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных методов, таких как описываемые в Kohler and Milstein, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," *Nature* 256:495-7 (1975), которая тем самым включена посредством ссылки во всей своей полноте. С использованием гибридомного метода мышь, хомяк или другого подходящего животного-хозяина иммунизируют, чтобы вызвать продуцирование лимфоцитами антител, которые будут специфически связываться с иммунизирующим антигеном.

В качестве альтернативы, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и сливают с подходящей линией миеломных клеток с использованием, например, полиэтиленгликоля, с образованием гибридомных клеток, которые затем могут быть выбраны из неслитых лимфоцитов и миеломных клеток. Гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, направленные специфически против, например, маркера клеточной поверхности, такого как CD34, CD45 или CD117: рецептора cKit/SCF, как определяют с помощью иммунопреципитации, иммуноблоттинга или с помощью *in vitro* анализа связывания, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), затем могут быть размножены либо в *in vitro* культуре с использованием стандартных способов (James Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (1986), которая тем самым включена посредством ссылки во всей своей полноте), либо *in vivo* как асцитные опухоли у животного. Моноклональные антитела затем могут быть очищены от культуральной среды или асцитной жидкости, как описывается выше для поликлональных антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональные антитела могут быть получены с использованием способов рекомбинантной ДНК, описываемых в патенте США № 4816567, Cabilly et al., который тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют, например, из зрелых В-клеток или гибридомных клеток, например, путем RT-PCR с использованием олигонуклеотидных праймеров, которые специфически амплифицируют гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, и их последовательность определяют с использованием традиционных процедур. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем клонируют в подходящие векторы экспрессии, которые при трансфекции в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичников китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые иным образом не продуцируют иммуноглобулиновый белок, и создают моноклональные антитела с помощью клеток-хозяев. Рекомбинантные моноклональные антитела или их фрагменты желаемых видов также могут быть выделены из описываемых библиотек фагового дисплея (McCafferty et al., "Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains," *Nature* 348: 552-554 (1990); Clackson et al., "Making Antibody Fragments using Phage Display Libraries," *Nature* 352: 624-628 (1991); и Marks et al., "By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage," *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, далее могут быть модифицированы рядом различных путей с использованием технологии рекомбинантной ДНК для создания альтернативных антител. Согласно одному варианту осуществления константные домены легкой и тяжелой цепей, например, мышинового моноклонального антитела, могут заменить такие области человеческого антитела с образованием химерного антитела. В качестве альтернативы, константные домены легкой и тяжелой цепей мышинового моноклонального антитела могут заменить отличный от иммуноглобулина полипептид с образованием антитела слияния. Согласно другим вариантам осуществления константные области усекают или уничтожают для создания желаемого фрагмента антитела моноклонального антитела. Кроме того, сайт-направленный или мутагенез высокой плотности вариабельной области может быть использован для оптимизации специфичности и аффинности моноклонального антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональным антителом против маркера клеточной поверхности или антигена, такого как CD34, CD45 или CD117: рецептора cKit/SCF, является гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональным антителом против маркера клеточной поверхности или антигена, такого как HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD47, CD58, CD71, CD84, CD97, CD117, CD133, CD162, CD166, CD205 и/или CD361, является гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела представляют собой антитела, которые содержат минимальные последовательности из не являющихся человеческими (например, мышинных) антител в вариабельных областях. Такие антитела используют в терапии для уменьшения антигенности и ответов человеческого антитела против антитела мыши при введении субъекту-человеку. Фактически гуманизированные антитела, как правило, представляют собой человеческие антитела с минимумом не являющихся человеческими последовательностей до отсутствия таковых. Человеческим антителом является антитело, продуцируемое человеком, или антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей антителу, продуцируемому человеком.

Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием различных методов, известных в уровне техники. Антитело может быть гуманизировано путем замещения определяющей комплементарности области (CDR) человеческого антитела таковой из не являющегося человеческим антитела (например, мыши, крысы, кролика, хомяка и т.д.), обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и характеристикой (Jones et al., "Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody With Those From a Mouse," *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., "Reshaping Human Antibodies: Grafting an Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536 (1988), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано путем замены дополнительных остатков или в каркасной области Fv, и/или в замещенных не являющихся чело-

вещескими остатках для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности и/или характеристики антитела.

Человеческие антитела могут быть непосредственно получены с использованием различных методов, известных в уровне техники. Могут быть созданы иммортализованные человеческие В-лимфоциты, иммунизированные *in vitro* или выделенные из иммунизированного индивидуума, который продуцирует антитело, направленное против целевого антигена (см., например, Reisfeld et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77 (Alan R. Liss, 1985), и патент США № 5750373, Garrard, которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Также, человеческое антитело может быть выбрано из фаговой библиотеки, при этом данная фаговая библиотека экспрессирует человеческие антитела (Vaughan et al., "Human Antibodies with Sub-Nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library," *Nature Biotechnology*, 14:309-314 (1996); Sheets et al., "Efficient Construction of a Large Nonimmune Phage Antibody Library: The Production of High-Affinity Human Single-Chain Antibodies to Protein Antigens," *Proc Nat'l Acad Sci USA* 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom et al., "By-passing Immunization. Human Antibodies From Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments Rearranged In Vitro," *J Mol. Biol.*, 227: 381-8 (1992); Marks et al., "By-passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage," *J. Mol. Biol.*, 222:581-97 (1991), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Гуманизированные антитела также могут быть получены у трансгенных мышей, содержащих локусы человеческого иммуноглобулина, которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител при отсутствии продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Этот подход описывается в патенте США № 5545807, Surani et al.; патенте США № 5545806, Lonberg et al.; патенте США № 5569825, Lonberg et al.; патенте США № 5625126, Lonberg et al.; патенте США № 5633425, Lonberg et al.; а также в патенте США № 5661016, Lonberg et al., которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно некоторым вариантам осуществления средства, которые содержат композиции иммунотоксина в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя биспецифические антитела, которые специфически распознают один или несколько маркеров клеточной поверхности. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые способны специфически распознавать и связывать по меньшей мере два разных эпитопа. Биспецифические антитела могут быть интактными антителами или фрагментами антител. Методы получения биспецифических антител распространены в уровне техники (Brennan et al., "Preparation of Bispecific Antibodies by Chemical Recombination of Monoclonal Immunoglobulin G1 Fragments," *Science* 229:81-3 (1985); Suresh et al., "Bispecific Monoclonal Antibodies From Hybrid Hybridomas," *Methods in Enzymol.* 121:210-28 (1986); Traunecker et al., "Bispecific Single Chain Molecules (Janusins) Target Cytotoxic Lymphocytes on HIV Infected Cells," *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); Shalaby et al., "Development of Humanized Bispecific Antibodies Reactive with Cytotoxic Lymphocytes and Tumor Cells Overexpressing the HER2 Protooncogene," *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992); Kostelny et al., "Formation of a Bispecific Antibody by the Use of Leucine Zippers," *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992); Gruber et al., "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated by a Bispecific Single Chain Antibody Expressed in *Escherichia coli*," *J. Immunol.* 152:5368-74 (1994); и патент США № 5731168, Carter et al., которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Согласно некоторым вариантам осуществления применение таких биспецифических антител может облегчать нацеливание композиций иммунотоксина, раскрываемых в настоящем документе, на первый маркер клеточной поверхности, экспрессируемый клетками целевых тканей, а также на второй маркер, способный облегчать интернализацию такой композиции иммунотоксина. Подобным образом, такие биспецифические антитела могут быть использованы для усиления точности нацеливания композиций иммунотоксина, раскрываемых в настоящем документе. В некоторых аспектах биспецифические антитела могут быть применимы для связывания маркера клеточной поверхности конкретной клетки (например, миелоидных клеток), тогда как второй маркер клеточной поверхности также может служить целью для интернализации композиции иммунотоксина. Например, согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела, раскрываемые в настоящем документе, связывают маркер клеточной поверхности, обладающий свойствами интернализации, что может быть использовано для облегчения внутриклеточной доставки токсина (например, токсина, такого как сапорин) в клетки целевой ткани с индуцированием тем самым клеточной смерти.

Биспецифические антитела, которые связывают, например, как CD34, так и CD45, могут быть получены любой методикой, известной в уровне техники. Например, в некоторых аспектах биспецифические антитела, раскрываемые в настоящем документе, могут быть получены с использованием химической связи. В качестве альтернативы, такие биспецифические антитела могут быть получены рекомбинантно с использованием совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулина. В некоторых аспектах биспецифические антитела могут быть получены путем дисульфидного обмена, продуцирования гибридных гибридом, с помощью транскрипции и трансляции для получения одной полипептидной цепи, реализующей биспецифическое антитело, или транскрипции и трансляции для получения более чем одной полипептидной цепи, которая может ковалентно связываться с получением биспецифического антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические средства или антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с одним или несколькими маркерами, выбранными из группы, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thy1, CD93, CD105: эндоглина, CD117: рецептора cKit/SCF, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоз, рецептора онкостатина М, эмбигина и IL-18R. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифическое средство или антитело, раскрываемое в настоящем документе, связывается с одним или несколькими маркерами, выбранными из группы, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD47, CD58, CD71, CD84, CD97, CD117, CD133, CD162, CD166, CD205 и CD361.

Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические средства или антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с двумя или более маркерами, выбранными из группы, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thy1, CD93, CD105: эндоглина, CD117: рецептора cKit/SCF, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоз, рецептора онкостатина М, эмбигина и IL-18R. Согласно некоторым вариантам биспецифические средства или антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с двумя или более маркерами, выбранными из группы, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD45, CD47, CD58, CD71, CD84, CD97, CD117, CD133, CD162, CD166, CD205 и CD361.

Согласно некоторым вариантам биспецифические средства или антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с двумя или более маркерами, экспрессируемыми на человеческих гемопоэтических стволовых клетках, и выбраны из группы, состоящей из CD7, CDw12, CD13, CD15, CD19, CD21, CD22, CD29, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD48, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD55, CD64a, CD68, CD71, CD72, CD73, CD81, CD82, CD85A, CD85K, CD90, CD99, CD104, CD105, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD117, CD123, CD124, CD126, CD127, CD130, CD131, CD133, CD135, CD138, CD151, CD157, CD162, CD164, CD168, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD183, CD191, CD200, CD201, CD205, CD217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD240, CD242, CD243, CD277, CD292, CDw293, CD295, CD298, CD309, CD318, CD324, CD325, CD338, CD344, CD349 и CD350.

Согласно некоторым вариантам биспецифические средства или антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с двумя или более маркерами, экспрессируемыми на человеческих гемопоэтических стволовых клетках, и выбраны из группы, состоящей из CD11a, CD18, CD37, CD47, CD52, CD58, CD62L, CD69, CD74, CD97, CD103, CD132, CD156a, CD179a, CD179b, CD184, CD232, CD244, CD252, CD302, CD305, CD317 и CD361.

Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с CD34 и CD117: рецептор cKit/SCF. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с CD45 и CD117: рецептор cKit/SCF. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела, раскрываемые в настоящем документе, связываются с CD34 и CD45.

Согласно некоторым вариантам осуществления может быть желательным применение фрагмента антитела, а не интактного антитела. Известны различные методы получения фрагментов антитела. Традиционно эти фрагменты получают путем протеолитического расщепления интактного антитела (см., например, Morimoto et al. "Single-step Purification of F(ab')<sub>2</sub> Fragments of Mouse Monoclonal Antibodies (immunoglobulins G1) by Hydrophobic Interaction High Performance Liquid Chromatography Using TSKgel Phenyl-5PW," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992), и Brennan et al., "Preparation of Bispecific Antibodies by Chemical Recombination of Monoclonal Immunoglobulin G1 Fragments," *Science* 229: 81-3 (1985), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Однако в настоящее время эти фрагменты, как правило, получают непосредственно с помощью рекомбинантной клетки-хозяина, как описывается выше. Таким образом, фрагменты антитела Fab, Fv и scFv могут быть экспрессированы и выделены из *E. coli* или других клеток-хозяев, что таким образом обеспечивает получение больших количеств таких фрагментов. В качестве альтернативы, такие фрагменты антитела могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Фрагментом антитела также могут быть линейные антитела, описываемые в патенте США № 5641870, Rinderknecht et al., который тем самым включен посредством ссылки, и могут быть моноспецифические или биспецифические. Другие методы получения фрагментов антитела будут очевидны практикующему специалисту.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вариантам и эквивалентам, которые, по сути, гомологичны химерным, гуманизированным и человеческим антителам или фрагментам этих антител. Они могут содержать, например, мутации в виде консервативных замен (например, замены одной или не-

скольких аминокислот подобными аминокислотами, которые сохраняют или улучшают связывающую активность антитела или фрагмента антитела).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления клетки, которые экспрессируют маркер, могут быть использованы в качестве иммуногена или в скрининге на предмет антитела, которое связывает маркер. Согласно одному варианту осуществления антитело обладает специфичностью в отношении маркера, эпитопа или их части. Согласно таким вариантам осуществления, если средство представляет собой или содержит антитело, то при идентификации и отборе маркера, который экспрессируется на поверхности клеток целевой ткани (например, CD45, CD117 или их части или эпитопа), может быть получено антитело против такого маркера с использованием принятых в уровне техники методов и способов.

В некоторых аспектах средство представляет собой или содержит лиганд. Например, согласно некоторым вариантам осуществления средство представляет собой или содержит лиганд, такой как фактор стволовых клеток, который взаимодействует или связывается с рецептором клеточной поверхности, например CD117.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство используют для доставки или для облегчения доставки токсина в клетки целевой ткани, и после доставки такого токсина в клетки целевой ткани этот токсин интернализируется такими клетками и тем самым проявляет цитотоксичный эффект в отношении этих клеток целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления средство используют для доставки или для облегчения доставки образующего поры фрагмента, такого как мутантный протективный антиген (mut-PA), в клетки целевой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления при доставке средства, связанного с токсином (например, CD117-SAP), в клетки целевой ткани как средство, так и токсин совместно локализируются во внутриклеточном компартменте одной или нескольких клеток целевой ткани с уничтожением или истощением тем самым таких клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть применены или иным образом осуществлены отдельно или в комбинации с другими доступными терапевтическими средствами. Например, способы, конъюгаты и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть применены субъекту в качестве основной терапии или в качестве вспомогательной терапии.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, осуществляют или применяют в комбинации (например, применяют совместно) с одним или несколькими мобилизирующими средствами, которые способны индуцировать миграцию, например, гемопоэтических стволовых клеток и/или клеток-предшественников, из первого компартмента (например, целевой ткани, такой как ниша стволовых клеток или компартмент костного мозга) во второй компартмент (например, в периферическую кровь или орган, такой как селезенка), как описывается в публикации международной заявки № WO 2014/134539, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно таким вариантам осуществления субъект может подвергаться мобилизационной терапии и средства, раскрываемые в настоящем документе, могут быть совместно введены или последовательно введены субъекту так, что мобилизованные клетки контактируют с введенной композицией в компартменте, в котором эти клетки были мобилизованы (например, в периферическом компартменте).

В некоторых аспектах совместное введение композиций, раскрываемых в настоящем документе, с одним или несколькими мобилизирующими средствами обеспечивает средство повышения или усиления активности и/или эффективности таких композиций путем повышения вероятности контакта таких композиций, например, с гемопоэтическими стволовыми клетками и/или клетками-предшественниками, которые были мобилизованы в периферическом компартменте. Типичные мобилизирующие средства включают в себя, например, один или несколько из агонистов CXCR2 (например, Gro-beta или Gro-beta $\Delta$ 4) и антагониста CXCR4 (например, плериксафор или Mozobil®). В некоторых аспектах мобилизирующее средство содержит G-CSF отдельно или в комбинации с плериксафором. В некоторых аспектах мобилизирующее средство содержит по меньшей мере один ингибитор гепарансульфата. В некоторых аспектах мобилизирующее средство представляет собой или содержит филграстим (G-CSF).

Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксичность способов, композиций и токсинов, раскрываемых в настоящем документе, зависит от интернализации и, таким образом, требует транслокации токсина во внутриклеточный компартмент клеток целевой ткани. Такая зависимая от интернализации токсичность отличается от прежних подходов нацеливания с использованием радиоиммунотоксина (RIT) против CD45. В частности, при обеспечении такого специфического связывания CD45-RIT с гемопоэтическими клетками смерть не зависит от интернализации, а, скорее, происходит с соседними клетками, подвергнутыми облучению, в том числе нежелательному облучению селезенки и печени. Напротив, композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, обеспечивают опосредованную интернализацией рецептора CD45 смерть с использованием, например, иммунотоксина против CD45-SAP (см., например, фиг. 4A-4C и фиг. 5A-5E, иллюстрирующие активность клеточного киллинга иммунотоксина CD45-SAP *in vitro* и *in vivo* и подтверждающие, что иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, могут быть интернализованы путем нацеливания на CD45). Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, не индуцируют кле-



точную смерть посредством повреждения ДНК.

Используемые в настоящем документе термины "интернализированный" и "интернализация", как правило, означают, что средство и/или токсин вводятся или иным образом достигают внутриклеточного компартмента одной или нескольких клеток (например, HSC или клеток-предшественников) целевой ткани (например, костного мозга). Например, средство и/или токсин могут достигать внутриклеточного компартмента клетки путем опосредованного рецептором процесса (например, процесса эндоцитоза), при котором клетка будет впитывать только внеклеточное средство и/или токсин при связывании со специфическим рецептором. В некоторых аспектах средства и/или токсины, раскрываемые в настоящем документе, интернализируются популяцией эндогенных стволовых клеток (например, HSC) или клеток-предшественников со степенью, составляющей по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

В некоторых аспектах композиции, раскрываемые в настоящем документе (например, конъюгаты антитело-токсин), интернализируются клеткой, экспрессирующей маркер (например, маркер клеточной поверхности CD34, CD45 или CD117), при связывании такого средства (например, антитела) с эпитопом маркера (например, CD34, CD45 или CD117).

Согласно некоторым вариантам осуществления композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, индуцируют цитотоксичность или клеточную смерть при интернализации токсина или иммунотоксина целевой клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой). Используемый в настоящем документе термин "токсин" используют, как правило, для обозначения любых химического или биологического соединения, композиции или фрагмента, которые могут индуцировать цитотоксичный или вредный эффект в отношении целевой клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксичные или вредные эффекты, которые индуцированы токсином или иммунотоксином, наблюдаются после его интернализации во внутриклеточном компартменте клетки (например, CD45+ или CD117+ клетки). Например, в некоторых аспектах при интернализации средства, связанного с токсином, токсин отщепляется от средства (например, токсин и средство разъединяются), и токсин ингибирует синтез белка, вызывая тем самым клеточную смерть. Подобным образом, в некоторых аспектах при интернализации средства, связанного с токсином, токсин отщепляется от средства (например, токсин и средство разъединяются), и токсин ингибирует рибосомальную активность, вызывая тем самым клеточную смерть.

Предпочтительно токсин должен получать доступ в клетку или должен быть иным образом интернализован, чтобы оказывать свой цитотоксичный или вредный эффект. Следовательно, предпочтительны токсины, которые оказывают цитотоксичный или вредный эффект только после их интернализации одной или несколькими клетками целевой ткани. Сапорин, каталитический N-гликозидазный инактивирующий рибосомный белок (RIP), который останавливает синтез белка, является типичным токсином для применения согласно способам и композициям, раскрываемым в настоящем документе. В отличие от других представителей рицинового семейства сапорин не имеет общего домена проникновения в клетку и не является токсичными, если не связывается с нацеливающимся антителом или лигандом (например, клоном 2B8), которые способны к опосредованной рецептором интернализации. Это показано на фиг. 2A, которая демонстрирует, что совместное введение антитела с сапорином не приводит к истощению гемопоэтических стволовых клеток из-за неспособности такого сапорина получать доступ в клетку. Напротив, как также показано на фиг. 2A, если сапориновый токсин был связан с антителом против CD45, то такой конъюгат CD45-SAP демонстрировал 98% истощение гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге, собранном через 8 дней после кондиционирования. В некоторых аспектах токсин является связанным со средством (например, гуманизированным антителом) для облегчения целевой доставки такого токсина в одну или несколько целевых клеток (например, CD45+ и/или CD117+ клеток).

В некоторых аспектах токсин представляет собой токсин на основе белка и может включать в себя, например, модифицированный рицин и цепные производные рицина А (например, цепь А рицина, дегликозилированную цепь А рицина), сапорин, дифтерийный токсин, токсины и варианты *Pseudomonas* (например, PE38 и другие), а также низкомолекулярные токсины. Токсин может быть токсином на основе белка, в том числе, например, биологически активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения и их фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин может быть получен рекомбинантным путем. В некоторых аспектах токсином может быть синтетический токсин.

Тогда как некоторые варианты осуществления, раскрываемые в настоящем документе, относятся к применению сапорина в качестве выбранного токсина, следует учитывать, что настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, не ограничивается сапорином или токсинами на основе белка. Скорее некоторые альтернативные токсины могут быть использованы в соответствии с описанием настоящего изобретения. Например, дифтерийный токсин (DT) и экзотоксин синегнойной палочки А (PE) останавливают синтез белка на стадии удлинения. Токсины рицинового семейства (например, сапорин)

обладают N-гликозидазной активностью, приводящей к депуринизации важного аденина в 28S рибосомальную РНК (rRNA). Все из этих токсинов ингибируют синтез белка и обладают общим свойством эффективности против делящихся и неделящихся клеток, если являются интернализированными; это контрастирует с конъюгатами антитело-лекарственное средство (ADC), в которых лекарственные средства специфически влияют на делящиеся клетки путем ковалентной модификации ДНК или нарушения динамики микротрубочек. Поскольку гемопоэтические стволовые клетки обычно находятся в непролиферирующем состоянии покоя, применение белковых токсинов, способных индуцировать клеточную смерть независимо от состояния клеточного цикла, является предпочтительным для эффективного истощения и кондиционирования гемопоэтических стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин выбран из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки А, модифицированных рициновых аналогов и цепных производных рицина А, низкомолекулярных токсинов и их комбинаций. В некоторых аспектах токсин представляет собой модифицированные рициновые аналоги или цепные производные рицина А, например, цепь А рицина. В некоторых аспектах токсин (например, цепь А рицина) был модифицирован, например, с удалением домена проникновения в клетку.

В некоторых аспектах токсин выбран из группы токсинов, состоящей из токсина абрина, токсина модессина, токсина гелонина, токсина момордина, токсина трихосантина, токсина люффина и их комбинаций.

Тогда как в некоторых аспектах токсином может быть токсин на основе белка, следует учитывать, что предполагаемые токсины не ограничиваются токсинами на основе белка. Скорее, токсины, предполагаемые для применения в соответствии с какими-либо аспектами настоящего изобретения, в широком понимании включают в себя любые соединения или средства (например, цитотоксичные соединения или средства), которые селективно приводят к смерти одной или нескольких клеток в целевой ткани (например, в нише стволовых клеток костного мозга) или которые иным образом снижают жизнеспособность клеток. Согласно различным вариантам осуществления любого аспекта настоящего изобретения токсин, применимый в соответствии с композициями и способами в соответствии с настоящим изобретением, содержат одну или несколько повреждающих ДНК молекул. Например, выбранный токсин может содержать одно или несколько антигубулиновых средств (например, майтансинов) или ингибиторов тубулина, сшивающих ДНК средств, алкилирующих ДНК средств и дезинтеграторов клеточного цикла или митоза. В некоторых аспектах выбранный токсин представляет собой или содержит дезинтегратор или ингибитор митоза, такой как майтансин, или его функциональный фрагмент, производное или аналог.

Согласно некоторым вариантам осуществления токсин (например, токсин грибкового происхождения) ингибирует РНК-полимеразу II и/или III (например, ингибитор РНК-полимеразы II и/или III млекопитающего). В некоторых аспектах такой токсин-ингибитор РНК-полимеразы II представляет собой или содержит один или несколько аматоксинов или их функциональный фрагмент, производное или аналог. Аматоксины являются мощными и селективными ингибиторами РНК-полимеразы II и включают в себя все циклические пептиды, состоящие из восьми аминокислот, выделенные из рода *Amanita*, в первую очередь из *Amanita phalloides*. Такие аматоксины могут быть выделены из ряда видов шляпочных грибов (например, *Amanita phalloides*, *Galerina marginata* и *Lepiota brunneo-incarnata*) или в некоторых аспектах могут быть получены синтетически. Типичные токсины, подходящих для применения согласно каким-либо из способов или композиций, раскрываемых в настоящем документе, могут включать в себя или содержать один или несколько аматоксинов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha$ -аманитина,  $\beta$ -аманитина,  $\gamma$ -аманитина,  $\epsilon$ -аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и каких-либо их функциональных производных или аналогов. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин представляет собой или содержит  $\alpha$ -аманитин, который является ингибитором РНК-полимеразы II и III, или его функциональный фрагмент, производное или аналог.

Согласно некоторым вариантам осуществления токсин является низкомолекулярным токсином. Такие низкомолекулярные токсины могут быть связаны со средством (например, моноклональным антителом) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), который может быть использован, например, для кондиционирования тканей субъекта с целью приживания. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин получают из бактерий. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин получают из насекомого. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин содержит или получается из вируса. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин получают из растения или грибка. Согласно некоторым вариантам осуществления токсин является встречающимся в природе токсином или его фрагментом. Согласно некоторым вариантам осуществления такой встречающийся в природе токсин может быть модифицирован относительно его встречающегося в природе эквивалента, например, с удалением каких-либо доменов или областей, что будет облегчать проникновение в клетку, или с заменой одной или нескольких аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления токсин может быть непосредственно соединен или иным образом связан со средством (например, антителом, которое специфически или селективно связывает CD34, CD45 или CD117). Например, средство непосредственно соединяется с одним или несколь-

кими токсинами (например, как химерный белок слияния). Используемые в настоящем документе термины "соединять" и "соединение" в широком смысле относятся к любым физическим, биологическим или химическим связи или объединению двух или более фрагментов или компонентов вместе. Такое соединение может быть непосредственным или опосредованным. Например, раскрываемые в настоящем документе средства (например, биспецифические средства), которые могут быть непосредственно или опосредованно связаны с токсинами. Подобным образом, также раскрываются мутантные протективные антигены (mut-PA), которые могут быть связаны со средством. Также раскрывается фактор (например, N-концевой домен летального фактора (LFN) и/или N-концевой домен вызывающего отек фактора (EFN)), который может быть связан с токсином. Согласно некоторым вариантам осуществления фактор представляет собой или содержит ферментативный фактор.

В некоторых аспектах термин "соединение" относится к функциональному соединению. Например, в настоящем документе предусматриваются любые соединения двух или более фрагментов, которые функционируют с облегчением совместной доставки таких связанных фрагментов внутриклеточно. В некоторых аспектах такое соединение может быть непосредственным соединением или опосредованным соединением. Согласно некоторым вариантам осуществления такое соединение может быть постоянным или временным. Например, в некоторых аспектах при интернализации средства (например, биспецифического средства), связанного с токсином, соединение расщепляется с высвобождением тем самым токсина внутриклеточно и проявлением цитотоксичного эффекта в отношении клетки.

Средства и токсин являются ковалентно или нековалентно соединенными или связанными друг с другом. Такое соединение может быть непосредственным или опосредованным. Например, токсин, выбранный из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки A, модифицированных рициновых аналогов и их комбинаций, может быть непосредственно или опосредованно соединен с антителом, которое селективно связывает CD45 с образованием иммуноксина. Согласно некоторым вариантам осуществления токсина, раскрываемые в настоящем документе, могут быть опосредованно соединены с антителом, как показано, например, на фиг. 1. На фиг. 1 показано, что такие антитела могут быть биотинилированными и соединенными с фрагментом стрептавидин-токсина. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления токсин может быть связан с биотином, который может быть опосредованно соединен с антителом против CD34, против CD45 или против CD117, которое может быть связанным или меченным одним или несколькими из стрептавидина, авидина, нейтравидина и любых других их вариантов. В некоторых аспектах антитела, раскрываемые в настоящем документе, являются гуманизированными.

В некоторых аспектах отношение средства (например, антитела) к токсину составляет приблизительно 0,1:1, приблизительно 0,25:1, приблизительно 0,5:1, приблизительно 1:1, приблизительно 2:1, приблизительно 3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5:1, приблизительно 6:1, приблизительно 7:1, приблизительно 8:1, приблизительно 9:1 или приблизительно 10:1. Согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления такие отношения выражают как отношение химический конъюгат стрептавидиновый тетрамер-токсин (например, химический конъюгат стрептавидиновый тетрамер-сапорин). Например, такой стрептавидиновый тетрамер может содержать в среднем 2,8 молекулы токсина (например, сапорина) и может быть выражен как отношение 1:1 средства к тетрамер-токсину, или, в качестве альтернативы, как отношение 1:2,8 средства к токсину. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение средства (например, антитела) к токсину составляет приблизительно 1:2, приблизительно 1:2,5, приблизительно 1:2,8, приблизительно 1:3, приблизительно, приблизительно 1:3,5, приблизительно 1:4, приблизительно 1:4,5, приблизительно 1:5, приблизительно 1:6, приблизительно 1:7, приблизительно 1:8, приблизительно 1:9 или приблизительно 1:10. Также предусматриваются химеры, в которых антитело и токсин экспрессируется рекомбинантно в виде одного белка. Также предусматриваются области или фрагменты антител, например, конъюгат scFv-токсин, химеры scFv-токсин, мультвалентные формы scFv-токсин, которые могут обеспечивать интернализацию с помощью сшивания рецептора CD45 (например, диатела, тандемный discFv, тандемный triscFv, триатела и/или тетратела). Также предусматриваются конъюгаты антитело-лекарственное средство (например, CD45-ADC), которые также могут быть применимы при гематологических злокачественных новообразованиях в качестве альтернативы трансплантации и на основании настоящего раскрытия, касающегося интернализирующей активности маркера клеточной поверхности (например, рецептора CD45). Согласно некоторым вариантам осуществления такие средства или антитела являются биспецифическими и связывают два маркера клеточной поверхности.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к интернализирующимся конъюгатам (фрагмент антитела) Fab-токсин. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к интернализирующимся конъюгатам (одноцепочечный фрагмент) scFv-токсин. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение, раскрываемое в настоящем документе, относится к диателу - нековалентному димеру одноцепочечного Fv (scFv), нацеливаемому на один или несколько рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, раскрываемое в настоящем документе, относится к двухвалентному (или биспецифическому) (scFv)<sub>2</sub>. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, раскрываемое в настоящем документе,

относится к тандемному scFv. Также предусматриваются интернализирующиеся конъюгаты аптамер-токсин и интернализирующиеся конъюгаты лиганд-токсин или любая химерная или нековалентная комбинация вышеописанного (например, scFv-лиганд-токсин), а также все нековалентные составы (например, биотин-стрептавидин и в том числе стрептавидиновые аналоги нейтравидин и авидин) и химерные молекулы, которые могут быть созданы путем рекомбинантной экспрессии белков слияния, нативного химического лигирования, катализируемой ферментом конъюгации (например, сортазой и другими) или другими способами конъюгации (например, клик-химией с использованием не встречающихся в природе аминокислот, средств на основе NHS-сложного эфира для модификации лизинов, малеимидных средств для модификации цистеина, дисульфидных мостиков). Также предусматривается включение пептидных последовательностей (например, натуральных, не встречающихся в природе и циклических пептидов), которые облегчают интернализацию (например, HIV-TAT, пенетратин, пептид RGD, полиаргинин и варианты) средств и/или токсинов, раскрываемых в настоящем документе.

Способы, раскрываемые в настоящем документе, не ограничиваются опосредованной рецептором интернализацией токсина, а, скорее, предусматривают любые доступные средства селективной доставки токсина во внутриклеточный компартмент клеток целевой ткани. Например, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрываются способы доставки токсинов внутриклеточно с использованием опосредованной порами интернализации.

В настоящем документе раскрываются способы кондиционирования субъекта с целью приживания или способы селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани (например, ткани костного мозга) субъекта путем введения субъекту эффективного количества образующей поры химеры, содержащей мутантный протективный антиген (mut-PA), связанный со средством (например, лигандом, таким как фактор стволовых клеток). Протективный антиген (PA) секретируется *Bacillus anthracis* как растворимая в воде форма-предшественник PA83 (83 кДа), которая подвергается протеолитической активации протеазами фуринового типа с отщеплением 20-кДа фрагмента от N-конца и с образованием тем самым активированного мономера PA, способного формировать предварительные поровые гептамеры. Такая образующая поры химера формирует одну или несколько пор в клеточной мембране популяции эндогенных стволовых клеток и тем самым облегчает доставку последовательного вводимого или совместно вводимого токсина в такую популяцию стволовых клеток. Например, эффективное количество второй химеры, содержащей фактор (например, ферментативный фактор, такой как N-концевой домен летального фактора и/или N-концевой домен вызывающего отек фактора или их фрагменты), связанный с токсином, может быть введено субъекту, после чего токсин интернализируется популяцией эндогенных стволовых клеток с селективным истощением или уничтожением тем самым популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани и кондиционированием субъекта с целью приживания. Согласно некоторым вариантам осуществления фактор представляет собой N-концевой домен летального фактора (LFN) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления фактор представляет собой N-концевой домен вызывающего отек фактора (EFN) или его фрагмент. Как летальный фактор (LF), так и вызывающий отек фактор (EF) нуждаются в связывании с компонентом протективного антигена (PA) для доставки в цитозоль клеток, в котором они проявляют ферментативные активности. 63-кДа C-концевая часть PA образует гептамерные каналы, которые встраиваются в эндосомальные мембраны при низком pH, необходимые для транслокации EF и LF в цитозоль целевых клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления образующий поры фрагмент, такой как мутантный протективный антиген (mut-PA), соединяется со средством, которое применимо для селективного нацеливания или направления такого образующего поры фрагмента в клетки целевых тканей (например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники) (Janowiak, B.E., et al., *Protein Sci.* 18(2): 348-358 (2009); Mourez M. et al., *PNAS* 100(24): 13803-08 (2003); Ming, Y & R Collier, J. *MolMed.* 9(1-2): 46-51 (2003); Rogers M.S., et al., *Cancer Res.* 15; 67(20): 9980-5 (2007)). Например, мутантные протективные антигены (mut-PA) могут быть соединены или иным образом слиты со средствами (например, лигандами или scFv) с созданием химер, которые обеспечивают специфическое по отношению к клеткам формирование пор клеточной поверхности. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления мутантные протективные антигены (mut-PA) могут быть соединены или иным образом слиты с биспецифическим средством (например, биспецифическим антителом) с созданием химер, которые обеспечивают специфическое по отношению к клеткам формирование пор клеточной поверхности. Такие поры клеточной поверхности в свою очередь могут быть использованы или применены для импорта или интернализации введенной (например, совместно введенной или последовательно введенной) химеры N-концевой домен летального фактора-токсин (LFN-токсин) с уничтожением или истощением тем самым клеток целевой ткани.

Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения выбранный токсин может содержать один или несколько летальных факторов, соединенных (например, функционально соединенных) с токсином (например, LFN-SAP). Различные токсины могут быть соединены с LFN, в том числе дифтерийный токсин и/или сапориновый токсин (например, LFN-DTA, LFN-SAP и т.д.). Механизм интернализации присущ PA и LFN и в общих чертах изображен на фиг. 27. В отличие от

некоторых вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем документе, вышеупомянутые варианты осуществления предпочтительно не требуют интернализирующегося маркера, рецептора или интернализирующих свойств антитела/лиганда, а, скорее, основываются на взаимодействии PA и LFN для облегчения доставки токсина внутриклеточно. Согласно некоторым вариантам осуществления средство выбрано из группы, состоящей из scFv, Fab, discFv, bisFcFv, triscFcFv, tandemного scFv, аптамера, антитела и лиганда.

Способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для кондиционирования любого числа целевых тканей субъекта, в том числе, например, ткани костного мозга. Используемый в настоящем документе термин "целевая ткань", как правило, относится к любым тканям субъекта, на которые композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть селективно нацелены. Согласно некоторым вариантам осуществления такие целевые ткани содержат эндогенную популяцию HSC или клеток-предшественников (например, ниша стволовых клеток ткани костного мозга). Согласно некоторым вариантам осуществления целевая ткань представляет собой или содержит ткань костного мозга субъекта.

В некоторых аспектах композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением применимы для немиелоаблативного кондиционирования у субъекта, например, кондиционирования костного мозга, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников. С помощью селективного нацеливания маркера (например, маркера клеточной поверхности CD45) с токсином (например, сапорином), для проявления цитотоксичного эффекта которого требуется проникновение в клетку, настоящее изобретение минимизирует частоту встречаемости и тяжесть неблагоприятных эффектов. Например, частота встречаемости и тяжесть неблагоприятных эффектов обычно ассоциируются с традиционными схемами кондиционирования, например, мукозита, что может быть минимизировано или в некоторых случаях устранено. Подобным образом, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что кондиционирование субъекта с использованием способов и композиций (например, иммунотоксинов CD45-SAP), раскрываемых в настоящем документе, минимизирует частоту встречаемости опасной для жизни тромбоцитопении, нейтропении и потери эритроцитов, все из которых обычно ассоциируются с традиционными способами кондиционирования, для которых зачастую необходимы как облучение, так и цитотоксичные лекарственные средства. Следовательно, в некоторых аспектах композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, характеризуются как являющиеся немиелоаблативными.

Отсутствие нейтропении, наблюдаемое после кондиционирования с CD45-SAP (как показано на фиг. 3B) и наблюдаемое повышение содержания нейтрофилов стало неожиданным результатом с учетом того, что нейтрофилы экспрессируют CD45. Без углубления в конкретную теорию, возможно, что нейтрофилы в отличие от других клеток крови не интернализируют CD45-SAP, или из-за их короткого срока жизни (12 ч) этот эффект не заметен ввиду быстрого оборота популяции клеток. Можно предположить, что быстрое наблюдаемое повышение содержания нейтрофилов может быть ответом на смерть клеток CD45+, поскольку нейтрофилы ответственны за клиренс апоптотических клеток. Не предполагается, что временное повышение содержания нейтрофилов станет неблагоприятным эффектом, поскольку нейтрофилы играют заметную роль в борьбе с бактериальными инфекциями, и, следовательно, повышение их содержания будет ограничивать заболеваемость бактериальной инфекцией, что является основной причиной смертности, связанной с традиционным кондиционированием.

Хотя наблюдали транзиторную лимфопению в В- и Т-клетках, возможно, что она необходима (но возможно не достаточна сама по себе) для возникновения приживления, на что указывает неэффективность ACK2 у иммунокомпетентных животных и в исследованиях в лаборатории авторов настоящего изобретения, демонстрирующих, что регуляторные Т-клетки непосредственно взаимодействуют с HSC в костном мозге и необходимы для персистенции HSC (Fujisaki, J., et al., *Nature* (2011) 474, 216-219). В то время как истощение Т-клеток может быть предметом беспокойства для субъектов с HIV, транзиторный характер истощения может быть приемлемым при индивидуальном оценивании отдельных больных (особенно до развития резко выраженного AIDS). Кроме того, истощение реципиентных Т-клеток может быть выгодным, поскольку это могло бы обеспечить клиренс CCR5-положительных Т-клеток, которые служили бы вирусными резервуарами HIV. Авторы настоящего изобретения не предполагают, что транзиторное истощение Т-клеток будет проблемой для лечения других гемоглобинопатий, и важно отметить, что существующие схемы кондиционирования полностью устраняют популяции Т-клеток и В-клеток.

Отсутствие анемии после кондиционирования с CD45-SAP, о чем свидетельствует отсутствие снижения уровней эритроцитов, гематокрита или гемоглобина, предполагает, что кондиционирование в соответствии со способами, раскрываемыми в настоящем документе, будет иметь значение для возможности трансплантации при анемических состояниях (например, при серповидноклеточной анемии, анемии Даймонда-Блэкфана и талассемии).

Композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения или излечения субъекта с заболеванием (например, нарушением стволовых клеток), при котором может быть полезна трансплантация гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников (например, при серповидно-клеточном заболевании), в том числе, например, способы аутологичной, ал-

логенной, ген-модифицированной и генной терапии. Используемая в настоящем документе фраза "нарушение стволовых клеток" в широком смысле относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, которое можно лечить или излечивать кондиционированием целевых тканей субъекта, и/или путем уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток в целевой ткани (например, путем уничтожения эндогенной HSC или популяции клеток-предшественников из ткани костного мозга субъекта), и/или путем пересаживания или трансплантации стволовых клеток в целевые ткани субъекта. Например, сахарный диабет I типа, как было показано, лечат трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и может быть полезно кондиционирование в соответствии с настоящим изобретением. Подобным образом, в некоторых аспектах композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для кондиционирования субъекта, принимающего лечение от гематологического злокачественного новообразования. В некоторых аспектах способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения, излечения или устранения заболеваний, выбранных из группы, состоящей из следующих заболеваний: серповидно-клеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, связанный с недостатком аденозиндеаминазы SCID (ADA SCID), HIV, метакроматическая лейкодистрофия, анемия Даймонда-Блэкфана и синдром Швахмана-Даймонда. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает или поражен наследственным нарушением крови (например, серповидно-клеточной анемией) или аутоиммунным нарушением.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает или поражен злокачественным новообразованием. Например, злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из гематологических злокачественных опухолей (например, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы или миелодиспластического синдрома) и нейробластомы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает или иным образом поражен метаболическим нарушением. Например, в некоторых аспектах субъект может страдать или иным образом быть пораженным метаболическим нарушением, выбранным из группы, состоящей из заболеваний накопления гликогена, мукополисахаридоза, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидоза, метакроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или нарушений, при которых могут быть полезными методы лечения и терапевтические средства, раскрываемые в настоящем документе, и в том числе без ограничения тяжелого комбинированного иммунодефицита, синдрома Вискотта-Олдрича, гипер-IgM-синдрома, болезни Чедиака-Хигаши, наследственного лимфоцитарного гистиоцитоза, остеопороза, несовершенного остеогенеза, болезней накопления, большой талассемии, серповидно-клеточного заболевания, системного склероза, системной красной волчанки, рассеянного склероза, ювенильного ревматоидного артрита, а также заболеваний или нарушений, описываемых в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 2000 (1) 319-338, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых аспектах композиции иммунотоксина, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для индуцирования переносимости трансплантата солидного органа. Согласно таким вариантам осуществления композиции иммунотоксина и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для истощения или уничтожения популяции клеток из целевой ткани (например, для истощения HSC из ниши стволовых клеток костного мозга). После такого истощения клеток из целевых тканей популяция стволовых или клеток-предшественников у донора органа (например, HSC у донора органа) может быть введена реципиенту трансплантата, и после приживления таких стволовых или клеток-предшественников временно достигается стабильный смешанный химеризм, что тем самым обеспечивает длительную переносимость трансплантированного органа без потребности дополнительных иммуносупрессивных средств. Например, иммунотоксины и способы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для индуцирования переносимости у реципиента трансплантата солидного органа (например, почечного трансплантата, трансплантата легкого, трансплантата печени и трансплантата сердца). Иммунотоксины и способы, раскрываемые в настоящем документе, хорошо подходят для применения в связи с индукцией переносимости трансплантата солидного органа, особенно потому, что низкопроцентное временное или стабильное донорское приживление является достаточным для того, чтобы вызвать долговременную переносимость трансплантированного органа.

Способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, характеризуются их повышенной или улучшенной эффективностью приживления. Используемая в настоящем документе фраза "эффективность приживления", как правило, относится к эффективности, с которой введенная популяция стволовых клеток (например, HSC) пересаживается в кондиционированную целевую ткань субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность приживления повышается по меньшей мере на приблизительно 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 100% или больше. В некоторых аспектах определение эффективности приживления оценивают относительно эффективности приживления способа, при котором приживление выполняют без способов кондиционирования, раскрываемых в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток (например, популяцию экзогенных стволовых клеток) вводят в целевые ткани субъекта после того, как токсин или иммунотоксин (например, иммунотоксин антитело против CD45-SAP) вывелся или рассеялся из целевых тканей

субъекта. Путем обеспечения выведения или снижения иным образом токсина или иммунотоксина до невыявляемых уровней в целевых тканях субъекта способность любого сохранившегося токсина или иммунотоксина оказывать цитотоксичный эффект в отношении введенной популяции стволовых клеток может быть снижена или иным образом устранена, с дополнительным повышением тем самым приживляющей эффективности способов и композиций, раскрываемых в настоящем документе. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят субъекту после снижения концентрации иммунотоксина в целевой ткани субъекта до невыявляемой концентрации. Период времени, необходимый для выведения токсина или иммунотоксина из целевой ткани субъекта, может быть определен с использованием рутинных средств, доступных специалисту в данной области, например, путем выявления концентрации средства, токсина или иммунотоксина в целевой ткани субъекта. Кроме того, период времени, необходимый для выведения токсина или иммунотоксина из целевой ткани субъекта, зависит от или иным образом определяется с учетом, среди прочего, свойств средства, токсина или иммунотоксина, вводимых доз средства, токсина или иммунотоксина, состояния и/или сопутствующих заболеваний субъекта (например, почечной недостаточности) и целевой ткани субъекта. Например, согласно некоторым вариантам осуществления популяцию стволовых клеток вводят в целевую ткань субъекта по меньшей мере через один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, десять, двенадцать, четырнадцать, двадцать один, тридцать шесть, сорок два, пятьдесят шесть, шестьдесят три, семьдесят, восемьдесят, девяносто, сто, сто двадцать дней, шесть месяцев, девять месяцев, двадцать месяцев или больше после того, как иммунотоксин вывелся или распределился из целевых тканей субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, например, млекопитающему или человеку, которому могут быть предоставлены методы лечения, раскрываемые в настоящем документе. При лечении тех состояний заболевания, которые являются специфическими для конкретного животного, такого как субъект-человек, термин "субъект" относится к этому конкретному животному. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек (например, подросток, взрослый или пожилой человек).

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены с выбранными фармацевтически приемлемыми носителями и вспомогательными средствами, описываемыми подробно, например, в L. William, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 22nd ed. Pharmaceutical Press (2012), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых аспектах композиции, раскрываемые в настоящем документе (например, конъюгат CD45-SAP), составляют для парентерального введения субъекту.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения существенной пользы для субъекта (например, кондиционирования целевой ткани субъекта для трансплантации). Например, эффективное количество средств, которые являются предметом настоящего изобретения, может быть, как правило, определено на основании активности таких средств и количества таких средств, которые необходимы для уничтожения или истощения ниши стволовых клеток. Эффективное количество композиций (например, конъюгатов антитело-токсин), необходимое для кондиционирования субъекта или для уничтожения гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественника субъекта, можно легко определить в зависимости от заболевания и других связанных с ним характеристик субъекта. Такие характеристики включают в себя состояние, общее состояние здоровья, возраст, субъективные симптомы, объективный внешний вид, пол и масса тела субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество композиций иммунотоксина, раскрываемых в настоящем документе, достигает максимального истощения стволовых клеток (например, приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 97,5, 98, 99, 99,5% или больше истощения гемопозитических стволовых клеток или стволовых клеток-предшественников из целевых тканей субъекта). Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество композиций, раскрываемых в настоящем документе, определяют на основании массы субъекта. Например, в некоторых аспектах такое эффективное количество композиций, раскрываемых в настоящем документе, представляет собой или содержит одну или несколько доз, варьирующих от приблизительно 10 до 0,01 мг/кг. В некоторых аспектах эффективное количество композиций, раскрываемых в настоящем документе, (например, конъюгата CD45-токсин или CD117-токсин) представляет собой или содержит одну или несколько доз 4,0 мг/кг. В некоторых аспектах эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, представляет собой или содержит одну или несколько доз 3,0 мг/кг. В некоторых аспектах эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, представляет собой или содержит одну или несколько доз 2,0 мг/кг. В некоторых аспектах эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, представляет собой или содержит одну или несколько доз 2,5 мг/кг. В некоторых аспектах эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, представляет собой или содержит одну или несколько доз 2,0 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, (например, конъюгата CD45-токсин или CD117-токсин) представляет собой или содержит одну или несколько доз 1,5 мг/кг. В некоторых аспектах эффективным количеством композиций, раскрываемых в настоящем документе, (например, конъюгат CD45-токсин) представляет собой или содержит одну или несколько доз 1,0 мг/кг.

Также в настоящем документе раскрываются способы и анализы для идентификации кандидатных средств, которые могут быть применимы для селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток в соответствии со способами, раскрываемыми в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы предусматривают стадию введения образца (например, образца, полученного из субъекта), содержащего популяцию стволовых клеток, в контакт с тестируемым средством, связанным с токсином. После такой стадии введения в контакт выполняют определение истощения или уничтожения одной или нескольких клеток популяции стволовых клеток из образца, при этом истощение или уничтожение одной или нескольких клеток популяции HSC или клеток-предшественников после стадии введения в контакт идентифицирует тестируемое средство как кандидатное средство, которое может быть применимо для селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления клетку вводят в контакт с тестируемым средством по меньшей мере на приблизительно 2-24 ч или больше. Используемые в настоящем документе термины "контакт" и "введение в контакт" относятся к сведению двух или более компонентов (например, клетки и средства) вместе или в непосредственную близость друг к другу так, что компоненты могут реагировать. Например, согласно одному варианту осуществления анализы в соответствии с настоящим изобретением предусматривают стадию введения в контакт популяции стволовых клеток с тестируемым средством.

Следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничивается в своем применении деталями, изложенными в настоящем описании или иллюстрированными. Настоящее изобретение охватывает другие варианты осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено различными путями. Также следует учитывать, что фразеология и терминология используются в настоящем документе с целью описания и не должны рассматриваться как ограничивающие.

Хотя некоторые средства, соединения, композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением были описаны конкретно согласно некоторым вариантам осуществления, следующие примеры служат исключительно целям иллюстрации способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением и не предназначены для их ограничения.

Единственное число, используемое в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если четко не указано иное, следует понимать, как предусматривающее объекты во множественном числе. Пункты формулы или описания, которые включают в себя "или" между одним или несколькими представителями группы, считаются удовлетворенными, если один, более чем один или все из представителей группы присутствуют, используются или иным образом имеют отношение к данному продукту или процессу, если не указано иное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует, используется или иным образом имеет отношение к данному продукту или процессу. Настоящее изобретение также включает в себя варианты осуществления, более чем один или все из представителей группы присутствуют, используются или иным образом имеют отношение к данному продукту или процессу. Кроме того, следует учитывать, что настоящее изобретение охватывает все вариации, комбинации и пермутации, в которых одно или несколько из ограничений, элементов, пунктов, описательных терминов и т.д. из одного или нескольких приведенных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт, зависимый от того же независимого пункта формулы изобретения (или, в соответствующих случаях, любого другого пункта формулы изобретения), если не указано иное, или если рядовому специалисту в данной области не было очевидно, что возникнет противоречие или несогласованность. Если элементы представлены в виде перечней (например, в виде группы Маркуша или подобного формата), следует учитывать, что также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой элемент(ы) может быть исключен из группы. Следует учитывать, что, в целом, если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения упоминаются как содержащие конкретные элементы, признаки и т.д., некоторые варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или состоят в основном из таких элементов, признаков и т.д. С целью упрощения такие варианты осуществления не были в каждом конкретном случае конкретно изложены в настоящем документе многословно. Также следует учитывать, что любой вариант осуществления или аспект настоящего изобретения может быть явно исключен из формулы изобретения независимо от того, указано ли конкретное исключение в настоящем описании. Публикации и другие справочные материалы, упомянутые в настоящем документе для описания предшествующего уровня техники настоящего изобретения и для предоставления дополнительных подробностей относительно его осуществления на практике, тем самым включены посредством ссылки.

### Примеры

#### Пример 1.

Авторы настоящего изобретения разрабатывали и исследовали применение меченого биотином мышинового моноклонального антитела против CD45 вместе с конъюгатом стрептавидин-сапорин с образованием иммунотоксина для CD45 (CD45-SAP). Сапорин является представителем ризинового семейства токсинов, которые каталитически инактивируют рибосомы, останавливая синтез белка, что тем самым приводит к клеточной смерти. Однако в отличие от ризицина сапорин не обладает интернализирующим доменом и индуцирует смерть только при связывании с лигандом или антителом, которые интернализи-



руется (Bergamaschi, G., et al., Br J Haematol (1996), 93, 789-794). Это позволяет авторам настоящего изобретения селективно нацеливаться на клетки, которые подлежат уничтожению, с сохранением при этом других тканей и снижением общей токсичности.

Цельные клетки костного мозга обрабатывали с CD45-SAP *ex vivo* и выполняли анализ образования колоний для оценивания кратковременной активности стволовых клеток и клеток-предшественников. Эффективное ингибирование колониеобразующей активности с помощью CD45-SAP наблюдали в зависимости от дозы ( $IC_{50}$  1 нМ), тогда как свободный сапорин не демонстрировал ингибирование роста при 100 нМ.

Затем авторы настоящего изобретения исследовали возможность истощения стволовых клеток в костном мозге *in vivo* введением CD45-SAP в виде однократной инъекции, оцениваемую проточной цитометрией костного мозга, собранного через 8 дней после инъекции. Эту временную точку выбирали как предварительные отчеты, в которых предполагалось, что устойчивое истощение гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников из костного мозга необходимо для проявления эффективного приживания донорских клеток (Хуе, X., et al. Blood (2010), 116, 5419-5422). С использованием оптимального отношения антитело:токсин, которое определяли как 1:1 в предварительном эксперименте (4 мыши на группу), проводили исследование доза-ответ для определения того, что 24 мкг CD45-SAP достигает максимального истощения HSC (приблизительно 98% истощения, 4 мыши на группу, как показано на фиг. 2А). В этой дозе используется небольшое количество сапорина (приблизительно 14%  $LD_{50}$  свободного сапорина). Истощение HSC было специфическим для CD45-SAP, поскольку авторы настоящего изобретения не смогли обнаружить истощение HSC в контрольной группе, получавшей совместную инъекцию с небиотинилированным антителом против CD45 и стрептавидин-сапорином (CD45 Ab + SAP, фиг. 2А). Также тестировали кратковременную активность в отношении клеток-предшественников (анализ колоний) костного мозга после кондиционирования, и авторы настоящего изобретения наблюдали 50% снижение колониеобразующей активности, несмотря на 98% истощение стволовых клеток, как показано на фиг. 2В. Интересно отметить, что, суммарная клеточность (число живых клеток в бедренной кости) фракции костного мозга фактически повышалась у обработанных CD45-SAP животных относительно контроля, вероятно, из-за гемопоэтического восстановления (фиг. 2С). Этот наблюдаемый результат кардинально отличается от низкодозового облучения, которое снижает клеточность костного мозга на 66% в той же временной точке (Andrade, J. et al., Biol Blood Marrow Transplant (2011), 17, 608-619). Таким образом, вышеупомянутое показывает, что средства CD45-SAP, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для эффективного выведения гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников из костного мозга.

Затем авторы настоящего изобретения исследовали, может ли схема однократной дозы CD45-SAP в соответствии с настоящим изобретением обеспечивать длительное приживание донорских клеток. Цельные клетки костного мозга от GFP+ мышей-доноров трансплантировали так, чтобы можно было отслеживать приживание у фона - реципиентов в нулевом GFP. Трансплантаты состояли из инъекцируемых  $1 \times 10^7$  цельных клеток костного мозга (которые содержали приблизительно 500 долговременных стволовых клеток, < 5% всех стволовых клеток у мыши), стандартной дозы при исследованиях трансплантации у мышей по изучению кондиционирования. Использовали цельный костный мозг, а не очищенные стволовые клетки, поскольку он более точно имитирует трансплантационные процедуры в клинике.

С целью характеристики окна для трансплантации GFP+ клетки трансплантировали в различные временные точки после CD45-SAP (через 2, 4, 6, 8, 10 или 12 дней, 5 мышей на группу). На данном этапе отслеживали химеризм в периферической крови в течение 2 месяцев, что выявляло высокие уровни приживания донорского материала (55% для CD45-SAP по сравнению с 1% для контрольных некондиционированных мышей, 55-кратное повышение, как показано на фиг. 2D). Авторы настоящего изобретения определили в предварительных пилотных исследованиях, что приживание и смешанный химеризм являются длительными (наблюдали в течение 4 месяцев). Удивительно, что не наблюдали различия в приживлении между временными точками, что указывает на большое окно трансплантации, как показано на фиг. 2Е. Это контрастирует с основанным на облучении кондиционированием у мышей, при котором оптимальной является трансплантация через 24 ч после облучения. Трехлинейный анализ полного распределения В-клеток, Т-клеток и миелоидных клеток у получавших трансплантацию мышей не выявлял ошибку (фиг. 2F). Анализ на каждой из линий подтверждал, что донорские клетки вносят свой вклад во все 3 линии, что указывает на действительное приживание стволовых клеток, как показано на фиг. 2G. Поскольку миелоидные клетки характеризуются самым быстрым обновлением линии (Tak, T., et al. J Leukoc Biol (2013), 94, 595-601) из-за их короткого срока жизни (12 ч), химеризм миелоидной фракции часто используют в качестве индикатора уровня приживания донорского материала на ранних временных точках (< 4 месяца) (Valcarcel, D., et al. Bone Marrow Transplant (2003), 31, 387-392). Как показано на фиг. 2G, 88% донорский химеризм наблюдали в миелоидной линии через 8 месяцев, период, который считали длительным восстановлением.

Для характеристики CD45-SAP как "немиелоаблативного" кондиционирования далее пытались оп-

ределить, способны ли выжить мыши, кондиционированные средством, но не получившие трансплантата донорских клеток. Обнаружили, что схема кондиционирования в соответствии с настоящим изобретением не была летальной, поскольку все мыши ( $n = 4$ ) выжили при оценивании в течение 100 дней - время завершения исследования. Напротив, мыши, получавшие кондиционирование путем облучения всего организма (ТБИ) умирали за 15-18 дней, если донорские клетки не были трансплантированы. Авторы настоящего изобретения также выполняли серийный анализ крови у мышей на протяжении 100-дневного периода с целью определения потери и восстановления различных клеток крови (фиг. 3А-3D). Как показано на фиг. 3А, CD45-SAP не индуцировал какую-либо потерю эритроцитов, и, что важнее, не наблюдали нейтропению (фиг. 3В) или тромбоцитопению (фиг. 3С; наблюдали только 30% понижение тромбоцитов в день 20; 90% понижение считалось бы тромбоцитопеническим). Несмотря на то, что CD45-SAP демонстрировал эффективное истощение В- и Т-лимфоцитов, восстановление было быстрым, при этом 20% восстановление происходило за 6 дней, и полное восстановление за 30 дней, как показано на фиг. 2D.

#### Пример 2.

Затем авторы настоящего изобретения оценивали токсичность иммунотоксина CD45-SAP по сравнению с токсичностью облучения у не получавших трансплантацию мышей. Эксперименты по определению зависимости от времени выполняли на мышах для сравнения токсичности кондиционирования с помощью CD45-SAP с эквивалентной сублетальной 5-Gy дозой облучения всего организма. Через два дня после кондиционирования мышью умерщвляли и подвергали грызунов патологоанатомическому обследованию для фиксации бедренной кости и вилочковой железы, приготовления срезов и окрашивания гематоксилином и эозином. Также выполняли полные анализы крови и анализы проточной цитометрии. Некондиционированные мыши представляли контроль.

Как показано на фиг. 7А и 7В, намного более быстрое восстановление популяции В- и Т-клеток наблюдали в получающей CD45-SAP группе по сравнению с облучением. Как показано на фиг. 7D и 7F, клеточность костного мозга и число колониеобразующих единиц (анализ активности клеток-предшественников) также были менее подвержены неблагоприятному воздействию CD45-SAP по сравнению с облучением.

Через два дня после кондиционирования живых мышей (под анестезией) закрепляли на изготовленном по требованиям заказчика 2-фотонном конфокальном микроскопе прямого изображения. Высокомолекулярный конъюгат вводили внутривенной инъекцией и изображения кости черепной крышки (свода черепа) получали через 30 минут после введения с целью оценивания целостности сосудов. Некондиционированные мыши представляли собой контроль. Как показано на фиг. 8 и в отличие от облучения, не наблюдали повреждение вилочковой железы после кондиционирования с CD45-SAP по сравнению с облучением.

Как показано на фиг. 9, гистология костного мозга подтверждает, что целостность кровеносных сосудов сохранялась интактной с CD45-SAP по сравнению с облучением. На фиг. 10, кроме того, показано, что через 2 дня после кондиционирования с иммунотоксином CD45-SAP целостность сосудов сохранялась.

Таким образом, вышеупомянутые результаты показывают, что схема кондиционирования с использованием CD45-SAP ассоциируется с пониженной токсичностью по сравнению с облучением всего организма.

#### Пример 3.

Для исследования применимости иммунотоксина CD45-SAP в коррекции животной модели серповидно-клеточного заболевания авторы настоящего изобретения создавали химеры мышей с серповидно-клеточным заболеванием с помощью миелоаблативного кондиционирования реципиентов дикого типа с последующей трансплантацией клеток костного мозга от мышей "knock-in" с человеческим серповидным гемоглобином (мышей Townes). Через два месяца после трансплантации мышью с серповидно-клеточным заболеванием кондиционировали с CD45-SAP и трансплантировали им цельные клетки костного мозга от мышью-доноров дикого типа CD45.1.

Исследовали три разных трансплантационных кондиционирования (представленных на фиг. 11А) с  $n = 6$  мышью на кондиционирование. Мыши в группе кондиционирования А получали  $1,3 \times$  стандартную дозу CD45-SAP, используемую ранее у мышью дикого типа в день 0, с последующей трансплантацией с  $1 \times 10^7$  донорских цельных клеток костного мозга в день 3 ( $1 \times$  доза клеток). Мыши в группе кондиционирования В получали инъекции  $1 \times$  CD45-SAP в день 0 и день 3 с последующей трансплантацией  $1 \times 10^7$  цельных клеток костного мозга в день 6 ( $1 \times$  доза клеток). Мыши в группе кондиционирования С получали  $1,3 \times$  CD45-SAP в день 0 и трансплантацию с  $1 \times 10^7$  цельных клеток костного мозга дикого типа в дни 3 и 6 ( $2 \times$  доза клеток). Приживление донорских клеток и коррекцию заболевания оценивали через 4 месяца после трансплантации и сравнивали с соответствующими по возрасту и полу не получающими трансплантацию химерами с серповидными клетками или с мышью дикого типа.

Как показано на фиг. 11А-11D, уровни эритроцитов, ретикулоцитов, гематокрита и гемоглобина возвращались к нормальным. Кроме того, как показано на фиг. 12А-12В, серповидный белок гемоглобин

в крови больше не наблюдали. Также выполняли наблюдение за патологией селезенки и печени и, как показано на фиг. 13А-13В, размер селезенки восстанавливался до нормального у кондиционированных с CD45-SAP мышей. Таким образом, вышеупомянутые результаты демонстрируют коррекцию серповидно-клеточного заболевания на мышинной модели.

Пример 4. С целью дальнейшего оценивания иммунотоксинов в качестве стратегии кондиционирования для освобождения от эндогенных HSC их ниш авторы настоящего изобретения нацеливались на антигены клеточной поверхности, представленные на HSC (мышь и человек) с использованием основанных на сапорине иммунотоксинов и проводили эксперименты в соответствии с настоящим изобретением на полностью иммунокомпетентных мышах C57B1/6, фон, который признан сложным для основанного на антителе кондиционирования.

Иммунотоксины получали путем объединения подходящих биотинилированных моноклональных антител с конъюгатом стрептавидин-сапорин и истощение HSC оценивали по экспериментальной схеме на фиг. 14А. Среди оцениваемых кандидатных антигенных целей (CD45, CD49d, CD84, CD90, CD133, CD135 и CD184) в *in vivo* скрининге в соответствии с настоящим изобретением основанный на сапорине иммунотоксин, нацеливающийся на CD45 (CD45-SAP), как выявили, эффективно истощает HSC костного мозга (фиг. 15А). Исследования оптимизации отношения и дозы (фиг. 14В и 15В) идентифицировали однократную дозу CD45-SAP (путем *i.v.* инъекции) 3 мг/кг при отношении 1:1 антитела к стрептавидин-сапорину, которая достигала максимального истощения иммунофенотипических HSC (98% с помощью проточной цитометрии). Кроме истощения HSC колониеобразующая активность клеток-предшественников костного мозга понижалась зависимым от дозы образом, но была менее подвержена неблагоприятному воздействию, чем HSC (фиг. 14В). Конкурентная трансплантация костного мозга подтверждала истощение функциональных HSC с помощью CD45-SAP (фиг. 15С). Как и ожидали, небитинилированное антитело против CD45 плюс стрептавидин-сапорин было не способно истощать HSC *in vivo* (фиг. 14С). Кроме того, поскольку используемое моноклональное антитело против CD45 (клон 104) селективно распознает изоформу CD45.2 мышинного CD45, иммунотоксин был не способен истощать HSC у конгенных мышей CD45.1 (фиг. 15D). Совместно эти результаты согласуются с антиген-специфическим истощением HSC с помощью CD45-SAP.

Для характеристики иммунотоксина CD45-SAP авторы настоящего изобретения выполняли серии *in vitro* экспериментов с использованием линий мышинных гематопозитических клеток EML (линии мультипотентных клеток-предшественников) и EL4 (линии Т-клеточной лимфомы). Клетки EML сходны с гематопозитическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками, поскольку их рост зависит от фактора стволовых клеток (SCF) роста, и они подвергаются мультилинейной дифференцировке при цитокиновой стимуляции. Кроме клона 104 антитела против CD45 авторы настоящего изобретения также исследовали клон 30-F11 (другое антитело против CD45), и оба клона эффективно индуцировали смерть клеток EML и EL4 с подобными значениями IC<sub>50</sub>, варьирующими от 40 до 71 пМ (фиг. 14D и 15E). Небитинилированное антитело в присутствии стрептавидин-сапорина не могло индуцировать клеточную смерть *in vitro* (фиг. 14D), что демонстрировало специфичность нацеленного сапорина. Количественное определение интернализации рецептора CD45 в клетках EL4 с использованием клона 104 демонстрировало 7% интернализацию антитела отдельно и 12% интернализацию комплекса антитело-стрептавидин на протяжении 24-часового периода (фиг. 14E). Удивительно, что несмотря на эквивалентную активность обоих клонов *in vitro* только клон 104 был способен к эффективному истощению HSC *in vivo* (фиг. 15F). Оценивание *in vivo* персистенции (через 24 ч после введения) показывало заметное связывание клона 104 с периферическими лейкоцитами, спленоцитами и HSC-содержащими клетками костного мозга LKS (Lin-cKit<sup>+</sup> Scal<sup>+</sup>), тогда как клон 30-F11 демонстрировал плохую персистенцию *in vivo* (фиг. 15G).

Совместно вышеупомянутые результаты подтверждают, что *in vivo* связывание и интернализация иммунотоксина CD45-SAP эффективно истощает HSC в костном мозге.

Пример 5.

Далее авторы настоящего изобретения исследовали, может ли истощение HSC с помощью CD45-SAP обеспечивать приживание донорских клеток. Поскольку на донорский трансплантат может негативно влиять несвязанный CD45-SAP *in vivo*, авторы настоящего изобретения варьировали время трансплантации для идентификации оптимального окна трансплантации (фиг. 16А) и исследовали трансплантацию 2 типов донорских клеток (в разных когортах): конгенных клеток CD45.1, на которые не может нацеливаться CD45-SAP, или сингенных клеток CD45.2-GFP, которые потенциально могут быть целями. Для трансплантации использовали дозу десять миллионов цельных клеток костного мозга донора, что согласуется с предшествующими исследованиями уменьшенного кондиционирования мышей и соответствует приблизительно 2% всего костного мозга мыши, что тем самым имитирует трансплантацию у человека, при которой собирают приблизительно 5% костного мозга донора.

Через четыре месяца после трансплантации в исследовании в соответствии с настоящим изобретением наблюдали 75-90% приживание донорских клеток в периферической крови обоих типов донорских клеток у животных, кондиционированных с CD45-SAP (фиг. 16В и 16С). Поразительно, что эквивалентные уровни приживания наблюдали для клеток, трансплантированных где-то через 2-12 дней после

введения CD45-SAP (фиг. 16B), что демонстрировало образование широкого окна трансплантации. Некондиционированные контрольные животные не демонстрировали результативное приживление донорского материала с уровнем химеризма <2% (фиг. 16B и 16C). Подобно химеризму периферической крови также наблюдали 90% донорский химеризм в HSC костного мозга через 4 месяца после трансплантации у кондиционированных с CD45-SAP животных (фиг. 17A). Оценивание зависимости от времени обнаруживаемого периферического химеризма было стабильным и достигало 93-94% через 15 месяцев для обоих типов донорских клеток (фиг. 16D и 17B). Анализ периферической крови трансплантата через 8 месяцев после трансплантации показывал нормальное распределение линий миелоидных, В- и Т-клеток, что указывает на действительное объективное приживление стволовых клеток (фиг. 16E), что дополнительно подтверждали серийной трансплантацией у летально облученных вторичных реципиентов (фиг. 17C). Кондиционирование с CD45-SAP также облегчало приживление очищенных стволовых клеток, так как инъекция 2000 LKS CD34-CD150+ или LKS CD48-CD150+ HSC давала 60% химеризм через четыре месяца (фиг. 16F), тогда как некондиционированные контрольные животные не могли демонстрировать результативное приживление (0-0,03% химеризм).

С целью сравнения CD45-SAP с другими способами кондиционирования выполняли дальнейшее изучение, сравнивающее традиционное TBI и экспериментальное основанное на CD117-антагонистическом антителе кондиционирование, с использованием клона ACK2 моноклональных антител. Как показано на фиг. 17D, химеризм достигался через 4 месяца после трансплантации с помощью CD45-SAP у мышей дикого типа, что соответствовало кондиционированию с помощью TBI 5 Gy (50% летальной дозы TBI). Кондиционирование с помощью ACK2 не могло обеспечить существенное приживление (<3% приживления) у такого иммунокомпетентного фона. Инъекция одной десятой дозы клеток (одного миллиона клеток костного мозга) подтвердила, что CD45-SAP и TBI 5 Gy достигают эквивалентного приживления (приблизительно 20% химеризм) при такой более низкой дозе клеток со значительной энергией (приблизительно 90% химеризм), если способы кондиционирования объединяли (фиг. 17E).

Пример 6.

Поскольку CD45-SAP и TBI 5 Gy давали эквивалентные уровни химеризма, авторы настоящего изобретения определяли присущие токсичности этих двух подходов кондиционирования путем измерения различных параметров крови и костного мозга у кондиционированных мышей, которые после кондиционирования не подвергались трансплантации. Как CD45-SAP, так и TBI 5 Gy были немиелоаблативными, поскольку они обеспечивали длительное выживание (> 6 месяцев) без трансплантации стволовых клеток (n = 12 мышей/группа, данные не показаны). Оценивание зависимости от времени после кондиционирования показывало, что CD45-SAP обладал значительно менее неблагоприятными немедленными эффектами в отношении клеточности костного мозга (фиг. 18A) с более быстрым восстановлением до нормальных уровней, чем облучение (6 против 12 дней для CD45-SAP по сравнению с облучением, соответственно). Подобным образом, эффект CD45-SAP в отношении клеток-предшественников костного мозга был менее значительным, чем эффект, проявляемый облучением, как измеряли с помощью *in vitro* анализов активности колониеобразующих клеток (CFC) (фиг. 18B). Несмотря на общую пониженную токсичность CD45-SAP в отношении клеточности костного мозга и кратковременных клеток-предшественников CD45-SAP истощал HSC столь же эффективно, что и облучение (приблизительно 98% истощение, фиг. 18C), хотя истощение HSC с помощью облучения было более немедленным.

Гистологический анализ бедренной кости, выполняемый через 2 дня после кондиционирования, показывал, что CD45-SAP не только сохраняет клеточность костного мозга в большей степени, чем облучение, но также поддерживает целостность сосудов в костном мозге, поскольку RBC оставались в кровеносных сосудах, подобно необработанным контрольным мышам (фиг. 19). Напротив, облученные 5 Gy мыши, демонстрировали более низкие уровни ядродержащих клеток в костном мозге с повсеместной дисперсией эритроцитов, что указывало на явное разрушение сосудистой сети. Для подтверждения этих различий авторы настоящего изобретения выполняли функциональный анализ с оцениванием целостности сосудов. Водили высокомолекулярный (2 МДа) родамин-декстран внутривенной инъекцией через 2 дня после кондиционирования и выполняли интравитальную визуализацию костного мозга свода черепа. Как показано на фиг. 18D, родамин-декстран эффективно сохранялся в кровеносных сосудах мышей, кондиционированных с CD45-SAP (подобно некондиционированному контролю), что предполагает поддержание целостности сосудов. У облученных реципиентов однако наблюдали диффузный декстран по всему костному мозгу, что свидетельствует о нарушении целостности сосудов.

Совместно эти результаты показывают, что CD45-SAP является менее вредным для клеточности костного мозга, гематопозитических клеток-предшественников и целостности сосудов, чем облучение 5 Gy, при достижении, между тем, эффективного истощения HSC и обеспечении сопоставимых уровней приживления.

Пример 7.

Восстановление приобретенного и врожденного иммунитета имеет первостепенное значение для выживания после HSCT, и его недостаточность после кондиционирования способствует заболеваемости и смертности, связанной с трансплантацией. Анализ периферической крови после кондиционирования

(без трансплантации) выявлял значительные различия между кондиционированием с CD45-SAP и TBI 5 Gy. В отличие от облучения, которое подавляло миелоидные клетки (Mac1+, Gr1+) в течение 28 дней, кондиционированные с CD45-SAP мыши демонстрировали немедленное и существенное повышение (3-кратное) циркулирующих миелоидных клеток, которое возвращалось до нормальных уровней через 12 дней (фиг. 20A). С целью тестирования врожденного иммунитета кондиционированных мышей провоцировали системной инфекцией *Candida albicans* (через 2 дня после кондиционирования), клинически релевантным штаммом грибка, который инфицирует больных с HSCT с ослабленным иммунитетом, после кондиционирования. Мыши, кондиционированные с TBI 5 Gy были высоко чувствительными к спровокации *Candida* с 100% летальностью, происходящей в течение 3 дней после инфицирования (фиг. 20B, р-значение по сравнению с контролем < 0,0001). Напротив, мыши, кондиционированные с CD45-SAP были значительно более устойчивыми (р-значение по сравнению с облучением < 0,0002) с общим выживанием в течение 50 дней, подобным необработанному контролю (р-значение контроля по сравнению с CD45-SAP = 0,57).

Как В-клетки, так и Т-клетки одинаково и эффективно истощались через 2 дня после кондиционирования с CD45-SAP и 5 Gy (фиг. 20C и 21B). Однако восстановление лимфоцитов происходило существенно быстрее у обработанных CD45-SAP мышей. В-клетки восстанавливались до 80% в течение 18 дней (фиг. 21B), а Т-клетки восстанавливались до 70% в течение 12 дней (фиг. 20C). Напротив, облученным мышам дополнительно потребовалось еще 30-36 дней для восстановления В- и Т-клеток до сопоставимых уровней (фиг. 20C и 21B). Более быстрое восстановление Т-клеток, наблюдаемое после CD45-SAP, возможно связано с дифференциальными эффектами в отношении вилочковой железы, органа, важного для создания новых Т-клеток, который, как известно, повреждается кондиционированием с TBI. Гистологическое исследование вилочковой железы через 2 дня после кондиционирования демонстрировало, что облучение индуцировало заметную атрофию вилочковой железы со значительным снижением точности тимоцитов в коре; тогда как не наблюдали атрофию вилочковой железы после CD45-SAP (фиг. 20D). Авторы настоящего изобретения тестировали сохранность функции вилочковой железы путем измерения присутствия Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC), молекулярного признака реаранжировки Т-клеточных рецепторов, которые не реплицируются геномной ДНК и, поэтому, отмечают вновь образованные Т-клетки. Количественное определение TREC на мг ткани вилочковой железы через 3 дня после кондиционирования (фиг. 20E) показало, что *de novo* выход Т-клеток после обработки CD45-SAP составлял 84% нормального (р-значение по сравнению с контролем = 0,025), тогда как TBI 5 Gy снижало выход Т-клеток до 8% (р-значение по сравнению с контролем < 0,0001). Облучение также снижало массу вилочковой железы на 80%, тогда как CD45-SAP уменьшал массу вилочковой железы на 50% (фиг. 21C).

CD45-SAP не индуцирует анемию, поскольку уровни эритроцитов, гематокрита и гемоглобина оставались нормальными, тогда как облучение индуцировало умеренную анемию через 6 дней после кондиционирования (фиг. 21D-21F). На тромбоциты обе схемы кондиционирования влияли умеренно со снижением уровней до 40% от нормальных (фиг. 21G). Не наблюдали заметную токсичность в желудочно-кишечном тракте, печени и яичниках либо при CD45-SAP, либо при облучении, как оценивали с помощью некропсии и гистологии (данные не показаны).

Совместно вышеупомянутые результаты предполагают, что кондиционирование с CD45-SAP сохраняет миелоидный врожденный иммунитет, избегает анемии и облегчает быстрое восстановление В- и Т-лимфоцитом по сравнению с эквивалентным кондиционированием дозой облучения.

#### Пример 8.

С целью исследования способности кондиционирования с CD45-SAP обеспечивать лечебную трансплантацию на релевантной модели доброкачественной гемоглобинопатии исследователи в соответствии с настоящим изобретением использовали мышей "knock-in", несущих человеческий ген серповидного гемоглобина, что имитирует серповидно-клеточное заболевание человека. Эти мыши демонстрировали пониженное число эритроцитов, уровни гематокрита и гемоглобина с повышенными количествами незрелых красных клеток крови (ретикулоцитов) и аномально большими селезенками. Предыдущие исследования трансплантации на мышях с серповидными клетками показывали, что 25% миелоидный химеризм возвращает параметры крови до 90% нормы, при этом для полной коррекции патофизиологии органа требуется 70% миелоидный химеризм.

Так как мыши с серповидными клетками имели повышенные уровни WBC (по сравнению с диким типом), авторы настоящего изобретения повторно оптимизировали дозу CD45-SAP и определяли, что однократная доза 4 мг/кг или 2 последовательные дозы по 3 мг/кг CD45-SAP достигали максимального истощения стволовых клеток ( $\approx 99\%$  истощения, фиг. 23A). На основании этих доз исследовали 3 протокола трансплантации (группы А-С), показанные на фиг. 22A и 23B (6 мышей/группа). Все 3 группы (18/18 мышей), кондиционированные с CD45-SAP и получившие трансплантацию клеток дикого типа, демонстрировали > 90% донорский миелоидный химеризм через 4 месяца после трансплантации (фиг. 22B). Полная нормализация уровней эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и ретикулоцитов также достигалась после трансплантации (фиг. 22C и 23C-E).

Серповидный белок гемоглобин в крови полностью замещался нормальным белком гемоглобина, как оценивали с помощью анализа с нативным PAGE (фиг. 22D). Кроме того, мазки крови демонстрирова-

ли отсутствие эритроцитов серповидной формы по сравнению с контролем с серповидными клетками (фиг. 22E), и размеры селезенки также возвращались к нормальным (фиг. 22F и 23F). Кондиционирование с CD45-SAP, таким образом, достигает > 90% миелоидного химеризма с полной коррекцией заболевания серповидно-клеточной анемии после трансплантации.

#### Пример 9.

Авторы настоящего изобретения выполняли анализ жизнеспособности для демонстрации активности различных антител и конъюгатов антитело-сапоринов, нацеливающихся на маркеры CD45 и CD117. ACK2 представляет собой клон антагонистического моноклонального антитела против mCD117, который ингибирует связывание фактора стволовых клеток 1 (SCF) с рецептором. 2B8 представляет собой клон неантагонистического моноклонального антитела против mCD117, которое в отличие от ACK2 не ингибирует связывание SCF. Выполняли анализ MTS путем обработки линии клеток-предшественников EML варьировавшими концентрациями антител, отдельных или связанных с сапорином. Клетки выращивали в среде, содержащей 200 нг/мл SCF, и жизнеспособность оценивали через 72 ч после обработки. Использовали 10 мкМ стауроспорина в качестве контроля со 100% смертностью. Как показано на фиг. 24, конъюгат 2B8-сапорин демонстрировал киллинг линии клеток-предшественников EML *in vitro*. Напротив, антитела 2B8 (CD117) и 104 (CD45) не были активными, если не были объединены с сапорином с образованием интернализирующегося конъюгата антитело-токсин. Кроме того, антитело ACK2 (CD117) демонстрировало собственную активность истощения клеток без сапорина из-за антагонизма взаимодействия SCF-CD117. Клетки, которые требуют SCF, являются чувствительными к антагонизму.

Следующие исследования проводили для оценивания различных моноклональных антител, направленных на известные антигены на HSC. Как показано на фиг. 25A и 25B, некоторые антитела давали очень высокое истощение HSC (например, антитела, нацеливающиеся на маркеры CD45, CD117, CD49d и CD184), тогда как некоторые другие обладали высокой токсичностью (например, CD34, CD93, CD201 и ESAM). Хотя, как ACK2-SAP, так и 2B8-SAP достигали фенотипического истощения HSC, как показано на фиг. 26, только 2B8-SAP обеспечивал приживание (фиг. 27 и 28). Как показано на фиг. 27, ACK2-SAP превосходит ACK2 отдельно, но 2B8-SAP является много более эффективным, чем тот и другой, и сопоставимым с CD45-SAP.

Затем после трансплантации 10 миллионов цельных клеток костного мозга GFP через 8 дней после введения конъюгата антитело-токсин оценивали химеризм (через 16 недель после трансплантации) в клетках крови и HSC костного мозга. Как показано на фиг. 28, конъюгат CD117 ACK2-SAP не обеспечивал приживание, тогда как конъюгат CD117 2B8-SAP обеспечивал эффективное приживание (80-98%) донорских клеток GFP.

#### Пример 10.

Выполняли *in vivo* исследование по оптимизации дозы CD117 2B8-SAP (n = 4 мышей на группу) с помощью внутривенного введения 2B8-SAP самкам мышей C57/B16 возрастом девять недель. Мышам вводили 2B8-SAP и оценивали истощение стволовых клеток через 8 дней после введения. Как показано на фиг. 29, не наблюдали явную токсичность при 0,1-0,5× дозах, тогда как наблюдали 2/4 смерти при 0,75× дозе и 4/4 смерти наблюдали при 1,0× дозе.

Как показано на фиг. 30, 2B8-SAP оставляет периферическую кровь интактной и, таким образом, является немиелоаблативным и нелимфоаблативным через 8 дней после введения. Как также показано на фиг. 30, наблюдали увеличение миелоидного компартмента, и в отличие от CD45-SAP, который истощает В- и Т-клетки, 2B8-SAP, что удивительно, не истощает В- и Т-клетки. Таким образом, основанный на клоне 2B8 CD117-сапорин избегает истощения Т-клеток и В-клеток, что указывает на сохранение врожденного иммунитета. Не наблюдали какой-либо потери RBC, связанной с анемическими заболеваниями.

#### Пример 11.

Авторы настоящего изобретения пытались сравнивать активность различных клонов CD117-SAP *in vivo* с клоном CD45-SAP и облучением 5 Gy всего организма (n = 5 мышей на группу). Выбранный конъюгат CD117-SAP вводили внутривенно самкам мышей C57/B16 возрастом девять недель и оценивали число стволовых клеток в ткани костного мозга субъектных животных через 8 дней после введения конъюгата антитело-токсин. Как показано на фиг. 31, конъюгат ACK2-SAP не мог существенно истощить HSC, тогда как два конъюгата неантагонистического антитела против CD117-токсин (2B8-SAP и 3C11-SAP) были более эффективными при истощении HSC в качестве иммунотоксинов.

Затем авторы настоящего изобретения выполняли шестнадцатинедельное исследование приживания (n = 5 мышей на группу) с конъюгатом CD117 2B8-SAP на самках мышей C57/B16 возрастом девять недель, как схематически показано на фиг. 32. Трансплантировали 10 миллионов цельных клеток костного мозга CD45.1 через 8 дней после введения конъюгата CD117 SAP-2B8 и химеризм оценивали через 16 недель после трансплантации. Суммарный химеризм крови составлял 80% донорского; донорские клетки вносили свой вклад в гранулоциты (миелоидные), Т-клетки и В-клетки. Как показано на фиг. 32, конъюгат неантагонистического 2B8-SAP достигал эффективного приживания донорских клеток у полностью иммунокомпетентных животных со значительным расширением тем самым диапазона заболеваний до включения отличных от SCID состояний. Вышеупомянутое представляет собой альтернативный подход

для лечения злокачественных и предзлокачественных заболеваний, а также во многих таких случаях рост злокачественных или предзлокачественных клеток зависит от SCF, и, вероятно, они особенно чувствительны к этому реагенту.

#### Пример 12.

Далее авторы настоящего изобретения пытались оценить *in vitro* активность конъюгатов антител против CD45 человека-токсин в отношении человеческих гемопоэтических стволовых клеток. Иммунотоксина CD45-SAP создавали из клонов 104 антител против антитела человека - MEM-28 и H130. Человеческие Jurkat CD45+ гемопоэтические клетки обрабатывали *in vitro* различными концентрациями иммунотоксинов антител против CD45 человека-SAP в течение 72 ч и оценивали жизнеспособность клеток с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано на фиг. 33, значения IC<sub>50</sub> для клеточного киллинга составляли 130 и 200 пМ для клонов MEM-28 и H130 соответственно, что свидетельствует о том, что интернализация CD45 не является видоспецифической и что такие конъюгаты CD45-токсин демонстрируют эффективность в отношении человеческих гемопоэтических клеток *in vitro*.

Активность конъюгата антител против CD34 человека-SAP в отношении человеческих гемопоэтических стволовых клеток (HSC) также оценивали *in vitro*. Человеческие мобилизованные CD34+ HSC периферической крови обрабатывали *in vitro* различными концентрациями иммунотоксинов антител против CD34 человека-SAP в течение 96 ч и оценивали жизнеспособность клеток с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано на фиг. 34, значения IC<sub>50</sub> для клеточного киллинга составляли приблизительно 100 пМ для обоих тестируемых клонов 581 и 4H11.

#### Пример 13.

Мутантные протективные антигены (mut-PA) могут быть слиты с лигандами или scFv с образованием химер, которые обеспечивают специфическое для клетки образование пор на клеточной поверхности, которые могут импортировать химеры N-концевой летальной фактор-токсин (LFN-токсин). Могут быть использованы различные LFN-токсины, в том числе дифтерийный токсин (LFN-DTA, LFN-SAP и т.д.). Механизм интернализации важен для PA и LFN, не требует интернализирующегося рецептора или свойств интернализации антител/лиганд и изображен на фиг. 35.

Авторы настоящего изобретения пытались продемонстрировать активность LFN-DTA в отношении человеческих гемопоэтических стволовых клеток (HSC) *in vitro*. Человеческие мобилизованные CD34+ HSC периферической крови обрабатывали *in vitro* различными концентрациями иммунотоксина LFN-DTA в присутствии 10 нМ WT-PA в течение 96 ч и оценивали жизнеспособность клеток с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано на фиг. 36, 100% клеточную смерть наблюдали при концентрации LFN-DTA 1 фемтомоль, что показывает, что LFN-DTA может быть использован для обеспечения эффективного киллинга человеческих HSC.

Также оценивали активность LFN-DTA в отношении гемопоэтических клеток на различных линиях клеток путем обработки таких клеток *in vitro* различными концентрациями иммунотоксина LFN-DTA в течение 48 ч и оценивали жизнеспособность клеток с использованием MTS-анализа (Promega). Как показано на фиг. 37, LFN-DTA демонстрировал активность в отношении обработанных линий клеток.

#### Пример 14.

С целью исследования того, способны ли терапевтические средства кондиционирования, раскрытые в настоящем документе, обеспечивать лечебную трансплантацию у людей, авторы настоящего изобретения использовали дальнейшее оценивание эффективности таких терапевтических средств на одном или нескольких субъектах-людях (например, на иммунокомпетентном субъекте-человеке), страдающих серповидно-клеточным заболеванием. В частности, авторы настоящего изобретения рассматривали введение нарастающих доз иммунотоксинов, раскрываемых в настоящем документе, субъектам-людям для оценивания эффективности таких иммунотоксинов при кондиционировании (например, истощении или уничтожении) клеток из целевых тканей субъекта.

Ткани (например, ткань костного мозга) субъектов-людей, страдающих или иным образом пораженных серповидно-клеточным заболеванием, могли быть кондиционированы путем введения субъектам иммунотоксинов (например, иммунотоксинов антител против CD45-SAP), раскрываемых в настоящем документе. После кондиционирования с использованием иммунотоксинов, раскрываемых в настоящем документе, предполагалось, что стволовые клетки из целевой ткани субъекта будут истощены. Затем могут быть оценены исходные общие анализы клеток крови (например, количество эритроцитов, уровни гематокрита и гемоглобина), наличие серповидного белка гемоглобина в крови субъекта и размер селезенки субъекта до кондиционирующей терапии и контролировали в ходе и после нее.

После кондиционирования субъектов-людей и рассеивания иммунотоксина из целевой ткани субъекта популяция стволовых клеток (например, популяция экзогенных стволовых клеток) была бы введена, трансплантирована или иным образом пересажена в кондиционированную целевую ткань субъекта. Оценивался бы химеризм в процентах до и после приживления.

Авторы настоящего изобретения предполагают, что после введения стволовых клеток в целевые ткани (например, ткани костного мозга) субъекта могла бы наблюдаться полная нормализация уровней эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и ретикулоцитов у субъекта, а серповидный белок гемоглобин в

крови субъекта мог быть полностью замещен нормальным белком гемоглобина (например, как оценивали бы анализом нативного PAGE). Подобным образом, предполагается, что мазки крови, получаемые после приживления, будут демонстрировать отсутствие эритроцитов серповидной формы относительно исходных значений или контроля с серповидными клетками, а размеры селезенки также вернутся к нормальным.

Как наблюдали на животных моделях заболевания, предполагали, что введение нацеленных иммунотоксинов, раскрываемых в настоящем документе, субъектам-людям также позволит избежать токсичности, традиционно ассоциированной с существующими подходами генотоксичного кондиционирования, с сохранением при этом врожденного иммунитета, целостности вилочковой железы и с обеспечением более быстрого восстановления приобретенных иммунных клеток, избегая при этом потери целостности сосудов, нежелательной анемии и продолжительных цитопений. Учитывая эти преимущества, авторы настоящего изобретения предполагают, что вышеупомянутое исследование продемонстрировало бы эффективность иммунотоксинов и связанных с ними способов, раскрываемых в настоящем документе, в качестве средства для кондиционирования субъектов-людей (например, субъектов доброкачественной трансплантации). Таким образом, вышеупомянутое также подтверждает немиелоаблативный характер иммунотоксинов, раскрываемых в настоящем документе, а также способность иммунотоксинов и связанных с ними способов, раскрываемых в настоящем документе, полностью устранять заболевание у субъектов-людей.

Пример 15.

Авторы настоящего изобретения проводили анализ киллинга человеческих CD34+ гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Иммунотоксины создавали с использованием сапорина из перечисленных коммерчески доступных человеческих моноклональных антител (mAb) и нацеливания на различные рецепторы клеточной поверхности и тестировали по их способности убивать полученные из человеческого костного мозга CD34+ HSC в течение 5 дней. Иммунотоксины, которые убивали более 20% человеческих CD34+ HSC, показаны ниже в таблице и представлены на фиг. 39.

Таблица. Анализ киллинга человеческих CD34+ HSC

Цель mAb	Клон mAb	Иммунотоксин	Концентрация mAb (нМ)	Вторичный токсин	% клеточной смерти
HLA-DR	L243	HLA-DR (L243)-SAP	3	3 нМ стрептавидин-сапорин	49,68553459
CD11a	TS2/4	CD11a (TS2/4)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	49,48805461
CD18	TS1/18	CD18 (TS1/18)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	40,9556314
CD34	581	CD34 (581)-SAP	10	10 нМ стрептавидин-сапорин	82,38
CD34	4H11	CD34 (4H11)-SAP	3	3 нМ стрептавидин-сапорин	64,77987421
CD41/61	A2A9/6	CD41/61 (A2A9/6)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	23,07692308
CD43	CD43-10G7	CD43 (CD43-10G7)-SAP	10	20 нМ Fab-сапорин	88,7312187
CD45	BHPT-1	CD45 (BHPT-1)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	21,97802198
CD45	orb12060	CD45 (orb12060)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	43,3447099
CD45	2D1	CD45 (2D1)-SAP	3	3 нМ стрептавидин-сапорин	27,04402516
CD47	CC2C6	CD47 (CC2C6)-SAP	3	3 нМ стрептавидин-сапорин	94,96855346
CD58	TS2/9	CD58 (TS2/9)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	58,24175824
CD71	CY1G4	CD71 (CY1G4)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	98,97610922
CD71	OKT9	CD71 (OKT9)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	98,9010989
CD84	CD84.1.21	CD84 (CD84.1.21)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	45,05119454
CD97	VIM3b	CD97 (VIM3b)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	54,60750853
CD117	A3C6E2	CD117 (A3C6E2)-SAP	3	3 нМ стрептавидин-сапорин	33,05785124
CD133	EMK08	CD133 (EMK08)-SAP	10	20 нМ Fab-сапорин	46,9115192
CD133	TMP4	CD133 (TMP4)-SA)-SAP	10	3 нМ стрептавидин-сапорин	50,16694491
CD162	KPL-1	CD162 (KPL-1)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	62,79863481
CD166	3a6	CD166 (3a6)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	21,97802198
CD205	HD83	CD205 (HD83)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	30,76923077
CD361	MEM-216	CD361 (MEM-216)-SAP	3	20 нМ Fab-сапорин	63,58866737

Таким образом, вышеупомянутое свидетельствует о том, что иммунотоксины в соответствии с на-



стоящим изобретением демонстрируют киллинговую активность в отношении человеческих CD34+ HSC.

Пример 16.

Получали CD45-SAP и, как в целом изображено на фиг. 40А, выполняли исследование трансплантации на иммунокомпетентных мышах Balb/c. Иммунокомпетентным мышам Balb/c возрастом 8 недель вводили инъекцией 3 мг/кг CD45-SAP (клона 104) или 1,5 мг/кг CD117-SAP (клона 2В8) и трансплантировали 10 млн цельных донорских клеток костного мозга через 6 дней после иммунотоксина. Оценивали общий суммарный и миелоидноспецифический донорский химеризм в периферической крови животных через 16 недель после трансплантации. Как показано на фиг. 40В, CD45-SAP и CD117-SAP обеспечивали эффективное приживание донорских клеток по сравнению с некondиционированными контрольными мышами (по меньшей мере  $n = 3$  мышей/группа).

Затем авторы настоящего изобретения выполняли исследование, предусматривающее трансплантацию человеческих CD34+ донорских клеток мышам NSG с ослабленным иммунитетом, как показано на фиг. 41А. Мышей NSG с ослабленным иммунитетом возрастом 8 недель кондиционировали с облучением 2 Gy, 3 мг/кг CD45.1-SAP или 1,5 мг/кг CD117-SAP и трансплантировали им человеческие CD34+ донорские клетки пуповинной крови через 6 дней после иммунотоксина. Оценивали суммарный человеческий донорский химеризм в периферической крови через 16 недель после трансплантации ( $n = 5$  мышей/группа), как показано на фиг. 41В.

Как показано на фиг. 41В, фиг. 42А и 42С, кондиционирование с облучением 2 Gy, CD117-SAP или CD45.1-SAP обеспечивало высокие уровни приживания человеческих клеток в костном мозге через 16 недель после трансплантации. Как показано на фиг. 42С, человеческие донорские клетки в костном мозге главным образом состояли из В-клеток с некоторым количеством миелоидных клеток и небольшим количеством Т-клеток.

### Обсуждение

Вышеупомянутые результаты являются первой демонстрацией интернализирующегося не меченого радиоактивно иммунотоксина, используемого как монопрепарат для эффективного кондиционирования полностью иммунокомпетентных животных для HSCT, и авторы настоящего изобретения считают, что это первый пример негенотоксичного кондиционирования и последующей HSCT, демонстрирующий коррекцию заболевания на животной модели. Поскольку рецептор CD45 экспрессируется исключительно гематопозитическими клетками, CD45 может быть идеальным маркером и целью иммунотоксина, что минимизирует токсичность для негематопозитических тканей.

Наблюдаемое отсутствие нейтропении (как показано на фиг. 3В) после кондиционирования с CD45-SAP и наблюдаемое наращивание нейтрофилов стало неожиданным результатом, учитывая, что нейтрофилы экспрессируют CD45. Без углубления в конкретную теорию, возможно, что нейтрофилы, в отличие от других клеток крови, не интернализируют CD45-SAP, или, поскольку у них короткий срок жизни (12 часов), этот эффект не заметен из-за быстрого оборота популяции клеток. Можно предположить, что быстрое наблюдаемое наращивание нейтрофилов может быть ответом на смерть CD45+ клеток, поскольку нейтрофилы отвечают за клиренс апоптотических клеток. Не предполагается, что транзитное наращивание нейтрофилов будет неблагоприятным эффектом, поскольку нейтрофилы играют заметную роль в борьбе с бактериальными инфекциями, и, следовательно, их наращивание будет ограничивать частоту встречаемости бактериальной инфекции, что является основной причиной традиционной смертности, связанной с кондиционированием.

Несмотря на то, что наблюдали транзиторную лимфопению в В- и Т-клетках, возможно, что это необходимо (но вероятно недостаточно само по себе) для возникновения приживания, о чем свидетельствует неэффективность АСК2 у иммунокомпетентных животных и исследования в лаборатории авторов настоящего изобретения, демонстрирующие, что регуляторные Т-клетки взаимодействуют непосредственно с HSC в костном мозге и необходимы для персистенции HSC (Fujisaki, J., et al., *Nature* (2011) 474, 216-219). Хотя истощение Т-клеток может быть предметом беспокойства для больных HIV, транзитный характер истощения может быть приемлемым при индивидуальном оценивании отдельных больных (особенно до развития резко выраженного AIDS). Кроме того, истощение Т-клеток реципиента может быть выгодным, поскольку это позволило бы вывести CCR5-положительные Т-клетки, которые служат вирусными резервуарами HIV. Авторы настоящего изобретения не предполагают, что транзитное истощение Т-клеток будет проблемой для лечения других гемоглобинопатий, и важно отметить, что существующие схемы кондиционирования полностью уничтожают популяции Т-клеток и В-клеток.

Отсутствие анемии после кондиционирования CD45-SAP, о чем свидетельствует отсутствие снижения уровней эритроцитов, гематокрита или гемоглобина, свидетельствует о том, что кондиционирование с CD45-SAP будет релевантным для возможности трансплантации при анемических состояниях (например, при серповидноклеточной анемии, анемии Даймонда-Блэкфана и талассемии).

Применение ранее исследуемых антител против CD117 может быть нацелено на негематопозитические CD117+ клетки (например, клетки-предшественники сердца, клетки желудочно-кишечного тракта, нервные клетки и клетки репродуктивной системы). Кроме того, предполагают, что успешное кондиционирование с использованием антагонистов CD117 будет ограничиваться больными с ослабленным иммунитетом, а доклинические исследования предполагают, что данный подход может привести к тяжелой

нейтропении, тромбоцитопении и анемии - факторам, которые могут ограничивать широкую применимость.

Применение белковых иммунотоксинов обеспечивает значительные преимущества по сравнению с облучением всего организма, алкилирующими ДНК средствами или радиоиммунотерапией (RIT). В дополнение к специфичности, которая достигается путем нацеливания антител, потребность в опосредованной рецептором интернализации белкового токсина значительно снижает риск нецелевой и побочной токсичности (например, в клетках ниши). Хотя RIT против CD45 на данный момент проходит клиническое испытание как миелоаблативная альтернатива традиционному кондиционированию больных с острым миелоидным лейкозом (AML) и миелодиспластическим синдромом (MDS), он приводит к токсичностям, подобно традиционному кондиционированию, в том числе к нейтропении, лимфопении и тромбоцитопении. Напротив, вышеупомянутые исследования показывают, что нацеливание на CD45 с использованием токсина на основе белка избегает нейтропении, анемии и повреждения вилочковой железы, с обеспечением тем самым быстрой регенерации костного мозга и периферических лимфоцитов, по-видимому, за счет избегания токсичности для нецелевых клеток ниши. Поэтому иммунотоксины на основе белка могут быть предпочтительными при доброкачественных состояниях, при которых стабильный смешанный химеризм является достаточным для излечения первопричинного заболевания (например, состояний гемоглобинопатии и SCID). Кроме того, повышенная стабильность и экономически эффективное производство иммунотоксинов на основе белка будет способствовать широкому применению, особенно в странах, где гемоглобинопатии больше распространены. Кроме того, поскольку иммунотоксины на основе белка в отличие от RIT не индуцируют повреждение ДНК, они могут лучше подойти для кондиционирования больных предзлокачественной анемией Фанкони, которые генетически предрасположены к гиперчувствительности к повреждающим ДНК средствам и традиционному кондиционированию.

Можно предположить, что подход, основанный на проверке и подтверждении принципа действия, используемый в вышеупомянутых исследованиях, может привести к специфическим к HSC иммунотоксинам, которые полностью сохраняют иммунитет, обеспечивая при этом приживление. Для достижения этой цели вышеупомянутые исследования предлагают несколько соображений. Поскольку HSC преимущественно находятся в покоящемся не делящемся состоянии, будет интересно определить, обладают ли токсины ингибиторы синтеза белка (например, сапорины, модифицированные аналоги рибцина, токсин псевдомонады или дифтерийный токсин) привилегией в осуществлении истощения HSC, поскольку они индуцируют смерть независимо от клеточного цикла, в отличие от антимиотических малых молекул, используемых на данный момент в конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC). Хотя предыдущее исследование показало, что CD45 будет непригодной целью для интернализации иммунотоксинов из-за его низкой частоты интернализации, авторы настоящего изобретения отметили, что интернализация 12% достаточна для достижения мощного истощения HSC для *in vivo* применимости. Поскольку CD45 в высокой степени экспрессируется с 200000 молекулами на лейкоцит, абсолютное число интернализированных молекул, а не частота интернализации отдельно, определяет целевую пригодность. Кроме того, еолин благоприятной *in vivo* персистенции для достижения широкого окна трансплантации может потребоваться высокоаффинные иммунотоксины, которые минимизируют теряемое и нежелательное нацеливание донорных клеток.

Совместно представленные в настоящем документе результаты подтверждают применение и эффективность нацеливающегося на человеческий CD45 и/или CD117 иммунотоксина в качестве менее токсичной немиелоаблативной схемы кондиционирования. Более того, такие результаты поразительно и неожиданно подтверждают нацеливание на CD45+ и CD117+ клетки как жизнеспособную цель кондиционирования и дают определенные преимущества и различия (например, относительно радиоиммунотоксина CD45). Такие наблюдения особенно удивляют, учитывая, что моноклональные антитела, нацеленные на CD45, ранее не считались жизнеспособной стратегией интернализации (Press, et al., Blood. (1994), 83(5): 1390-1397). Например, нацеливающиеся на CD45 иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, являются стабильными при хранении и будут экономически эффективными для изготовления, тогда как радиоиммунотоксин CD45 имеет короткий период полувыведения (из-за радиоактивного распада) и требует высокоспециализированной и дорогостоящей инфраструктуры для производства. В отличие от радиоиммунотоксина CD45, который имитирует миелоаблативную природу облучения, нацеливающиеся на CD45 иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, не истощают нейтрофилы и тромбоциты и, поэтому, как ожидается, минимизируют риск для больного и необходимость в паллиативной помощи после трансплантации.

Кроме того, способы и композиции, раскрываемые в настоящем документе, селективно нацеливаются на CD45+ и/или CD117+ клетки, поскольку интернализация является необходимым условием для клеточной смерти. Напротив, хотя радиоиммунотоксин CD45 будет специфически связываться с гематопоэтическими клетками, смерть не зависит от интернализации и будет происходить в соседних клетках, подверженных облучению (в том числе нежелательному облучению селезенки и печени). Важно отметить, что облучаемые радиацией клетки, которые включают в себя клетки, содержащиеся в нише, имеют важное значение для продолжения приживления (Wang, Y., et al., Free Radic Biol Med (2010), 48, 348-356;

Wang, Y., et al., Blood (2006), 107, 358-366; и Madhusudhan, T., et al., Stem Cells Dev (2004), 13, 173-182). Таким образом, хотя радиоиммунотоксин CD45 подходит для ВМТ у больных со злокачественным новообразованием (например, когда требуется миелоаблативное кондиционирование, чтобы обеспечить 100% донорный химеризм), CD45- и/или CD117-иммунотоксины, раскрываемые в настоящем документе, подходят для лечения субъектов, если частичный химеризм является достаточным для устранения доброкачественного заболевания и минимизирует риски в ходе процедуры кондиционирования. Пониженный риск применимости CD45 и/или CD117 иммунотоксинов в качестве стабильного при хранении монопрепарата, вероятно, позволят более широко использовать трансплантацию костного мозга (как аллогенную, так и аутологичную генную терапию) даже в больницах, в которых на данный момент отсутствует инфраструктура (например, облучатель) или средства паллиативной помощи для выполнения традиционной ВМТ.

До настоящего времени ни один из способов на основе не меченного радиоактивно антитела успешно не кондиционировал иммунокомпетентных животных, и CD45-SAP, CD117-SAP и связанные с ними композиции и способы, раскрываемые в настоящем документе, представляют собой первый пример этого. Более того, антитело ACK2 (антагонист рецептора c-kit) является примером подхода к антителу, который работает только у иммунодефицитных мышей и не может кондиционировать иммунокомпетентных животных. Интернализирующиеся антитело-иммунотоксины при кондиционировании какого-либо животного ранее не использовались.

Хотя клиническая применимость иммунотоксинов в противораковой терапии в основном была ограничена проблемами иммуногенности и кумулятивной токсичности, ограничивающей дозу, эти факторы не применимы к кондиционированию перед трансплантацией HSC, где подходит нерекуррентное применение. Кроме того, множество данных о безопасности, полученных в ходе предыдущих клинических испытаний иммунотоксина, нацеленных на гематологические злокачественные новообразования, фактически может способствовать быстрому переходу к клиническому применению. Представленные в настоящем документе результаты в значительной степени свидетельствуют о том, что CD45-SAP, CD117-SAP или аналогичные иммунотоксины на основе белка могут быть применимы при трансплантации стволовых клеток, чтобы позволить лечение заболеваний, которые в настоящее время ограничиваются токсичностями существующих схем кондиционирования.

#### **Материалы и способы**

##### **Общие способы и статистические характеристики**

Размеры образцов для исследований на животных (как правило,  $n = 5$  мышей/группа в каждом эксперименте) основывались на предшествующей подобной работе без применения дополнительных статистических оценок. Все статистические характеристики вычисляли с использованием непарного  $t$ -критерия Стьюдента с использованием двустороннего анализа кроме данных по методу Каплана-Мейера, которые анализировали с помощью логарифмического рангового критерия Кокса-Мантеля.

Использовали буквенно-цифровое кодирование для маскировки данных патологии образцов и подсчета колониеобразующих клеток (CFC).

##### **Животные**

Все исследования на животных выполняли с одобрения институционального IACUC. Самок мышей CD45.2 дикого типа (C57BL/6J), конгенных мышей CD45.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ), мышей GFP (CBуJ.B6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J) и мышей с серповидными клетками (B6;129-Hbamt1(HBA)Tow Hbhtm2(HBG1,HBB\*)Tow/Hbhtm3(HBG1,HBB)Tow/J) приобретали у компании Jackson Laboratories. Для экспериментов использовали мышей возрастом приблизительно 9 недель, если не указано иное. Для экспериментов с серповидными клетками создавали серповидноклеточные химеры путем трансплантации летально облученным (однократная доза 9,5 Gy, облучатель с цезием-137, JL Shephard & Associates) мышам C57BL/6J возрастом 6 недель 5 млн цельных клеток костного мозга (BM), собранных от мышей с серповидными клетками. Иммунотоксиковое кондиционирование и трансплантацию у серповидноклеточных химер выполняли через 8 недель после создания химер.

##### **Получение антител и иммунотоксинов**

Биотинилированные моноклональные антитела против CD45 (клон 30-F11), против CD45.2 (клон 104), против CD49d (клоны 9C10) и против CD84 (клон mCD84,7) приобретали у компании BioLegend. Биотинилированные моноклональные антитела против CD90 (клон 30-H12), против CD133 (клон 13A4), против CD184 (клон CD184) и против CD135 (клон A2F10) приобретали у компании eBioscience. Антагонистическое антитело против CD117 (клон ACK2) приобретали у компании BioLegend и вводили инъекцией при 28 мг/кг. Иммунотоксины получали путем объединения биотинилированных антител (MW160 кДа) с конъюгатом стрептавидин-сапорин (MW 135 кДа, Advanced Targeting Systems) при мольном отношении 1:1, а затем разбавляли в PBS непосредственно перед применением. Расчеты дозы допускали объединенную молекулярную массу 295 кДа для иммунотоксинов. In vivo введение иммунотоксина выполняли с помощью внутривенных инъекций (объемом 300 мкл).

##### **In vitro анализ клеточной смерти**

In vitro эксперименты по клеточной смерти, предусматривающие клетки EL4 (ATCC TIB-39) или EML (ATCC CRL-11691), выполняли в 96-луночных планшетах с 5000 клеток/луночка, высеянных в 100

мкл среды для культуры клеток, содержащей различные концентрации иммунотоксина. Выполняли три независимых эксперимента с тремя техническими повторностями в каждом эксперименте. Клетки EML тестировали в присутствии 200 нг/мл рекомбинантного мышинового фактора стволовых клеток (R&D Systems). Через 72 ч определяли жизнеспособность клеток с использованием MTS-анализа CellTiter (Promega). Использовали обработанные PBS и обработанные 10 мкМ стауропоорином клетки (Sigma Aldrich) в качестве живых и мертвых контролей соответственно.

#### **Измерение интернализации антитела**

Оценивали *in vitro* интернализацию антитела, как описывалось ранее. Вкратце, клетки EL4 (200000/мл) в полной среде (RPMI без фенолового красного, 10% FBS) высевали в 96-луночные планшеты с 20 нМ AF488-меченного антитела против CD45.2 (клон 104, BioLegend) или смесь 1:1 биотинилированного антитела против CD45.2 и конъюгата стрептавидин-AF488 (Life Technologies). После 24 ч инкубации клетки дважды промывали и повторно суспендировали в PBS, содержащем 2% FBS. Образцы делили на двое и половину инкубировали с 0,25 мг/мл поликлонального тушащего антитела против AF488 (клон A-11094, Life Technologies). Сигнал AF488 в образцах с тушащим антителом и без такового определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Для определения эффективности тушения и вычисления частоты интернализации осуществляли неокрашенные контроли и контроли в нулевой момент времени.

#### **In vivo персистенция антитела**

Мышам *i.v.* инъекцией вводили конъюгат стрептавидин-AF488, предварительно смешанный с биотинилированным антителом против CD45 (отношение 1:1 в PBS, 1,8 мг/кг). Через 24 ч после введения собирали кровь, ВМ и селезенку и определяли сигнал AF488 с помощью проточной цитометрии. Клетки ВМ совместно окрашивали коктейлем линий (BD Biosciences), антителами против cKit и против Scal с целью определения сигнала AF488 в популяции клеток-предшественников Lin-cKit+Scal+ (LKS). Сигнал AF488 в спленocyтах и клетках периферической крови оценивали во фракции CD45+ клеток после *ex vivo* окрашивания антителом против CD45 PeCy7.

#### **Анализ и трансплантация ВМ**

Клетки ВМ для трансплантации или анализа собирали с помощью дробления всех конечностей или одной бедренной кости, соответственно. Определяли суммарную клеточность с помощью общего анализа с полным подсчетом клеток крови (CBC) с использованием прибора Abaxis VetScan HM5 и выполняли анализы колоний клеток-предшественников согласно инструкциям изготовителя (Stem Cell Technologies). Иммунофенотипическое количественное определение стволовых клеток выполняли с помощью проточной цитометрии с использованием коктейля линий антител, антител против cKit, против Scal, против CD48 и против CD150, и стволовые клетки определяли как Lin-cKit+Scal+CD48-CD150+. Для трансплантаций цельных ВМ 10 миллионов клеток в 300 мкл PBS вводили внутривенной инъекцией. Для инъекций очищенных стволовых клеток цельные клетки ВМ истошали по определенным линиям путем отбора с использованием магнитных частиц (BD Biosciences) перед FACS-сортировкой LKS CD48-CD150+ или LKS CD34-CD150+ клеток. Каждой мыши вводили инъекцией две тысячи очищенных стволовых клеток. Вторичные трансплантации выполняли путем инъекции 1 млн клеток ВМ от первично кондиционированных и получивших трансплантацию мышей (через 4 месяца после трансплантации) и вводили инъекцией вторично летально облученным реципиентам (однократной дозой 9,5 Gy). Конкурентные трансплантации выполняли путем инъекции 1 миллиона клеток ВМ, содержащих при отношении 1:1 конкурирующих клеток CD45.1 и тестируемых клеток CD45.2, летально облученным (однократной дозой 9,5 Gy) конгенным реципиентам CD45.1.

#### **Анализ периферической крови**

У когорт мышей (как правило, 4 мыши/группа) периодически забирали кровь или их окончательно обескровливали путем сердечного кровопускания. Уровни лейкоцитов (WBC), гемоглобина, эритроцитов (RBC), тромбоцитов и гематокрита определяли количественно с помощью анализа CBC (Abaxis VetScan HM5). Для количественного определения Т-клеток, В-клеток и миелоидных клеток с помощью проточной цитометрии образцы крови лизировали с помощью RBC, фиксировали перед окрашиванием антителами против CD45, против B220, против CD3, против Mac1 и против Gr1 и вычисляли абсолютные числа Т-клеток, В-клеток и миелоидных клеток с использованием данных проточной цитометрии и значений WBC. Донорский химеризм периферической крови определяли с помощью проточной цитометрии с использованием антител против CD45.1 и CD45.2 для трансплантаций, предусматривающих донорские клетки CD45.1. Для трансплантаций с использованием донорских клеток CD45.2-GFP химеризм был основан на GFP+ событиях в гейтировании по CD45+. Частоты встречаемости ретикулоцитов в популяции эритроцитов определяли с помощью проточной цитометрии с использованием красителя тиазола оранжевого (реагент Retic-COUNT, BD Biosciences). Анализ нативного PAGE белка гемоглобина выполняли на Any-kD Precast Gels (Bio-Rad) с использованием лизированных образцов цельной крови.

#### **Патология и гистология**

В различные временные точки (через 2, 4, 6 и 8 дней после кондиционирования) мышей умерщвляли, фиксировали в растворе Боуэна (Sigma Aldrich) и подвергали некропсии и гистологии. Выполняли два независимых эксперимента с 1 мышью/группа. Выполняли окрашивание гематоксилином и эозином

на залитых парафином срезах печени, селезенки, бедренной кости, почки, кишечника, лимфатических узлов, вилочковой железы и яичников для оценивания токсичности. Представленные типичные изображения согласуются между двумя независимыми экспериментами.

#### **Интравитальная визуализация целостности сосудов**

Прижизненную визуализацию мышшиной сосудистой сети ВМ свода черепа у кондиционированных мышей (через 2 дня после кондиционирования) или необработанных контрольных мышей выполняли с использованием изготовленного по требованиям заказчика мультифотонного микроскопа (Thorlabs, Inc.), соединенного с фемтосекундным волоконным лазером с высокой энергией импульса (Cazadero FLCPA, Calmar laser) с длинами волны возбуждения, установленными на 775 и 950 нм. Водно-иммерсионный 60x/1,00w объектив (LUMPLFLN60XW, Olympus) обеспечивал 415×415-мкм поле зрения и 0,5-5-мкм шаги смещения по оси Z использовали для глубины 150-200 мкм. Мышей держали под анестезией (смесь 1,35% изофурана/кислорода) и центральную температуру тела поддерживали с использованием нагретой пластины. U-образным разрезом на скальпе обнажали черепную кость, на которую наносили 2% метилцеллюлозный гель для согласования показателей преломления. Сигнал генерации второй гармоники (возбужденный при 387,5 нм) использовали для визуализации костного коллагена и определения интересующей области. Мыши, находящейся под микроскопом, проводили ретро-орбитальную инъекцию 2 МДа конъюгата родамин-декстран (150 мкл D-7139 3,3 мг/мл, Life Technologies) и непрерывно регистрировали сигнал родамина (возбуждение 585 нм) (13 кадров/с) в течение первых 2-5 мин после инъекции. Последовательные изображения собирали до 30 мин после инъекции. Изображения, сделанные аналогичные моменты времени после введения декстрана, использовали для сравнения между группами, и выполняли 2 независимых эксперимента с n = 1 мышшь/группа. Настройки контрастности и яркости изображений на графических материалах корректировали исключительно для отображения.

#### **Системная провокация с *Candida albicans***

*Candida albicans*, штамм SC5314 дикого типа (ATCC MYA-2876), выращивали в течение ночи из замороженных исходных штаммов на среде с дрожжевым экстрактом, пептоном и декстрозой (YPD) (BD Biosciences) с 100 мкг/мл ампициллина (Sigma) на орбитальном встряхивателе при 30°C. После осаждения центрифугированием и промывания холодным PBS дрожжи подсчитывали с использованием гемцитометра и плотность клеток доводили в PBS до 75000 CFU на 200 мкл. Мышам вводили инъекцией через боковую хвостовую вену 75000 CFU и обследовали животных ежедневно. Умиравших мышей гуманно умерщвляли.

#### **Количественное определение T-рецепторных эксцизионных колец (TREC) вилочковой железы**

Количественное определение TREC выполняли, как описывалось ранее. Вкратце, собирали вилочковую железу у некондиционированных мышей, кондиционированных с TBI 5 Gy или CD45-SAP мышей (через 3 дня после кондиционирования). Суммарную ДНК экстрагировали с использованием TRIZOL после гомогенизации ткани на приборе Bullet Blender Storm BBX24 (Next Advance, Inc.). Определяли количество ДНК с помощью UV-Vis и использовали 1 мкг ДНК на образец в качестве входящей для ПЦР в режиме реального времени. Для вычисления абсолютного числа sjTREC на образец использовали стандартную кривую мышшиной плазмиды sjTREC.

### **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ кондиционирования субъекта для приживания стволовых клеток, при этом способ предусматривает селективное истощение или уничтожение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта путем введения субъекту эффективного количества интернализирующегося антитела или его фрагмента, связанного с токсином, причем антитело или его фрагмент специфически или селективно связывается с белком клеточной поверхности, экспрессированным гемопоэтической стволовой клеткой или клеткой-предшественником; при этом токсин интернализируется популяцией эндогенных стволовых клеток и истощает или уничтожает популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников в целевой ткани, тем самым кондиционируя субъекта для приживания стволовых клеток; при этом целевая ткань представляет собой костный мозг.

2. Способ пересаживания стволовых клеток субъекту, при этом способ предусматривает введение популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевой ткани субъекта, при этом целевая ткань представляет собой костный мозг и при этом субъекту ранее вводили эффективное количество интернализирующегося антитела или его фрагмента, связанного с токсином, который интернализируется популяцией эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников и селективно истощает или уничтожает популяцию эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта; причем антитело или его фрагмент специфически или селективно связывается с белком клеточной поверхности, экспрессированным гемопоэтической стволовой клеткой или клеткой-предшественником.

3. Способ лечения нарушения стволовых клеток у субъекта, при этом способ предусматривает введение популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта, при этом введенная популяция стволовых

клеток приживается в целевой ткани субъекта, при этом целевая ткань представляет собой костный мозг, и при этом субъекту ранее вводили эффективное количество интернализирующегося антитела или его фрагмента, связанного с токсином, который интернализируется популяцией эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта и истощает или уничтожает популяции эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта; причем антитело или его фрагмент специфически или селективно связывается с белком клеточной поверхности, экспрессированным гемопоэтической стволовой клеткой или клеткой-предшественником.

4. Способ селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей антитело или его фрагмент и токсин; при этом популяция эндогенных HSC или клеток-предшественников экспрессирует маркер CD45 и при этом антитело или его фрагмент селективно связывается с CD45, токсин интернализируется популяцией эндогенных HSC или клеток-предшественников и токсин истощает или уничтожает популяции эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани, и при этом целевая ткань представляет собой костный мозг.

5. Способ селективного истощения или уничтожения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или клеток-предшественников в целевой ткани субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества анти-CD117 антитела или его фрагмента и токсина; при этом популяция эндогенных HSC или клеток-предшественников экспрессирует маркер CD117, при этом токсин интернализируется популяцией эндогенных HSC или клеток-предшественников и истощает или уничтожает популяцию эндогенных HSC или клеток-предшественников в целевой ткани; и при это целевая ткань представляет собой костный мозг.

6. Способ по пп.1-5, при котором токсин интернализируется путем опосредованной рецептором интернализации.

7. Способ по пп.1 и 5, дополнительно предусматривающий стадию введения популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта после истощения или уничтожения популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, при этом введенная популяция стволовых клеток приживается в целевой ткани субъекта.

8. Способ по пп.2, 3 и 7, при этом способ повышает эффективность приживления введенной популяции стволовых клеток в целевой ткани по сравнению со способом, выполняемым с использованием только стадии введения популяции стволовых клеток в целевую ткань субъекта.

9. Способ по любому из пп.1-3, при котором эндогенные стволовые клетки экспрессируют один или несколько маркеров и при этом антитело или его фрагмент селективно связывается с одним или несколькими маркерами или с их фрагментом или эпителием.

10. Способ по пп.1-3 и 6-9, при котором антитело или его фрагмент связывается с клеточной поверхностью белка, выбранного из группы, состоящей из CD45, CD49d (VLA-4), CD49f (VLA-6), CD51, CD84, CD90, CD117, CD133, CD134 и CD184 (CXCR4).

11. Способ по пп.2, 3 и 7, при котором популяцию стволовых клеток вводят в целевую ткань субъекта после рассеивания токсина из целевой ткани.

12. Способ по пп.1-11, при котором токсин выбран из группы токсинов, состоящей из сапорина, дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки A, цепных производных рицина A, низкомолекулярного токсина и их комбинаций.

13. Способ по пп.1-12, при котором токсин не является радиоиммунотоксином.

14. Способ по пп.1-13, при котором антитело или его фрагмент непосредственно связывается с токсином.

15. Способ по пп.1-13, при котором антитело или его фрагмент опосредованно связывается с токсином.

16. Способ по п.15, при котором антитело или его фрагмент является биотинилированным.

17. Способ по п.15, при котором антитело или его фрагмент связывается с химерой стрептавидин-токсин.

18. Способ по пп.1-3 или 6-17, при этом антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из клона 104 антитела против CD45, клона 2B8 антитела против CD117, клона 2B11 антитела против CXCR4, клона АСК2 антитела против CD117, клона 3С11 антитела против CD117, антигенсвязывающего фрагмента клона антитела 104, антигенсвязывающего фрагмента клона антитела 2В11 и антигенсвязывающего фрагмента клона антитела 2В8, антигенсвязывающего фрагмента клона антитела АСК2 и антигенсвязывающего фрагмента клона антитела 3С11.

19. Способ по пп.1-18, при котором субъект является иммунокомпетентным.

20. Способ по пп.1-3, при котором антитело или его фрагмент связывается с клеточной поверхностью белкового маркера, выбранного из группы, состоящей из CD13, CD33, CD34, CD44, CD45, CD49d: VLA-4, CD49f: VLA-6, CD59, CD84: семейства CD150, CD90: Thy1, CD93, CD105: эндоглина, CD123: IL-3R, CD126: IL-6R, CD133, CD135: рецептора Flt3, CD166: ALCAM, CD184: CXCR4, промиллина 2, эритропоэтина R, молекулы селективной адгезии эндотелиальных клеток, CD244, Tie1, Tie2, MPL, G-CSFR

или CSF3R, IL-1R, gp130, рецептора фактора, ингибирующего лейкоз, рецептора онкостатина М, эмбигина и IL-18R.

21. Способ по пп.1-20, при котором токсин включает в себя ингибитор РНК-полимеразы II и/или III.

22. Способ по п.21, при котором ингибитор РНК-полимеразы II и/или III включает в себя аматоксин.

23. Способ по п.22, при котором аматоксин выбран из группы, состоящей из  $\alpha$ -аманитина,  $\beta$ -аманитина,  $\gamma$ -аманитина,  $\xi$ -аманитина, аманина, аманинамида, амануллина, амануллиновой кислоты и их функциональных фрагментов, производных или аналогов.

24. Способ по пп.1-20, при котором токсин включает в себя повреждающую ДНК молекулу.

25. Способ по п.24, при котором повреждающая ДНК молекула выбрана из группы, состоящей из антитубулинового средства, сшивающего ДНК средства, алкилирующего ДНК средства и дезинтегрирующего митоз средства.

26. Способ по п.25, при котором повреждающая ДНК молекула включает в себя майтансин или его функциональные фрагменты, производные или аналоги.

27. Способ по пп.1-26, при котором антитело или его фрагмент является биспецифическим.

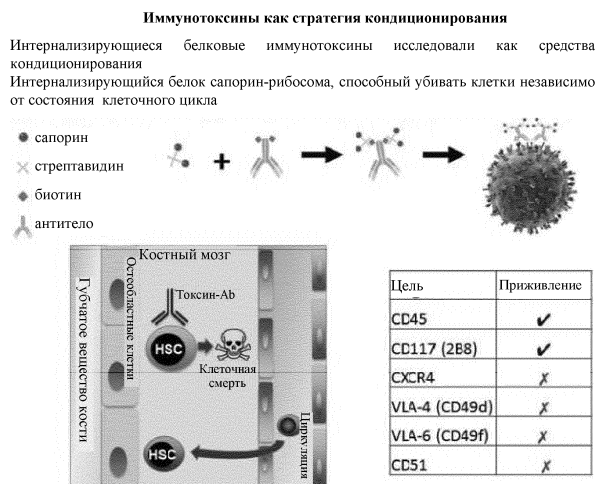
28. Способ по пп.1-3 или 6-27, при котором антитело или его фрагмент связывается с белком клеточной поверхности, выбранным из группы, состоящей из HLA-DR, CD11a, CD18, CD34, CD41/61, CD43, CD58, CD71, CD97, CD162, CD166, CD205 и CD361.

29. Способ по пп.1-3 или 6-27, при котором антитело или его фрагмент связывается с белком клеточной поверхности, выбранным из группы, состоящей из CD7, CDw12, CD13, CD15, CD19, CD21, CD22, CD29, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD48, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD55, CD64a, CD68, CD71, CD72, CD73, CD81, CD82, CD85A, CD85K, CD90, CD99, CD104, CD105, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD123, CD124, CD126, CD127, CD130, CD131, CD133, CD135, CD138, CD151, CD157, CD162, CD164, CD168, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD183, CD191, CD200, CD201, CD205, CD217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD240, CD242, CD243, CD277, CD292, CDw293, CD295, CD298, CD309, CD318, CD324, CD325, CD338, CD344, CD349 и CD350.

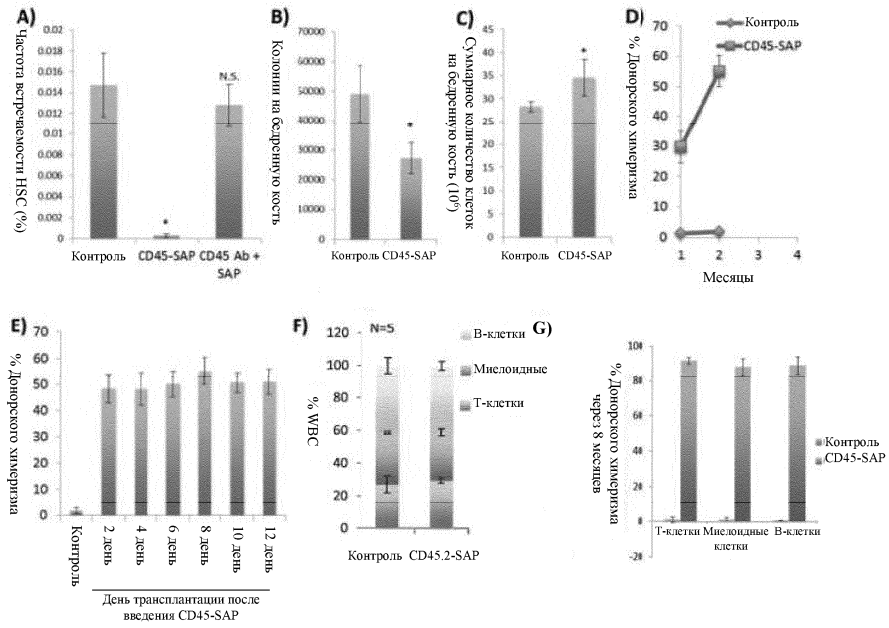
30. Способ по пп.1-3 или 6-27, при котором антитело, или его фрагмент, связывается с белком клеточной поверхности, выбранным из группы, состоящей из CD11a, CD18, CD37, CD47, CD52, CD58, CD62L, CD69, CD74, CD97, CD103, CD132, CD156a, CD179a, CD179b, CD184, CD232, CD244, CD252, CD302, CD305, CD317 и CD361.

31. Способ по любому из пп.1-3 или 6-27, при котором антитело или его фрагмент выбрано из группы, состоящей из клона L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4H11, клона A2A9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона CC2C6, клона TS2/9, клона CY1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона Заб, клона HD83, клона MEM-216 и антигенсвязывающих фрагментов этих клонов.

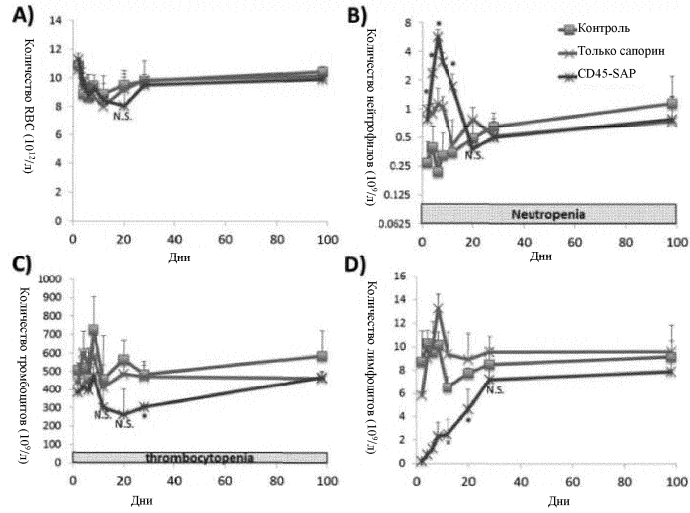
32. Способ по любому из пп.1-3 или 6-27, при этом антитело или его фрагмент содержит определяющую комплементарность область, которая является такой же, что и определяющая комплементарность область для одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из L243, клона TS2/4, клона TS1/18, клона 581, клона 4H11, клона A2A9/6, клона CD43-10G7, клона ВНРТ-1, клона orb12060, клона 2D1, клона CC2C6, клона TS2/9, клона CY1G4, клона ОКТ9, клона CD84.1.21, клона VIM3b, клона АЗС6Е2, клона ЕМК08, клона ТМР4, клона KPL-1, клона Заб, клона HD83 и клона MEM-216.



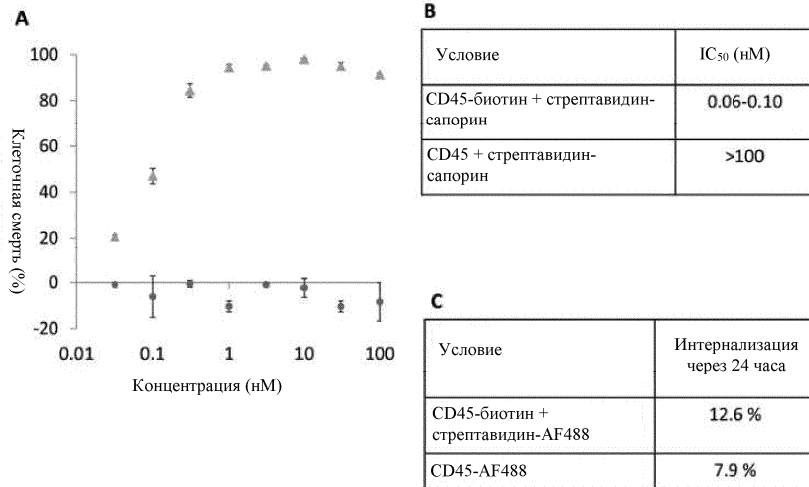
Фиг. 1



Фиг. 2А-2G



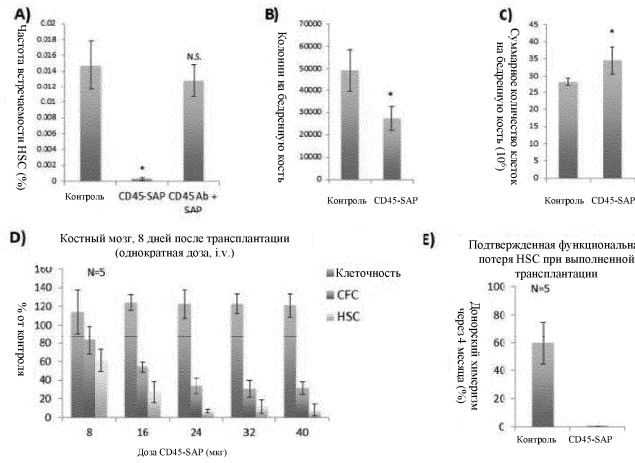
Фиг. 3А-3D



Фиг. 4А-4С

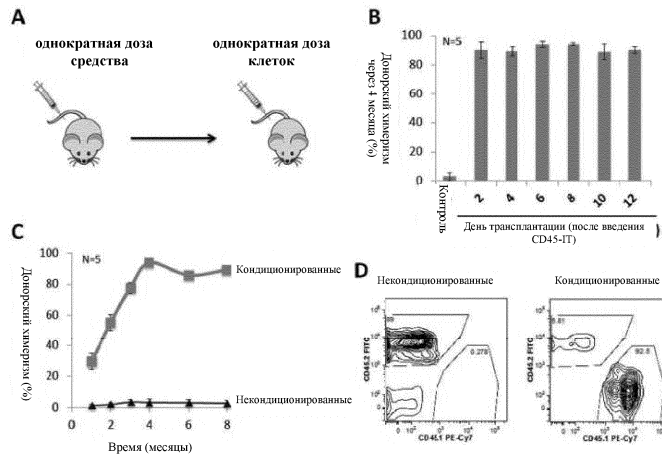


Истощение HSC in vivo с помощью CD45-SAP



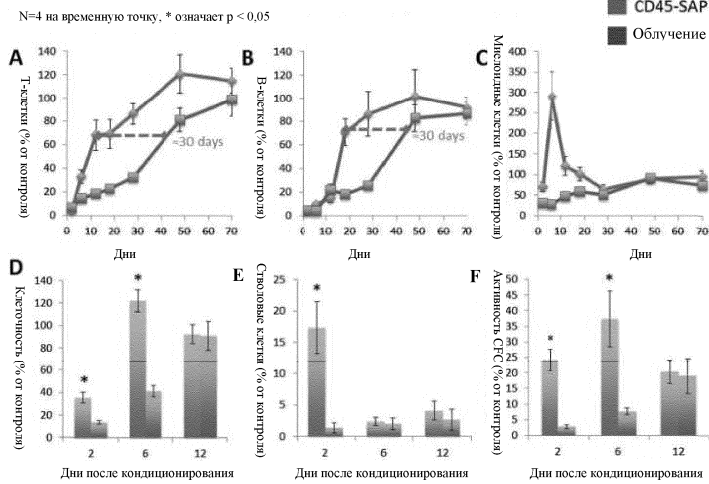
Фиг. 5A-5E

Результаты приживления



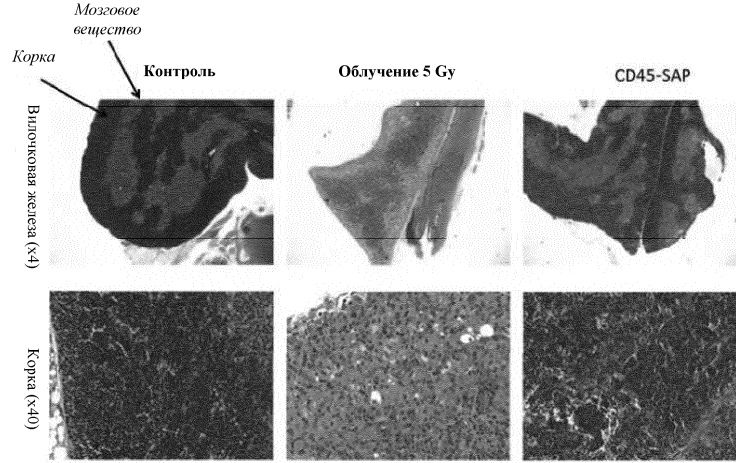
Фиг. 6A-6D

Сравнение с облучением 5 Gy



Фиг. 7A-7F

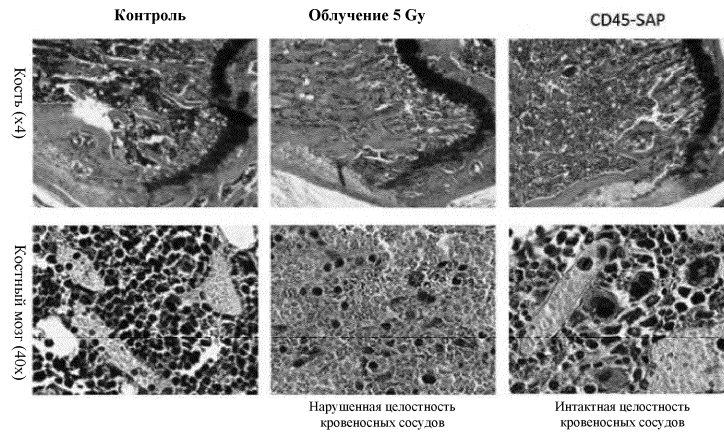
Отсутствие атрофии вилочковой железы



2, 4, 6 и 8 дней после рассматриваемого кондиционирования

Фиг. 8

Гистология костного мозга



Нарушенная целостность кровеносных сосудов

Интактная целостность кровеносных сосудов

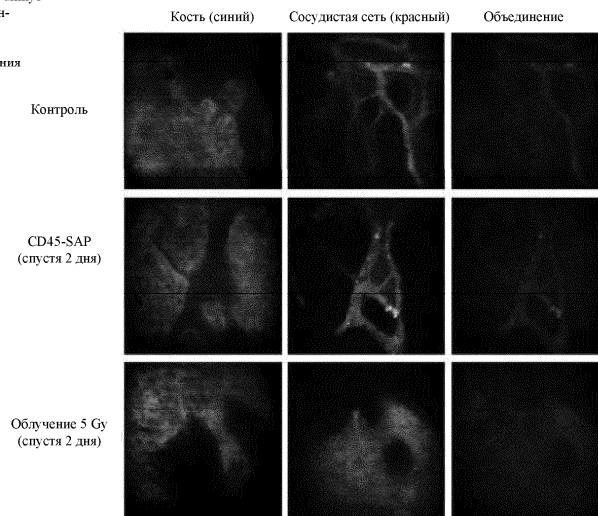
2, 4, 6 и 8 дней после рассматриваемого кондиционирования

Фиг. 9

Сохранение целостности сосудов

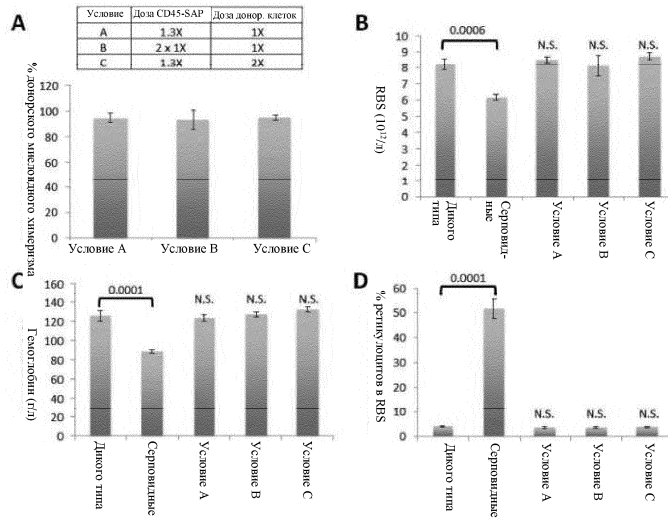
Визуализацию выполняли через 30 минут после i.v. инъекции 2 МДа роламин-декстрана

через 2 дня после кондиционирования



Фиг. 10

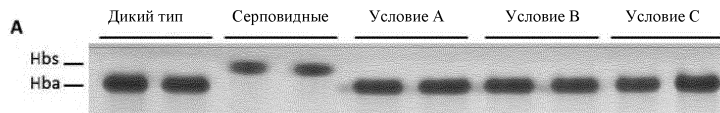
Коррекция мышинной модели серповидных клеток



Фиг. 11A-11D

Коррекция мышинной модели серповидных клеток

Анализ нативного PAGE в геле серповидного гемоглобина (Hbs) и нормального гемоглобина (Hba)

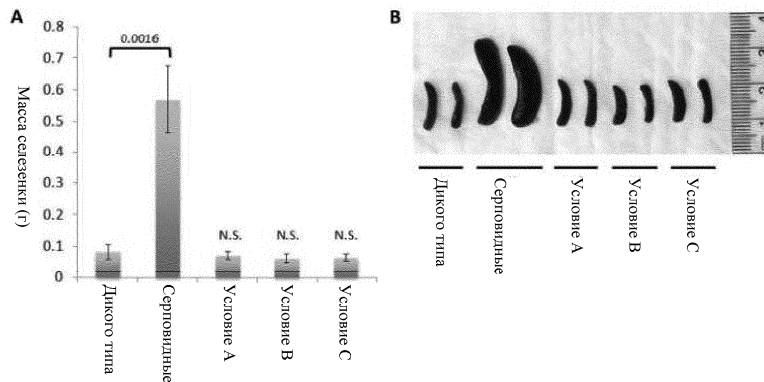


**B** Мазки крови и окрашивание демонстрируют исчезновение серповидных RBC

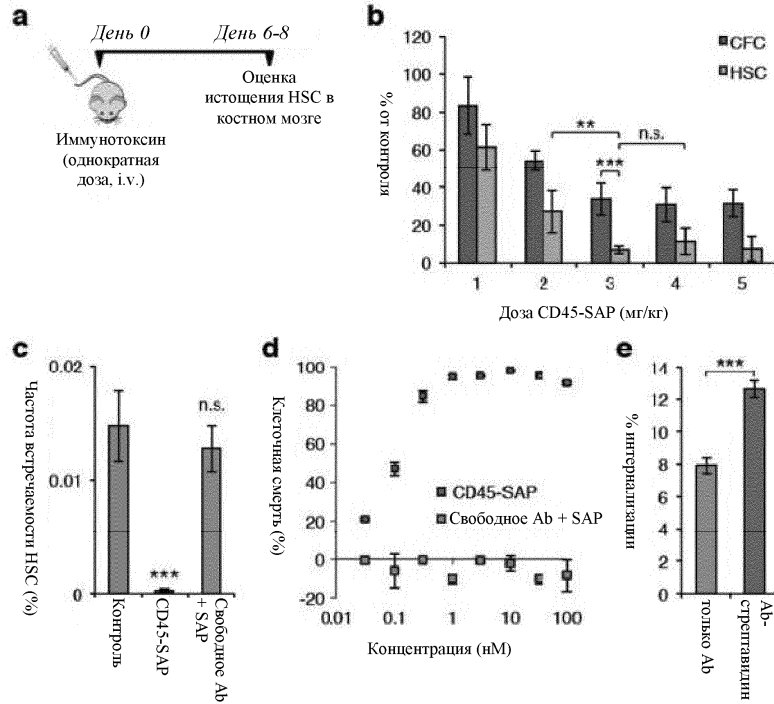


Фиг. 12A-12B

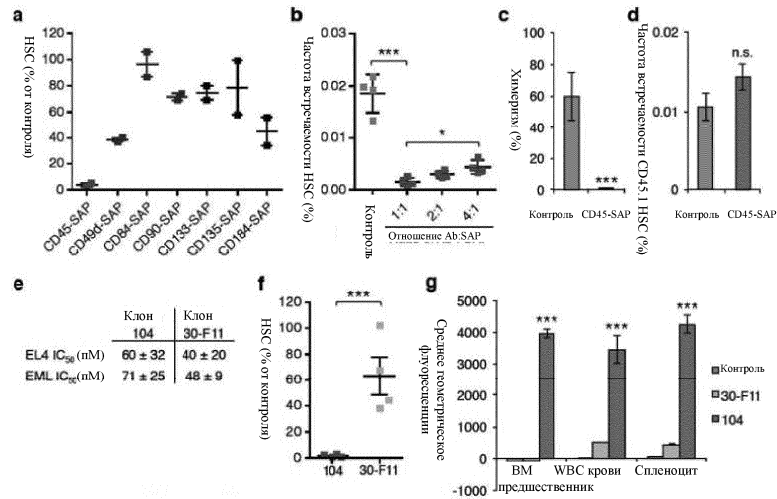
Коррекция размера селезенки модели серповидных клеток



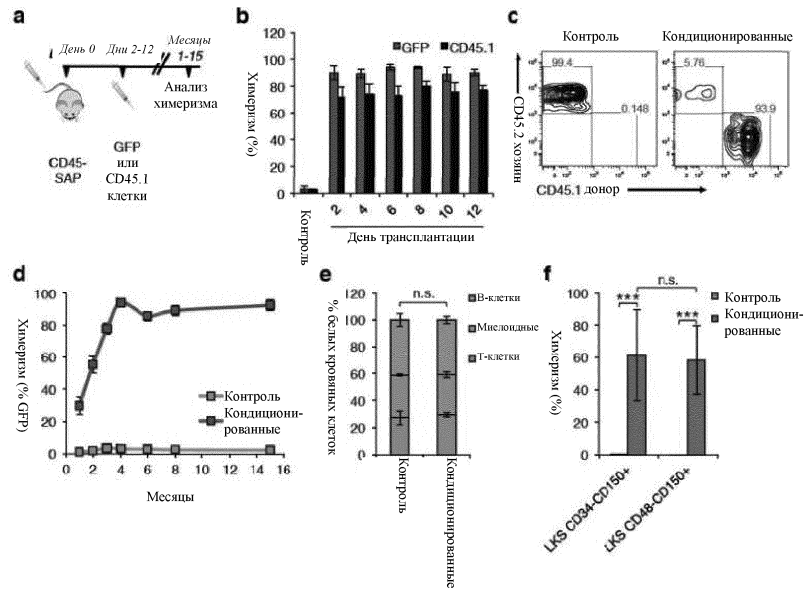
Фиг. 13A-13B



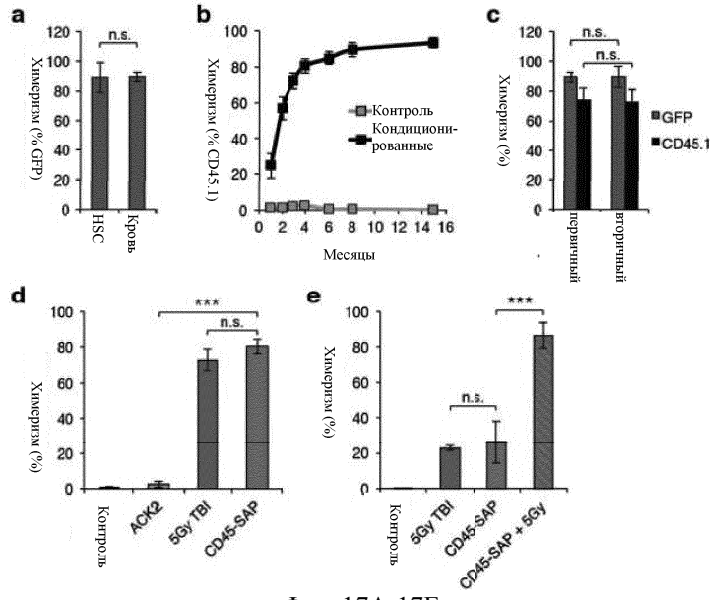
Фиг. 14А-14Е



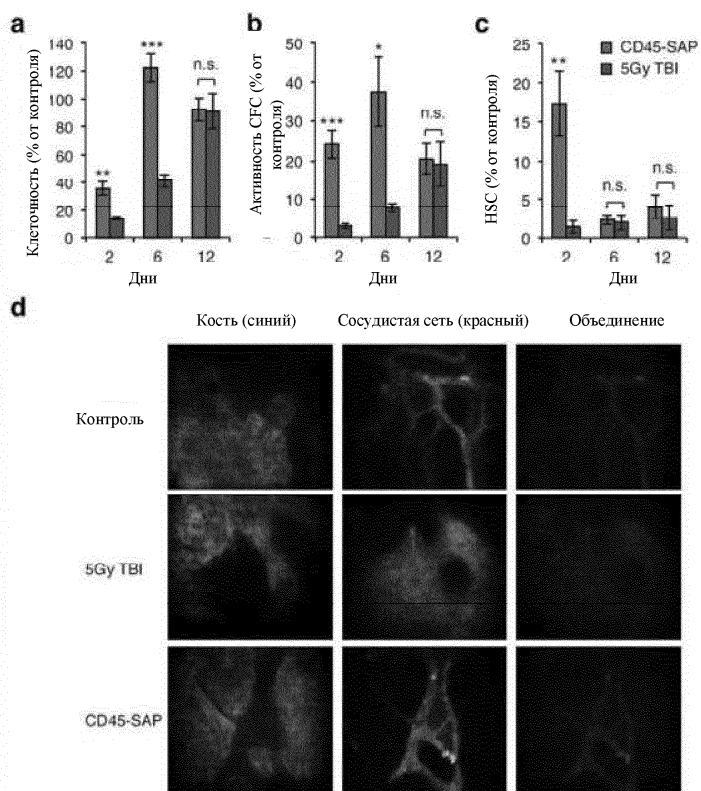
Фиг. 15А-15Г



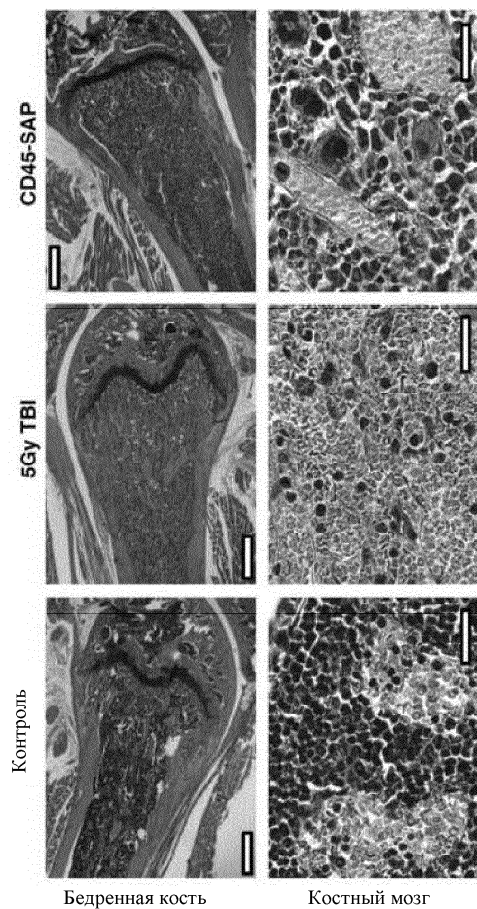
Фиг. 16А-16F



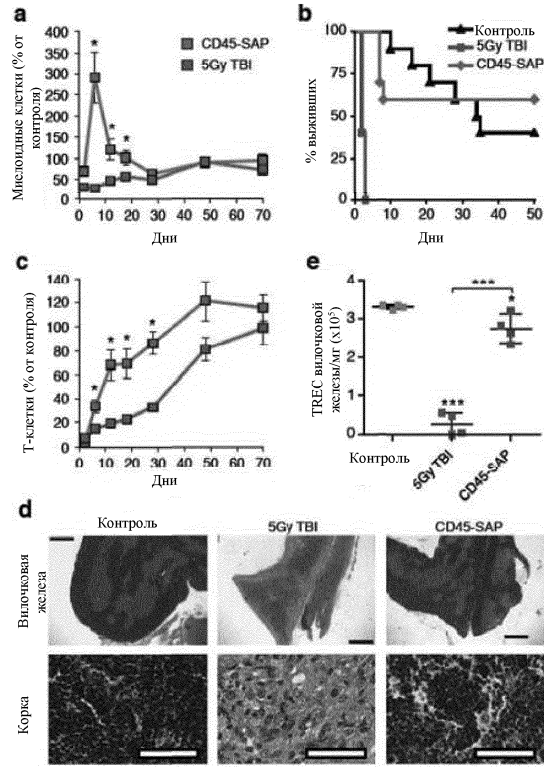
Фиг. 17А-17Е



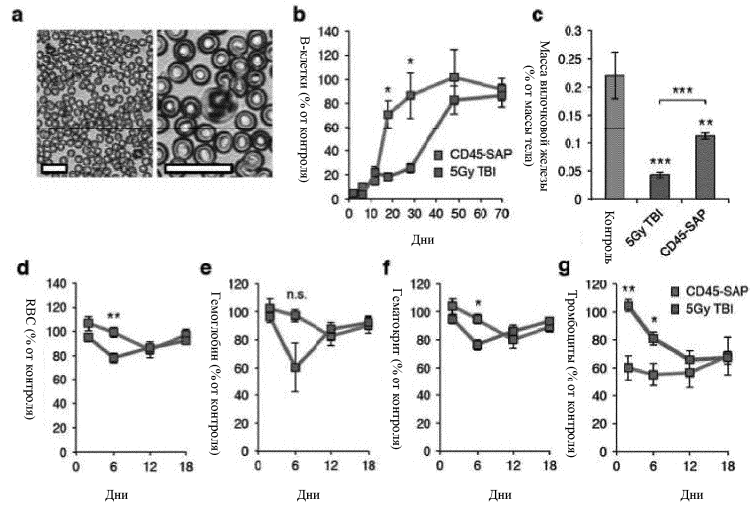
Фиг. 18А-18D



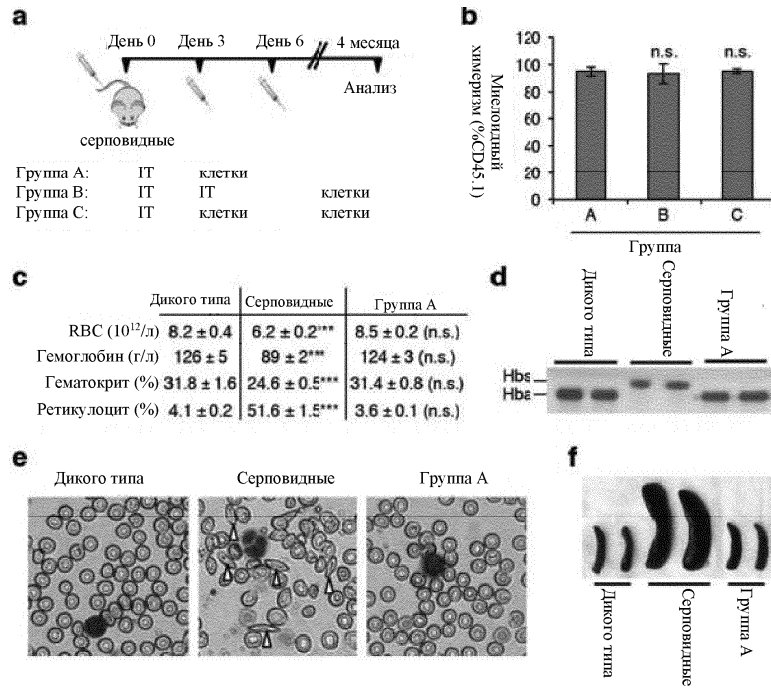
Фиг. 19



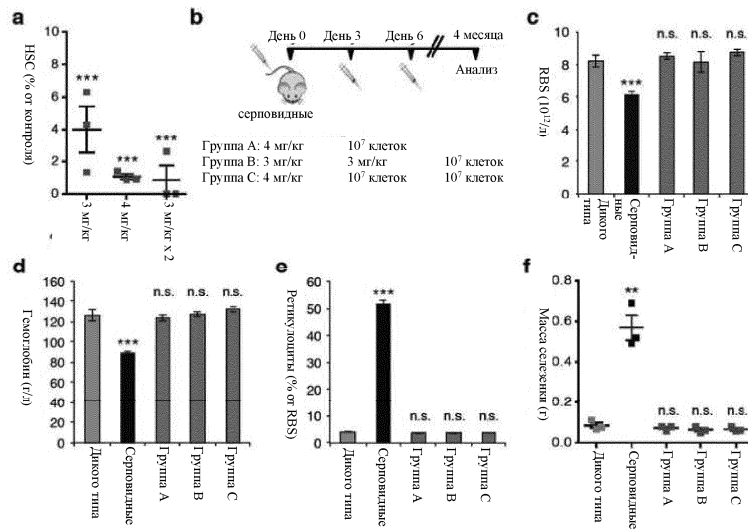
Фиг. 20А-20Е



Фиг. 21А-21Г



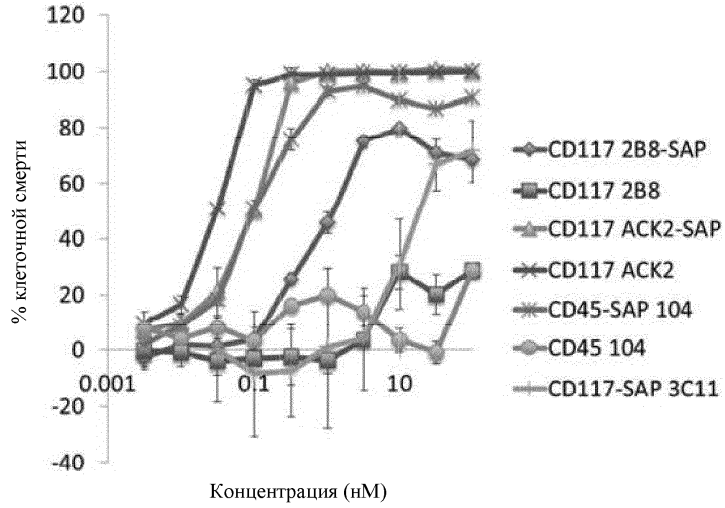
Фиг. 22А-22F



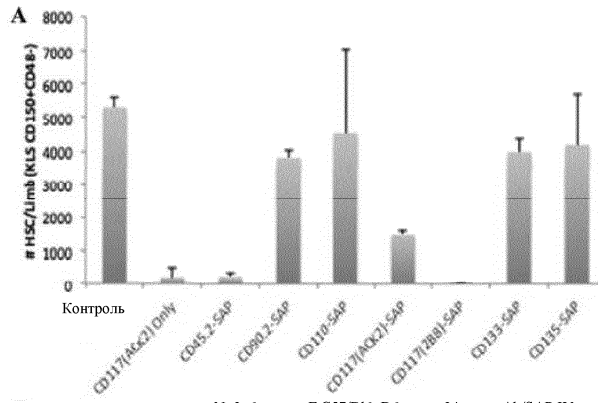
Фиг. 23А-23F



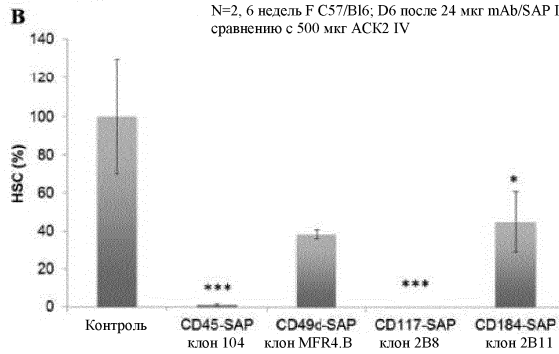
Средство	Значение IC50 (нМ)
CD117 2B8-SAP	1
CD117 2B8	>100
CD117 ACK2-SAP	0.1
CD117 ACK2	0.03
CD45-SAP 104	0.1
CD45 104	>100
CD117-SAP 3C11	10



Фиг. 24

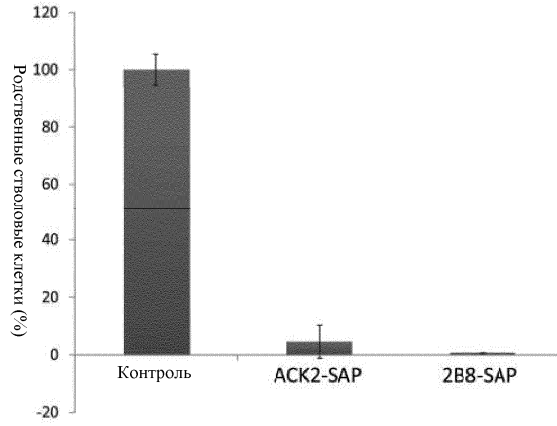


N=2, 6 недель F C57/Bl6; D6 после 24 мкг mAb/SAP IV по сравнению с 500 мкг ACK2 IV

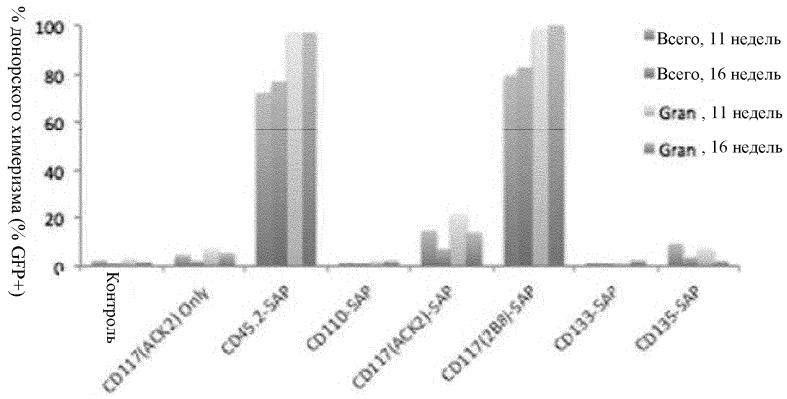


N=2-4, 9 недель F C57/Bl6; D6-8 после mAb/SAP IV

Фиг. 25A-25B



Фиг. 26

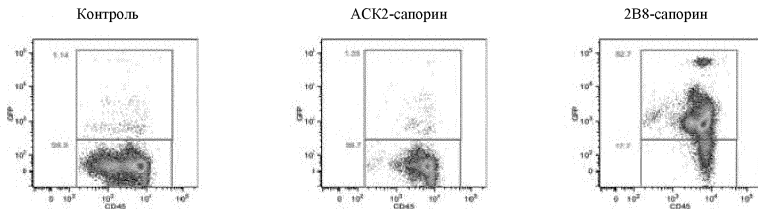


Фиг. 27

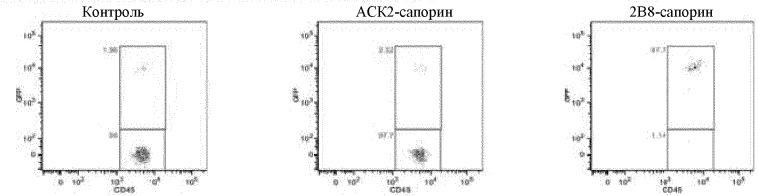
Пилотное исследование приживления – 16 недель

n=1

Химеризм в периферической крови через 16 недель



Химеризм в LKS-SLAM (HSC) в костном мозге через 16 недель

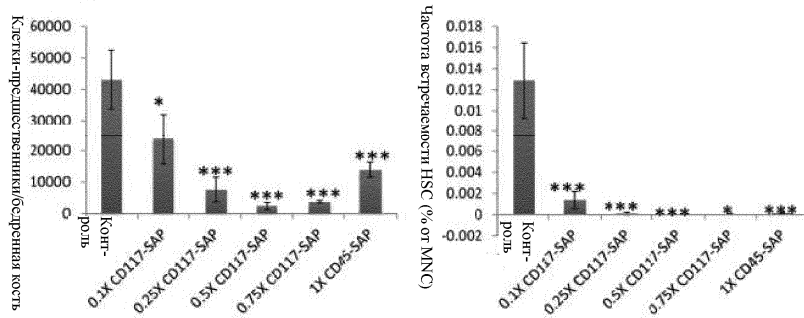


Фиг. 28

**Ответ на дозу 2B8 CD117-SAP in vivo**

Исследование по оптимизации дозы CD117-SAP (N=4 мыши на группу)  
8 дней после введения

Титровали дозу клона 2B8 CD117-SAP и сравнивали с 1x клоном 104 CD45-SAP:  
0,1x = 0,3 мг/кг    0,25x = 0,75 мг/кг    0,5x = 1,5 мг/кг    0,75x = 2,25 мг/кг  
1x = 3 мг/кг

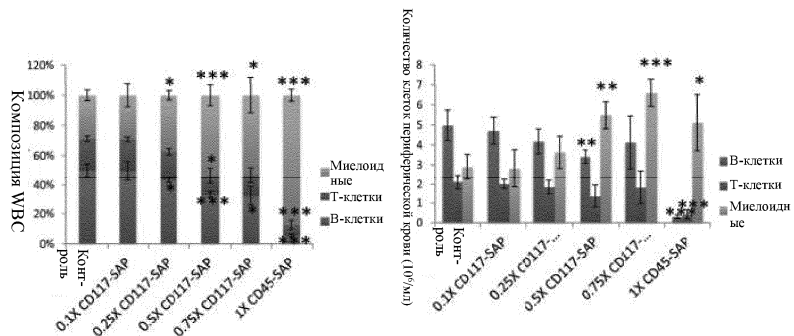


Не наблюдали токсичность при дозе 0,1-0,5x CD117-SAP.  
2/4 смерти при дозе 0,75x CD117-SAP.  
4/4 смерти при дозе 1,0x CD117-SAP.

N=4, 9 недель F C57/Bl6; D8 после mAb/SAP IV

Фиг. 29

**CD117-SAP-2B8 оставляет периферическую кровь интактной:**  
немиелоаблативный и недимфоаблативный  
8 дней после введения



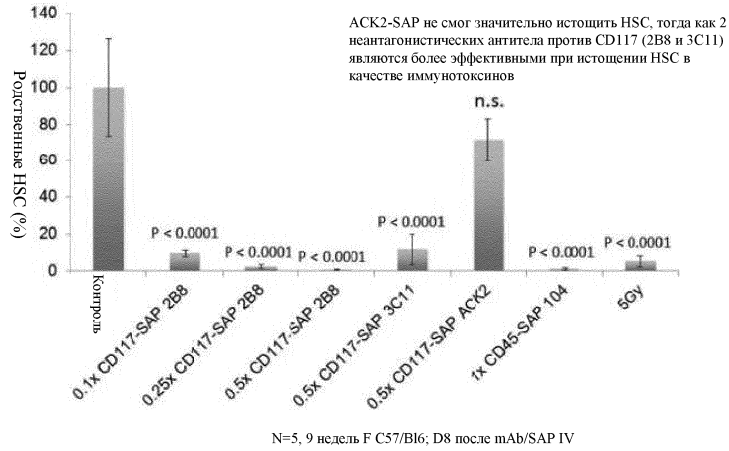
- Нарастание миелоидного компартамента как для CD45-SAP, так и для CD117-SAP  
=> усиливало дифференцировку клеток-предшественников?  
- CD45-SAP истощает В- и Т-клетки.  
- CD117-SAP не истощает В- и Т-клетки.

N=4, 9 недель F C57/Bl6; D8 после mAb/SAP IV

Фиг. 30

**Сравнение различных клонов CD117-SAP *in vivo***

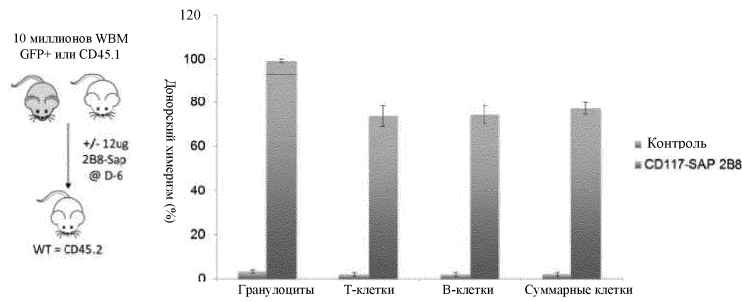
Клоны 2B8, 3C11 и ACK2 CD117-SAP сравнивали с CD45-SAP и облучением 5 Gy всего организма (n = 5 мышей на группу)  
Оценивали число стволовых клеток в костном мозге через 8 дней после введения



Фиг. 31

**16-недельное исследование приживления для 2B8 CD117-SAP**

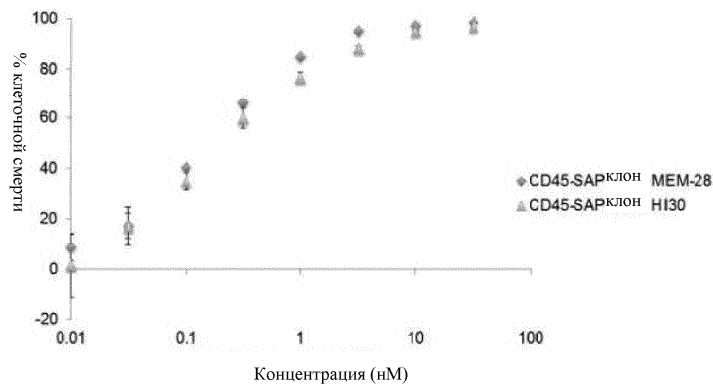
- 10 миллионов цельных клеток костного мозга CD45.1 трансплантировали через 8 дней после введения 2B8 CD117-SAP
- химеризм оценивали через 16 недель после трансплантации
- Суммарный химеризм крови составляет 80% донорских клеток; при этом донорские клетки вносили свой вклад в гранулоциты (миелоидные), Т-клетки и В-клетки.



Фиг. 32

**Активность антител против CD45 человека-SAP в отношении человеческих гематопоэтических клеток *in vitro***

- Человеческие CD45+ гематопоэтические клетки Jurkat обрабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксинов антител против CD45 человека-SAP (созданных с использованием антител против человеческих антител) в течение 72 часов
- Жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega)
- Значения IC<sub>50</sub> для клеточного киллинга составляли 130 nM и 200 nM для клонов MEM-28 и HI30, соответственно



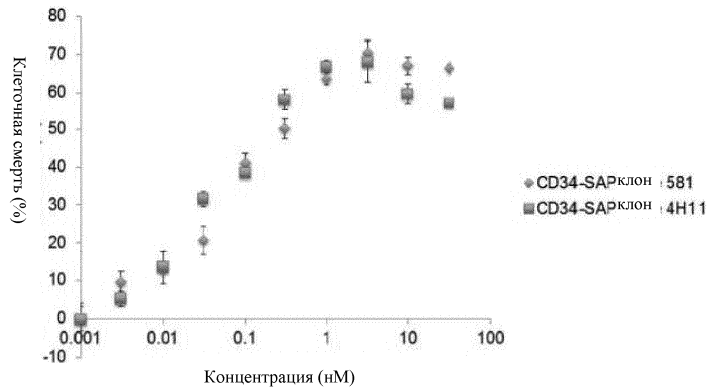
Фиг. 33

**Активность антитело против CD34 человека-SAP в отношении человеческих HSC *in vitro***

Человеческие мобилизованные в периферической крови CD34+ HSC обрабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксина антитело против CD34 человека-SAP в течение 96 часов

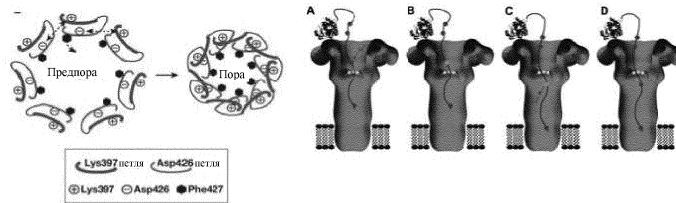
Жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega)

Значение IC<sub>50</sub> для клеточного киллинга составляет приблизительно 100 пМ для обоих тестируемых клонов



Фиг. 34

**Механизм транслокации**



- LF, EF и LFN связываются с PA63 с высокой аффинностью ( $k_d \sim 1-2$  нМ;  $k_{on} \sim 3 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>;  $k_{off} \sim (3-5) \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup>)
- Механизм транспорта хорошо изучен на плоских двуслойных мембранах. АТФ не требуется, но требуется ΔрН
- Механизм транслокации броуновских храповиков в заряженном состоянии
- N-конец LFN является спиральным, а противоположный N-конец является основным и дестабилизируется при кислом рН, облегчая протягивание белка в пору в направлении N-C
- Пора является катионселективной, и кислотные остатки должны быть протонированы перед транслокацией. Транспорт является односторонним, поскольку кислотные остатки становятся депротонированными в цитозоле (при более высоком рН) и не могут диффундировать обратно
- Введенные дисульфидные поперечные связи или добавление низкомолекулярных лигандов к LFN-DTA или LFN-DHFR препятствует транслокации

Molecular Aspects of Medicine 30 (2009) 413-422

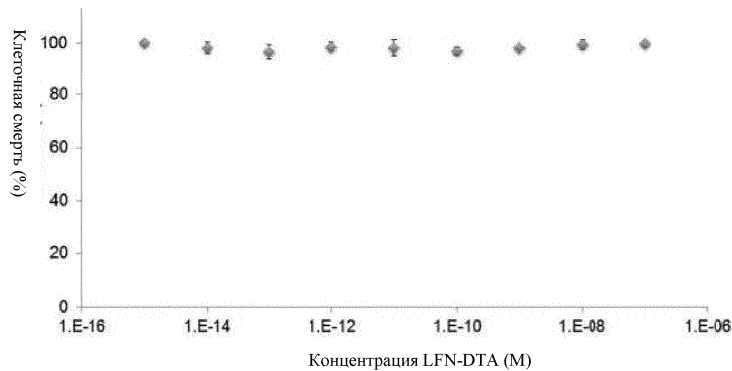
Фиг. 35

**Активность LFN-DTA в отношении человеческих HSC *in vitro***

Человеческие мобилизованные в периферической крови CD34+ HSC обрабатывали *in vitro* разными концентрациями иммунотоксина LFN-DTA в присутствии 10 нМ WT-PA в течение 96 часов

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием MTS-анализа (Promega)

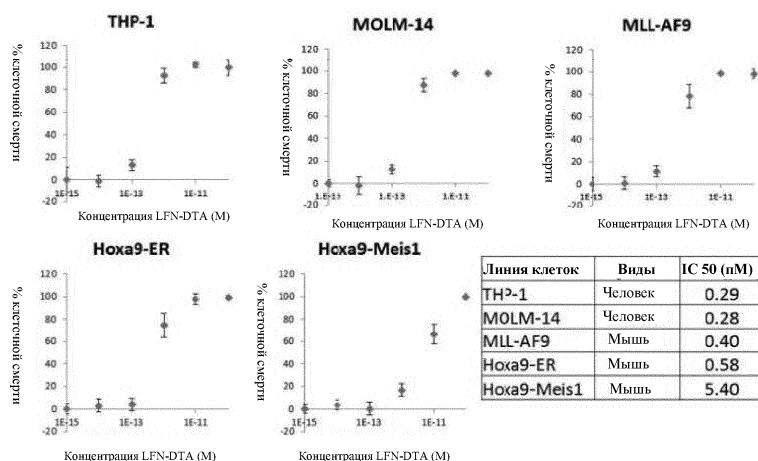
100% клеточную смерть наблюдали при концентрации 1 фемтомоль LFN-DTA, что показывает, что LFN-DTA может быть использован для обеспечения эффективного киллинга человеческих HSC



Фиг. 36

Активность LFN-DTA в отношении гематopoэтических клеток

48 часов, 5000 слеток/лунка, MTS-анализ

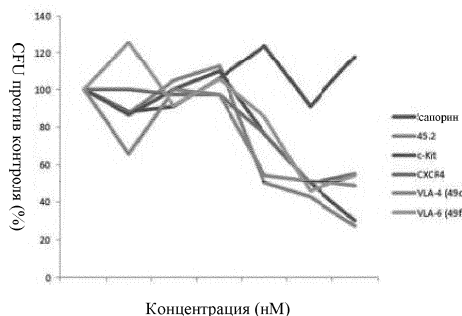


Фиг. 37

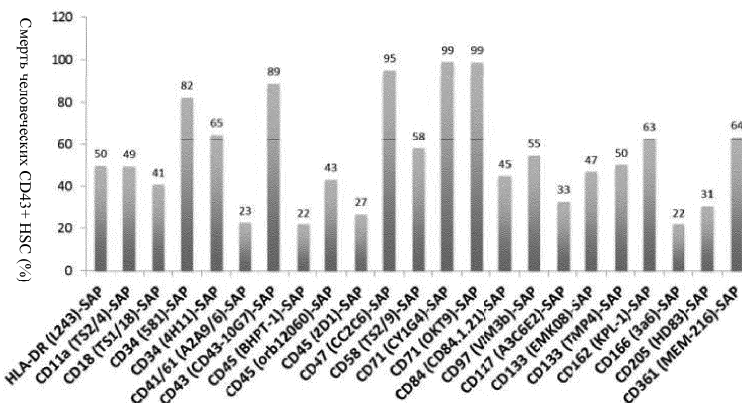
Цели кондиционирования

Цель	Клон	Антитело	Блокирующее ли Ab?
CXCR4	2B11	Антитело крысы к мыш. mAb	Не блокирует SDF-1
CD45.2	104	Антитело мыши к мышному mAb	
c-Kit (CD117)	2B8	Антитело крысы к мыш. rAb	Не блокирует SCF
CD49d (VLA-4)	R1-2	Антитело крысы к мыш. mAb	
CD49f (VLA-6)	eBioGoH3 (GoH3)	Антитело крысы к мыш./человеч. mAb	

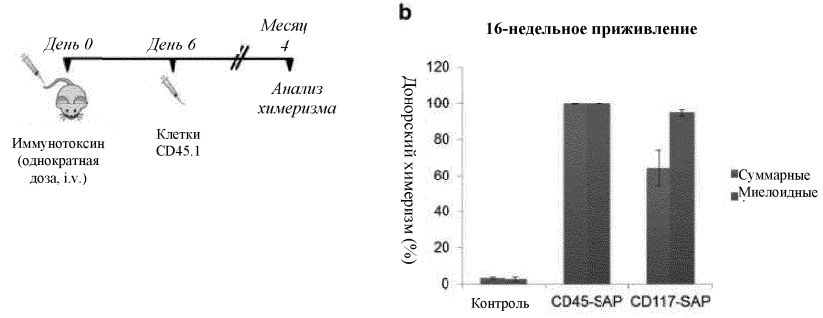
30000 цельных клеток костного мозга в 50 мкл среды IMDM с цитокином обрабатывали разными концентрациями иммунотоксинов или сапорина отдельно в течение 24 часов. Затем клетки высевали на метилцеллюлозу M3434 и колонии, возникающие из гематopoэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), подсчитывали спустя 7 дней. Установили, что все иммунотоксины были активными и исощали HSPC со значениями IC<sub>50</sub> 1-10 нМ. Сапорин отдельно (без антитела) не был активным, даже при высоких концентрациях (100 нМ)



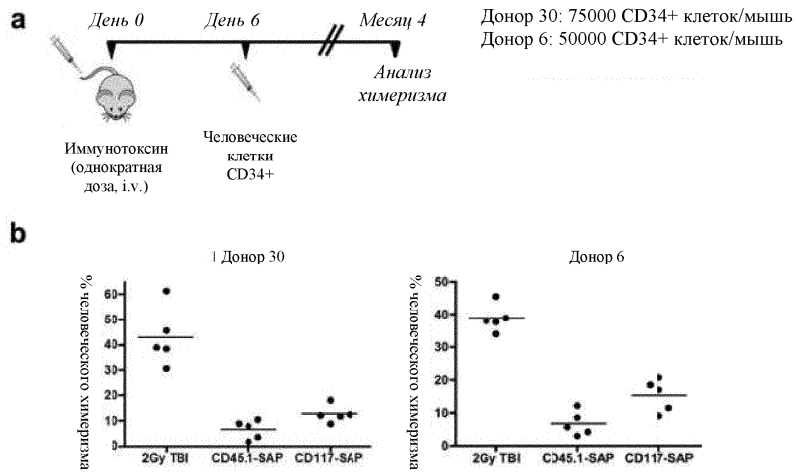
Фиг. 38



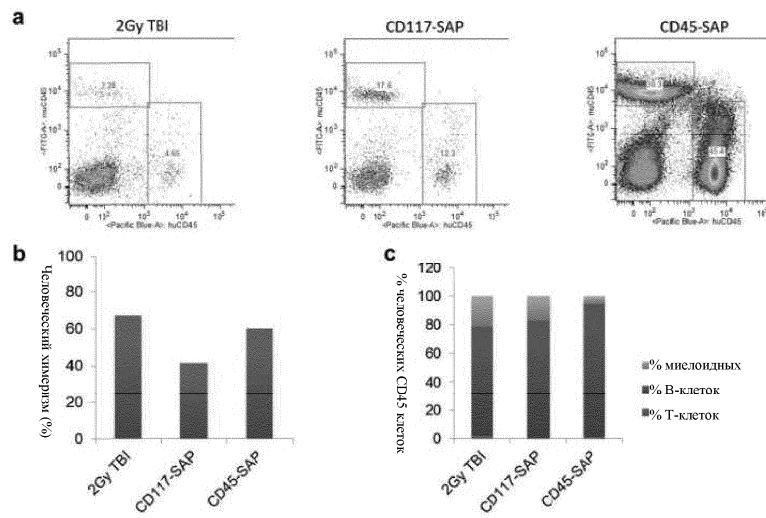
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42