

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291362** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.26

(22) Дата подачи заявки
2020.10.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD45 И ИХ КОНЬЮГАТЫ

(31) 62/929,137; 62/929,194; 62/929,207; 62/929,283;
62/929,288; 62/929,347; 62/929,601; 62/940,742;
62/978,147; 63/015,348; 63/046,046; 63/046,164;
63/084,903

(32) 2019.11.01; 2019.11.01; 2019.11.01; 2019.11.01;
2019.11.01; 2019.11.01; 2019.11.01; 2019.11.26;
2020.02.18; 2020.04.24; 2020.06.30; 2020.06.30;
2020.09.29

(33) US

(86) PCT/US2020/058373

(87) WO 2021/087368 2021.05.06

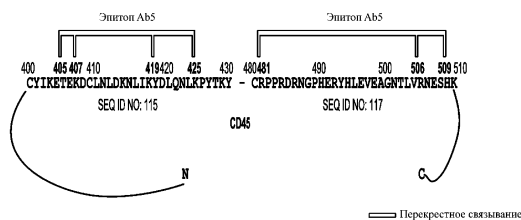
(88) 2021.06.10

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

(72) Изобретатель:
Бойтано Энтони, Кук Майкл,
Макдонаг Шарлотт, Палчаудури
Рахул, Панвар Раджив, Пирс
Брэдли Р., Видбум Пол Фредрик,
Круит Патриция Энн (US)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Раскрыты антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), которые специфично связываются с CD45 человека. Такие антитела и ADC применимы в терапевтических способах, включая способы истощения клеток CD45+ у пациента. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для непосредственного лечения нарушения, например, путем истощения популяции CD45+ раковых клеток или аутоиммунных клеток. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, также можно использовать для подготовки пациента к терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток и для улучшения приживления трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток путем избирательного истощения эндогенных CD45+ клеток перед процедурой трансплантации.



A1

202291362

202291362

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD45 И ИХ КОНЪЮГАТЫ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/929137, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929194, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929207, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929288, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929601, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929283, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/929347, поданной 1 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/940742, поданной 26 ноября 2019 г.; предварительной заявки на патент США № 62/978147, поданной 18 февраля 2020 г.; предварительной заявки на патент США № 63/015348, поданной 24 апреля 2020 г.; предварительной заявки на патент США № 63/046,046, поданной 30 июня 2020 г.; предварительной заявки на патент США № 63/046164, поданной 30 июня 2020 г.; и предварительной заявки на патент США № 63/084903, поданной 29 сентября 2020 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых приоритетных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и во всей полноте включен в настоящую заявку посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 29 октября 2020 г., имеет название 2020-10-29_M103034 1525WO_SL_ST25.txt, и размер 233 килобайт.

Область техники

В настоящем документе описаны антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты антитело-лекарственное средство. Также описано лечение пациентов, страдающих различными патологиями, такими как заболевания крови, нарушения обмена веществ, рак и аутоиммунные заболевания, среди прочего, путем введения антитела против CD45, его антигенсвязывающего фрагмента или его конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), при этом указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или ADC способны связывать CD45 на клетке-мишени (например, гемопоэтической стволовой клетке, иммунной клетке или клетке другого типа).

Уровень техники

CD45, также известный как протеинтирозинфосфатаза, рецептор типа C (PTPRC), представляет собой фермент, который у человека кодируется геном PTPRC (Kaplan et al., *PNAS* 87:7000-7004 (1990)). CD45 является членом семейства протеинтирозинфосфатаз (PTP), которое включает сигнальные молекулы, регулирующие различные клеточные процессы, включая рост клеток, дифференцировку, митотический цикл и онкогенную трансформацию. CD45 содержит внеклеточный домен, один трансмембранный сегмент и два тандемных внутрицитоплазматических каталитических домена и, таким образом, принадлежит к семейству PTP рецепторного типа. CD45 представляет собой трансмембранный белок типа I, который присутствует в различных изоформах на дифференцированных гемопоэтических клетках (за исключением эритроцитов и плазматических клеток) (Holmes, *Immunology* 117:145-55 (2006)). Было показано, что CD45 является регулятором передачи сигналов T- и B-клеточного антигенного рецептора. Он функционирует либо путем непосредственного взаимодействия с компонентами комплексов антиген-рецептор через свой внеклеточный домен (форма ко-стимуляции), либо путем активации различных киназ семейства Src, необходимых для передачи сигналов антиген-рецептор через его цитоплазматический домен. CD45 также подавляет киназы JAK и, таким образом, действует как негативный регулятор передачи сигналов цитокинового рецептора.

CD45 присутствует на поверхности гемопоэтических клеток, включая ГСК, лейкоциты и остеокласты гемопоэтического происхождения (Shivtiel et al., *J Exp Med* 205:2381 (2008)). Делеционные мутации в CD45 у человека связаны с тяжелым иммунодефицитом. Это в первую очередь связано с отсутствием CD45 на T-клетках, где он обычно находится в избытке и необходим для модуляции активности SFK во время антигенного ответа. Костный мозг CD45-дефицитных (CD45^{-/-}) мышей содержит нормальное количество гемопоэтических клеток, но количество наиболее примитивных ГСК снижено, а их мобилизация в ответ на G-CSF нарушена. Отчасти этот дефект присущ ГСК; без CD45-опосредованного подавления активности SFK опосредованная интегрином адгезия является высокой, и ГСК с большей вероятностью останутся в нише стволовых клеток. CD45^{-/-} ГСК также не имеют G-CSF-стимулированной мобилизации и возвращения к хемокину CXCL12/SDF-1, что отрицательно влияет на приживание клеток после трансплантации. Эти недостатки могут быть восстановлены путем добавления ингибиторов SFK, что указывает на то, что эту роль обычно выполняет CD45. Аналогичным образом реципиенты CD45^{-/-} также демонстрируют недостаточное приживание и последующую мобилизацию нормальных ГСК, что указывает на роль CD45 в нише стволовых клеток, а также в ГСК (Shivtiel et al., *J Exp Med* 205:2381 (2008)).

Несмотря на достижения в области медицины, остается потребность в лечении патологий кроветворной системы, таких как заболевания определенных клеток крови, нарушения обмена веществ, рак и аутоиммунные состояния, среди прочего. Хотя гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) обладают значительным терапевтическим потенциалом, ограничением, препятствующим их использованию в клинике, является сложность, связанная с обеспечением приживления трансплантатов ГСК в организме хозяина. В частности, терапия гемопоэтическими стволовыми клетками с участием антител, нацеленных на антигены клеточной поверхности на эндогенных ГСК, может запускать нежелательные иммуностимулирующие и эффекторные функции, которые препятствуют приживлению экзогенного трансплантата ГСК. Поскольку CD45 экспрессируется, например, на ГСК и лейкоцитах, он представляет собой мишень для терапии, включая подготовительную терапию, иммунную перезагрузку и лечение заболеваний.

Краткое описание сущности изобретения

Учитывая важную роль CD45 в клеточной биологии, существует потребность в антителах против CD45 и их фрагментах. В настоящем документе описаны антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут связываться с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) и могут использоваться, например, в качестве подготовительных агентов для трансплантации ГСК. В частности, антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их ADC, описанные в настоящем документе, можно использовать для специфического истощения, например, ГСК хозяина, иммунных клеток (например, лейкоцитов) или болезнетворных клеток. Кроме того, антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их ADC, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения пациентов с лейкемией или лимфомой или для лечения пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз и склеродермия. Антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и ADC, описанные в настоящем документе, удовлетворяют потребность в композициях и способах для стимуляции приживления трансплантатов экзогенных гемопоэтических стволовых клеток таким образом, чтобы мультипотентность и гемопоэтическая функциональность этих клеток сохранялись после трансплантации.

В первом аспекте в настоящем документе предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, домен CDR2, содержащий аминокислотную

[illegible]

- (j) переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:92, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:93, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:94; и
- 5 переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:96, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:97; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:98.

В другом аспекте в настоящем документе предложено выделенное антитело против

10 CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее: переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:119, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:120, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:121; и переменную

15 область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:122, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:123; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:124.

В другом аспекте в настоящем документе предложено выделенное антитело против

20 CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5; (b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:11, и переменную область

25 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15; (c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25; (d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

30 изложенную в SEQ ID NO:31, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35; (e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45; (f) переменную область тяжелой цепи,

35 содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:51, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:55; (g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:61, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:65; (h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:75; (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:85; или (j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:91, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:95.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых аспектов выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека или Fc-область IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой интактное антитело, содержащее константную область.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG. В конкретных вариантах осуществления IgG представляет собой IgG1 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых аспектов антитело содержит константную область, при этом константная область содержит по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L235A, D265C, H310A и H435A (нумерация по индексу EU). В конкретных вариантах осуществления константная область содержит аминокислотные замены L234A, L235A и D265C (нумерация согласно индексу EU).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против CD45 согласно настоящему изобретению содержит константную область, при этом константная область содержит (a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106; и (b) аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45, содержащее: (а) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:9, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:10; (b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:20; (c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:29, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:30; (d) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:40; (e) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:50; (f) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:60; (g) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:69, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:70; (h) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:79, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:80; (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:89, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:90; или (j) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:99, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:100.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, которое специфично связывается с CD45 человека на эпитопе, расположенном внутри фрагмента 1 CD45 (SEQ ID NO:114), фрагмента 2 CD45 (SEQ ID NO:115), фрагмента 3 CD45 (SEQ ID NO:116), фрагмента 4 CD45 (SEQ ID NO:117) и/или фрагмента 5 CD45 (SEQ ID NO:118).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с (а) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 2 CD45, и эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 4; (b) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 1 CD45, и эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 3 CD45; или (c) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 5 CD45.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с (а) одним или более остатками,

выбранными из группы, состоящей из 405T, 407K, 419Y, 425K, 481R, 505R и 509H в CD45 человека (пронумерованы на основании SEQ ID NO:113); или (b) одним или более остатками, выбранными из группы, состоящей из 486R, 493Y и 502T в CD45 человека (пронумерованы на основании SEQ ID NO:113).

5 В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению специфично связывается с CD45 человека и является перекрестно-реактивным с CD45 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению связывается с CD45 человека со скоростью диссоциации (K_{OFF}) от 1×10^{-2} до 1×10^{-3} , от 1×10^{-3} до 1×10^{-4} , от 1×10^{-4} до 1×10^{-5} , от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} , от 1×10^{-6} до 1×10^{-7} или от 1×10^{-7} до 1×10^{-8} , согласно измерениям с помощью интерферометрии биослоя (BLI).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению связывается с CD45 человека с K_D примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее или примерно 0,1 нМ или менее, как определено с помощью интерферометрии биослоя (BLI).

20 В другом аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем документе предложена выделенная нуклеиновая кислота, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте в настоящем документе предложен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте в настоящем документе предложена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

В другом аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть согласно любому из вышеупомянутых аспектов, для применения в истощении популяции клеток CD45+ у пациента-человека.

В другом аспекте в настоящем документе предложен способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека путем введения пациенту-человеку антитела или его антигенсвязывающей части в соответствии с любым из вышеупомянутых аспектов. В некоторых вариантах осуществления клетки CD45+ представляют собой CD3+, CD19+, CD33+, CD34+ или CD45+/B2M+. В других вариантах осуществления клетки CD45+ представляют собой гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). В других вариантах осуществления клетки CD45+ представляют собой ГСК, Т-клетки, В-клетки и/или миелоидные клетки.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта клетки CD45+ подвергают истощению из костного мозга пациента и/или из периферической крови пациента.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта пациент нуждается в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта способ дополнительно включает введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления трансплантат является аллогенным. В альтернативных вариантах трансплантат является аутологичным.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство (ADC), содержащему антитело против CD45 или его антигенсвязывающую часть, конъюгированное с цитотоксином через линкер, где антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть согласно любому из вышеупомянутых аспектов.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта антитело конъюгировано с цитотоксином посредством остатка цистеина в константном домене антитела. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина вводят путем аминокислотной замены в константной области антитела. В конкретных вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой D265C и/или V205C (нумерация EU).

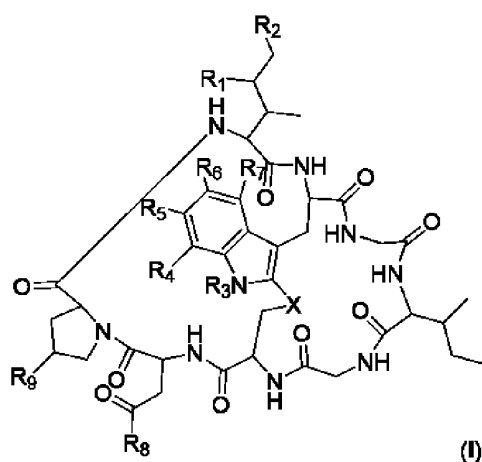
В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта ADC имеет отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы, интеркалирующий ДНК агент, алкилирующий ДНК агент, сшивающий ДНК агент, нарушающий синтез белка агент, нарушающий динамику микротрубочек агент или нарушающий митотическое веретено агент.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта цитотоксин выбран

из группы, состоящей из аматоксина, антрацилина, ауристатина, калихимицина, дебуганина, дифтерийного токсина, дуокармицина, индолинобензодиазепа (IGN), димера индолинобензодиазепа, иринотекана, майтансина, майтансиноида, экзотоксина А псевдомонад, пирролобензодиазепа (PBD), димера пирролобензодиазепа, сапорина и SN-38. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аматоксин.

В некоторых вариантах осуществления ADC представлен формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am представляет собой аматоксин. В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (I):



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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D ;

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

R_C представляет собой -L-Z;

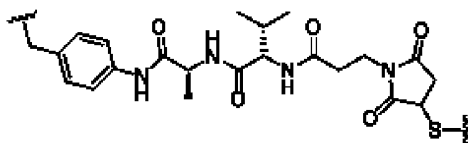
R_D представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно

замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

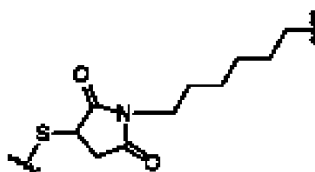
- 5 L представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, $-(C=O)-$, дисульфид, гидразон или их комбинацию; и

- Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,
- 15 где Am содержит ровно один заместитель R_C .

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой

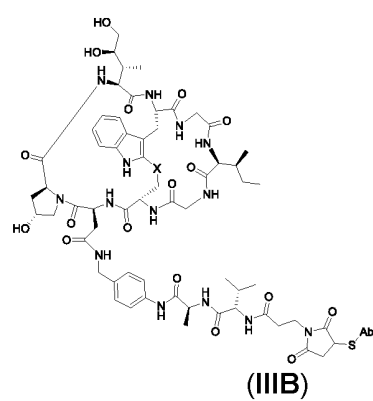
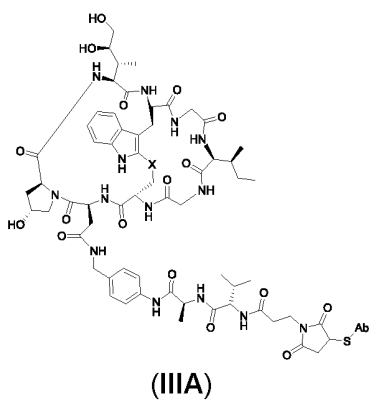
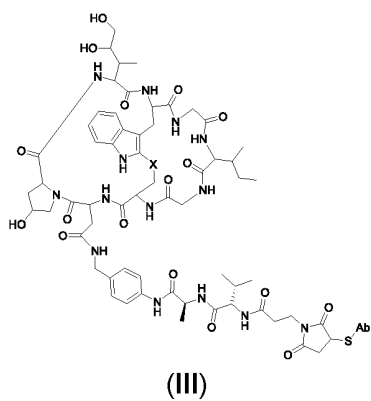


или



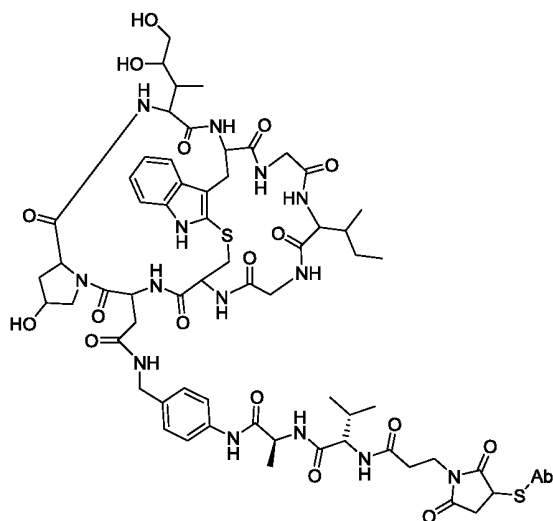
20

В некоторых вариантах осуществления ADC представлен одним из:



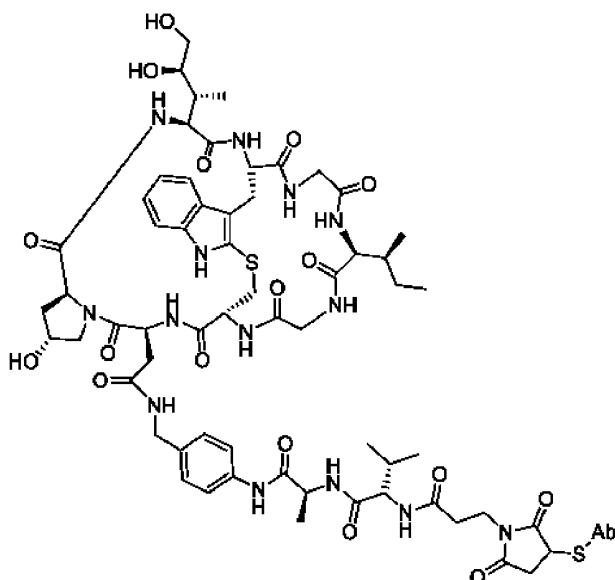
где x представляет собой $-S-$, $-S(O)-$ или $-SO_2-$.

5 В некоторых вариантах осуществления ADC имеет формулу



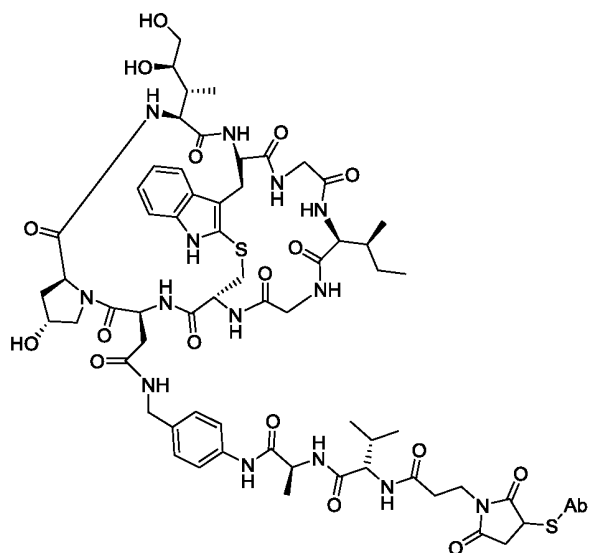
где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В других вариантах осуществления ADC имеет формулу



где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

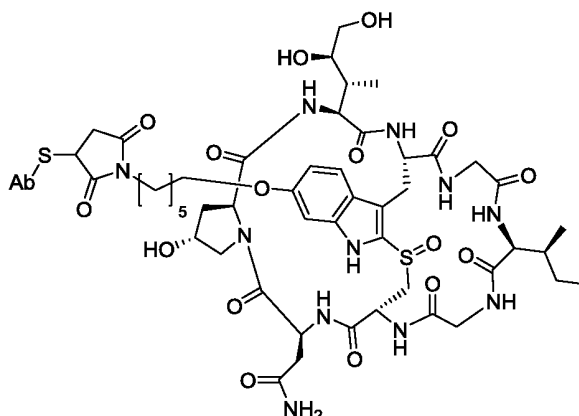
В альтернативных вариантах осуществления ADC имеет формулу



5

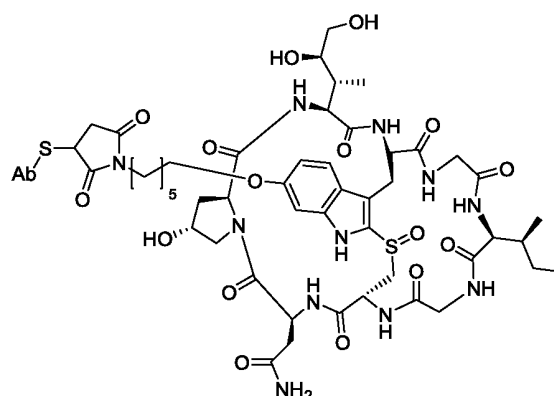
где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В других вариантах осуществления ADC имеет формулу



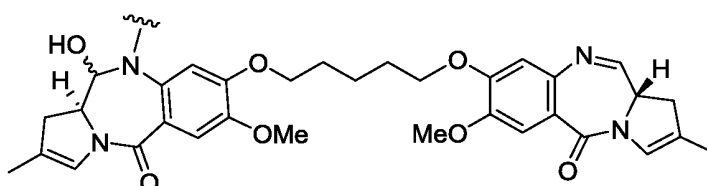
где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В других вариантах осуществления ADC имеет формулу



5 где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В некоторых вариантах осуществления ADC, описанных в настоящем документе, цитотоксин представляет собой пирролобензодиазепин (PBD). В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер PBD. В конкретных вариантах осуществления димер PBD представлен



10

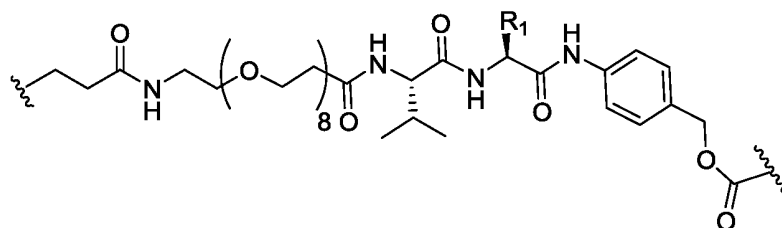
где волнистая линия обозначает точку присоединения к линкеру ADC.

В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытого в настоящем документе, линкер содержит один или более из пептида, олигосахарида, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_q-$, $-(C=O)(CH_2)_r-$, $-(C=O)(CH_2CH_2O)_t-$, $-(NHCH_2CH_2)_u-$, -PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB, где каждый из p, q, r, t и u представляет собой целое число от 1 до 12, выбранное

15

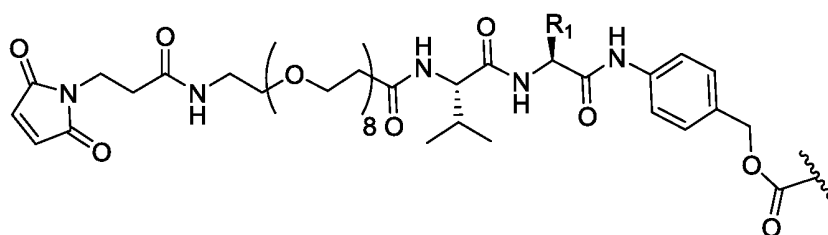
независимо для каждого случая.

В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытых в настоящем документе, линкер имеет структуру



- 5 где R_1 представляет собой CH_3 (Ala) или $(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CO})\text{NH}_2$ (Cit).

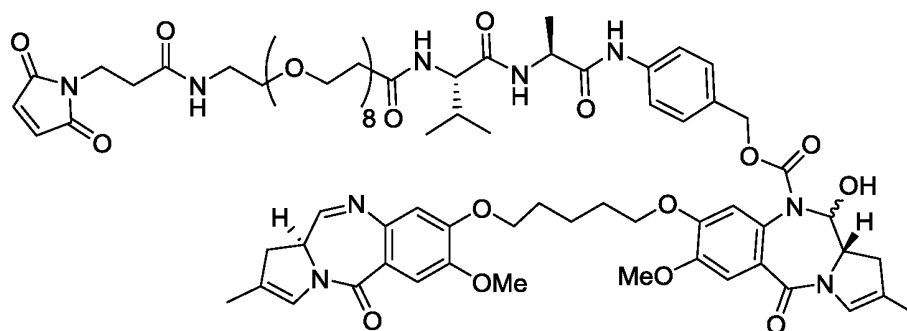
В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытых в настоящем документе, линкер до конъюгации с антителом против CD45 и включающий реакционноспособный заместитель Z' , взятые вместе как L- Z' , имеет структуру



- 10 В определенных вариантах осуществления R_1 представляет собой CH_3 .

В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытых в настоящем документе, конъюгат цитотоксин-линкер до конъюгации с антителом против CD45 и включающий реакционноспособный заместитель Z' , вместе взятые как Cy-L- Z' , представляет собой теизин, имеющий структуру:

15

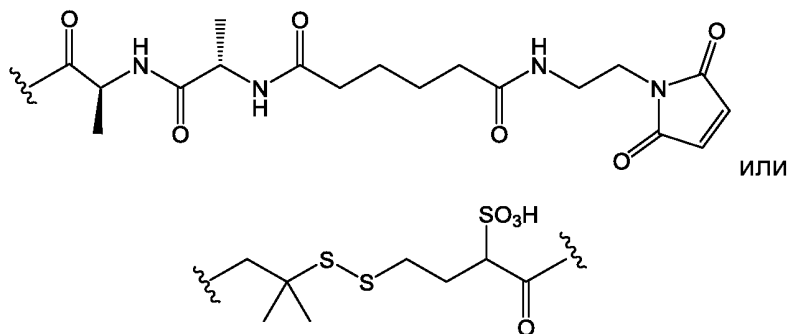


В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытый в настоящем документе, имеет структуру

5 В некоторых вариантах осуществления ADC, описанных в настоящем документе, цитотоксин представляет собой индолинобензодиазепин (IGN). В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер IGN или псевдодимер IGN.

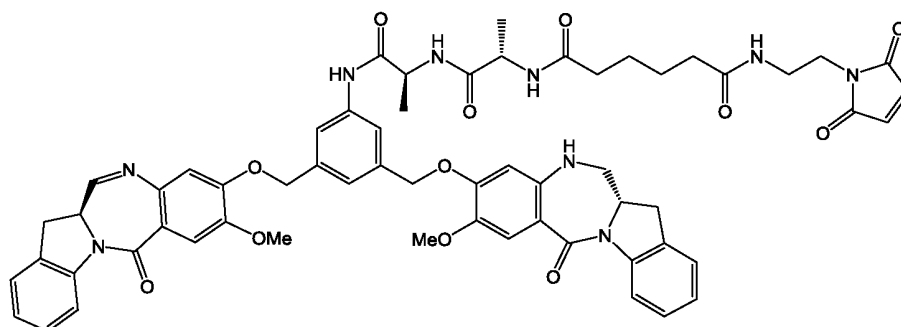
Chemical structure of compound 10, a symmetrical molecule. It features a central benzene ring substituted with an amino group (HN) at the para position and two methoxy groups (OMe) at the meta positions. This central benzene ring is linked via methoxy groups to two indole-3-carboxamide units. Each indole unit consists of an indole ring system with a carboxamide group (NH) at the 3-position and a methoxy group (OMe) at the 5-position. The indole units are attached to the central benzene ring via methoxy groups at the 5-position of the indole ring.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит:



В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитотоксин-линкер до конъюгации с

антителом против CD45 или его антигенсвязывающей частью и включающий реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как Cy-L-Z', имеет структуру:



5 В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ADC, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем документе предложен способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека путем введения пациенту эффективного количества ADC против CD45, описанного выше.

10 В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта клетки CD45+ представляют собой CD3+, CD19+, CD33+, CD34+ или CD45+/B2M+. В некоторых вариантах осуществления клетки CD45+ представляют собой гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). В других вариантах осуществления клетки CD45+ представляют собой ГСК, Т-клетки, В-клетки и/или миелоидные клетки.

15 В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта клетки CD45+ подвергают истощению из костного мозга пациента и/или из периферической крови пациента.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта пациент нуждается в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

20 В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного аспекта способ дополнительно включает введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических
25 стволовых клеток (ГСК), путем введения пациенту ADC, описанного выше, до того, как пациент получит трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу, включающему: (а) введение пациенту-человеку ADC, описанного выше, в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента; и (b) последующее введение пациенту

трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат является аллогенным. В других вариантах трансплантат является аутологичным.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат, содержащий гемопоэтические
5 стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация ADC по существу выведется из крови пациента.

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

10 В некоторых вариантах осуществления при трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток,
15 природных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет заболевание крови, нарушение обмена веществ, рак или аутоиммунное расстройство или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID). В некоторых вариантах осуществления пациент болен раком. В
20 конкретных вариантах осуществления рак представляет собой гематологический рак. В конкретных вариантах осуществления гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз или множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет аутоиммунное расстройство. В конкретных вариантах осуществления аутоиммунное расстройство представляет собой
25 рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа или склеродермию. В других вариантах осуществления аутоиммунное расстройство выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего
30 спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости с иммунной дисфункцией, хронической воспалительной
35 демиелинизирующей полиневропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, глютенowego

герпетиформного дерматита, болезни холодových агглютининов, CREST-синдрома, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпуры, идиопатического легочного фиброза, нейропатии IgA, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромииотонии, синдрома опсоклонус-миоклонус, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, вульгарной 5
10
15
пузырчатки, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного цирроза, узелкового полиартериита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.

Кроме того, настоящее изобретение также включает следующие варианты осуществления:

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, 20
содержащую вариabельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:3, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4, и содержащую легкую цепь, содержащую вариabельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, 25
изложенную в SEQ ID NO:6, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую 30
аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его 35
антигенсвязывающая часть содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1; и
вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,
изложенную в SEQ ID NO:5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его
5 антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его
антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10.

10 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его
антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9; и легкую цепь, содержащую
аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное
15 антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь,
содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, CDR2, имеющую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:13, CDR3, имеющую аминокислотную
последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14, и содержащую легкую цепь, содержащую
20 вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность,
изложенную в SEQ ID NO:16, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность,
изложенную в SEQ ID NO:17, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность,
изложенную в SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его
25 антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую
аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:11.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его
антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую
аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15.

30 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его
антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую
аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:11; и
вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,
изложенную в SEQ ID NO:15.

35 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его

антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:23, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24, и содержащую легкую цепь, содержащую переменную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:21.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:21; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную

последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:33, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:36, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:31.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:31; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39; и легкую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:43, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:41.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:41; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную

последовательность, изложенную в SEQ ID NO:52, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:53, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:54, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:56, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:57, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:51.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:55.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:51; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:55.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:59.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:59; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:63, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность,

изложенную в SEQ ID NO:66, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:67, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68.

5 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:61.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:65.

10 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:61; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:65.

15 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:69.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:69; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70.

25 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:73, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:74, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:76, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:77, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:78.

35 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его

антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:71.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:75.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:71; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:75.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:79.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:80.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:79; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:80.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:82, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:83, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:84, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:86, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:87, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:88.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:81.

В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:85.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:81; и

- 5 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:85.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:89.

- 10 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:90.

- В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:89; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:90.
- 15

- В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:92, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:93, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:94, и содержащую легкую цепь, содержащую вариабельную область, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:96, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:97, CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:98.
- 20
- 25

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:91.

- 30 В другом варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:95.

- В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:91; и
- 35

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:95.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:99.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:100.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:99; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:100.

В одном варианте осуществления антитело против CD45, описанное в настоящем документе, является интактным.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела против CD45 выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂ и scFv.

В других вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть представляет собой человеческое антитело или его связывающий фрагмент.

В других вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит Fc-область, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену H435 или I235/H310/H435 (нумерация EU). В одном варианте осуществления Fc-область содержит аминокислотную замену H435, которая представляет собой H435A (нумерация EU). В другом варианте осуществления Fc-область содержит аминокислотные замены I235/H310/H435, указанные как I235A/H310A/H435A (нумерация EU).

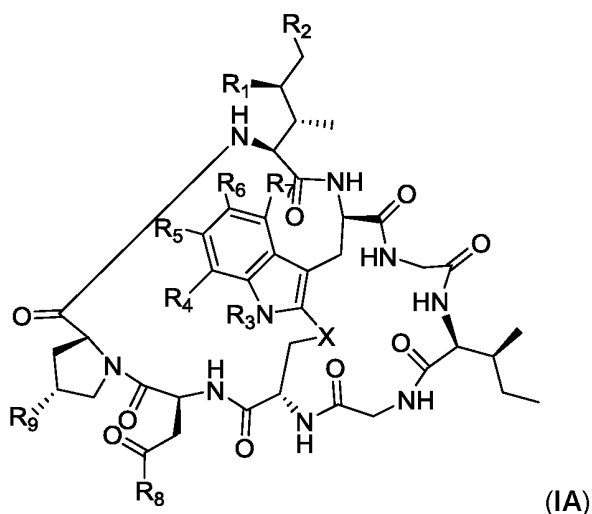
В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть представляет собой IgG, *например*, IgG1 или IgG4.

Также в настоящем документе описаны конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитела против CD45 (или их антигенсвязывающие фрагменты), причем антитело (или CD45-связывающий фрагмент) конъюгировано с цитотоксином через линкер.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит антитело против CD45, конъюгированное с цитотоксином ингибитором РНК-полимеразы.

В одном варианте осуществления ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аматоксин.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит цитотоксин, который представляет собой аматоксин, представленный формулой (IA)



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

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

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D ;

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

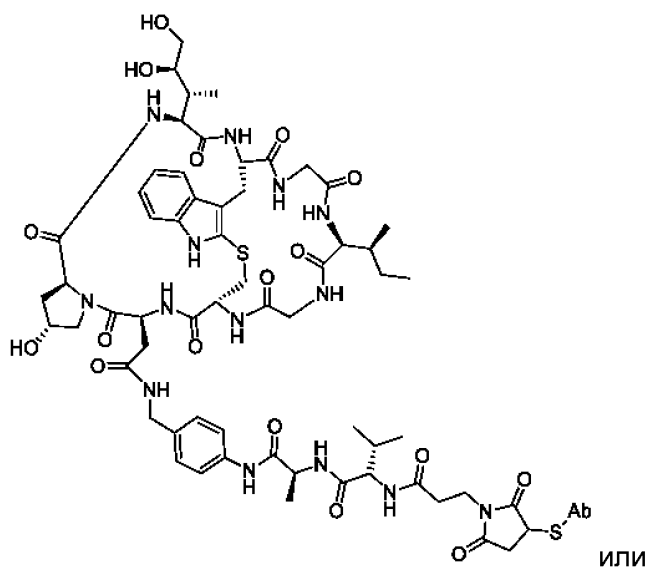
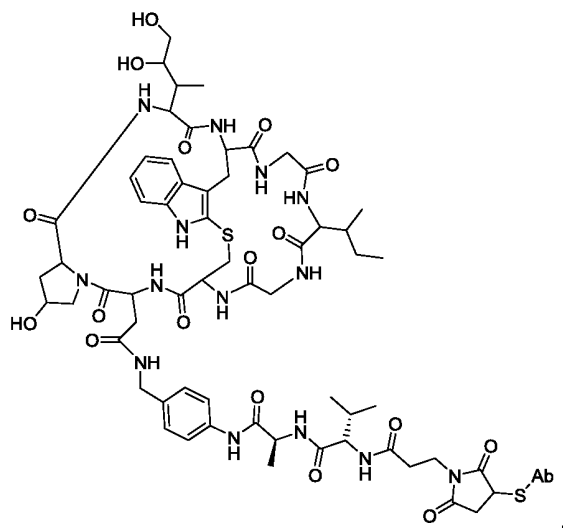
R_C представляет собой -L-Z;

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

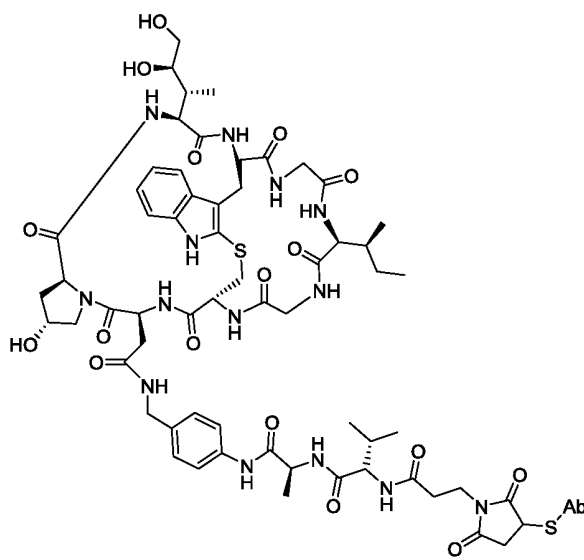
20 L представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алкилен, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкилен, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенилен, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенилен, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинилен, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно
25 замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен; и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит ровно один заместитель R_C.

5 В одном варианте осуществления ADC против CD45 имеет формулу

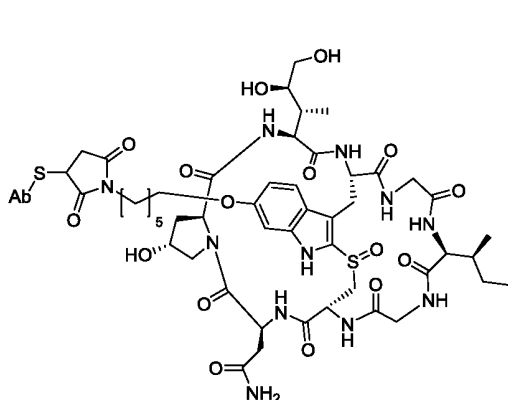


или

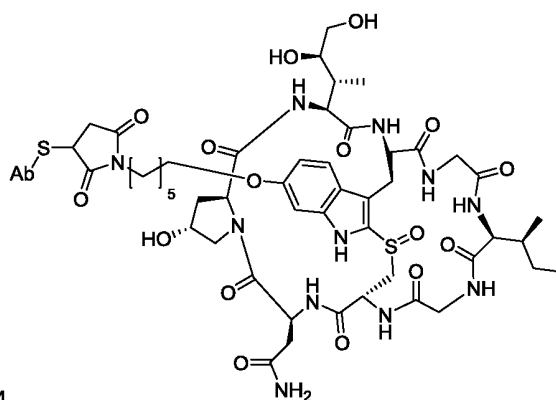


где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 имеет формулу



или



где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит цитотоксин, который представляет собой аманитин, *например*, α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту и проамануллин.

В одном варианте осуществления CD45 против ADC содержит цитотоксин, выбранный из группы, состоящей из экзотоксина А псевдомонад, дебуганина, дифтерийного токсина, сапорина, майтансина, майтансиноида, ауристатина (*например*, MMAE или MMAF), антрациклина, калихимицина, иринотекана, SN-38, дуокармицина, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина и димера индолинобензодиазепина.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит цитотоксин, содержащий бензодиазепиновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ADC

против CD45 содержит пирролобензодиазепин («PBD»). В некоторых вариантах осуществления ADC против CD45 содержит индолинобензодиазепин («IGN»).

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит антитело против CD45, конъюгированное с токсином посредством остатка цистеина в Fc-домене антитела. В одном варианте осуществления остаток цистеина вводят посредством аминокислотной замены в Fc-домене антитела. В одном варианте осуществления аминокислотная замена представляет собой D265C и/или V205C (нумерация EU).

В некоторых вариантах осуществления ADC против CD45 имеет отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Также в настоящее изобретение включена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD45 или ADC, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Описанные в настоящем документе антитела против CD45, фрагменты и ADC можно использовать в терапевтическом способе у пациента-человека, включая, но не ограничиваясь этим, подготовительную терапию перед аллогенной или аутологичной трансплантацией.

В одном варианте осуществления в настоящем документе раскрыт способ истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества антитела против CD45, фрагмента или ADC, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

В других вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата (аллогенного или аутологичного), содержащего гемопоэтические стволовые клетки, при этом пациенту ранее вводили антитело против CD45, фрагмент или ADC, описанные в настоящем документе, в количестве, достаточном для истощения популяции гемопоэтических стволовых клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления гемопоэтическая стволовая клетка представляет собой клетку CD45+.

В других вариантах осуществления антитело против CD45, фрагмент или ADC, описанные в настоящем документе, используют для лечения пациента-человека, страдающего заболеванием крови, нарушением обмена веществ, раком или аутоиммунным заболеванием, или тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID).

В одном варианте осуществления антитело против CD45-антитело, фрагмент или ADC, описанные в настоящем документе, вводят пациенту-человеку для лечения лейкемии у

пациента-человека.

В других вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ, включающий введение пациенту-человеку трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, при этом пациенту ранее вводили антитело против CD45, фрагмент или ADC, описанные в настоящем документе, в количестве, достаточном для истощения популяции иммунных клеток у пациента. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой клетку CD137+, CD2+ или CD5+. В других вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

10

Краткое описание чертежей

На **фиг. 1** графически представлены результаты анализа связывания *in vitro*, в котором связывание антител CD45 с созревшей аффинностью и их соответствующих родительских антител (Родитель 1-4) оценивали на предмет связывания с CD45 человека или CD45 яванского макака. Родитель 1 соответствует описанному в настоящем документе Ab1. Связывание измеряли с помощью интерферометрии биослоя (BLI) указанного очищенного IgG (связанного с сенсором), инкубированного с очищенным эктодоменом CD45 человека или CD45 яванского макака.

15

На **фиг. 2** графически представлены результаты анализа связывания клеток *in vitro* для оценки связывания указанных антител против CD45 (Ab5 и Ab7) с клетками REH, клетками PBMC человека и клетками PBMC яванского макака («супо»). В этом исследовании использовали Ab5_D265C_LALA_H435A и A7_D265C_LALA_H435A, Fc-варианты Ab5 и Ab7. В качестве контроля оценивали ненацеливающий изотипический IgG, имеющий Fc-модифицированную область (D265C LALA H435A).

20

На **фиг. 3** представлены результаты исследования картирования эпитопа CD45 с помощью антитела против CD45 Ab5. Представлена схема сайта взаимодействия Ab5 на CD45 с аминокислотными последовательностями (SEQ ID NO:115 и SEQ ID NO:117), окружающими эпитоп Ab5. Контактные остатки выделены как 405T, 407K, 419Y, 425K, 481R, 505R и 509H, причем нумерация остатков относится к фрагменту CD45 человека, представленному в SEQ ID NO:113.

25

На **фиг. 4** графически представлены результаты анализа интернализации *in vitro*, оценивающего интернализацию конъюгата антитела против CD45-лекарственное средство (ADC), сконструированного из Ab5, в CD34+ клетках костного мозга человека. Ab5 D265C.LALA.H435A, Fc-вариант Ab5, конъюгировали с аматоксином (аматоксином 1 (AM1)) с образованием Ab5-AM1 D265C.LALA.H435A. ADC против CD45 конъюгировали с красителем

35

pHAb, который является водорастворимым, ярким, светочувствительным и pH-реактивным. После интернализации конъюгированное антитело может перемещаться к кислой эндосоме/лизосоме, где краситель pHAb излучает при 563 нМ и может быть обнаружен с помощью проточной цитометрии. CD34+ клетки костного мозга человека инкубировали на льду в течение двух часов с насыщающей концентрацией ADC в течение 0, 2, 24, 48 или 72 часов. Левая панель графически изображает уровень pHAb с течением времени. Молекулу анти-IgG, меченную флуорофором, использовали для оценки связанного поверхностного hlgG1 с помощью проточной цитометрии, исходя из которой рассчитывали процент поверхностного IgG с течением времени, как показано на правой панели.

На фиг. 5А и 5В графически представлены результаты киллинг-анализов клеточных линий *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированные из Ab4 и Ab5, были эффективны при киллинге клеточных линий CD45+ *in vitro* (Jurkat (клеточная линия острого Т-клеточного лейкоза, ATCC № TIB-152), SKNO-1 (клеточная линия острого миелоидного лейкоза JCRB1170) и REH-1 (клеточная линия В-клеточной неходжкинской лимфомы, ATCC № CRL-3004)). Ab4 D265C.LALA.H435A и Ab5 D265C.LALA.H435A, Fc-варианты Ab4 и Ab5, конъюгировали с аматоксином (аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2)) с образованием Ab4-AM2 D265C.LALA.H435A ("Ab4-AM2") и Ab5-AM1 D265C.LALA.H435A ("Ab5-AM1"). На фиг. 5А клеточные линии SKNO1, Jurkat, REH (CD45+) или REH (CD45-/-) культивировали в течение семи суток в присутствии Ab5-AM1 или контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM1»), а жизнеспособность клеток измеряли по люминесценции (ось Y) с помощью Celltiter Glo в зависимости от концентрации антитела (ось X). На фиг. 5В клеточные линии SKNO1, Jurkat или REH (CD45+) культивировали в течение семи суток в присутствии Ab4-AM2 или контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM2»), и жизнеспособность клеток измеряли на основе люминесценции (ось Y) с помощью Celltiter Glo в зависимости от концентрации антитела (ось X).

На фиг. 6А-6С графически представлены результаты киллинг-анализов первичных клеток *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированные из Ab2, Ab4 или Ab5, были эффективны в отношении киллинга первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека или яванского макака (PBMC) или гемопоэтических стволовых клеток человека (ГСК) *in vitro*. Ab2 D265C.LALA.H435A, Ab4 D265C.LALA.H435A, Ab5 D265C.LALA.H435A, Fc-варианты Ab2, Ab4 и Ab5 конъюгировали с аматоксином (аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2)) с образованием Ab2-AM2 D265C.LALA.H435A ("Ab2-AM2"), Ab4-AM2 D265C.LALA.H435A ("Ab4-AM2") и Ab5-AM1 D265C.LALA.H435A ("Ab5-AM1"). На фиг. 6А PBMC человека культивировали в течение семи

суток в присутствии конъюгата CD45-AM (Ab5-AM1) или контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM1»), и жизнеспособность клеток (ось Y) измеряли с помощью Celltiter Glo в зависимости от концентрации антител (ось X). На **фиг. 76В** и **фиг. 6С** первичные CD34⁺ клетки костного мозга человека культивировали в течение 5 суток с анти-
 5 CD45-ADC (Ab5-AM1 на **фиг. 6В**; Ab2-AM2 или Ab4-AM2 на **фиг. 6С**) или конъюгатом «изотип-AM», и количество живых CD34⁺CD90⁺ ГСК (ось Y) определяли с помощью проточной цитометрии в зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 7** графически представлены результаты киллинг-анализа первичных клеток *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированный из Ab2, был эффективен при
 10 уничтожении нестимулированных (неделящихся) и стимулированных (делящихся) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) *in vitro*. Ab2 D265C.LALA.H435A, Fc-вариант Ab2, конъюгировали с аматоксином 2 (AM2) с образованием Ab2-AM2 D265C.LALA.H435A («Ab2-AM2»). Стимулированные и нестимулированные PBMC культивировали в течение четырех суток в присутствии конъюгата CD45-AM (Ab2-AM2) или
 15 контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM2»), и жизнеспособность клеток (ось Y) измеряли с помощью Celltiter Glo в зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 8** графически представлены результаты киллинг-анализа *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированный из Ab6, был эффективен при
 20 киллинге макрофагов *in vitro*. Ab6 D265C.LALA.H435A, Fc-вариант Ab6, конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) с образованием Ab6-AM1 D265C.LALA.H435A («Ab6-AM1»). Макрофаги культивировали в течение шести суток в присутствии конъюгата CD45-AM (Ab6-AM1) или контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM1»), и жизнеспособность клеток измеряли по люминесценции (RLU; ось Y) с помощью Celltiter Glo в
 25 зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 9** графически представлены результаты анализа стабильности в сыворотке, оценивающего стабильность ADC против CD45, сконструированного из Ab5, в сыворотке человека (верхняя панель) или сыворотке яванского макака («яванского макака») (нижняя панель). Ab5 D265C.LALA.H435A, Fc-вариант Ab5, конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) с
 30 образованием Ab5-AM1 D265C.LALA.H435A («Ab5-AM1»). Чтобы определить, стабилен ли этот ADC в сыворотке, ADC предварительно инкубировали в сыворотке человека или яванского макака (суно) при 37°C в течение 0 или 72 часов, после чего ADC оценивали в отношении киллинга клеток REH. Процент жизнеспособности клеток (ось Y) клеток REH оценивали по Cell-titer Glo в зависимости от концентрации обработанных сывороткой ADC
 35 (ось X).

На **фиг. 10А-10Е** графически изображены результаты анализа истощения клеток *in vivo*, показывающие, что ADC против CD45 с коротким периодом полувыведения, сконструированные из Ab2, Ab3, Ab5 и Ab7, избирательно истощают человеческие ГСК и иммунные клетки у гуманизированных мышей NSG. Ab2 D265C.LALA.H435A, Ab3 D265C.LALA.H435A, Ab5 D265C.LALA.H435A и Ab7 D265C.LALA.H435A (Fc-варианты Ab2, Ab3, Ab5, and Ab7) конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) или Аматоксином 2 (AM2) с образованием Ab2 D265C.LALA.H435A-AM2 ("Ab2-AM2"), Ab3 D265C.LALA.H435A-AM2 ("Ab3-AM2"), Ab5 D265C.LALA.H435A-AM1 ("Ab5-AM1") и Ab7 D265C.LALA.H435A-AM1("Ab7-AM1"). Мышей, получавших PBS, оценивали в качестве контроля. На **фиг. 10А** показано процентное содержание человеческих CD3+ Т-клеток, CD19+ В-клеток и CD33+ миелоидных клеток по отношению к исходному уровню у мышей через 14 суток после введения ADC против CD45 (Ab2-AM2, Ab3-AM2, AbA-AM2). На **фиг. 10В** показан процент клеток CD45+ человека в периферической крови через 0, 7 и 14 суток после введения ADC против CD45 (Ab2-AM2 или Ab3-AM2). На **фиг. 10С** показано абсолютное количество клеток CD45 человека (левая панель) и ГСК человека (правая панель) в костном мозге гуманизированных мышей NSG через 14 суток после введения ADC против CD45 (Ab2-AM2 или Ab3-AM2). На **фиг. 10D** графически представлены процентное содержание и абсолютное количество ГСК (клеток CD34+, клеток CD34+, CD38- и CD34+, CD117+) в костном мозге гуманизированных мышей NSG через 14 суток после введения ADC против CD45 (Ab2-AM2 и Ab3-AM2). На **фиг. 10Е** графически представлен процент клеток CD45 человека в периферической крови (относительно исходного уровня), абсолютное количество клеток CD45 человека в костном мозге и абсолютное количество ГСК (CD34+CD38-клеток) в костном мозге гуманизированных NSG мышей через 14 суток после введения ADC против CD45 (Ab5-AM1 или Ab7-AM1).

На **фиг. 11А и 11В** графически изображены результаты анализа истощения клеток *in vivo*, показывающие, что ADC анти-CD45-аматоксин с коротким периодом полувыведения, сконструированные из Ab4, Ab5 и Ab7, эффективно истощают ГСК и иммунные клетки приматов, отличных от человека, *in vivo*. Ab4 D265C.LALA.H435A, Ab5 D265C.LALA.H435A и Ab7 D265C.LALA.H435A (Fc-варианты Ab4, Ab5 и Ab7) конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) с образованием Ab4 D265C.LALA.H435A-AM2 ("Ab4-AM1"), Ab5 D265C.LALA.H435A-AM1 ("Ab5-AM1") и Ab7 D265C.LALA.H435A-AM1("Ab7-AM1"). На **фиг. 11А** графически показано абсолютное количество лимфоидных клеток в периферической крови яванских макаков через 72 часа после введения ADC против CD45 (Ab5-AM1 или Ab7-AM1 в дозе 0,5 мг/кг или 2 мг/кг). На **фиг. 11В** графически представлены уровни лейкоцитов, ГСК и лимфоцитов в костном мозге яванских макаков на 7-й сутки после введения ADC против CD45 (Ab4-AM1 в дозе 1 мг/кг или Ab5-AM1 в дозе 0,5 или 2 мг/кг).

На **фиг. 12** графически представлены результаты фармакокинетического анализа у яванских макаков ADC против CD45 с коротким периодом полувыведения, сконструированных из Ab4. Ab4 D265C.LALA.H435A, Fc-вариант Ab4, конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2) с образованием Ab4 D265C.LALA.H435A-AM1 ("Ab4-AM1") и Ab4 D265C.LALA.H435A-AM2 ("Ab4-AM2"). Среднюю концентрацию лекарственного средства в плазме (ось Y) каждого ADC контролировали во времени (ось X).

На **фиг. 13** графически представлены результаты анализа реагента полиспецифичности (PSR), оценивающего связывание гуманизированных клонов, происходящих от родительских клонов A, B и C из примера 15, со смесью мембранных и цитозольных белков.

На **фиг. 14** графически представлены результаты анализа связывания клеток *in vitro* для оценки связывания антител против CD45 AbA, AbB и AbC (идентифицированных в примере 15) с клетками PBMC человека и клетками PBMC яванского макака («супо»).

На **фиг. 15** представлены результаты исследования картирования эпитопа CD45 с использованием антитела AbA против CD45, идентифицированного в примере 15. Представлена схема сайта взаимодействия AbA на CD45 с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:117), окружающей обозначенный эпитоп AbA. Контактные остатки выделены как 486R, 493Y и 502T, при этом нумерация остатков относится к фрагменту CD45 человека, представленному SEQ ID NO:113.

На **фиг. 16** графически представлены результаты анализа интернализации *in vitro*, оценивающего интернализацию конъюгата антитела против CD45-лекарственное средство (ADC), сконструированного из AbA, в CD34+ клетках костного мозга человека. AbA_D265C_LALA_H435A, вариант Fc AbA, конъюгировали с аматоксином (аматоксином 1) с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1, ADC против CD45. ADC против CD45 конъюгировали с красителем pHAb, который является водорастворимым, ярким, светочувствительным и pH-реактивным. После интернализации конъюгированное антитело может перемещаться к кислой эндосоме/лизосоме, где краситель pHAb излучает при 563 нМ и может быть обнаружен с помощью проточной цитометрии. CD34+ клетки костного мозга человека инкубировали на льду в течение двух часов с насыщающей концентрацией ADC в течение 0, 2, 24, 48 или 72 часов. Левая панель графически изображает уровень pHAb с течением времени. Молекулу анти-IgG, меченную флуорофором, использовали для оценки связанного поверхностного hlgG1 с помощью проточной цитометрии, исходя из которой рассчитывали процент поверхностного IgG с течением времени, как показано на правой панели.

На **фиг. 17А и 17В** графически представлены результаты киллинг-анализов первичных клеток *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированные из AbA, были эффективны в отношении киллинга первичных моноклеарных клеток периферической крови человека или яванского макака (PBMC) *in vitro*.

5 AbA_D265C_LALA_H435A, Fc-вариант AbA, был конъюгирован с одним из двух аматоксинов, т. е. аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2), с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2. PBMC человека культивировали в течение семи суток в присутствии указанного конъюгата CD45-AM (AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 (**Фиг 17А**) или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 (**Фиг. 17В**)) или
10 контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM1» или «изотип-AM2»), и жизнеспособность клеток (ось Y) измеряли с помощью Celltiter Glo в зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 18** графически представлены результаты киллинг-анализов первичных клеток *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированные из AbA, были эффективны
15 при киллинге гемопоэтических стволовых клеток человека (ГСК) *in vitro*. Fc-варианты AbA, AbA, AbA_D265C_LALA_H435A and AbA_D265C_LALA_IHH были конъюгированы с аматоксином 1 (AM1), аматоксином 2 (AM2) или PBD с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1, AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 или AbA_D265C_LALA_IHH-PBD. Первичные CD34⁺ клетки костного мозга человека культивировали в течение 5 суток в
20 присутствии указанных ADC (AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 и AbA_D265C_LALA_IHH-PBD) или изотипического контроля. Количество живых CD34⁺CD90⁺ ГСК (ось Y) определяли с помощью проточной цитометрии в зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 19** графически представлены результаты киллинг-анализа *in vitro*, показывающие, что ADC против CD45, сконструированный из AbA, был эффективен при
25 киллинге макрофагов *in vitro*. AbA_D265C_LALA_H435A, вариант Fc AbA, был конъюгирован с аматоксином 1 (AM1) с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1, CD45 ADC. Макрофаги культивировали в течение шести суток в присутствии ADC (AbA_D265C_LALA_H435A-AM1) или контрольного, ненацеливающего изотипа, связанного с ADC («изотип-AM1»), и жизнеспособность клеток измеряли по люминесценции (RLU; ось Y) с помощью Celltiter Glo в
30 зависимости от концентрации антител (ось X).

На **фиг. 20** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у гуманизированных мышей NSG, обработанных конъюгатом антител против CD45-лекарственное средство (AbA-PBD), в котором оценивали истощение клеток человека в периферической крови. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя
35 (PBS), либо конъюгата «изотипический контроль-PBD» («Iso-PBD»), либо CD45-PBD (AbA-

PBD). Периферическую кровь собирали в указанные моменты времени и оценивали общее содержание гемопозитических клеток человека ($h\beta_2M^+$), содержание миелоидных клеток ($CD33^+$), содержание В-клеток ($CD19^+$) и содержание Т-клеток ($CD3^+$). Результаты представлены в виде процента истощения, нормализованного к исходному уровню.

5 На **фиг. 21** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у гуманизированных мышей NSG, получавших ADC против CD45 (AbA-PBD), в котором оценивали истощение клеток человека в костном мозге. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо конъюгата «изотип-IGN», либо CD45-PBD (AbA-PBD). Образцы BM собирали на 14-й сутки после обработки и оценивали на содержание
10 человеческих клеток-предшественников/ГСК. Результаты представлены в виде процентного содержания человеческих клеток и абсолютного числа/ в бедренной кости.

На **фиг. 22** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у гуманизированных мышей NSG, обработанных ADC против CD45-(AbA-PBD), в которых истощение человеческих CD45⁺ клеток, двойных положительных (DP) тимоцитов, зрелых
15 CD4⁺ одиночных положительных (SP) тимоцитов или зрелых CD8⁺ одиночных положительных (SP) тимоцитов оценивали через 14 суток после лечения. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо конъюгата «изотип-IGN», либо CD45-PBD (AbA-PBD).

На **фиг. 23** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у
20 гуманизированных мышей NSG, обработанных конъюгатом антитело против CD45-лекарственное средство (AbA-IGN), в котором оценивали истощение клеток человека в периферической крови. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо конъюгата «изотипический контроль-IGN» (“Iso-IGN”), либо CD45-IGN (AbA-IGN). Периферическую кровь собирали в указанные моменты времени и оценивали общее
25 содержание гемопозитических клеток человека ($h\beta_2M^+$), содержание миелоидных клеток ($CD33^+$), содержание В-клеток ($CD19^+$) и содержание Т-клеток ($CD3^+$). Результаты представлены в виде процента истощения, нормализованного к исходному уровню.

На **фиг. 24** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у
30 гуманизированных мышей NSG, получавших CD45-IGN, в котором оценивали истощение клеток человека в костном мозге. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо конъюгата «изотип-IGN», либо CD45-IGN. Образцы BM собирали на 14-й сутки после обработки и оценивали на содержание человеческих клеток-предшественников/ГСК. Результаты представлены в виде процентного содержания человеческих клеток и абсолютного числа/ в бедренной кости.

На **фиг. 25** графически представлены результаты анализа истощения *in vivo* у гуманизированных мышей NSG, обработанных AbA-IGN, в которых оценивали истощение человеческих CD45⁺ клеток, двойных положительных (DP) тимоцитов, зрелых CD4⁺ одиночных положительных (SP) тимоцитов или зрелых CD8⁺ одиночных положительных (SP) тимоцитов. Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо конъюгата «изотип-IGN», либо AbA-IGN.

На **фиг. 26** графически представлены результаты анализа истощения клеток *in vivo*, показывающие, что ADC анти-CD45-аматоксин, сконструированный из AbA, эффективно истощает ГСК и иммунные клетки приматов, отличных от человека, *in vivo*. AbA_D265C_LALA_H435A, Fc-вариант AbA (модификации Fc-области были введены для уменьшения периода полувыведения), конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2) с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 ("CD45 ADC-AM1") или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 ("CD45 ADC-AM2"). Уровни лейкоцитов, ГСК и иммунных клеток (В-клетки, Т-клетки и миелоидные клетки) в костном мозге яванских макаков измеряли в указанные моменты времени (сутки 6, сутки 14, сутки 20 и сутки 28) после введения однократной инъекции 1 мг/кг указанных ADC.

На **фиг. 27** графически представлены результаты фармакокинетического анализа ADC против CD45, сконструированных из AbA, у яванских макаков. AbA_D265C_LALA_H435A, Fc-вариант AbA (модификации Fc-области были введены для уменьшения периода полувыведения), конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2) с образованием AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 ("CD45 ADC-AM1") или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 ("CD45 ADC-AM2"). Среднюю концентрацию лекарственного средства в плазме (ось Y) каждого ADC контролировали во времени (ось X).

На **фиг. 28** графически представлены результаты исследования на мышах *in vivo*, показывающие, что однократная доза AbA-AM ADC оказывает циторедуктивное действие на опухоли, полученные у пациента, и продлевает выживаемость за пределы стандартов лечения на группе моделей, имитирующих заболевание, не подвергавшееся лечению и рецидивирующее заболевание. AML модели ксенотрансплантата пациента (PDX) [AML #1 (получен от пациента, ранее не получавшего лечения), AML #2 (получен от получавшего предварительное лечение пациента с рецидивом тяжелой формы после аллогенной HSCT)] и T-ALL (получен от пациента с прогрессирующим заболеванием после химиотерапии DHAP), вместе с полученной из клеточной линии моделью ALL иммортализованной клеточной линии (REH-Luc) систематически инокулировали мышам с иммунодефицитом (NSG-SGM3 или NSG). Лечение начинали, когда периферическая опухолевая нагрузка PDX (n=3-5/группа) и CDX у мышей достигала 2-16% бластов в периферической крови или на 5-й

сутки после имплантации для модели REH-luc (n=10/группа). Разовые дозы анти-CD45-ADC (1, 3, 6 или 10 мг/кг) сравнивали с носителем (PBS) или конъюгатом «изотип-AM» (6 или 10 мг/кг) и сравнивали с клинически подтвержденным стандартом схемы лечения Ara-c (30 мг/кг QDx5, в/в), дексаметазона (5 мг/кг Q3Dx9, в/б) или доксорубицина (3 мг/кг QWx3, в/в).

5 Показана опухолевая нагрузка на протяжении исследования.

На **фиг. 29A-29C** графически изображены результаты исследования на мышах *in vivo*, показывающие, что короткий период полувыведения CD45-ADC (AbA-AM) увеличивает медиану выживаемости в модели ALL ксенотрансплантата REH-люциферазы. На **фиг. 29A** графически представлена процентная выживаемость в зависимости от суток после имплантации для мышей в указанных группах обработки. На **фиг. 29B** графически изображен уровень свечения (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего) в REH-люциферазе в течение времени исследования в указанных группах обработки. На **фиг. 29C** представлены репрезентативные псевдоцветные изображения сигнала биolumинесценции были получены на 22-23 сутки после имплантации для всех групп обработки.

15 На **фиг. 30A и 30B** графически изображены результаты исследования на мышах *in vivo*, показывающие, что короткий период полувыведения CD45-ADC (AbA-AM) снижает количество клеток периферического лейкоза, что приводит к задержке роста опухоли в модели T-ALL PDX. На **фиг. 30A** графически представлена процентная выживаемость в зависимости от суток после имплантации для мышей в указанных группах обработки. На **фиг. 30B** графически представлен процент опухолевой массы (hCD45+) в периферической крови в зависимости от суток после имплантации для мышей в каждой из указанных групп обработки.

На **фиг. 31A-31D** графически изображены результаты исследования на мышах *in vivo*, показывающие, что короткий период полувыведения CD45-DC (AbA-AM) эффективно истощает лейкозные клетки человека в двух моделях AML, полученных от пациентов. На **фиг. 31A и 31B** графически изображен процент выживаемости в зависимости от суток после имплантации для мышинной модели PDX AML #1 (**фиг. 31A**) или для мышинной модели PDX AML #2 (**фиг. 31B**) в указанных группах обработки. На вставке к каждой из **фиг. 31A и 31B** показан анализ проточной цитометрии каждой модели AML PDX для оценки экспрессии CD117 и CD45 на клеточной поверхности спленоцитов больных мышей. На **фиг. 31C и 31D** графически изображен процент опухолевой нагрузки (hCD45+) в периферической крови в зависимости от суток после имплантации для мышинной модели PDX AML #1 (**фиг. 31C**) и для мышинной модели PDX с AML #2 (**фиг. 31D**) в каждой из указанных групп обработки.

На **фиг. 32** показано множественное выравнивание последовательностей 35 переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антител против

CD45 Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и Ab7. CDR каждой вариабельной области указаны жирным шрифтом.

Подробное описание изобретения

5 В настоящем документе раскрыты новые антитела против CD45, их антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство; ADC), которые являются подходящими, например, поскольку они являются перекрестно-реактивными между CD45 человека и CD45 примата, отличного от человека. Кроме того, антитела против CD45 и их фрагменты, описанные в настоящем

10 документе, можно использовать в качестве терапевтических средств. Например, антитела против CD45, их фрагменты и ADC против CD45 можно использовать для лечения пациентов с состояниями, при которых истощение клеток CD45+ является благоприятным, включая, но не ограничиваясь ими, лейкозы и лимфомы, а также пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз и склеродермия. Кроме того, антитела

15 против гемопоэтических клеток (антитела против CD45), включенные в настоящее описание, применимы в терапии гемопоэтическими стволовыми клетками. Например, антитела или ADC согласно настоящему изобретению применимы в процедурах подготовки, в которых пациента готовят к получению трансплантата, включающего гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата гемопоэтических

20 стволовых клеток. В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, пациента можно подготовить к терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток путем введения пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента против CD45, способного связывать CD45 (например, CD45, экспрессируемый гемопоэтическими клетками (например, гемопоэтическими стволовыми клетками или зрелыми иммунными

25 клетками (например, Т-клетками)). Как описано в настоящем документе, антитело против CD45 может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Введение ADC, способного к связыванию CD45, пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток,

30 например, путем избирательного истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая место для заполнения экзогенным трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток.

В следующих разделах представлены новые антитела против CD45 и их фрагменты, которые обладают уникальными свойствами, например, перекрестной реактивностью с CD45

35 как человека, так и примата, отличного от человека. В следующих разделах также

приводится описание антител против CD45 или их конъюгатов, которые можно вводить пациенту, например, пациенту, страдающему раком или аутоиммунным заболеванием, или пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, для стимуляции приживления трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, а также

5 способы введения таких терапевтических средств пациенту (например, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток).

Определения

Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к значению,

10 которое находится в пределах 5% выше или ниже описываемого значения. Например, термин «примерно 100 нМ» указывает на диапазон 95-105 нМ.

Используемый в настоящем документе термин «аллогенный» в контексте трансплантации используется для определения трансплантата (например, клетки, ткани или трансплантата органа), который трансплантируется от донора реципиенту, при этом

15 реципиентом является другой индивидуум того же вида по отношению к донору.

Используемый в настоящем документе термин «аутологичный» в контексте трансплантации относится к трансплантату, в котором донором и реципиентом является один и тот же человек, т. е. один и тот же субъект.

Используемый в настоящем документе термин «ксеногенный» в контексте

20 трансплантации относится к трансплантату, в котором донор и реципиент принадлежат к разным видам.

Используемый в настоящем документе термин «иммунная клетка» включает, но не ограничивается ими, клетку гемопоэтического происхождения, которая играет роль в иммунном ответе. Иммунные клетки включают, но не ограничиваются ими, Т-клетки и

25 природные клетки-киллеры (NK). Природные клетки-киллеры хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления природные клетки-киллеры включают клеточные линии, такие как клетки NK-92. Дополнительные примеры клеточных линий NK включают клетки NKG, YT, NK-YS, HANK-1, YTS и NKL. Иммунная клетка может быть аллогенной или аутологичной.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфично связывается с определенным антигеном или иммунологически реагирует с ним. Антитело включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичное антитело) и фрагменты антител при условии, что они проявляют

35 желаемую антигенсвязывающую активность.

Как правило, антитела содержат тяжелые и легкие цепи, содержащие антигенсвязывающие области. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающая часть» антитела, используемый в настоящем документе, относится к одной или более частям антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном-мишенью. Антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Фрагменты антител могут представлять собой, например, Fab, F(ab')₂, scFv, диатело, триатело, аффитело, нанотело, аптамер или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают, но не ограничиваются ими: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb, включающий домены VH и VL; (vi) фрагмент dAb, который состоит из домена VH (см., например, Ward et al., Nature 341:544-546, 1989); (vii) dAb, который состоит из домена VH или VL; (viii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR); и (ix) комбинацию двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или шести) выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных способов с помощью

линкера, что позволяет сделать их единой белковой цепью, в которой области VL и VH спариваются, образуя моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988 and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием
 5 обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов или, в некоторых случаях, методами химического синтеза пептидов, известными в данной области
 10 техники.

Термин «интактное» или «полноразмерное» антитело в настоящем документе относится к антителу, имеющему два полипептида тяжелой (H) цепи и два полипептида легкой (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления токсин может быть конъюгирован с интактным антителом против CD45,
 15 имеющим аминокислотные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, описанные в настоящем документе.

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым способом, доступным или известным в данной
 20 области техники, и не ограничивается антителами, полученными посредством гибридомной технологии. Моноклональные антитела, подходящие для целей настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование гибридомных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

Термины «Fc-область», «Fc-домен» и «Fc-домен IgG», используемые в настоящем документе, относятся к части иммуноглобулина, например, молекулы IgG, которая соответствует кристаллизуемому фрагменту, полученному расщеплением молекулы IgG папаином. Область Fc включает C-концевую половину двух тяжелых цепей молекулы IgG, которые связаны дисульфидными связями. Он не обладает антигенсвязывающей
 25 активностью, но содержит углеводную часть и сайты связывания для рецепторов комплемента и Fc, включая рецептор FcRn (см. ниже). Например, Fc-домен содержит весь второй константный домен CH2 (остатки в положениях согласно EU 231-340 IgG1) и третий константный домен CH3 (остатки в положениях согласно EU 341-447 IgG1 человека). Как используется в настоящем документе Fc-домен включает «нижнюю шарнирную область»
 30 (остатки в положениях согласно EU 233-239 IgG1).

Fc может относиться к этой области отдельно или к этой области в контексте антитела, фрагмента антитела или слитого белка Fc. Полиморфизмы наблюдались в ряде положений в Fc-доменах, включая, помимо прочего, положения согласно EU 270, 272, 312, 315, 356 и 358, и, таким образом, могут существовать небольшие различия между последовательностями, представленными в настоящей заявке, и последовательностями, известными в данной области техники. Таким образом, «Fc-домен IgG дикого типа» или «Fc-домен IgG WT» относится к любой встречающейся в природе Fc-области IgG (т.е. любому аллелю). Последовательности тяжелых цепей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека можно найти в ряде баз данных последовательностей, например, в базе данных Uniprot (www.uniprot.org) под номерами доступа P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN) и P01861 (IGHG1_HUMAN) соответственно.

Термины «модифицированная Fc-область» или «вариант Fc-области», используемые в настоящем документе, относятся к Fc-домену IgG, содержащему одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций, введенных в любое положение внутри Fc-домена. В некоторых аспектах вариант Fc-домена IgG содержит одну или более аминокислотных замен, приводящих к уменьшенной или устраненной аффинности связывания с Fc гамма-R и/или C1q по сравнению с Fc-доменом дикого типа, не содержащим одну или более аминокислотных замен. Кроме того, взаимодействия связывания Fc необходимы для множества эффекторных функций и последующих сигнальных событий, включая, но не ограничиваясь ими, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC). Соответственно, в некоторых аспектах антитело, содержащее вариант Fc-домена (например, антитело, слитый белок или конъюгат), может проявлять измененную аффинность связывания по меньшей мере с одним или более Fc-лигандами (например, Fc gamma Rs) по сравнению с соответствующим антителом, в противном случае имеющим аминокислотную последовательность, но не содержащую одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций, таких как, например, немодифицированная Fc-область, содержащая встречающиеся в природе аминокислотные остатки в соответствующем положении в Fc-области.

Вариантные Fc-домены определяются в соответствии с модификациями аминокислот, из которых они состоят. Для всех аминокислотных замен, обсуждаемых в настоящем документе в отношении Fc-области, нумерация всегда соответствует индексу EU согласно Kabat. Так, например, D265C представляет собой Fc-вариант с аспарагиновой кислотой (D) в положении 265 согласно EU, замещенной цистеином (C) относительно исходного Fc-домена. Следует отметить, что порядок, в котором приведены замены, является произвольным.

Термины «Fc-рецептор гамма» или «Fc-гамма-R» в настоящем документе относятся к любому члену семейства белков, которые связывают Fc-область антитела IgG и кодируются генами FcgammaR. У людей это семейство включает, но не ограничивается ими, FcgammaRI (CD64), включая изоформы FcgammaRIa, FcgammaRIb, и FcgammaRIc; FcgammaRII (CD32),
 5 включая изоформы FcgammaRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcgammaRIIb (включая FcgammaRIIb-1 и FcgammaRIIb-2), и FcgammaRIIc; и FcgammaRIII (CD16), включая изоформы FcgammaRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcgammaRIIIb (включая аллотипы FcgammaRIIIb-NA1 и FcgammaRIIIb-NA2), а также любые необнаруженные человеческие FcgammaR или изоформы или аллотипы FcgammaR. FcgammaR может происходить из
 10 любого организма, включая, помимо прочего, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Мышиные FcgammaR включают, но не ограничиваются ими, FcgammaRI (CD64), FcgammaRII (CD32), FcgammaRIII (CD16) и FcgammaRIII-2 (CD16-2), а также любые необнаруженные мышиные FcgammaR или изоформы или аллотипы FcgammaR.

Термин «эффекторная функция», используемый в настоящем документе, относится к
 15 биохимическому событию, которое возникает в результате взаимодействия Fc-домена с Fc-рецептором. Эффекторные функции включают, но не ограничиваются ими, ADCC, ADCP и CDC. Под "эффекторной клеткой" в контексте настоящего изобретения подразумевается клетка иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, но не
 20 ограничиваются ими, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, природные клетки-киллеры (NK) и гамма-дельта Т-клетки, и могут происходить из любого организма, включая, но не ограничиваясь ими, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

Термин «молчащий», «выключенный» или «подавленный», используемый в настоящем документе, относится к антителу, имеющему модифицированную Fc-область, описанному в настоящем документе, которое имеет сниженное связывание с Fc-рецептором гамма (FcγR) по сравнению со связыванием идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область, с FcγR (например, снижение связывания с FcγR по
 30 меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 % относительно связывания идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область, с FcγR, как измерено, например, с помощью BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело с выключенным Fc не имеет обнаруживаемого связывания с FcγR.
 35 Связывание антитела, имеющего модифицированную Fc-область, с FcγR можно определить

с использованием различных методов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, равновесных методов (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализа (RIA)), или анализа поверхностного плазмонного резонанса, или
 5 другого механизма анализа, основанного на кинетике (например, анализа BIACORE.RTM. или анализа Octet™ (forteBIO)), и других способов, таких как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания с переносом энергии флуоресцентного резонанса (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие методы способны использовать метку на одном или более исследуемых компонентах и/или
 10 использовать различные способы обнаружения, включая, помимо прочего, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в публикации Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой основное внимание уделяется взаимодействиям антитело-иммуноген. Одним из примеров анализа конкурентного
 15 связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого антигена с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого антигена и обнаружение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность представляющего интерес антитела к конкретному антигену и скорость диссоциации связывания можно определить по данным анализа графика Скэтчарда. Конкуренцию со
 20 вторым антителом также можно определить с помощью радиоиммуноанализа. В этом случае антиген инкубируют с представляющим интерес антителом, конъюгированным с меченым соединением, в присутствии возрастающих количеств второго немеченого антитела.

Используемый в настоящем документе термин «идентичное антитело, содержащее немодифицированную Fc-область» относится к антителу, в котором отсутствуют указанные
 25 аминокислотные замены (например, D265C, H435A), но которое в остальном имеет ту же аминокислотную последовательность, что и Fc-модифицированное антитело, с которым его сравнивают.

Термины «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относятся к форме цитотоксичности, при которой полипептид, содержащий Fc-
 30 домен, например, антитело, связывается с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, прежде всего NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах) и позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфично связываться с несущей антиген «клеткой-мишенью» и впоследствии уничтожать клетку-мишень цитотоксинами. (Hogarth et al., *Nature review Drug Discovery* 2012, 11:313)
 35 Предполагается, что, помимо антител и их фрагментов, другие полипептиды, содержащие

Fc-домены, например, слитые белки Fc и белки-конъюгаты Fc, обладающие способностью специфично связываться с несущей антиген клеткой-мишенью, может оказывать клеточно-опосредованное цитотоксическое действие.

Для простоты клеточно-опосредованная цитотоксичность, возникающая в результате активности полипептида, содержащего Fc-домен, также упоминается как ADCC-активность. Можно оценить способность любого конкретного полипептида согласно настоящему изобретению опосредовать лизис клетки-мишени с помощью ADCC. Для оценки активности ADCC представляющий интерес полипептид (например, антитело) добавляют к клеткам-мишеням в комбинации с иммунными эффекторными клетками, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз обычно обнаруживают по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). Конкретные примеры анализа ADCC *in vitro* описаны в Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351 (1987); Wilkinson et al., J. Immunol. Methods 258:183 (2001); Patel et al., J. Immunol. Methods 184:29 (1995). В качестве альтернативы или дополнительно ADCC-активность представляющего интерес антитела может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652 (1998).

Используемые в настоящем документе термины «подготовка» и «подготовительный» относятся к процессам, посредством которых пациента готовят к получению трансплантата, например, трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки. Такие процедуры способствуют приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (например, о чем свидетельствует устойчивое увеличение количества жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток в образце крови, выделенном у пациента после процедуры подготовки и последующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток). В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, пациента можно подготовить к терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток путем введения пациенту ADC, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать CD45, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками. Как описано в настоящем документе, антитело может быть ковалентно конъюгировано с цитотоксином с образованием конъюгата лекарственное средство-антитело. Введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, способных связывать ранее стоящий антиген, пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, может способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем

избирательного истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая место для заполнения экзогенным трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтического агента, *например*, ADC против CD45, которое является достаточным для достижения желаемого результата в контексте лечения, предотвращения, улучшения состояния или уменьшения симптомов заболевания или расстройства у пациента. Например, в некоторых случаях терапевтически эффективное количество антитела или ADC против CD45 представляет собой количество, достаточное для уменьшения или истощения популяции клеток CD45+ у пациента. В других случаях терапевтически эффективным количеством антитела или ADC против CD45 является количество, достаточное для подготовки пациента к получению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Таким образом, терапевтически эффективное количество может представлять собой, например, количество, достаточное для селективного истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, и/или количество, достаточное для стимуляции приживления трансплантата гемопоэтических стволовых клеток у пациента. Другими словами, терапевтически эффективное количество антитела или ADC против CD45 представляет собой количество, достаточное для воздействия на аутоиммунное заболевание или рак у пациента-человека.

Используемый в настоящем документе термин «период полувыведения» относится к времени, которое требуется для того, чтобы концентрация лекарственного средства-антитела в плазме в организме у субъекта, например, у человека, снизилась наполовину или на 50%. Это 50% снижение концентрации в сыворотке крови отражает количество циркулирующего лекарственного средства.

Используемая в настоящем документе фраза «по существу выведен из крови» относится к моменту времени после введения терапевтического агента (такого как антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент) пациенту, когда концентрация терапевтического агента в образце крови, выделенном от пациента, является такой, что терапевтический агент не может быть обнаружен обычными средствами (например, такой, что терапевтический агент не может быть обнаружен выше порога шума устройства или анализа, используемого для обнаружения терапевтического агента). Для обнаружения антител или фрагментов антител можно использовать различные методы, известные в данной области техники, такие как анализы обнаружения на основе ELISA, известные или описанные в данной области техники. Дополнительные анализы, которые можно использовать для обнаружения антител или фрагментов антител, включают методы

иммунопреципитации и анализы иммуноблоттинга, среди прочего, известные в данной области техники.

Термины «специфичное связывание» или «специфическое связывание», используемые в настоящем документе, относятся к способности антитела распознавать и связываться со специфичной белковой структурой (эпитопом), а не с белками в целом. Если антитело является специфичным к эпитопу «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом. Например, антитело «специфично связывается» с мишенью, если меченое антитело может быть оттеснено от своей мишени соответствующим немеченым антителом. В одном варианте осуществления антитело специфично связывается с мишенью, например, CD45, если антитело имеет K_D для мишени по меньшей мере примерно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или менее (менее означает число меньше 10^{-12} , например, 10^{-13}). В одном варианте осуществления термин «специфичное связывание с CD45» или «специфично связывается с CD45», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое связывается с CD45 и имеет константу диссоциации (K_D) $1,0 \times 10^{-7}$ М или менее, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном варианте осуществления K_D (М) определяют в соответствии со стандартной интерферометрией биослоя (BLI). В одном варианте осуществления K_{off} (1/с) определяют в соответствии со стандартной интерферометрией биослоя (BLI). Однако следует понимать, что антитело может быть способно специфично связываться с двумя или более антигенами, которые родственны по последовательности. Например, в одном варианте осуществления антитело может специфично связываться как с человеческими, так и с нечеловеческими ортологами CD45 (например, мыши, яванского макака или примата, отличного от человека). Таким образом, в настоящем документе антитело, которое «специфично связывается с CD45 человека», означает антитело, которое связывается с CD45 человека (и, возможно, CD45 одного или более отличных от человека видов, например, яванского макака), но по существу не связываются с белками, отличными от CD45. Предпочтительно антитело связывается с CD45 человека с K_D 1×10^{-7} М или менее, K_D 5×10^{-8} М или менее, K_D 3×10^{-8} М или менее, K_D 1×10^{-8} М или менее или K_D 5×10^{-9} М или менее.

Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие варибельные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Таким образом, когда человеческое антитело содержит константную область, константная область может быть также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческое

антитело может включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro*, или во время реорганизации генов, или в результате соматической мутации *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Человеческое антитело может быть получено в клетке человека (например, путем рекомбинантной экспрессии) или в клетке животного, отличного от человека, или в прокариотической или эукариотической клетке, которая способна экспрессировать функционально переорганизованные гены человеческого иммуноглобулина (такие как тяжелая цепь и/или легкая цепь). Когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может включать линкерный пептид, которого нет в нативных антителах человека. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до примерно восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея или способы дрожжевого дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека (см., например, публикации PCT № WO 1998/24893; WO 1992/01047; WO 1996/34096; WO 1996/33735; патенты США № 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771; и 5939598).

Термин «химерное антитело» предназначен для обозначения антител, в которых последовательности переменной области происходят от одного вида, а последовательности константной области происходят от другого вида, например антитела, в которых последовательности переменной области происходят от крысиного антитела и последовательности константной области получены из человеческого антитела.

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных или крысиных) антител представляют собой иммуноглобулины, которые содержат минимальные последовательности, полученные из нечеловеческого иммуноглобулина. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR

соответствуют областям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все области FR являются последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может также содержать всю или часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антител известны в данной области техники. См., например, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; патенты США № 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; и 6180370 и Queen et al.; EP239400; PCT публикацию WO 91/09967; патенты США № 5225539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; и патент США No. 5565332.

Также предусмотрены «модификации консервативной последовательности» последовательностей, представленных в SEQ ID NO. Консервативные модификации последовательности включают модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не прекращают связывание антитела или его антигенсвязывающей части, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, предоставленной в настоящем документе, с его родственным антигеном (например, CD45). Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные нуклеотидные и аминокислотные замены, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в SEQ ID NO, описанные в настоящем документе, стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный ПЦР. Консервативные модификации последовательности включают консервативные замены аминокислот, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотой, имеющей аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, предсказанный остаток заменимой аминокислоты в антителе против CD73 предпочтительно заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации нуклеотидов и аминокислотных консервативных замен,

которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)).

Используемый в настоящем документе термин «потенциал приживления трансплантата» используется для обозначения способности гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников к репопуляции ткани, вне зависимости от того, циркулируют ли такие клетки в естественных условиях или получены путем трансплантации. Эти термины охватывают все события, связанные с приживлением трансплантата или ведущие к нему, такие как заселение клеток в ткани и колонизация клеток в представляющей интерес ткани. Эффективность приживления или скорость приживления можно оценить или количественно определить с использованием любого клинически приемлемого параметра, известного специалистам в данной области техники, и может включать, например, оценку конкурентных единиц репопуляции (CRU); включение или экспрессию маркера в ткани (тканях), в которые стволовые клетки вернулись, колонизировались или прижились; или путем оценки прогрессирования заболевания у субъекта, выживаемости гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников или выживаемости реципиента. Приживление также можно определить путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в посттрансплантационном периоде. Приживление также можно оценить, измерив восстановление клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного мозга.

Используемый в настоящем документе термин «гематопозитические стволовые клетки» («ГСК») относится к незрелым клеткам крови, обладающим способностью к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки крови, включающие, но не ограничиваясь этим, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Такие клетки могут включать клетки CD34⁺. Клетки CD34⁺ представляют собой незрелые клетки, которые экспрессируют маркер клеточной поверхности CD34. Считается, что у людей клетки CD34⁺ включают субпопуляцию клеток со свойствами стволовых клеток, определенными выше, тогда как у мышей ГСК являются CD34⁻. Кроме того, ГСК также относятся к ГСК с длительной репопуляцией (LT-HSC) и ГСК с краткосрочной репопуляцией (ST-HSC). LT-HSC и ST-HSC дифференцируются на основе функционального потенциала и экспрессии маркеров клеточной поверхности. Например, ГСК человека представляют собой CD34⁺, CD38⁻, CD45RA⁻, CD90⁺, CD49F⁺ и lin-

(отрицательные по маркерам зрелых клеток линии, включая CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11B, CD19, CD20, CD56, CD235A). У мышей LT-HSC костного мозга представляют собой CD34-, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+, CD48- и lin- (отрицательные по маркерам зрелых клеток линии, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra), тогда как ST-HSC представляют собой CD34+, SCA-1+, C-kit+, CD135-, Slamf1/CD150+ и lin- (отрицательные по маркерам зрелых клеток линии, включая Ter119, CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD8, B220, IL7ra). Кроме того, ST-HSC менее неподвижны и более пролиферативны, чем LT-HSC в гомеостатических условиях. Однако LT-HSC обладают более высоким потенциалом самообновления (т. е. они выживают на протяжении всей взрослой жизни и могут быть последовательно трансплантированы последовательными реципиентами), тогда как ST-HSC имеют ограниченное самообновление (т. е. они выживают только в течение ограниченного периода времени), и не обладают потенциалом для серийной трансплантации). Любая из этих ГСК может быть использована в способах, описанных в настоящем документе. ST-HSC особенно подходят, поскольку они обладают высокой пролиферативной активностью и, таким образом, могут быстрее давать дифференцированное потомство.

Используемый в настоящем документе термин «функциональный потенциал гемопоэтических стволовых клеток» относится к функциональным свойствам гемопоэтических стволовых клеток, которые включают 1) мультипотентность (которая относится к способности дифференцироваться в несколько различных линий дифференцировки, включая, но не ограничиваясь этим, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты, и лимфоциты (например, NK-клетки, Т-клетки и В-клетки), 2) самообновление (которое относится к способности гемопоэтических стволовых клеток давать начало дочерним клеткам, которые имеют такой же потенциал, как и материнская клетка, и, кроме того, эта способность может повторяться в течение всей жизни человека без истощения), и 3) способность гемопоэтических стволовых клеток или их потомства к повторному введению в трансплантат-реципиент, после чего они размещаются в нише гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Используемые в настоящем документе термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, такому как человек, который получает лечение от конкретного заболевания или состояния, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях субъект или пациент,

упомянутый в способах, представленных в настоящем документе, представляет собой человека.

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

В настоящем документе «лечить» или «лечение» относится к любому улучшению любого последствия заболевания, такому как увеличение продолжительности жизни, снижение заболеваемости и/или уменьшение побочных эффектов, которые являются побочными продуктами альтернативного терапевтического воздействия; как легко понять в данной области техники, полное устранение заболевания является предпочтительным, но не обязательным для лечебного действия. Например, лечение может относиться к уменьшению тяжести и/или частоты симптомов заболевания, устранению симптомов заболевания и/или основной причины указанных симптомов, уменьшению частоты или вероятности появления симптомов заболевания и/или их основной причины, а также улучшению или устранению последствий, непосредственно или косвенно вызванных заболеванием. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, стимулирование приживания экзогенных гемопоэтических клеток у пациента после подготовительной терапии антителами, как описано в настоящем документе, и последующую терапию трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительные благоприятные результаты включают увеличение количества клеток или относительной концентрации гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, после подготовительной терапии и последующего введения пациенту экзогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Благоприятные результаты описанной в настоящем документе терапии могут также включать увеличение количества клеток или относительной концентрации одной или более клеток гемопоэтической линии, таких как мегакариоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглиальные клетки, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, Т-лимфоциты или В-лимфоциты после подготовительной терапии и последующей терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительные благоприятные результаты могут включать уменьшение количества популяции болезнетворных клеток, такой как популяция раковых клеток (например, CD45+ лейкозных клеток) или аутоиммунных клеток (например, CD45+ аутоиммунных лимфоцитов, таких как CD45+ Т-клеток, экспрессирующих Т-клеточный

рецептор, который перекрестно реагирует с собственным антигеном). Поскольку способы согласно настоящему изобретению направлены на предотвращение нарушений, следует понимать, что термин «предотвращать» не требует полного предотвращения болезненного состояния. Скорее, используемый в настоящем документе термин «предотвращение»
5 относится к способности специалиста в данной области техники идентифицировать популяцию, которая предрасположена к нарушениям, так что введение соединений согласно настоящему изобретению может происходить до начала заболевания. Этот термин не означает, что болезненного состояния можно полностью избежать.

В настоящем документе «нуждающиеся» в трансплантации гемопоэтических
10 стволовых клеток пациенты включают пациентов с дефектом или недостаточностью одного или более типов клеток крови, а также пациентов с нарушением стволовых клеток, аутоиммунным заболеванием, раком или другими патологиями, описанными в настоящем документе. Гемопоэтические стволовые клетки обычно демонстрируют 1) мультипотентность и, таким образом, могут дифференцироваться во множество различных линий крови,
15 включая, помимо прочего, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки), 2) самообновление, и, таким
20 образом, могут обеспечивать увеличение дочерних клеток, которые имеют потенциал, эквивалентный материнской клетке, и 3) способность повторного введения реципиенту трансплантата, после чего они размещаются в нише гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз. Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или недостаточностью одного или
25 более типов клеток гемопоэтической линии для восстановления дефектной или дефицитной популяции клеток *in vivo*. Например, пациент может страдать от рака, а дефицит может быть вызван введением химиотерапевтического агента или другого лекарственного средства, которое избирательно или неспецифично истощает популяцию раковых клеток. Дополнительно или в качестве альтернативы пациент может страдать от гемоглобинопатии
30 (например, незлокачественной гемоглобинопатии), такой как серповидноклеточная анемия, талассемия, анемия Фанкони, апластическая анемия и синдром Вискотта-Олдрича. Субъект может быть субъектом, который страдает тяжелым комбинированным иммунодефицитом аденозиндезаминазы (ADA SCID), ВИЧ/СПИДом, метахроматической лейкодистрофией, анемией Даймонда-Блекфена и синдромом Швахмана-Даймонда. Субъект может иметь или
35 быть пораженным наследственным заболеванием крови (например, серповидноклеточной

анемией) или аутоиммунным заболеванием. Дополнительно или в качестве альтернативы субъект может иметь или быть пораженным злокачественным новообразованием, таким как нейробластома или гематологический рак. Например, у субъекта может быть лейкемия, лимфома или миелома. В некоторых случаях у субъекта имеется острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественная миелома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома или неходжкинская лимфома. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет аутоиммунное расстройство, такое как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона, диабет 1 типа или другую описанную в настоящем документе аутоиммунную патологию. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CART). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или иным образом поражен нарушением накопления метаболитов. Субъект может страдать или быть иным образом поражен нарушением обмена веществ, выбранным из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлер, сфинголипидозов, метакроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или нарушений, при которых может быть благоприятным описанное лечение и терапия, включая, без ограничений, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулинемии М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и те заболевания или расстройства, которые описаны в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, поскольку она относится к патологиям, которые можно лечить с помощью терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Дополнительно или в качестве альтернативы, пациент, «нуждающийся» в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, может представлять собой пациента, который страдает или не страдает одной из вышеперечисленных патологий, но, тем не менее, демонстрирует сниженный уровень (например, по сравнению с таковым у здорового субъекта) одного или более эндогенных типов клеток гемопоэтической линии, таких как мегакариоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, природные клетки-киллеры,

Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Специалист в данной области техники может легко определить, снижен ли уровень одного или более из вышеперечисленных типов клеток или другого типа клеток крови по сравнению со здоровым в остальном субъектом, например, с помощью способов проточной цитометрии и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), среди прочих методик, известных в данной области техники.

Используемая в настоящем документе фраза «нарушение стволовых клеток» в широком смысле относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, которое можно лечить или вылечить путем подготовки тканей-мишеней субъекта и/или путем удаления популяции эндогенных стволовых клеток в ткани-мишени (например, удаление популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников из ткани костного мозга субъекта) и/или путем прививки или трансплантации стволовых клеток в ткани-мишени субъекта. Например, было показано, что диабет типа I излечивается трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и на него может оказать положительное влияние подготовка в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе. Дополнительные нарушения, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе композиций и способов, включают, без ограничения, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, апластическую анемию, синдром Вискотта-Олдрича, ADA SCID, ВИЧ/СПИД, метакроматическую лейкодиistroфию, анемию Даймонда-Блекфена, и синдром Швахмана-Даймонда. Дополнительные заболевания, которые можно лечить с использованием способов подготовки пациента и/или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, описанных в настоящем документе, включают наследственные заболевания крови (например, серповидноклеточную анемию) и аутоиммунные расстройства, такие как склеродермия, рассеянный склероз, язвенный колит и болезнь Крона. Дополнительные заболевания, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе способов подготовки и/или трансплантации, включают злокачественное новообразование, такое как нейробластома, или гематологический рак, такой как лейкоз, лимфома и миелома. Например, рак может представлять собой острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому или неходжкинскую лимфому. Дополнительные заболевания, поддающиеся лечению с использованием описанных в настоящем документе способов подготовки и/или трансплантации, включают миелодиспластический синдром. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или иным образом поражен нарушением накопления метаболитов. Например, субъект может страдать или быть иным образом поражен нарушением обмена веществ, выбранным из

группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлер, сфинголипидозов, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или нарушений, при которых может быть благоприятным описанное лечение и терапия, включая, без ограничений, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулинемии М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и те заболевания или расстройства, которые описаны в "Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease," ASH Education Book, 1:319-338 (2000), описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, поскольку она относится к патологиям, которые можно лечить с помощью терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» включает вектор нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, ДНК-вектор, плазмид, РНК-вектор, вирус или другой подходящий репликон. Векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, могут содержать полинуклеотидную последовательность, а также, например, дополнительные элементы последовательности, используемые для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клетки млекопитающего. Некоторые векторы, которые можно использовать для экспрессии антител и фрагментов антител согласно настоящему изобретению, включают плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как промоторные и энхансерные области, которые управляют транскрипцией гена. Другие применимые векторы для экспрессии антител и фрагментов антител содержат полинуклеотидные последовательности, которые повышают скорость трансляции этих генов или улучшают стабильность или ядерный экспорт мРНК, возникающей в результате транскрипции гена. Эти элементы последовательности могут включать, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области и сигнальный сайт полиаденилирования, чтобы направлять эффективную транскрипцию гена, переносимого вектором экспрессии. Описанные в настоящем документе векторы экспрессии могут также содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для селекции клеток, содержащих такой вектор. Примеры подходящего маркера включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин и нурсеотрицин.

Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» или «конъюгат антитело-лекарственное средство» или «ADC» относится к антителу, которое связано с цитотоксином или токсином, и используется взаимозаменяемо повсюду. В одном варианте осуществления

ADC образуется путем химической связи реакционноспособной функциональной группы одной молекулы, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с соответствующей реакционноспособной функциональной группой другой молекулы, такой как цитотоксин, описанный в настоящем документе. Неограничивающие примеры цитотоксинов, которые в некоторых вариантах осуществления можно использовать в конъюгате, предложенном в настоящем документе, включают небольшую органическую молекулу (например, с молекулярной массой 1500 Да или менее), биомолекулу (например, белок), наночастицу, наполненную лекарственным средством, или радионуклид. Конъюгаты могут включать линкер между двумя молекулами, связанными друг с другом, *например*, между антителом и цитотоксином. Примеры линкеров, которые можно использовать для образования конъюгата, включают линкеры, содержащие пептиды, такие как те, которые содержат встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как D-аминокислоты. Линкеры могут быть получены с использованием различных стратегий, описанных в настоящем документе и известных в данной области техники. В зависимости от содержащихся в нем реакционноспособных компонентов линкер может расщепляться, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в кислых условиях, гидролизом в щелочных условиях, окислением, дисульфидным восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлоорганическим расщеплением (см., например, Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012).

Термин «конъюгировать», «конъюгат с» или «конъюгировать с», когда он используется в контексте по меньшей мере двух молекул, конъюгированных вместе, относится к одной молекуле, например, антителу, связанному или объединенному со второй молекулой, например, токсином. Антитела против CD45 и их фрагменты могут быть конъюгированы с другими молекулами, включая токсины, метящие агенты (например, флуоресцеин или биотин), наночастицы, наполненные лекарственным средством. Конъюгированные молекулы могут быть конъюгированы за счет ковалентных или нековалентных взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его фрагмент конъюгируют с белковым токсином с образованием слитого белка, например, химеры scFv-токсин. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные молекулы могут быть связаны посредством нековалентного взаимодействия первого взаимодействующего фрагмента (например, биотина) и второго взаимодействующего фрагмента (например, стрептавидина), связанных с конъюгированными молекулами.

Используемый в настоящем документе термин «отношение лекарственного средства к антителу» или «DAR» относится к количеству лекарственного средства, например, аматоксина, присоединенного к антителу конъюгата. DAR ADC может варьироваться от 1 до

8, хотя возможны и более высокие нагрузки в зависимости от количества сайтов связывания на антителе. В некоторых вариантах осуществления DAR конъюгата составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Используемый в настоящем документе термин «агент, связывающий микротрубочки» относится к соединению, которое действует, разрушая сеть микротрубочек, которая необходима для митотической и межфазной клеточной функции в клетке. Примеры агентов, связывающих микротрубочки, включают, но не ограничиваются ими, майтансин, майтансиноиды и их производные, такие как описанные в настоящем документе или известные в данной области техники, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винбластина сульфат, винкристин, винкрестина сульфат, виндезин, и винорелбин, таксаны, такие как доцетаксел и паклитаксел, макролиды, такие как дискодермолиды, кохицин и эпотилоны, и их производные, такие как эпотилон В или его производное.

Используемый в настоящем документе термин «аматоксин» относится к члену семейства пептидов аматоксинов, продуцируемых грибами *Amanita phalloides*, или его производному, такому как его вариант или производное, способное ингибировать активность РНК-полимеразы II. Аматоксины, пригодные в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают соединения, описанные в настоящем документе, например, α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновую кислоту или проамануллин. Как описано в настоящем документе, аматоксины могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством линкерного фрагмента (L) (таким образом образуя ADC). Примеры способов конъюгации аматоксина и линкеров, применимых для таких способов, описаны ниже. Примеры аматоксинов, содержащих линкер, пригодных для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с композициями и способами, также описаны в настоящем документе.

Термин «ацил», используемый в настоящем документе, относится к $-C(=O)R$, где R представляет собой водород («альдегид»), C1-C12 алкил, C2-C12 алкенил, C2-C12 алкинил, C3-C7 карбоциклл, C6- C20-арил, 5-10-членный гетероарил или 5-10-членный гетероциклл, как определено в настоящем документе. Неограничивающие примеры включают формил, ацетил, пропаноил, бензоил и акрилоил.

Термин «C1-C12 алкил», используемый в настоящем документе, относится к насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 1 до 12 атомов углерода. Репрезентативные C1-C12 алкильные группы включают, но не ограничиваются ими, -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил и -н-гексил; в то время как разветвленные C1-C12 алкилы включают, но не ограничиваются ими, -изопропил, -втор-

бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил и 2-метилбутил. Алкильная группа C1-C12 может быть незамещенной или замещенной.

Термин «алкенил», используемый в настоящем документе, относится к углеводороду C2-C12, содержащему нормальные, вторичные или третичные атомы углерода по меньшей мере с одним участком ненасыщенности, т.е. углерод-углеродной sp^2 -двойной связью. Примеры включают, но не ограничиваются ими: этилен или винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил, пропенил, изопропенил, бутенил, трет-бутиленил, гексенил и т.п. Алкенильная группа может быть незамещенной или замещенной.

"Алкинил" в контексте настоящего описания относится к углеводороду C2-C12, содержащему нормальные, вторичные или третичные атомы углерода по меньшей мере с одним участком ненасыщенности, т.е. углерод-углеродной sp -тройной связью. Примеры включают, но не ограничиваются ими, ацетиленовые и пропаргильные, бутинильные, пентинильные, гексинильные и т.п. Алкинильная группа может быть незамещенной или замещенной.

Используемый в настоящем документе термин «арил» относится к C6-C20 карбоциклической ароматической группе. Примеры арильных групп включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил и антраценил. Арильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Арилалкил», используемый в настоящем документе, относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанный с атомом углерода, обычно с концевым или sp^3 -атомом углерода, заменен арильным радикалом. Типичные арилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и т.п. Арилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода, например, алкильный фрагмент, включая алканильные, алкенильные или алкинильные группы, арилалкильной группы содержит от 1 до 6 атомов углерода, а арильный фрагмент содержит от 5 до 14 атомов углерода. Алкарильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Циклоалкил», используемый в настоящем документе, относится к насыщенному карбоциклическому радикалу, который может быть моно- или бициклическим. Циклоалкильные группы включают кольцо, имеющее от 3 до 7 атомов углерода в виде моноцикла или от 7 до 12 атомов углерода в виде бицикла. Примеры моноциклических циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил,

циклогептил и циклооктил. Циклоалкильная группа может быть незамещенной или замещенной.

«Циклоалкенил», используемый в настоящем документе, относится к ненасыщенному карбоциклическому радикалу, который может быть моно- или бициклическим.

5 Циклоалкенильные группы включают кольцо, имеющее от 3 до 6 атомов углерода в виде моноцикла или от 7 до 12 атомов углерода в виде бицикла. Примеры моноциклических циклоалкенильных групп включают 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил и 1-циклогекс-3-енил. Циклоалкенильная группа может быть незамещенной или замещенной.

10 «Гетероаралкил», используемый в настоящем документе, относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанный с атомом углерода, обычно с концевым или sp^3 -атомом углерода, заменен гетероарильным радикалом. Типичные гетероарилалкильные группы включают, но не ограничиваются ими, 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и т.п. Гетероарилалкильная группа содержит от 6 до 20

15 атомов углерода, например алкильный фрагмент, включая алканильные, алкенильные или алкинильные группы, гетероарилалкильной группы содержит от 1 до 6 атомов углерода, а гетероарильный фрагмент содержит от 5 до 14 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероарильный фрагмент гетероарилалкильной группы может представлять собой моноцикл, содержащий от 3 до 7 атомов в кольце (от 2 до 6 атомов

20 углерода), или бицикл, содержащий от 7 до 10 атомов в кольце (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система.

«Гетероарил» и «гетероциклоалкил», используемые в настоящем документе, относятся к ароматической или неароматической кольцевой системе, соответственно, в

25 которой один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатом, например азот, кислород и серу. Гетероарильный или гетероциклоалкильный радикал содержит от 2 до 20 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероарил или гетероциклоалкил может представлять собой моноцикл, содержащий от 3 до 7 членов в кольце (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), или

30 бицикл, имеющий от 7 до 10 членов в кольце (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система. Гетероарил и гетероциклоалкил могут быть незамещенными или замещенными.

Гетероарильные и гетероциклоалкильные группы описаны в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), в частности

35 главы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John

Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности тома 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

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

Примеры гетероциклоалкилов включают в качестве примера, но не ограничиваясь этим, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тетрагидротиофенил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, пиперазинил, хинуклидинил и морфолинил.

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

В качестве примера, но не ограничения, связанные азотом гетероарилы и гетероциклоалкилы связаны в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола, в положении 2 изоиндола или изоиндолина, в положении 4 морфолина в и положении 9 карбазола или бета-карболина. Еще более связанные азотом

типично гетероциклы включают 1-азиридил, 1-азетедил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиразолил и 1-пиперидинил.

«Замещенный» в настоящем документе и применительно к любому из указанных выше алкилов, алкенилов, алкинилов, арилов, арилалкилов, циклоалкилов, гетероариллов, гетероциклилов и т.п. означает, что каждый из одного или более атомов водорода независимо замещен заместителем. Примеры заместителей включают, но не ограничиваются ими, -X, -R, -OH, -OR, -SH, -SR, NH₂, -NHR, -N(R)₂, -N⁺(R)₃, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, -NO, -NO₂, -N₃, -NC(=O)H, -NC(=O)R, -C(=O)H, -C(=O)R, -C(=O)NH₂, -C(=O)N(R)₂, -SO₃-, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NH₂, -S(=O)₂N(R)₂, -S(=O)R, -OP(=O)(OH)₂, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃, -PO₃H₂, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂H, -CO₂R, -CO₂-, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NH₂, -C(=O)N(R)₂, -C(=S)NH₂, -C(=S)N(R)₂, -C(=NH)NH₂ и -C(=NR)N(R)₂, где каждый X независимо выбран для каждого случая из F, Cl, Br и I, и каждый R независимо выбран для каждого случая из C₁-C₁₂ алкила, C₆-C₂₀ арила, C₃-C₁₄ гетероциклоалкила или гетероарила, защитной группы и фрагмента пролекарства. Когда группа описана как «необязательно замещенная», эта группа может быть замещена одним или более из вышеуказанных заместителей независимо для каждого случая.

Следует понимать, что некоторые соглашения об именах радикалов могут включать либо монарадикал, либо дирадикал, в зависимости от контекста. Например, когда заместитель требует двух точек присоединения к остальной части молекулы, подразумевается, что заместитель представляет собой ди-радикал. Например, заместитель, идентифицированный как алкил, который требует двух точек присоединения, включает бирадикалы, такие как -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂- и т.п. Другие соглашения по наименованию радикалов ясно указывают на то, что радикал представляет собой бирадикал, такой как «алкилен», «алкенилен», «арилен», «гетероциклоалкилен» и т.п.

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

«Изомерия» означает соединения, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но различаются последовательностью связывания их атомов или расположением их атомов в пространстве. Изомеры, различающиеся расположением атомов в пространстве, называются стереоизомерами. Стереои́зомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются «диастереоизомерами», а стереои́зомеры, которые не являются наложенными друг на друга зеркальными отображениями, называются «энантиомерами» или иногда «оптическими изомерами».

Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется «хиральным центром». «Хиральный изомер» означает соединение по меньшей мере с одним хиральным центром. Соединения с более чем одним хиральным центром могут существовать либо в виде отдельного диастереомера, либо в виде смеси диастереомеров, называемой «смесь диастереомеров». Когда присутствует один хиральный центр, стереоизомер может быть охарактеризован абсолютной конфигурацией (R или S) этого хирального центра. Абсолютная конфигурация относится к расположению в пространстве заместителей, присоединенных к хиральному центру. Заместители, присоединенные к рассматриваемому хиральному центру, ранжируются в соответствии с правилом последовательности Кана, Ингольда и Прелога. (Cahn et al., *Angew. Chem. Inter. Edit.* 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., *Angew. Chem.* 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, *J. Chem. Soc.* 1951 (London), 612; Cahn et al., *Experientia* 1956, 12, 81; Cahn, *J. Chem. Educ.* 1964, 41, 116). Смесь, содержащая равные количества индивидуальных энантиомерных форм противоположной хиральности, называется «рацемической смесью».

Соединения, раскрытые в настоящем описании и в формуле изобретения, могут содержать один или более центров асимметрии, и могут существовать разные диастереомеры и/или энантиомеры каждого из соединений. Подразумевается, что описание любого соединения в настоящем описании и в пунктах формулы изобретения включает все энантиомеры, диастереомеры и их смеси, если не указано иное. Кроме того, подразумевается, что описание любого соединения в данном описании и в формуле изобретения включает как отдельные энантиомеры, так и любую смесь, рацемическую или иную, энантиомеров, если не указано иное. Когда структура соединения изображена как конкретный энантиомер, следует понимать, что раскрытие настоящей заявки не ограничивается этим конкретным энантиомером. Соответственно, в настоящем документе рассматриваются энантиомеры, оптические изомеры и диастереомеры каждой из структурных формул согласно настоящему изобретению. В настоящем описании структурная формула соединения представляет собой определенный изомер для удобства в некоторых случаях, но настоящее описание включает все изомеры, такие как геометрические изомеры, оптические изомеры на основе асимметричного углерода, стереоизомеры, таутомеры и т.п., при этом следует понимать, что не все изомеры могут иметь одинаковый уровень активности. Соединения могут встречаться в различных таутомерных формах. Предполагается, что соединения согласно настоящему изобретению включают все таутомерные формы, если не указано иное. Когда структура соединения изображается как конкретный таутомер, следует понимать, что раскрытие настоящей заявки не ограничивается этим конкретным таутомером.

Соединения любой формулы, описанные в настоящем документе, включают сами соединения, а также их соли и их сольваты, если применимо. Соль, например, может быть образована между анионом и положительно заряженной группой (например, амина) в соединении согласно настоящему изобретению. Подходящие анионы включают хлорид, бромид, йодид, сульфат, бисульфат, сульфамат, нитрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, салицилат, лактат, нафталинсульфонат и ацетат (например, трифторацетат). Термин «фармацевтически приемлемый анион» относится к аниону, подходящему для образования фармацевтически приемлемой соли. Аналогичным образом, соль также может образовываться между катионом и отрицательно заряженной группой (например, карбоксилатом) соединения согласно настоящему изобретению. Подходящие катионы включают ион натрия, ион калия, ион магния, ион кальция и катион аммония, такой как ион тетраметиламмония. Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются производные: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Соединения согласно настоящему изобретению также включают те соли, которые содержат четвертичные атомы азота. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничиваются ими, полученные из следующих неорганических кислот: соляной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой. Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничиваются ими, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетиоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфорсульфоновой, коричной, лимонной, эдетовой, этандисульфоновой, этансульфоновой, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфаниловой, винной, толуолсульфоновой и валериановой. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают, но не ограничиваются ими, полученные из следующих полимерных кислот: дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза.

Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению, например соли соединений, могут существовать либо в гидратированной, либо в негидратированной (безводной) форме или в виде сольватов с другими молекулами растворителя.

Неограничивающие примеры гидратов включают моногидраты, дигидраты и т.д. Неограничивающие примеры сольватов включают сольваты этанола, сольваты ацетона и т.д. «Сольват» означает формы присоединения растворителя, которые содержат либо стехиометрические, либо нестехиометрические количества растворителя. Некоторые соединения имеют тенденцию улавливать фиксированное молярное соотношение молекул растворителя в кристаллическом твердом состоянии, образуя, таким образом, сольват. Если растворителем является вода, образующийся сольват представляет собой гидрат; и если растворителем является спирт, образующийся сольват представляет собой алкоголь. Гидраты образуются при соединении одной или более молекул воды с одной молекулой вещества, в котором вода сохраняет свое молекулярное состояние в виде H_2O . Гидрат относится, например, к моногидрату, дигидрату, тригидрату и т.д.

Кроме того, для соединений или их солей, представленных раскрытыми в настоящем документе формулами, может присутствовать кристаллический полиморфизм. Следует отметить, что любая кристаллическая форма, смесь кристаллических форм или их ангидрид или гидрат входят в объем настоящего изобретения.

Антитела против CD45

В настоящем документе рассмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD45, которые можно использовать в качестве терапевтических средств отдельно или в виде конъюгатов (ADC), например, (i) для лечения рака и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся клетками CD45+, и (ii) чтобы способствовать приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантационной терапии. Эти терапевтические действия могут быть вызваны, например, связыванием выделенных антител против CD45, их антигенсвязывающих фрагментов или ADC, которые связываются с CD45, экспрессируемым на поверхности клетки, такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или гемопоэтическая стволовая клетка, и впоследствии вызывает гибель клеток. Истощение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может обеспечить нишу, в которую трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут вернуться и впоследствии установить продуктивный гемопоэз. Таким образом, трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут успешно приживаться у пациента, такого как пациент-человек, страдающий описанным в настоящем документе заболеванием стволовых клеток. Кроме того, истощение лейкоцитов у нуждающегося в этом пациента в комбинации с трансплантацией ГСК может перезагрузить иммунную систему пациента, таким образом, например, излечивая пациента от аутоиммунного заболевания.

CD45, также известный как лейкоцитарный общий антиген и тирозин-протеинфосфатаза С рецепторного типа, представляет собой гемопоэтическую клеточно-специфичную трансмембранную протеинтирозинфосфатазу, необходимую для передачи сигналов, опосредованной Т- и В-клеточным антигенным рецептором. CD45 включает

5 большой внеклеточный домен и цитозольный домен, содержащий фосфатазу. CD45 может действовать как положительный и отрицательный регулятор в зависимости от природы стимула и вовлеченного типа клеток. Хотя в гене CD45 возможно большое количество пермутаций, у человека традиционно идентифицируют только шесть изоформ. Изоформами являются RA, RO, RB, RAB, RBC и RABC (Hermiston et al. 2003 "CD45: a critical regulator of

10 signaling thresholds in immune cells." *Annu Rev Immunol.* 2:107-137.). CD45RA экспрессируется на наивных Т-клетках, а CD45RO экспрессируется на активированных Т-клетках и Т-клетках памяти, некоторых субпопуляциях В-клеток, активированных моноцитах/макрофагах и гранулоцитах. CD45RB экспрессируется на периферических В-клетках, наивных Т-клетках, тимоцитах, слабо на макрофагах и дендритных клетках. Аминокислотная

15 последовательность CD45RABC представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:112. Аминокислотная последовательность CD45RA представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:107. Аминокислотная последовательность CD45RO представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:108. Аминокислотная последовательность CD45RB представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:109. Аминокислотная последовательность CD45RAB

20 представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:110. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:RBC представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:111.

Как описано ниже, в некоторых вариантах осуществления новые антитела против CD45 человека (hCD45) идентифицировали путем скрининга дрожжевой дисплейной

25 библиотеки, которая отображает полностью человеческие антитела. Было идентифицировано семь человеческих антител (обозначенных как антитело 1 (Ab1), антитело 2 (Ab2), антитело 3 (Ab3), антитело 4 (Ab4), антитело 5 (Ab5), антитело 6 (Ab6) и антитело 7 (Ab7)) в скрининге, которые связываются с CD45 человека (все изоформы) и которые перекрестно реагируют с CD45 приматов, отличных от человека (например, CD45

30 яванского макака и/или CD45 макака резус).

В других вариантах осуществления гуманизированные антитела и антитела с созревшей аффинностью получали из трех крысиных антител против CD45. Таким образом, были идентифицированы три дополнительных антитела (обозначенные как антитело А (AbA), антитело В (AbB) и антитело С (AbC), которые связываются с CD45 человека (все

35 изоформы) и перекрестно реагируют с CD45 от приматов, отличных от человека (например,

CD45 яванского макака и/или CD45 макака-резус). Идентифицированные антитела обладают диагностическими и терапевтическими характеристиками, как описано в настоящем документе.

Соответственно, в настоящем документе предложены антитела или их
5 антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с CD45 человека и которые перекрестно реагируют с CD45 приматов, отличных от человека.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 человека (SEQ ID NO:112) и с CD45 яванского макака (SEQ ID NO:145) и/или с CD45 макака резус (SEQ ID NO :146). В
10 некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с CD45 человека с K_D примерно 100 нМ или менее, например, примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее,
15 примерно 10 нМ или менее или примерно 0,1 нМ или менее, как определено с помощью интерферометрии биослоя (BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с CD45 яванского макака с K_D примерно 100 нМ или менее, например, примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ
20 или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее или примерно 0,1 нМ или менее, как определено с помощью интерферометрии биослоя (BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с CD45 макака резус с K_D примерно 100 нМ или менее, например, примерно 100 нМ или менее,
25 примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее или примерно 0,1 нМ или менее, как определено с помощью интерферометрии биослоя (BLI). В некоторых вариантах осуществления антитело
30 представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой деиммунизированное
35 антитело или его антигенсвязывающую часть.

Внеклеточная область CD45 человека включает муциноподобный домен и четыре фибронектиноподобных домена (d1, d2, d3 и d4). Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что антитела Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и Ab7 взаимодействуют с остатками CD45 человека, расположенными в фибронектиноподобных доменах d3 и d4. В частности, эти антитела могут взаимодействовать с фрагментом CD45 человека, представленным в SEQ ID NO:115, и фрагментом CD45 человека, представленным в SEQ ID NO:117. Описанные в настоящем документе исследования перекрестного связывания предполагают, что антитела могут специфично взаимодействовать с одним или более аминокислотными остатками CD45, которые являются консервативными между CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус. Эти остатки включают 405T, 407K, 419Y, 425K и 505R (пронумерованные в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). Кроме того, эти антитела могут взаимодействовать с остатками 481R и/или 509H в CD45 человека (пронумерованы в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 человека на эпитопе, расположенном в фибронектиноподобных доменах d3 и/или d4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 в эпитопе CD45 человека, расположенном внутри фрагмента 2 CD45 (SEQ ID NO:115) и/или фрагмента 4 CD45 (SEQ ID NO:117). В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 в эпитопе CD45 человека, расположенном внутри фрагмента 1 CD45 (SEQ ID NO:114) и/или фрагмента 3 CD45 (SEQ ID NO:116). В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 в эпитопе, содержащем по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять консервативных аминокислотных остатков среди CD45 человека, CD45 яванского макака и/или CD45 макака резус. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться по меньшей мере с одним, по меньшей мере с двумя, по меньшей мере с тремя, по меньшей мере с четырьмя или всеми пятью из следующих аминокислотных остатков в CD45 человека: 405T, 407K, 419Y, 425K и 505R (пронумерованные в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с одним или более, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, пятью или более, шестью или более или семью из следующих аминокислотных остатков в

CD45 человека: CD45: 405T, 407K, 419Y, 425K, 481R и 505R, 509H (пронумерованы в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). В настоящем документе также предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое конкурирует с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и/или Ab7 за связывание с CD45 человека (SEQ ID NO:112). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть также могут конкурировать с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и/или Ab7 за связывание с CD45 яванского макака (SEQ ID NO:145) и/или CD45 макака резус (SEQ ID NO:146). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающую часть.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что антитело AbA, описанное в настоящем документе, также связывается с фибронектиноподобным доменом d4 CD45, но не конкурирует ни с одним из Ab1-Ab7 за связывание с CD45. Эксперименты по картированию эпитопов, описанные в настоящем документе, предполагают, что AbA связывается с фибронектиноподобным доменом d4 на противоположной стороне молекулы по сравнению с Ab1-Ab7. В частности, считается, что это антитело взаимодействует с фрагментом CD45 человека, представленным в SEQ ID NO:118. Описанные в настоящем документе исследования перекрестного связывания предполагают, что AbA могут специфично взаимодействовать с одним или более аминокислотными остатками CD45, которые являются консервативными между CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус. Эти остатки включают 493Y и 502T (пронумерованные в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). Кроме того, это антитело может взаимодействовать с остатком 486R в CD45 человека (пронумерован в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 человека на эпитопе, расположенном в фибронектиноподобном домене d4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 в эпитопе CD45 человека, расположенном внутри фрагмента 5 CD45 (SEQ ID NO:118). В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с CD45 в эпитопе, содержащем по меньшей мере один или по меньшей мере два консервативных

аминокислотных остатка среди CD45 человека, CD45 яванского макака и/или CD45 макака резус. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с одним или обоими из следующих аминокислотных остатков в CD45 человека: 493Y и 502T (пронумерованные в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может связываться с одним или более, двумя или более или тремя из следующих аминокислотных остатков в CD45 человека: 486R, 493Y и 502T (пронумерованные в соответствии с фрагментом hCD45, представленным в SEQ ID NO:113). В настоящем документе также предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое конкурирует с AbA за связывание с CD45 человека (SEQ ID NO:112). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть также могут конкурировать с AbA за связывание с CD45 яванского макака (SEQ ID NO:145) и/или CD45 макака резус (SEQ ID NO:146). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающую часть.

В других вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с тем же эпитопом CD45 человека, что и AbB. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно реагирует с CD45 яванского макака и/или CD45 макака резус. В настоящем документе также предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое конкурирует с AbB за связывание с CD45 человека (SEQ ID NO:112). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть также могут конкурировать с AbB за связывание с CD45 яванского макака (SEQ ID NO:145) и/или CD45 макака резус (SEQ ID NO:146). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающую часть.

В других вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с тем же эпитопом CD45 человека, что и AbC. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно реагирует с CD45 яванского макака и/или CD45 макака резус. В настоящем документе также предложено антитело или его антигенсвязывающая часть, которое конкурирует с AbC за связывание с CD45 человека (SEQ ID NO:112). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть также могут конкурировать с AbC за связывание с CD45 яванского макака (SEQ ID NO:145) и/или CD45 макака резус (SEQ ID NO:146). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающую часть.

Аминокислотные последовательности различных участков связывания антител против CD45 Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB и AbC описаны в Таблице 27. В различных аспектах в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее последовательности CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела, описанного в Таблице 27. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в Таблице 27. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела, описанного в Таблице 27. Дополнительные свойства антител и их антигенсвязывающих частей, предложенных в настоящем документе, описаны ниже.

Ab1

Антитело 1 (Ab1) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab1 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab1, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или вариабельные области, соответствующие областям Ab1.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) Ab1 представлена в SEQ ID NO:1 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab1 представлены в SEQ ID NO:2 (VH CDR1); SEQ ID NO:3 (VH CDR2) и SEQ ID NO:4 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) Ab1 описана в SEQ ID NO:5 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab1 представлены в SEQ ID NO:6 (VL CDR1); SEQ ID NO:7 (VL CDR2) и SEQ ID NO:8 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:3, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:2-4 и 6-8), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab1).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать вариабельную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую вариабельный домен HC, содержащий SEQ ID NO:1 или вариант SEQ ID NO:1, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:1 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:1 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:1 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:1, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или

неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab1) или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:5 или вариант SEQ ID NO:5, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:5 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:5 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:5 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:5, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab1) или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab1.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab1, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблужьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab1, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем

документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений: 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab1, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab1, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:9 или вариант SEQ ID NO:9, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:9 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:9 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:9 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:9, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab1), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab1.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:10 или вариант SEQ ID NO:10, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:10 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:10 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:10 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5

аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:10, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab1), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab1.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab1, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab1, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab2

Антитело 2 (Ab2) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab2 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab2, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab2. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab2 представлена в SEQ ID NO:11 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab2 представлены в SEQ ID NO:12 (VH CDR1); SEQ ID NO:13 (VH CDR2) и SEQ ID NO:14 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab2 представлена в SEQ ID NO:15 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab2 представлены в SEQ ID NO:16 (VL CDR1); SEQ ID NO:17 (VL CDR2) и SEQ ID NO:18 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:13, и домен

CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:12-14 и 16-18), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab2).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:11, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:11 или вариант SEQ ID NO:11, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:11 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:11 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:11 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:11, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab2), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:15 или вариант SEQ ID NO:15, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:15 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:15 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:15 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:15, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab2), или
 5 обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab2.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab2, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих
 10 фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3
 15 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab2, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах
 20 осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем
 25 документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab2, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU
 30 согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab2, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID
 35 NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:19 или вариант SEQ ID NO:19, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:19 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:19 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:19 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:19, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab2), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab2.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:20 или вариант SEQ ID NO:20, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:20 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:20 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:20 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:20, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab2), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab2.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab1, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области

CDR и/или переменные области Ab2, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab3

5 Антитело 3 (Ab3) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab3 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab3, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

10 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab3. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab3 представлена в SEQ ID NO:21 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности

15 домена VH CDR Ab3 представлены в SEQ ID NO:22 (VH CDR1); SEQ ID NO:23 (VH CDR2) и SEQ ID NO:24 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab3 описана в SEQ ID NO:25 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab3 представлены в SEQ ID NO:26 (VL CDR1); SEQ ID NO:27 (VL CDR2) и SEQ ID NO:28 (VL CDR3).

20 Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:23, и домен

25 CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28. В

30 некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:22-24 и 26-28), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab3).

35 В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область

тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:21, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:21 или вариант SEQ ID NO:21, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:21 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:21 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:21 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:21, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab3), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:25 или вариант SEQ ID NO:25, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:25 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:25 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:25 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:25, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab3), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab3.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab3, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела

(включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab3, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих 15 положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab3, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее 20 последовательности CDR и/или вариабельной области Ab3, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:29 или вариант SEQ ID NO:29, причем вариант (i) отличается от 30 SEQ ID NO:29 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:29 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:29 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:29, причем в любом из (i)-(iv) 35

аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab3), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab3.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:30 или вариант SEQ ID NO:30, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:30 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:30 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:30 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:30, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab3), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab3.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab3, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab3, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab4

Антитело 4 (Ab4) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab4 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab4, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие

области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab4. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab4 представлена в SEQ ID NO:31 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab4 представлены в SEQ ID NO:32 (VH CDR1); SEQ ID NO:33 (VH CDR2) и SEQ ID NO:34 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab4 описана в SEQ ID NO:35 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab4 представлены в SEQ ID NO:36 (VL CDR1); SEQ ID NO:37 (VL CDR2) и SEQ ID NO:38 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:32, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:33, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:34; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:36, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:37; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:38. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:32-34 и 36-38), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab4).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:31, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:31 или вариант SEQ ID NO:31, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:31 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:31 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:31 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID

NO:31, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab4), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:35 или вариант SEQ ID NO:35, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:35 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:35 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:35 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:35, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab4), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab4.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab4, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab4, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная

область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab4, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab4, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:39. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:39 или вариант SEQ ID NO:39, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:39 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:39 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:39 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:39, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab4), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab4.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:40 или вариант SEQ ID NO:40, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:40 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii)

отличается от SEQ ID NO:40 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:40 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:40, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab4), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab4.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab4, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab4, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab5

Антитело 5 (Ab5) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab5 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab5, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab5. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab5 представлена в SEQ ID NO:41 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab5 представлены в SEQ ID NO:42 (VH CDR1); SEQ ID NO:43 (VH CDR2) и SEQ ID NO:44 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab5 описана в SEQ ID NO:45 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab5 представлены в SEQ ID NO:46 (VL CDR1); SEQ ID NO:47 (VL CDR2) и SEQ ID NO:48 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий

аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:42, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:43, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:44; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:46, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:47; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:48. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:42-44 и 46-48), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab5).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:41, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать вариабельную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую вариабельный домен HC, содержащий SEQ ID NO:41 или вариант SEQ ID NO:41, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:41 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:41 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:41 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:41, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом вариабельная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab5), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой вариабельной областью тяжелой цепи Ab5. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую вариабельный домен LC, содержащий SEQ ID NO:45 или вариант SEQ ID NO:45, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:45 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:45 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:45 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными

заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:45, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab5), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab5.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab5, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab5, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab5, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области Ab5, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах

осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:49. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:49 или вариант SEQ ID NO:9, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:49 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:49 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:49 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:49, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab5), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:50 или вариант SEQ ID NO:50, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:50 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:50 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:50 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:50, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab5), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab5.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab5, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab5, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab6

Антитело 6 (Ab6) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab6 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab6, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab6. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab6 представлена в SEQ ID NO:51 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab6 представлены в SEQ ID NO:52 (VH CDR1); SEQ ID NO:53 (VH CDR2) и SEQ ID NO:54 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab6 описана в SEQ ID NO:55 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab6 представлены в SEQ ID NO:56 (VL CDR1); SEQ ID NO:57 (VL CDR2) и SEQ ID NO:58 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:52, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:53, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:54; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:56, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:57; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:58. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:52-54 и 56-58), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-

специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab6).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:51, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:51 или вариант SEQ ID NO:51, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:51 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:51 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:51 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:51, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab6), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:55 или вариант SEQ ID NO:55, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:55 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:55 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:55 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:55, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab6), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab6.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab6, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным

вариабельным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv), scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab6, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab6, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab6, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:59. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:59 или вариант SEQ ID NO:59, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:59 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:59 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:59 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5

аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:59, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab6), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:60. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:60 или вариант SEQ ID NO:60, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:60 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:60 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:60 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:60, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab6), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab6.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab6, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab6, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

Ab7

Антитело 7 (Ab7) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 Ab7 описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе Ab7, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям Ab7. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) Ab7 представлена в SEQ ID NO:61 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR Ab7 представлены в SEQ ID NO:62 (VH CDR1); SEQ ID NO:63 (VH CDR2) и SEQ ID NO:64 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) Ab7 описана в SEQ ID NO:65 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR Ab7 представлены в SEQ ID NO:66 (VL CDR1); SEQ ID NO:67 (VL CDR2) и SEQ ID NO:68 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:62, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:63, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:64; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:66, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:67; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:62-64 и 66-68), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной Ab7).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:61, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:65. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:61 или вариант SEQ ID NO:61, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:61 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными

заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:61 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:61 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:61, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab7), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи Ab7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:65 или вариант SEQ ID NO:65, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:65 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:65 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:65 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:65, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab7), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи Ab7.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области Ab7, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv), scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab7, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab7, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области Ab7, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:69 или вариант SEQ ID NO:69, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:9 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:69 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:69 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:69, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab7), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи Ab7.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:70 или вариант SEQ ID NO:70, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:70 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:70 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:70 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:70, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную Ab7), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи Ab7.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab7, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области Ab7, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

AbA

Антитело A (AbA) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 AbA описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе AbA, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям AbA. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) AbA представлена в SEQ ID NO:71 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR AbA представлены в SEQ ID NO:72 (VH CDR1); SEQ ID NO:73 (VH CDR2) и SEQ ID NO:74 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области

легкой цепи (VL) AbA описана в SEQ ID NO:75 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR AbA представлены в SEQ ID NO:76 (VL CDR1); SEQ ID NO:77 (VL CDR2) и SEQ ID NO:78 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее 5 переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:72, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:73, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:74; 10 и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:76, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:77; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:78. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в 15 настоящем документе (SEQ ID NO:72-74 и 76-78), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной AbA).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область 20 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:71, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:71 или вариант SEQ ID 25 NO:71, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:71 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:71 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:71 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей 30 мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:71, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbA), или обладает повышенной 35 биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи

AbA. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:75 или вариант SEQ ID NO:75, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:75 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:75 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:75 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:75, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbA), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи AbA.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области AbA, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv), scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблужьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области AbA, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной

области AbA, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области AbA, может дополнительно

5 содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его

10 антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:79. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:79 или вариант SEQ ID NO:79, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:79 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii)

15 отличается от SEQ ID NO:79 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:79 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:79, причем в любом из (i)-(iv)

20 аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbA), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи AbA.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его

25 антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:80. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:80 или вариант SEQ ID NO:80, причем вариант (i) отличается от

30 SEQ ID NO:80 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:80 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:80 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%,

35 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:80, причем в любом из (i)-(iv)

аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbA), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи AbA.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbA, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbA, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

AbB

Антитело B (AbB) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 AbB описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе AbB, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям AbB. Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) AbB представлена в SEQ ID NO:81 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR AbB представлены в SEQ ID NO:82 (VH CDR1); SEQ ID NO:83 (VH CDR2) и SEQ ID NO:84 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) AbB описана в SEQ ID NO:85 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VL CDR AbB представлены в SEQ ID NO:86 (VL CDR1); SEQ ID NO:87 (VL CDR2) и SEQ ID NO:88 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:82, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:83, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:84; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:86, домен CDR2,

содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:87; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:82-84 и 86-88), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной AbB).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:81, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать вариабельную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую вариабельный домен HC, содержащий SEQ ID NO:81 или вариант SEQ ID NO:81, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:81 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:81 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:81 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:81, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом вариабельная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbB), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой вариабельной областью тяжелой цепи AbB. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую вариабельный домен LC, содержащий SEQ ID NO:85 или вариант SEQ ID NO:85, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:85 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:85 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:85 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:85, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом вариабельная область модифицированной легкой цепи

сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbB), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи AbB.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области AbB, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv), scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области AbB, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область. Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области AbB, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или переменной области AbB, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах осуществления

антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:89 или вариант SEQ ID NO:89, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:89 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:89 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:89 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:89, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbB), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи AbB.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:90. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:90 или вариант SEQ ID NO:90, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:90 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:90 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:90 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:90, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbB), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи AbB.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbB, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbB, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

AbC

Антитело С (AbC) перекрестно реагирует с CD45 человека, CD45 яванского макака и CD45 макака резус и может связывать различные изоформы CD45 человека.

5 Аминокислотные последовательности для различных областей связывания антитела против CD45 AbC описаны в Таблице 27. В настоящее изобретение включены антитела против CD45 на основе AbC, *например*, которые содержат CDR, как указано в Таблице 27.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающие области, *например*, CDR и/или переменные области, соответствующие областям AbC.

10 Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) AbC представлена в SEQ ID NO:91 (см. Таблицу 27). Аминокислотные последовательности домена VH CDR AbC представлены в SEQ ID NO:92 (VH CDR1); SEQ ID NO:93 (VH CDR2) и SEQ ID NO:94 (VH CDR3). Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи (VL) AbC описана в SEQ ID NO:95 (см. Таблицу 27). Аминокислотные

15 последовательности домена VL CDR AbC представлены в SEQ ID NO:96 (VL CDR1); SEQ ID NO:97 (VL CDR2) и SEQ ID NO:98 (VL CDR3).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий

20 аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:92, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:93, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:94; и/или переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:96, домен CDR2,

25 содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:97; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:98. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 содержит CDR, описанные в настоящем документе (SEQ ID NO:92-94 и 96-98), где CDR содержит консервативную аминокислотную замену (или 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен) при сохранении CD45-

30 специфичности антитела (т.е. специфичности, аналогичной AbC).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:991, и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

35 последовательность, изложенную в SEQ ID NO:95. В некоторых вариантах осуществления

антитело может содержать переменную область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую переменный домен HC, содержащий SEQ ID NO:91 или вариант SEQ ID NO:91, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:91 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:91 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:91 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:91, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbC), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью тяжелой цепи AbC. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую переменный домен LC, содержащий SEQ ID NO:95 или вариант SEQ ID NO:95, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:95 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:95 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:95 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:95, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом переменная область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbC), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой переменной областью легкой цепи AbC.

Антитела, содержащие последовательности CDR и/или переменной области AbC, могут быть в форме полноразмерных антител, биспецифичных антител, антител с двойным переменным доменом, многоцепочечных или одноцепочечных антител и/или связывающих фрагментов, которые специфично связываются с CD45 человека, включая, но не ограничиваясь ими, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), суррогатные антитела (включая суррогатную конструкцию легкой цепи), однодоменные антитела, верблужьи антитела и т.п. Они также могут относиться к любому изотипу или происходить из него, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3

или IgG4) или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело против 45 представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области AbC, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека, константную область IgG3 человека или константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи может представлять собой модифицированную константную область.

Типичные замены и/или модификации константных областей описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, замены в одном или более из следующих положений 234, 235, 265 и 435 (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области AbC, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую одну или более из следующих замен: L234A, L235A, D265C и H435A (индекс EU согласно Kabat). В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее последовательности CDR и/или вариабельной области AbC, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:99. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной тяжелой цепи (HC), содержащую домен HC, содержащий SEQ ID NO:99 или вариант SEQ ID NO:99, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:99 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:99 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:99 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:99, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной тяжелой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную

AbC), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью тяжелой цепи AbC.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:100. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область модифицированной легкой цепи (LC), содержащую домен LC, содержащий SEQ ID NO:100 или вариант SEQ ID NO:100, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO:100 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO:100 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO:100 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:100, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и при этом область модифицированной легкой цепи сохраняет специфичность антитела к CD45 (т.е. специфичность, аналогичную AbC), или обладает повышенной биологической активностью по сравнению с другой областью легкой цепи AbC.

В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbC, могут быть включены в конъюгаты антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Кроме того, антитела, содержащие области CDR и/или переменные области AbC, можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, для истощения клеток CD45+ у субъекта.

25 *Консенсусные CDR*

Сравнение аминокислотных последовательностей CDR Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и Ab7 представлено на Фиг. 32. Эти антитела связываются с одним и тем же эпитопом на CD45 человека и имеют общие консенсусные остатки в своих CDR областях. Консенсусные последовательности CDR аминокислот тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:121; и консенсусные последовательности CDR аминокислот легкой цепи представлены в SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:124.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:119, домен CDR2,

содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:120, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:121; и переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:122, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:123; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:124. В некоторых вариантах осуществления указанное выше антитело может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. Например, в некоторых вариантах осуществления указанное выше антитело может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, выбранную из представленной в любой из SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106, и/или константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.

Fc-модифицированные антитела

В настоящем документе рассматриваются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать CD45 и имеющие Fc-модификации, обеспечивающие сайленсинг Fc, где такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в качестве терапевтических агентов по отдельности или в качестве ADC для истощения клеток, экспрессирующих CD45, у нуждающегося в этом пациента. Например, в некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, рассматриваемые в настоящем документе, можно использовать для истощения определенных типов клеток, включая ГСК и лейкоциты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для подготовки пациента к трансплантации ГСК. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для перезагрузки иммунной системы пациента, например, путем истощения ГСК и лейкоцитов у пациента и введения пациенту трансплантата ГСК. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для лечения заболевания, связанного с CD45-положительными клетками, включая, помимо прочего, рак и аутоиммунное заболевание, путем элиминации вызывающих заболевание CD45+ клеток у пациента.

Например, в настоящем документе рассматриваются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные связывать антиген, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, такими как CD45, и имеющие модификации Fc,

обеспечивающие сайленсинг Fc, причем такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, можно использовать в качестве терапевтических агентов отдельно или в качестве ADC (i) для лечения рака и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся CD45+ гемопоэтическими стволовыми клетками; и (ii) чтобы способствовать приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у пациента, нуждающегося в трансплантационной терапии. Эти терапевтические активности могут быть вызваны, например, связыванием антитела против CD45 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с CD45, экспрессируемым гемопоэтической клеткой (например, гемопоэтической стволовой клеткой или зрелой иммунной клеткой (например, Т-клеткой), такой как раковая клетка, аутоиммунная клетка или гемопоэтическая стволовая клетка, и впоследствии вызывая гибель клеток. Истощение эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может обеспечить нишу, в которую трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут вернуться и впоследствии установить продуктивный гемопоэз. Таким образом, трансплантированные гемопоэтические стволовые клетки могут успешно приживаться у пациента, такого как пациент-человек, страдающий описанным в настоящем документе заболеванием стволовых клеток. Fc-модифицированные антитела и ADC, рассматриваемые в настоящем документе, не только позволяют избирательно истощать эндогенные гемопоэтические стволовые клетки, но также обладают сниженным цитотоксическим действием на экзогенный трансплантат гемопоэтических стволовых клеток, тем самым дополнительно способствуя приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток.

Антитела или связывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут также включать модификации и/или мутации, которые изменяют свойства антител и/или фрагментов, такие как те, которые увеличивают или уменьшают время полувыведения или увеличивают или уменьшают ADCC. В одном варианте осуществления предложены антитела, содержащие одну или более меченых радиоактивным изотопом аминокислот. Антитело с радиоактивной меткой можно использовать как в диагностических, так и в терапевтических целях (конъюгация с молекулами, мечеными радиоактивным изотопом, является еще одним возможным свойством). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , and ^{125}I , ^{131}I и ^{186}Re . Способы получения меченых радиоактивным изотопом аминокислот и производных родственных пептидов известны в данной области техники (см., например, Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и патент США № 4681581, патент США № 4735210, патент США № 5101827, патент США № 5102990 (U.S. RE35,500), патент США № 5648471 и патент США № 5697902. Например, радиоизотоп может быть конъюгирован методом хлорамина T.

В одном варианте осуществления антитело против CD45 или его связывающий фрагмент содержит модифицированную Fc-область, где указанная модифицированная Fc-область содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с Fc-областью дикого типа, так что указанная молекула имеет измененную аффинность или связывания с FcγR (FcγR). Из кристаллографических исследований известно, что некоторые положения аминокислот в области Fc непосредственно контактируют с FcγR. В частности, аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (петля B/C), аминокислоты 297-299 (петля C'/E) и аминокислоты 327-332 (петля F/G) (см. Sondermann et al., 2000 Nature, 406: 267-273). Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать варианты Fc-областей, включающие модификацию по меньшей мере одного остатка, который непосредственно контактирует с FcγR, на основании структурного и кристаллографического анализа. В одном варианте осуществления Fc-область антитела против CD45 (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в положении аминокислоты 265 в соответствии с индексом EU, как в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), явно включенном в настоящий документ посредством ссылок. «Индекс EU согласно Kabat» относится к нумерации человеческого антитела IgG1 EU. В одном варианте осуществления область Fc содержит мутацию D265A. В одном варианте осуществления область Fc содержит мутацию D265C. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в положении аминокислоты 234 в соответствии с индексом EU согласно Kabat.

В одном варианте осуществления область Fc содержит мутацию в положении аминокислот D265, V205, H435, I253 и/или H310. Например, специфичные мутации в этих положениях включают D265C, V205C, H435A, I253A и/или H310A.

В одном варианте осуществления область Fc содержит мутацию L234A. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела против CD45 (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в положении аминокислоты 235 в соответствии с индексом EU согласно Kabat. В одном варианте осуществления область Fc содержит мутацию L235A. В еще одном варианте осуществления Fc-область содержит мутации L234A и L235A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C, L234A и L235A. В еще одном варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C, L234A, L235A и H435A. В другом варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C и H435A.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD45 содержит Fc-область, содержащую одну из следующих модификаций или комбинаций модификаций: D265A, D265C, D265C / H435A, D265C / LALA, D265C / LALA / H435A, D265C /

N297G, D265C / N297G / H435A, D265C (IgG2*), D265C (IgG2) / H435A, D265C / N297Q / H435A, D265C / N297Q, EPLVLAdelG / H435A, N297A, N297G или N297Q (индекс EU согласно Kabat).

Связывание или аффинность между модифицированной Fc-областью и Fc-рецептором гамма можно определить с использованием различных методов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, равновесных методов (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализа (RIA)), или анализа поверхностного плазмонного резонанса, или другого механизма анализа, основанного на кинетике (например, анализа BIACORE.RTM. или анализа Octet™ (forteBIO)), и других способов, таких как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания с переносом энергии флуоресцентного резонанса (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие методы способны использовать метку на одном или более исследуемых компонентах и/или использовать различные способы обнаружения, включая, помимо прочего, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в публикации Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой основное внимание уделяется взаимодействиям антитело-иммуноген. Одним из примеров анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого антигена с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого антигена и обнаружение антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность представляющего интерес антитела к конкретному антигену и скорость диссоциации связывания можно определить по данным анализа графика Скэтчарда. Конкуренцию со вторым антителом также можно определить с помощью радиоиммуноанализа. В этом случае антиген инкубируют с представляющим интерес антителом, конъюгированным с меченым соединением, в присутствии возрастающих количеств второго немеченого антитела.

В одном варианте осуществления антитело, имеющее модификации Fc, описанные в настоящем документе (например, D265C, L234A, L235A и/или H435A), имеет снижение по меньшей мере на 70%, снижение по меньшей мере на 80%, снижение по меньшей мере на 90%, снижение по меньшей мере на снижение на 95%, снижение по меньшей мере на 98%, снижение по меньшей мере на 99% или снижение примерно на 100% связывания с рецептором Fc-гамма по сравнению со связыванием идентичного антитела, содержащего немодифицированную Fc-область, с рецептором Fc-гамма (например, по оценке путем интерферометрии биослоя (BLI)).

Взаимодействия связывания Fc-области с Fc-гамма рецептором необходимы для множества эффекторных функций и последующих сигнальных событий, включая, но не ограничиваясь ими, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC). Соответственно, в некоторых аспектах антитело, содержащее модифицированную Fc-область (например, содержащее мутацию L234A, L235A и/или D265C), существенно снижает или устраняет эффекторные функции. Эффекторные функции можно анализировать с использованием различных способов, известных в данной области техники, например, путем измерения клеточных ответов (например, дегрануляции тучных клеток или высвобождения цитокинов) в ответ на представляющее интерес антитело. Например, используя стандартные способы в данной области техники, Fc-модифицированные антитела могут быть проанализированы на их способность вызывать дегрануляцию тучных клеток или на их способность запускать высвобождение цитокинов, т.е. мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Таким образом, в одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию, приводящую к уменьшению времени полувыведения (например, по сравнению с антителом, имеющим немодифицированную Fc-область). Антитело с коротким периодом полувыведения может быть подходящим в некоторых случаях, когда ожидается, что антитело будет функционировать в качестве терапевтического средства с коротким периодом полувыведения, например, на стадии подготовки, описанной в настоящем документе, когда антитело вводят с последующим введением ГСК. Как правило, антитело будет в значительной степени выведено перед доставкой ГСК, которые также обычно экспрессируют антиген-мишень (например, CD45), но не являются мишенью антитела против CD45, в отличие от эндогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления Fc-области содержат мутацию в положении 435 (индекс ЕС согласно Kabat). В одном варианте осуществления мутация представляет собой мутацию H435A.

В одном варианте осуществления антитело против CD45, описанное в настоящем документе, имеет период полувыведения (например, у человека), равный или менее 24 часов, равный или менее 23 часов, равный или менее 22 часов, равный или менее 21 часа, равный или менее 20 часов, равный или менее 19 часов, равный или менее 18 часов, равный или менее 17 часов, равный или менее 16 часов, равный или менее 15 часов, равный или менее 14 часов, равный или менее 13 часов, равный или менее 12 часов или равный или менее 11 часов.

В одном варианте осуществления антитело против CD45, описанное в настоящем документе, имеет период полувыведения (например, у человека) примерно 1-2 часа, примерно 1-3 часа, примерно 1-5 часов, примерно 1-10 часов, примерно 5-10 часов,

примерно 5-15 часов, примерно 10-15 часов, примерно 10-20 часов, примерно 15-20 часов, примерно 15-25 часов или примерно 20-25 часов.

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

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином (например, аматоксином) посредством остатка цистеина в Fc-домене антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина вводят путем мутации в Fc-домен антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, остаток цистеина может быть выбран из группы, состоящей из Cys118, Cys239 и Cys265. В одном варианте осуществления Fc-область антитела против CD45 (или его фрагмента) содержит аминокислотную замену в положении аминокислоты 265 в соответствии с индексом EU согласно Kabat. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутации D265C и H435A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A и L235A. В одном варианте осуществления Fc-область содержит мутацию D265C, L234A, L235A и H435A.

Примечательно, что положения аминокислот в Fc указаны в соответствии с индексом нумерации EU, если не указано иное.

Описание каждой из предшествующих публикаций включено в настоящий документ в качестве ссылки, поскольку оно относится к антителу против CD45. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают вышеописанные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также варианты тех нечеловеческих антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые описаны выше, и антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают тот же эпитоп, что и описанные выше, по оценке, например, с помощью анализа конкурентного связывания антигена.

Способы конструирования антител, включающих любую из описанных в настоящем документе модификаций Fc, хорошо известны в данной области техники. Эти способы

включают, но не ограничиваются ими, получение сайт-направленным (или опосредованным олигонуклеотидами) мутагенезом, ПЦР-мутагенезом и кассетным мутагенезом подготовленной молекулы ДНК, кодирующей антитело или, по меньшей мере, константную область антитела. Сайт-направленный мутагенез хорошо известен в данной области техники (см., например, Carter et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:4431-4443 (1985) and Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488 (1987)). ПЦР-мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотной последовательности исходного полипептида. См. Higuchi, in *PCR Protocols*, pp. 177-183 (Academic Press, 1990); and Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989). Другой способ получения вариантов последовательностей, кассетный мутагенез, основан на способе, описанном в Wells et al., *Gene*, 34:315-323 (1985).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его связывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с меткой. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или фрагменты, которые обнаруживаются непосредственно (например, флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживаются косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примеры меток включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, 3-галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказу и ксантинооксидазу, в сочетании с ферментом, использующим пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

В настоящем документе также предложены молекулы нуклеиновой кислоты (например, ДНК или мРНК), которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело против CD45, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающую часть.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариabельную

область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область легкой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC. В других вариантах осуществления в настоящем документе представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь и легкую цепь Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, AbA, AbB или AbC.

Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела или ее часть, может присутствовать в той же молекуле нуклеиновой кислоты (например, векторе экспрессии), что и нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела или ее часть. В качестве альтернативы последовательности тяжелой и легкой цепей могут присутствовать на отдельных молекулах нуклеиновых кислот (например, на отдельных векторах экспрессии).

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая:

- (a) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:125;
- (b) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:126;
- (c) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:127;

- (d) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:128;
- (e) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:129;
- (f) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:130;
- (g) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:131;
- 5 (h) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:132;
- (i) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:133;
- (j) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:134;
- (k) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:135;
- (l) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:136;
- 10 (m) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:137;
- (n) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:138;
- (o) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:139;
- (p) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:140;
- (q) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:141;
- 15 (r) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:142;
- (s) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:143; и/или
- (t) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:144;

при этом выделенная нуклеиновая кислота кодирует антитело против CD45 или его часть.

- В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложена
- 20 выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая:

- (a) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:150;
- (b) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:151;
- (c) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:152;
- (d) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:153;
- 25 (e) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:154;
- (f) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:155;
- (g) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:156;
- (h) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:157;
- (i) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:158;
- 30 (j) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:159;
- (k) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:160; и/или
- (l) последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO:161;

при этом выделенная нуклеиновая кислота кодирует антитело против CD45 или его часть.

Антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном варианте осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против CD45, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В дополнительном варианте осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, т.е. клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела против CLL-1, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения антитела против CD45 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают описанные в настоящем документе прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела могут продуцироваться бактериями, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются. В отношении экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248

(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев. Например, могут быть использованы клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); мышинные клетки Сертоли (клетки TM4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982), клетки MRC5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

В одном варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97% или 99% идентична SEQ ID No, раскрытым в настоящем документе. В качестве альтернативы антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, содержащие SEQ ID No, раскрытые в настоящем документе, с каркасными областями вариабельных областей, описанных в настоящем документе, имеющих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере 95%, 96%, 97% или на 99% идентична SEQ ID No, раскрытым в настоящем документе.

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

против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи, константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, раскрытую в настоящем документе.

5

Способы идентификации антител

В настоящем документе предложены новые антитела против CD45, которые можно использовать, например, для истощения клеток CD45+ у пациента. Эти антитела могут быть полезны, например, в способах подготовки для трансплантации стволовых клеток. С учетом раскрытия, представленного в настоящем документе, могут быть идентифицированы другие антитела против CD45.

Способы высокопроизводительного скрининга антител или библиотек фрагментов антител, способных связывать CD45, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, можно применять для идентификации антител против CD45, подходящих для лечения рака, аутоиммунных заболеваний и подготовки пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии гемопоэтическими стволовыми клетками, как описано в настоящем документе. Такие способы можно применять для идентификации улучшенных версий антител против CD45, описанных в настоящем документе. Такие способы включают в себя методы дисплея *in vitro*, известные в данной области техники, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей, дисплей клеток млекопитающих, дисплей рибосом, дисплей мРНК и дисплей кДНК, среди прочих.

Использование фагового дисплея для выделения антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают биологически релевантные молекулы, рассмотрено, например, в Felici et al., *Biotechnol. Annual Rev.* 1:149-183, 1995; Katz, *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45, 1997; and Hoogenboom et al., *Immunotechnology* 4:1-20, 1998, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к методам дисплея *in vitro*. Рандомизированные комбинаторные библиотеки пептидов были сконструированы для отбора полипептидов, которые связывают антигены клеточной поверхности, как описано в Kay, *Perspect. Drug Discovery Des.* 2:251-268, 1995 and Kay et al., *Mol. Divers.* 1:139-140, 1996, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к обнаружению антигенсвязывающих молекул. Белки, такие как мультимерные белки, были успешно выведены использованы в фаговом дисплее в виде функциональных молекул (см., например, EP 0349578; EP 4527839 и EP 0589877, а также Chiswell and McCafferty, *Trends Biotechnol.* 10:80-84 1992, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ

посредством ссылки, поскольку оно относится к использованию методов дисплея *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул. Кроме того, функциональные фрагменты антител, такие как Fab- и scFv-фрагменты, были экспрессированы в форматах дисплея (см., например, McCafferty et al., Nature 348:552- 554, 1990; Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991; и Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, описание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку они относятся к платформам дисплея *in vitro* для обнаружения антигенсвязывающих молекул). Например, также могут быть получены антитела против CD45 человека в HuMAb-Mouse® или XenoMouse™. Эти методы, среди прочих, могут быть использованы для выявления и улучшения аффинности антител, антитела или их фрагментов, способных связывать CD45, экспрессируемых гемопоэтическими стволовыми клетками, в свою очередь могут быть использованы для истощения эндогенных гемопоэтических стволовых клеток у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

В дополнение к методам дисплея *in vitro* методы компьютерного моделирования могут использоваться для разработки и идентификации антител, способных связывать антиген (например, CD45), экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками. Например, используя методы компьютерного моделирования, специалист в данной области техники может провести скрининг библиотек антител или фрагментов антител *in silico* на наличие молекул, способных связывать специфичные эпитопы на антигене, экспрессированном гемопоэтическими стволовыми клетками (например, CD45), такие как внеклеточные эпитопы антигена.

Дополнительные методы могут быть использованы для идентификации антител или фрагментов антител, способных связывать CD45, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками, и которые интернализуются клеткой, например, посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором. Например, методы дисплея *in vitro*, описанные выше, могут быть адаптированы для скрининга антител или фрагментов антител, которые связывают CD45 и которые впоследствии интернализуются. Фаговый дисплей представляет собой один из таких методов, который можно использовать в сочетании с этой парадигмой скрининга. Для идентификации антитела против CD45 или фрагмента антитела, которые могут интернализоваться гемопоэтическими стволовыми клетками, специалист в данной области техники может использовать методы фагового дисплея, описанные в Williams et al., Leukemia 19:1432-1438, 2005, раскрытие которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Например, используя способы мутагенеза, известные в данной области техники, можно получить библиотеки рекомбинантных фагов, которые

кодируют антитела, фрагменты антител, такие как scFv-фрагменты, Fab-фрагменты, диатела, триатела и ¹⁰Fn3-домены, среди прочего, или лиганды, которые содержат рандомизированные аминокислотные кассеты (например, в одной или более или во всех CDR или их эквивалентных областях или антителе или фрагменте антитела). Каркасные области, шарнир, Fc-домен и другие области антител или фрагментов антител могут быть сконструированы таким образом, что они не являются иммуногенными для человека, например, благодаря наличию последовательностей или последовательностей антител зародышевой линии человека, которые проявляют лишь незначительные вариации по отношению к антителам зародышевой линии человека.

Используя методы фагового дисплея, описанные в настоящем документе или известные в данной области техники, фаговые библиотеки, содержащие рандомизированные антитела или фрагменты антител, ковалентно связанные с фаговыми частицами, можно инкубировать, например, с CD45, сначала инкубируя фаговую библиотеку с блокирующими агентами (такими как, например, молочный белок, бычий сывороточный альбумин и/или IgG, чтобы удалить фаг, кодирующий антитела или фрагменты антител, которые проявляют неспецифичное связывание с белком, и фаг, который кодирует антитела или их фрагменты, которые связывают Fc-домены, а затем инкубируя фаговую библиотеку с популяцией клеток, например, гемопоэтическими стволовыми клетками, которые экспрессируют CD45. Фаговую библиотеку можно инкубировать с гемопоэтическими стволовыми клетками в течение времени, достаточного для того, чтобы антитела против CD45 или фрагменты антител могли связать родственный клеточной поверхности антиген и впоследствии интернализироваться гемопоэтическими стволовыми клетками (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C, например, 1 час при 4°C). Фаг, содержащий антитела или фрагменты антител, которые не обладают достаточной аффинностью к CD45, чтобы обеспечить возможность связывания и интернализацию гемопоэтическими стволовыми клетками, может быть впоследствии удален путем промывания клеток, например, холодным (4°C) 0,1 М глициновым буфером при pH 2,8. Фаг, связанный с антителами или фрагментами антител, интернализированными гемопоэтическими стволовыми клетками, можно идентифицировать, например, путем лизиса клеток и извлечения интернализированного фага из среды культивирования клеток. Затем фаг может быть амплифицирован в бактериальных клетках, например, путем инкубации бактериальных клеток с извлеченным фагом в среде 2xYT с использованием способов, известных в данной области техники. Затем фаг, извлеченный из этой среды, можно охарактеризовать, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты гена(ов), кодирующего антитела или фрагменты антител, встроенные в геном фага. Кодированные антитела или фрагменты антител

впоследствии могут быть получены de novo путем химического синтеза (например, фрагментов антител, таких как фрагменты scFv) или путем рекомбинантной экспрессии (например, полноразмерных антител).

Интернализирующая способность полученных антител или фрагментов антител может
 5 быть оценена, например, с использованием методов интернализации радионуклидов, известных в данной области техники. Например, антитела против CD45 или фрагменты антител, идентифицированные с использованием методов дисплея in vitro, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники, могут быть функционализированы путем
 10 включения радиоактивного изотопа, такого как ^{18}F , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{122}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{169}Yb , ^{186}Re , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{77}As , ^{72}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{212}Bi , ^{213}Bi или ^{225}Ac . Например, радиоактивные галогены, такие как ^{18}F , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{122}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{211}At , могут быть
 15 включены в антитела или фрагменты антител с использованием шариков, таких как полистироловые шарики, содержащие электрофильные галогенные реагенты (например, йодированные шарики, Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA). Антитела, меченные радиоактивным изотопом, их фрагменты или ADC можно инкубировать с гемопоэтическими
 20 стволовыми клетками в течение времени, достаточного для интернализации (например, от 30 минут до 6 часов при 4°C , например, 1 час при 4°C). Затем клетки можно промыть для удаления неинтернализированных антител или их фрагментов (например, с использованием холодного (4°C) 0,1 М глицинового буфера при pH 2,8). Интернализованные антитела или фрагменты антител
 25 могут быть идентифицированы путем обнаружения испускаемого излучения (например, γ -излучения) полученных гемопоэтических стволовых клеток по сравнению с испускаемым излучением (например, γ -излучением) восстановленного промывочного буфера. Вышеупомянутые анализы интернализации также можно использовать для характеристики ADC.

Антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и
 25 композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном варианте осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против CD45, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи
 30 антитела). В дополнительном варианте осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую
 35 аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную

последовательность, содержащую VH антитела или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, т.е. клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела против CLL-1, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения антитела против CD45 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают описанные в настоящем документе прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела могут продуцироваться бактериями, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются. В отношении экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев. Например, могут быть использованы клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK); мышинные клетки Сертоли (клетки TM4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562);

клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982), клетки MRC5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых

5 линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003). В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, т.е. клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

10

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

Антитела против CD45 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы (связаны) с цитотоксином через линкер. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с

15 интернализирующим клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем документе, так что после поглощения клетками антитела или его фрагмента цитотоксин может получить доступ к его внутриклеточной мишени и опосредовать гибель гемопозитических клеток. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD45, содержащий переменные области VH и VL, описанные в настоящем документе (или

20 переменные области, содержащие наборы CDR легкой и тяжелой цепей, описанные в настоящем документе), конъюгируют с токсином с образованием scFv-токсин.

Цитотоксины

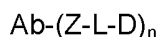
Различные цитотоксины могут быть конъюгированы с антителом против CD45 через

25 линкер для применения в описанных в настоящем документе методах лечения. В частности, ADC против CD45 включают антитело против CD45 (или его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированное (т.е. ковалентно присоединенное линкером) с цитотоксическим фрагментом (или цитотоксином). В различных вариантах осуществления цитотоксический фрагмент проявляет пониженную цитотоксичность или не проявляет цитотоксичности при

30 связывании в конъюгате, но возобновляет цитотоксичность после отщепления от линкера. В различных вариантах осуществления цитотоксический фрагмент сохраняет цитотоксичность без отщепления от линкера. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая молекула конъюгирована с интернализирующим клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем документе, так что после

поглощения клетками антитела или его фрагмента цитотоксин может получить доступ к его внутриклеточной мишени и, например, опосредовать гибель Т-клеток.

Таким образом, ADC согласно настоящему изобретению могут иметь общую формулу



5 где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) конъюгированы (ковалентно связаны) с линкером (L) через химический фрагмент (Z) с цитотоксическим фрагментом («лекарственное средство», D или «Су»).

Соответственно, антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с рядом фрагментов лекарственного средства, что обозначено целым
10 числом n, которое представляет собой среднее количество цитотоксинов на антитело, которое может находиться в диапазоне, например, от примерно 1 до примерно 20. В некоторых вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления n равно 1. Среднее количество фрагментов лекарственного средства на антитело в препаратах ADC из реакций конъюгации можно охарактеризовать с помощью
15 обычных средств, таких как масс-спектропия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Количественное распределение ADC по n также может быть определено. В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенного ADC, где n представляет собой определенное значение, от ADC с другими нагрузками лекарственного средства могут быть достигнуты с помощью таких средств, как ВЭЖХ с обращенной фазой или электрофорез.

20 Для некоторых ADC против CD45 они могут быть ограничены количеством сайтов связывания на антителе. Например, когда присоединение представляет собой тиол цистеина, антитело может иметь только одну или более тиоловых групп цистеина или может иметь только одну или более достаточно реакционноспособных тиоловых групп, через которые может быть присоединен линкер. Как правило, антитела не содержат много
25 свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут быть связаны с фрагментом лекарственного средства; прежде всего, тиоловые остатки цистеина в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть восстановлено восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в условиях частичного или
30 полного восстановления с образованием реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В некоторых вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственного средства (DAR), например, $n > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления во время реакции конъюгации с антителом
35 конъюгируется меньше фрагментов лекарственного средства, чем теоретический максимум.

Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Только наиболее реакционноспособные группы лизина могут вступать в реакцию с линкерным реагентом, реагирующим с амином. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают денатурации для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Загрузку (соотношение лекарство/антитело) ADC можно контролировать различными способами, например, путем: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по отношению к антителу, (ii) ограничения времени реакции конъюгации или температуры, (iii) частичных или ограничивающих восстановительных условий для модификации тиола цистеина, (iv) конструирования с помощью рекомбинантных методов аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы количество и положение остатков цистеина изменялось для контроля количества и/или положения присоединения линкер-лекарственное средство.

Цитотоксины, подходящие для использования с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают агенты, интеркалирующие ДНК (например, антрациклины), агенты, способные разрушать аппарат митотического веретена (например, алкалоиды барвинка, майтансин, майтансиноиды и их производные), ингибиторы РНК-полимеразы (например, аматоксин, такой как α -аманитин и его производные), и агенты, способные нарушать биосинтез белка (например, агенты, которые проявляют активность N-гликозидазы рРНК, такие как сапорин и А-цепь ризина), среди прочих, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой агент, связывающийся с микротрубочками (например, майтансин или майтансиноид), аматоксин, экзотоксин А псевдомонад, дебуганин, дифтерийный токсин, сапорин, ауристатин, антрациклин, калихимицин, иринотекан, SN-38, дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепаина, индолинобензодиазепин, димер индолинобензодиазепаина или их вариант, или другое цитотоксическое соединение, описанное в настоящем документе или известное в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аматоксин или его производное. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе, представляет собой аматоксин или его производное, такое как α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин,

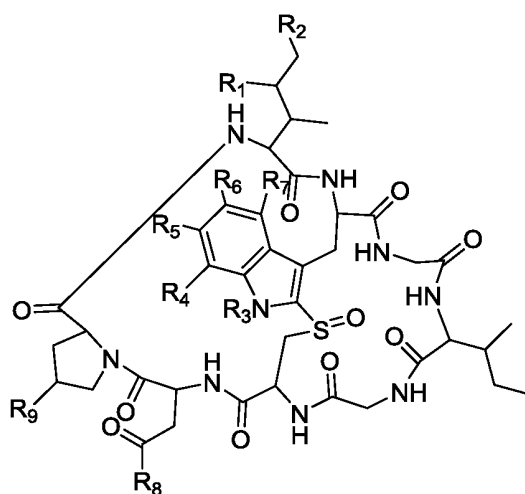
аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота, проамануллин или его производное.

Дополнительные подробности относительно цитотоксинов, которые можно использовать в ADC против CD45, применимых в композициях и способах согласно настоящему изобретению, описаны ниже.

Аматоксины

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой аматоксин или его производное, которое представляет собой ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе, представляет собой аматоксин или его производное, такое как α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ϵ -аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота, проамануллин или его производное.

Структура типичных аматоксинов представлена формулой IV ниже; примеры также раскрыты, например, в Zanotti et al., Int. J. Peptide Protein Res. 30, 1987, 450-459.



(IV).

20

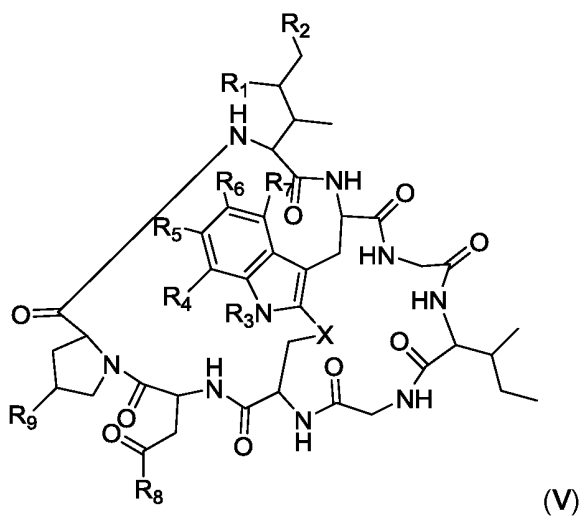
В приведенной ниже таблице представлены дополнительные структуры аматоксина:

Название	R ₁	R ₂	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₆ , R ₇	R ₈	R ₉
α -аманитин	OH	OH	H	OH	H	NH ₂	OH

β- амантин	ОН	ОН	Н	ОН	Н	ОН	ОН
γ- амантин	ОН	Н	Н	ОН	Н	NH ₂	ОН
ε- амантин	ОН	Н	Н	ОН	Н	ОН	ОН
Аманин	ОН	ОН	Н	Н	Н	ОН	ОН
Аманинамид	ОН	ОН	Н	Н	Н	NH ₂	ОН
Амануллин	Н	Н	Н	ОН	Н	NH ₂	ОН
Амануллино вая кислота	Н	Н	Н	ОН	Н	ОН	ОН
Проаманулл ин	Н	Н	Н	ОН	Н	NH ₂	Н

Аматоксины, применимые в сочетании с композициями, например, ADC против CD45, и способы, описанные в настоящем документе, включают соединения согласно, но не ограничиваясь ими, формуле (V),

5



где:

R₁ представляет собой H, OH или OR_A;

R₂ представляет собой H, OH или OR_B;

10

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

R_3 представляет собой H или R_D ;

R_4 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_5 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

5 R_7 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

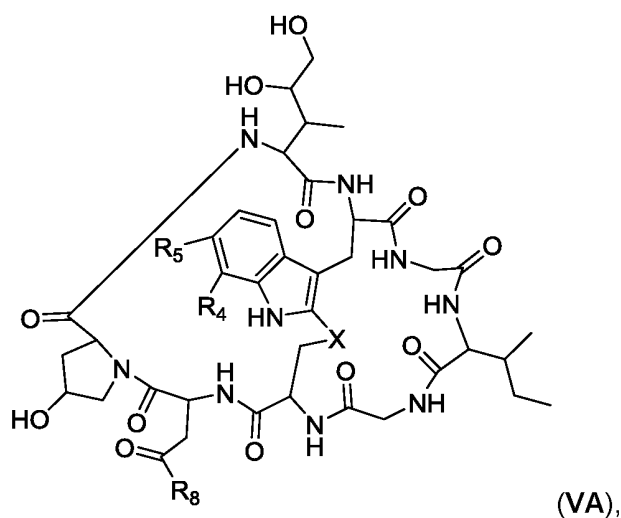
R_8 представляет собой OH, NH_2 или OR_D ;

R_9 представляет собой H, OH или OR_D ;

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

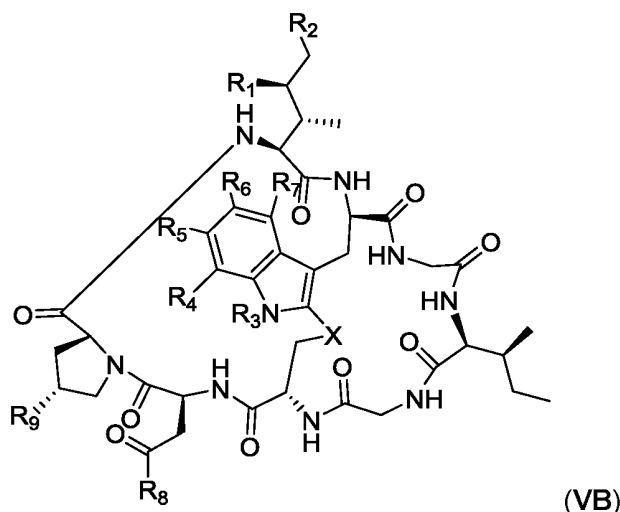
R_D представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C₁-C₆ алкил),
 10 необязательно замещенный гетероалкил (например, C₁-C₆ гетероалкил), необязательно замещенный алкенил (например, C₂-C₆ алкенил), необязательно замещенный гетероалкенил (например, C₂-C₆ гетероалкенил), необязательно замещенный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

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



20 где R_4 , R_5 , X и R_8 каждый является таким как определено выше.

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



где:

R_1 представляет собой H, OH или OR_A ;

R_2 представляет собой H, OH или OR_B ;

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

R_3 представляет собой H или R_D ;

R_4 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

10 R_5 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_7 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

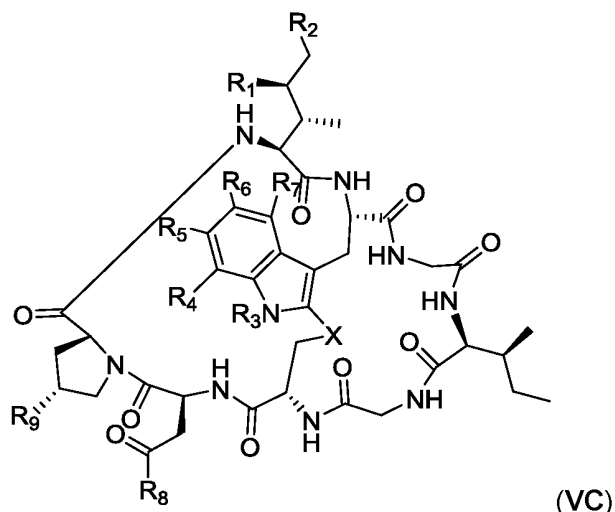
R_8 представляет собой OH, NH_2 или OR_D ;

R_9 представляет собой H, OH или OR_D ;

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

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

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



где:

R_1 представляет собой H, OH или OR_A ;

R_2 представляет собой H, OH или OR_B ;

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

R_3 представляет собой H или R_D ;

R_4 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

10 R_5 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_6 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_7 представляет собой H, OH, OR_D или R_D ;

R_8 представляет собой OH, NH_2 или OR_D ;

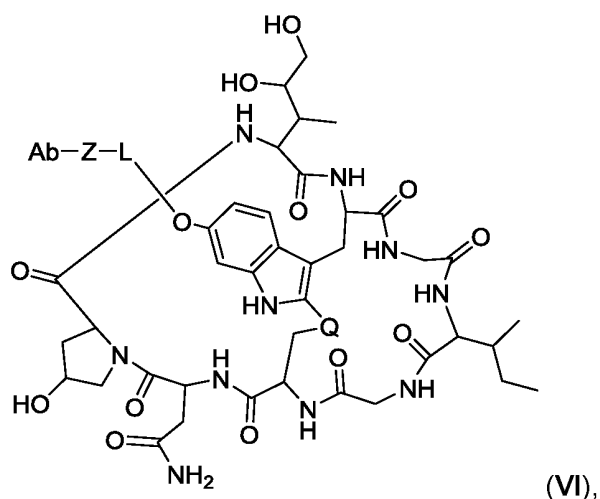
R_9 представляет собой H, OH или OR_D ;

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

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

Дополнительные примеры аматоксинов, которые можно использовать в конъюгатах, описанных в настоящем документе, включают описанные в WO 2020/216927, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. В одном варианте осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент

конъюгировано с аматоксином через линкер, где ADC имеет структуру формулы (VI)



5 или его стереоизомер;

где:

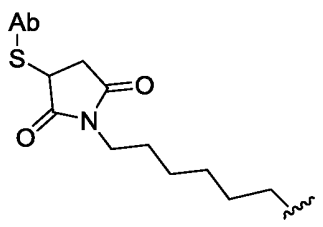
Q представляет собой S;

L представляет собой линкер;

10 Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, и

Ab представляет собой антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В другом варианте осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В одном варианте осуществления L содержит $-(CH_2)_n-$ звено, где n представляет собой целое число от 2 до 6. В одном варианте осуществления L представляет собой $-(CH_2)_n-$, где n равно 6. В одном варианте осуществления Ab, Z и L, вместе взятые как Ab-Z-L, представлены формулой:

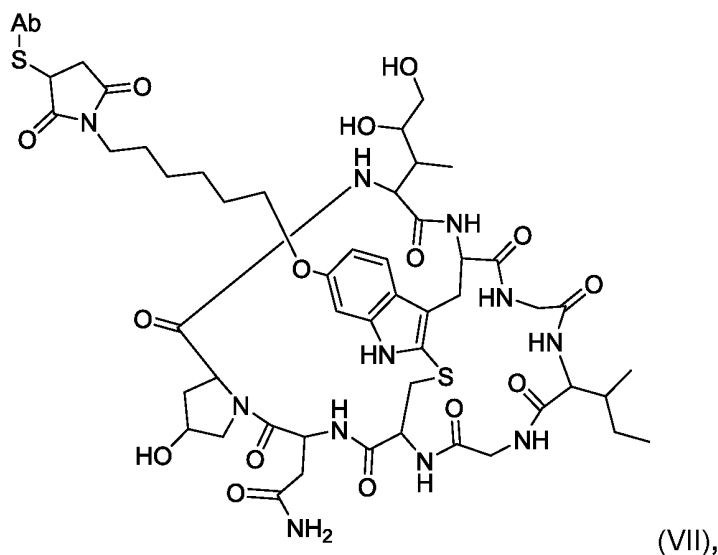
20



где S представляет собой атом серы остатка цистеина, присутствующего в антителе против CD45 или его антигенсвязывающем фрагменте.

В одном варианте осуществления ADC содержит антитело против CD45, конъюгированное с аматоксином, причем ADC имеет структуру согласно формуле (VII):

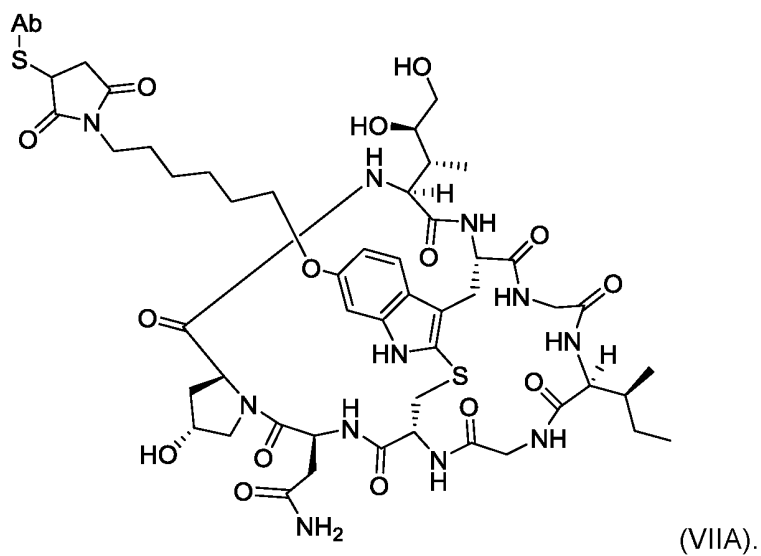
5



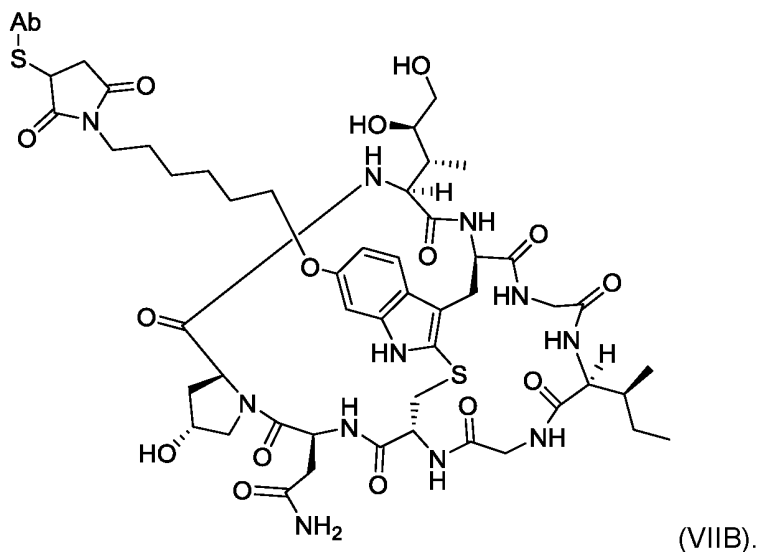
или его стереоизомер.

10

В одном варианте осуществления ADC содержит антитело против CD45, конъюгированное с аматоксином, причем ADC имеет структуру согласно формуле (VIIA):



В одном варианте осуществления ADC содержит антитело против CD45, конъюгированное с аматоксином, причем ADC имеет структуру согласно формуле (VIIB):



Синтетические способы получения аматоксина описаны в патенте США № 9676702, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

В других вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с аматоксином с образованием конъюгата, представленного формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am представляет собой аматоксин. Многие положения на аматоксинах или их производных могут служить в качестве положений для ковалентного связывания линкерного фрагмента L и, следовательно, антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

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

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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

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

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

R_C представляет собой -L-Z;

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

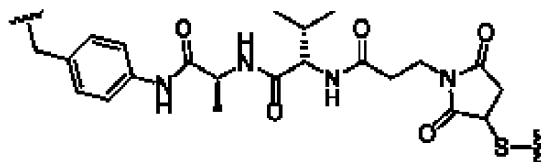
15 L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C₁-C₆ алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (например, C₁-C₆ гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C₂-C₆ алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C₂-C₆ гетероалкенилен),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

и

25 Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которое связывает антиген-мишень (например, CD45).

В некоторых вариантах осуществления Am содержит ровно один заместитель R_C .

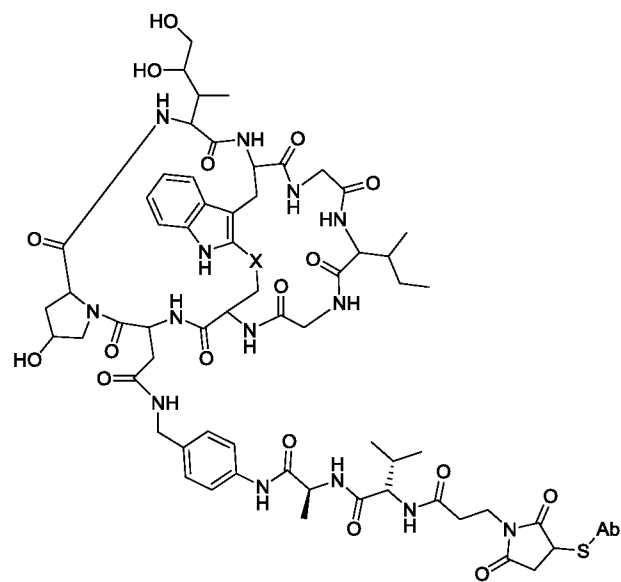
30 В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



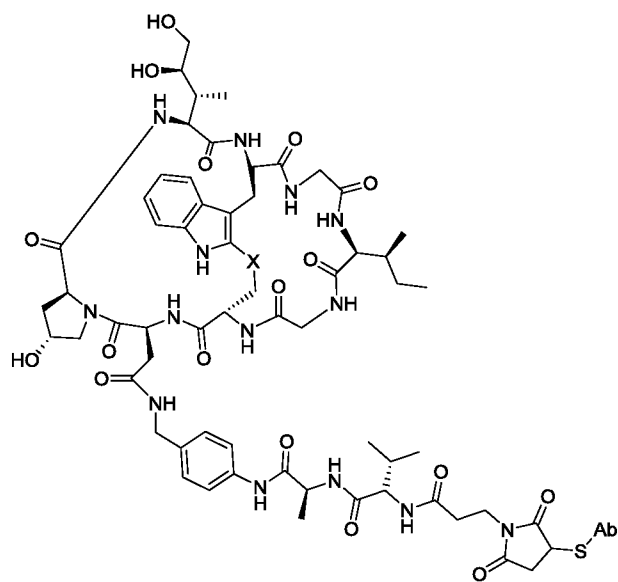
где S представляет собой атом серы, который представляет собой реактивный заместитель, присутствующий в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает

антиген-мишень (например, из группы -SH остатка цистеина).

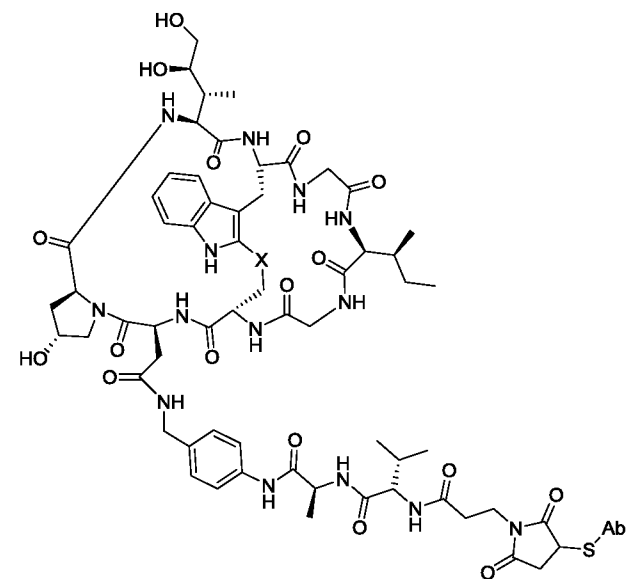
В некоторых вариантах осуществления конъюгат представлен одной из формул III,
IIIА или IIIВ:



(III)



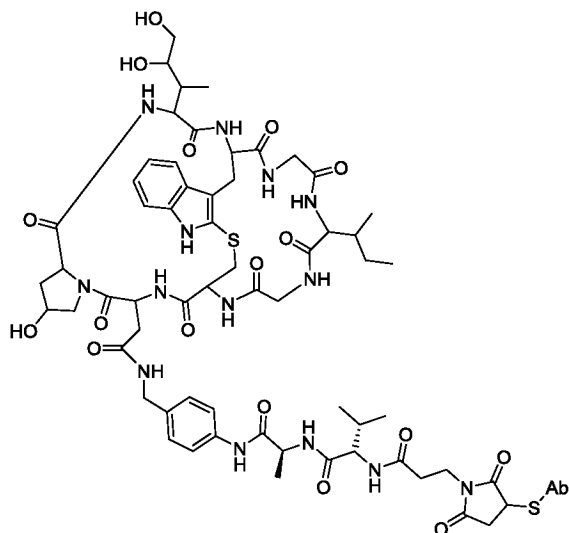
(IIIA)



(IIIB)

где X представляет собой S, SO или SO₂, и показано, что Ab обозначает точку присоединения Ab.

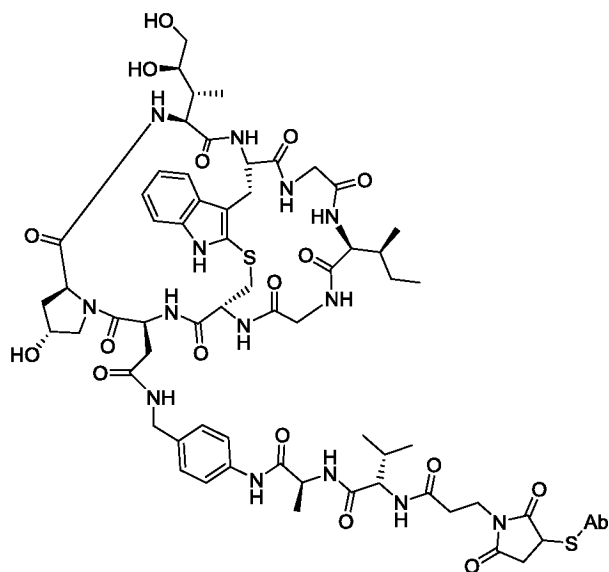
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



5

где Ab обозначает точку присоединения Ab.

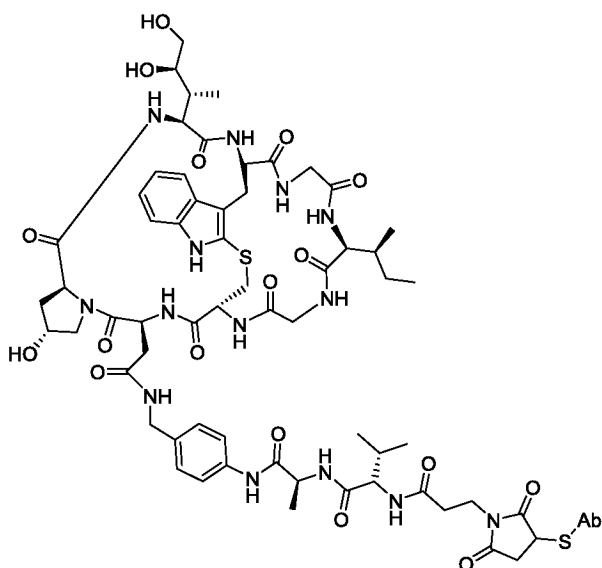
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



10

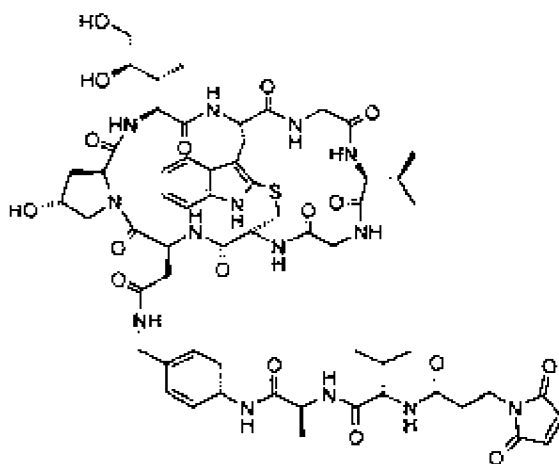
где Ab обозначает точку присоединения Ab.

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



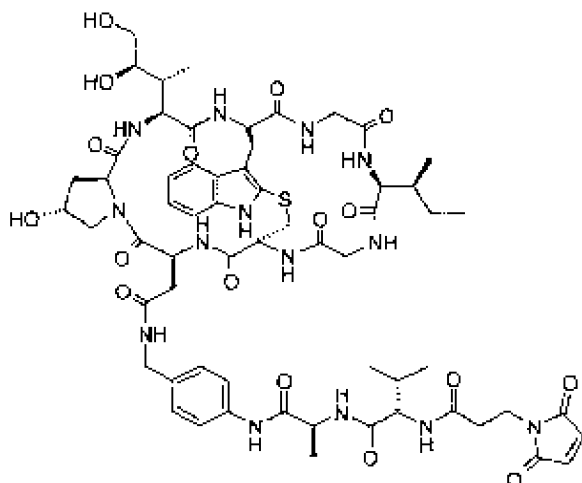
где Ab обозначает точку присоединения Ab.

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



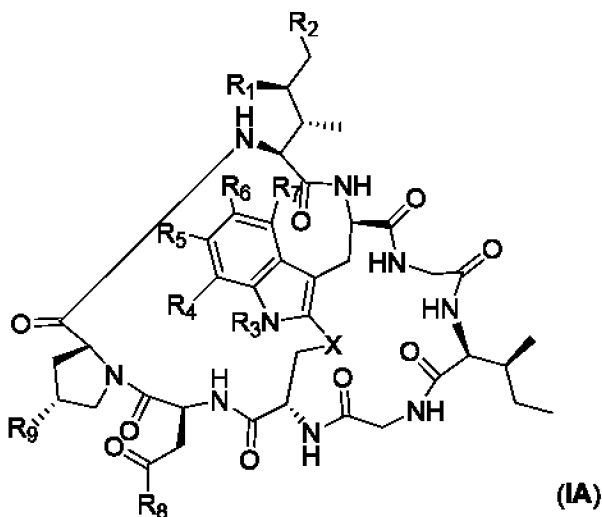
при этом maleимид реагирует с тиоловой группой, обнаруживаемой на цистеине в антителе.

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



при этом малеимид реагирует с тиоловой группой, обнаруживаемой на цистеине в антителе.

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



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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

R₉ представляет собой H, OH, OR_C или OR_D;

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

R_C представляет собой $-L-Z$:

R_D представляет собой необязательно замещенный алкил (например, C₁-C₆)

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

L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен

(например, C₁-C₆ алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (например,

C₁-C₆ гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C₂-C₆

15 алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C_2-C_8

гетероалкенилен), необязательно замещенный алкинилен (например, C_2-C_6

алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C₂-C₆

гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно

замещенный гетероциклоалкилен. необязательно замещенный арилен.

20 необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, $-(C=O)-$, дисульфид,

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате

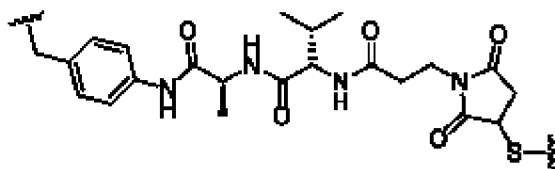
реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в

L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его

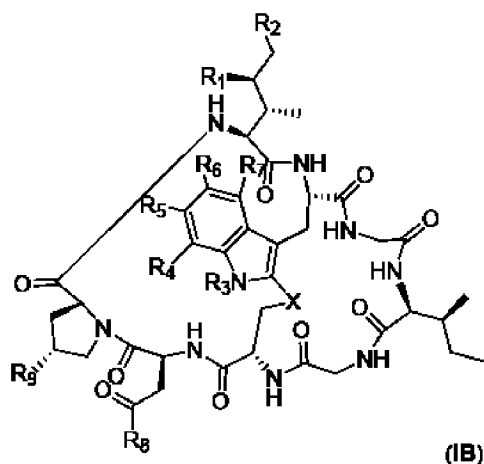
25 антигенсвязывающем фрагменте, которое связывает CD45;

причем A_m содержит ровно один заместитель R_c .

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



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



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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

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

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

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

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D ;

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

R_C представляет собой $-L-Z$;

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

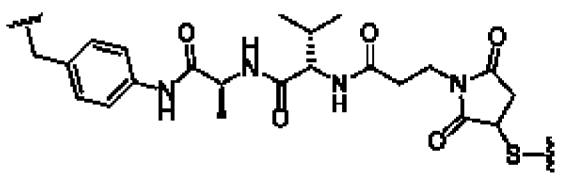
L представляет собой линкер, такой как необязательно замещенный алкилен (например, C_1 - C_6 алкилен), необязательно замещенный гетероалкилен (например, C_1 - C_6 гетероалкилен), необязательно замещенный алкенилен (например, C_2 - C_6 алкенилен), необязательно замещенный гетероалкенилен (например, C_2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

алкинилен), необязательно замещенный гетероалкинилен (например, C_2-C_6 гетероалкинилен), необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, $-(C=O)-$, дисульфид, гидразон или их комбинацию;

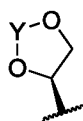
Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, которое связывает CD45;

причем Am содержит ровно один заместитель R_C .

В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



В некоторых вариантах осуществления R_A и R_B , если они присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми они связаны, объединены с образованием



5-членной гетероциклоалкильной группы формулы:

где Y представляет собой $-(C=O)-$, $-(C=S)-$, $-(C=NR_E)-$ или $-(CR_E R_E)-$; и

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

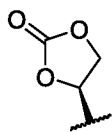
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

R_A и R_B , если они присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми

они связаны, объединены с образованием:



R_3 представляет собой H или R_C ;

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

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

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

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

R_8 представляет собой OH, NH_2 , OR_C или NHR_C ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

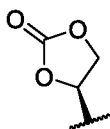
где R_C и R_D каждый является таким как определено выше.

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

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

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

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



R_3 представляет собой H или R_C ;

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

R_6 и R_7 каждый представляет собой H;

R_8 представляет собой OH, NH_2 , OR_C или NHR_C ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

25 где R_C является таким как определено выше.

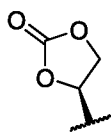
В некоторых вариантах осуществления Am-L-Z представлен формулой (IA) или формулой (IB),

где R_1 представляет собой H, OH или OR_A ;

R_2 представляет собой H, OH или OR_B ;

30 R_A и R_B , если они присутствуют, вместе с атомами кислорода, с которыми

они связаны, объединены с образованием:



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

R_5 представляет собой OR_C ;

5 R_8 представляет собой OH или NH_2 ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

где R_C является таким как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2016/0002298, раскрытие которой полностью включено в настоящее описание посредством

10 ссылки.

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

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

15 R_3 представляет собой R_C ;

R_4 , R_6 и R_7 каждый представляет собой H;

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

R_8 представляет собой OH или NH_2 ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

где R_C является таким как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0294865, раскрытие которой полностью включено в настоящее описание посредством

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

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

R_3 , R_6 и R_7 каждый представляет собой H;

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

30 R_8 представляет собой OH или NH_2 ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

где R_C является таким как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220,

раскрытие которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

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

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

R_3 , R_6 и R_7 каждый представляет собой H;

R_4 и R_5 каждый независимо представляет собой H или OH;

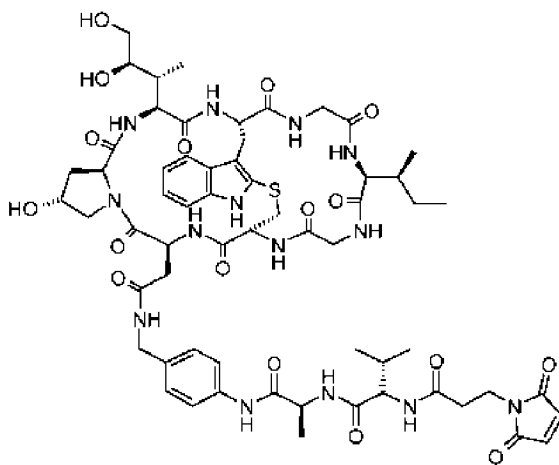
R_8 представляет собой OH, NH_2 , OR_C или NHR_C ;

R_9 представляет собой H или OH;

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

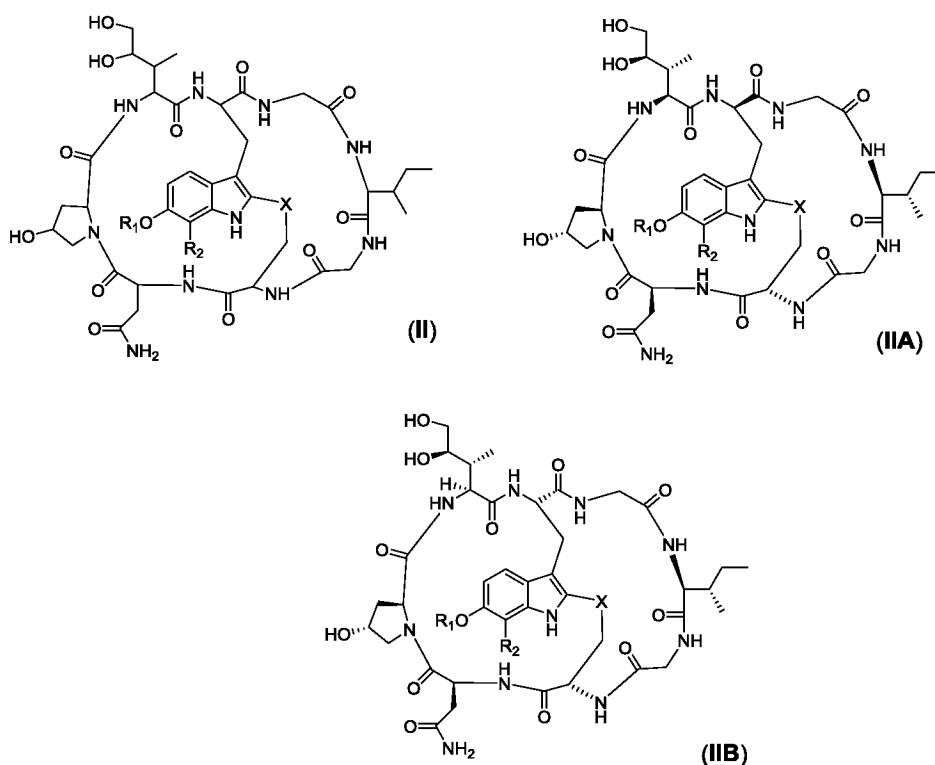
где R_C является таким как определено выше. Такие конъюгаты аматоксина описаны, например, в патентах США № 9233173 и 9399681, а также в патенте США 2016/0089450, описание каждого из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

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



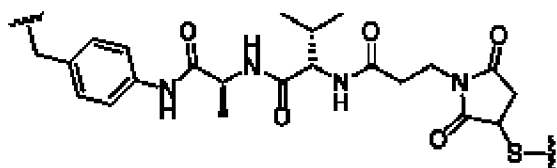
20 Дополнительные аматоксины, которые можно использовать для конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в WO 2016/142049; WO 2016/071856; WO 2017/149077; WO 2018/115466; и WO 2017/046658, описание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

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



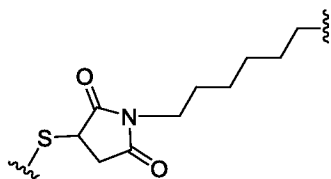
где X представляет собой S, SO или SO₂; R₁ представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством химического фрагмента Z, образованного в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и R₂ представляет собой H или линкер, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством химического фрагмента Z, образованного в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем Z', присутствующим на линкере, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; причем когда R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой линкер, и когда R₂ представляет собой H, R₁ представляет собой линкер.

В некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой линкер, а R₂ представляет собой H, а линкер и химический фрагмент вместе как L-Z представляют собой

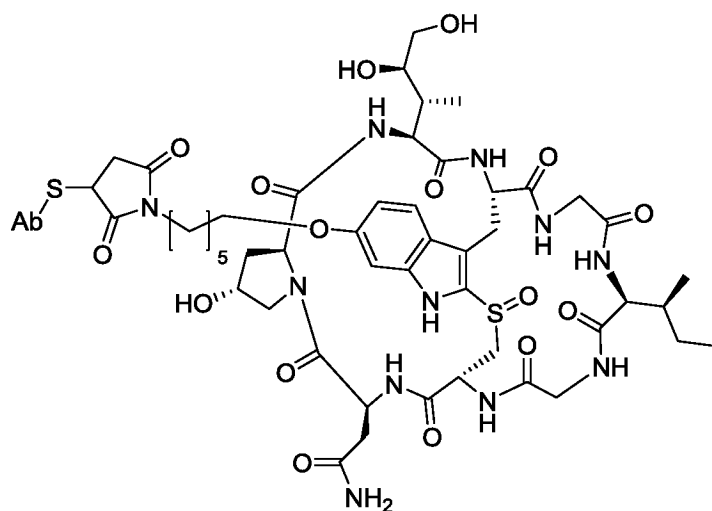


В некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой линкер, а R₂

представляет собой H, а линкер и химический фрагмент вместе как L-Z представляют собой

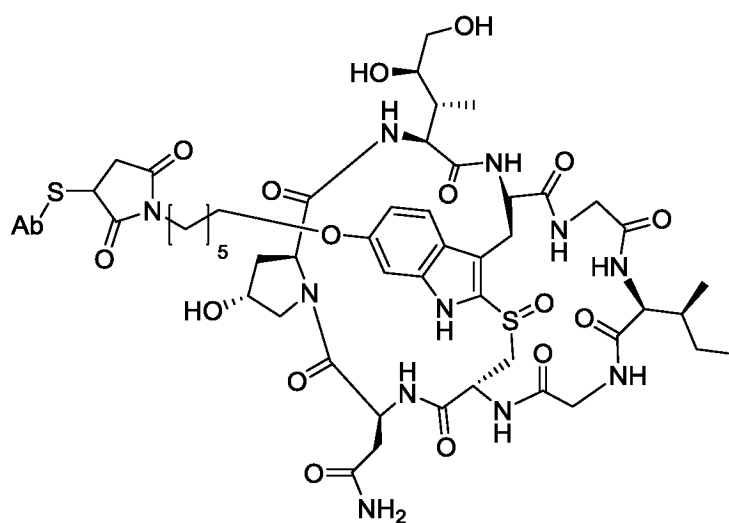


В одном варианте осуществления Am-L-Z-Ab представляет собой



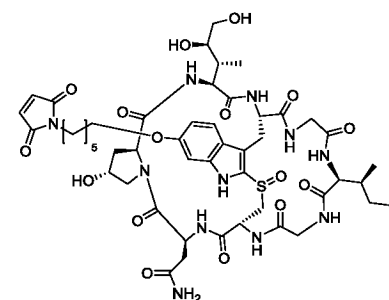
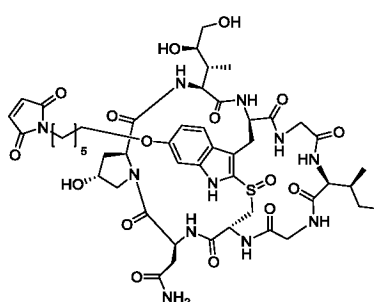
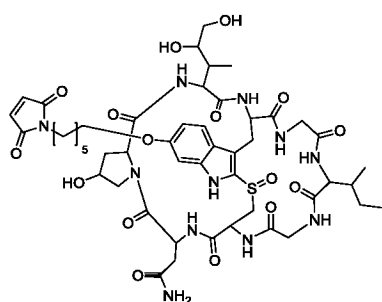
5

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



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

10



; при этом малеимид реагирует с тиоловой группой, обнаруживаемой на цистеине в антителе с образованием конъюгата Am-L-Z-Ab.

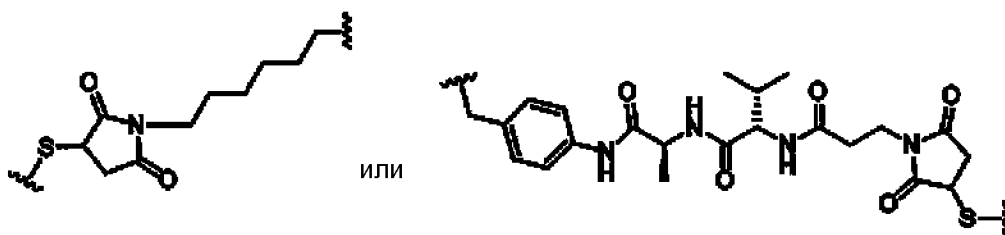
15 В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой α -аманитин. В некоторых вариантах осуществления α -аманитин присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления α -аманитин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть присоединен к α -аманитину формулы V в любом из нескольких возможных

20 положений (например, в любом из R^1 - R^9) для получения конъюгата α -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает

25 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

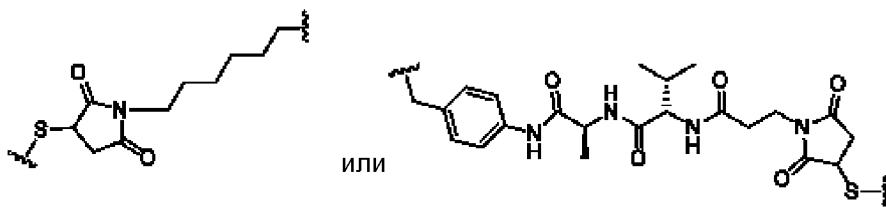
30 В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$.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

35 фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой β -аманитин. В некоторых вариантах осуществления β -аманитин присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления β -аманитин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть присоединен к β -аманитину формулы V в любом из нескольких возможных положений (например, в любом из R^1 - R^9) для получения конъюгата β -аманитин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

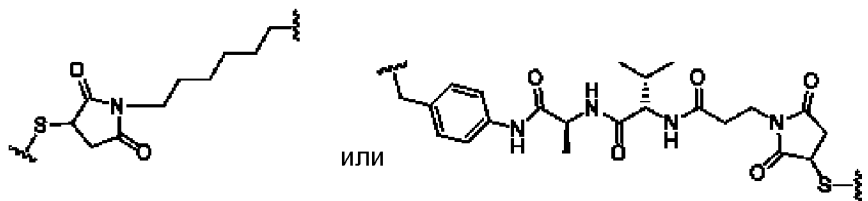
В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$.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



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой γ -аманитин. В некоторых вариантах осуществления γ -аманитин присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления

γ-аманитин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть
 присоединен к γ-аманитину формулы V в любом из нескольких возможных
 65 положений (например, в любом из R¹-R⁹) для получения конъюгата γ-аманитин-
 линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых
 вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и
 Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает
 70 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число
 от 1 до 6.

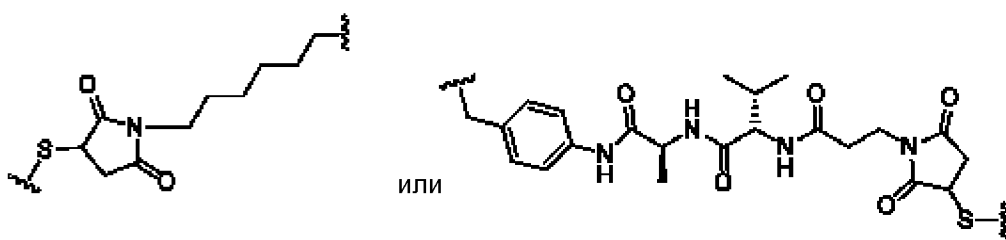
75 В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$,
 где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах
 осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В
 некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-$
 $((C=O)(CH_2)_n-$.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



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой
 ε-аманитин. В некоторых вариантах осуществления ε-аманитин присоединен к
 антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления
 85 ε-аманитин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть
 присоединен к ε-аманитину формулы V в любом из нескольких возможных
 положений (например, в любом из R¹-R⁹) для получения конъюгата ε-аманитин-
 линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых
 90 вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и
 Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает
 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления

линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления
 95 линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

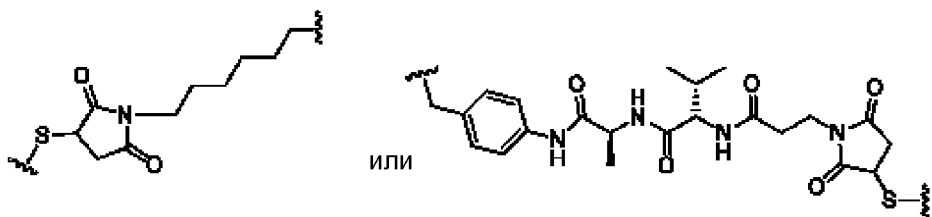
В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$,
 где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах
 осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В
 100 некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-$
 $((C=O)(CH_2)_n-$.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



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой
 105 аманин. В некоторых вариантах осуществления аманин присоединен к
 антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления
 аманин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть
 присоединен к аманину формулы V в любом из нескольких возможных
 положений (например, в любом из R^1-R^9) для получения конъюгата аманин-
 110 линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых
 вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и
 Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает
 парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления
 115 линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления
 линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число
 от 1 до 6.

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

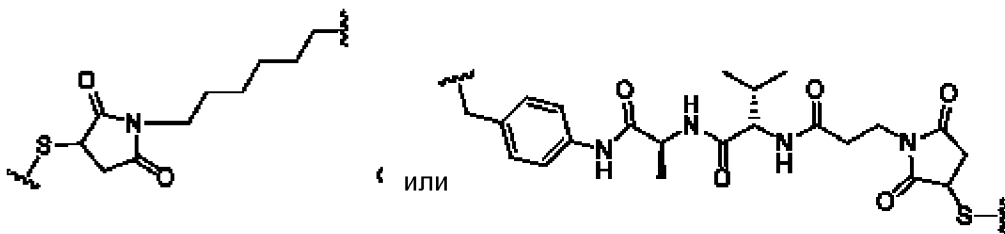
фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



125

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой аманинамид. В некоторых вариантах осуществления аманинамид присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления аманинамид представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть присоединен к аманинамиду формулы V в любом из нескольких возможных положений. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено –
 $(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

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



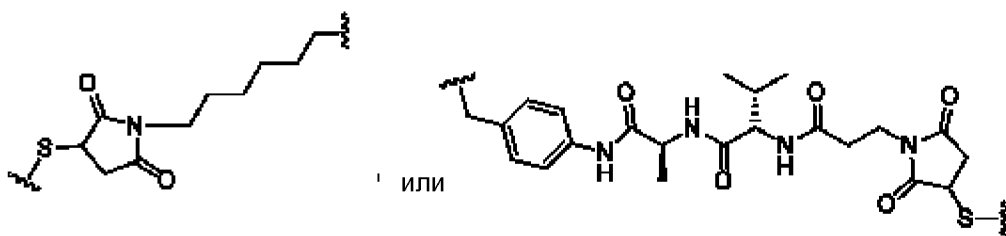
145

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой амануллин. В некоторых вариантах осуществления амануллин присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления амануллин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть

150

присоединен к амануллину формулы **V** в любом из нескольких возможных положений (например, в любом из R^1 - R^9) для получения конъюгата амануллин-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

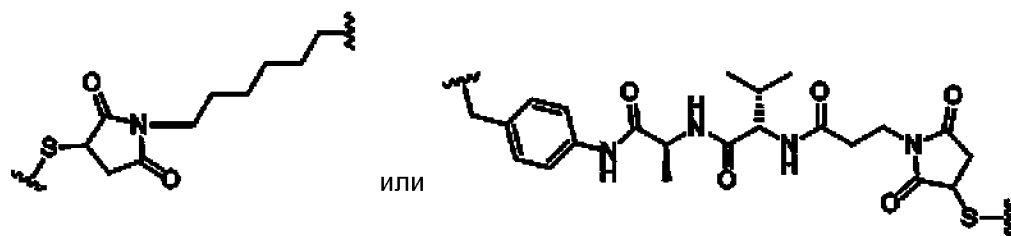
В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$.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



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой амануллиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота присоединена к антителу против CD45 через линкер **L**. В некоторых вариантах осуществления амануллиновая кислота представляет собой соединение формулы **V**. Линкер **L** может быть присоединен к амануллиновой кислоте формулы **V** в любом из нескольких возможных положений (например, в любом из R^1 - R^9) для получения конъюгата амануллиновая кислота-линкер формулы **I**, **IA**, **IB**, **II**, **IIA** или **IIB**. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиозфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер

включает парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

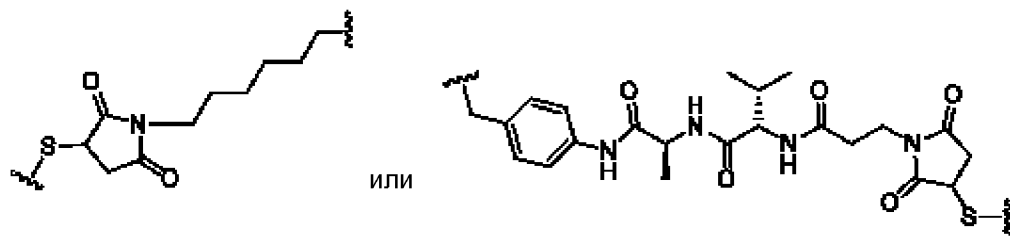
В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$.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



В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой проамануллин. В некоторых вариантах осуществления проамануллин присоединен к антителу против CD45 через линкер L. В некоторых вариантах осуществления проамануллин представляет собой соединение формулы V. Линкер L может быть присоединен к проамануллину формулы V в любом из нескольких возможных положений (например, в любом из R^1 - R^9) для получения конъюгата проамануллин-линкер формулы I, IA, IB, II, IIA или IIB. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления линкер включает парааминобензильную группу (PAB). В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Cit-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает фрагмент PAB-Ala-Val. В некоторых вариантах осуществления линкер включает звено $-(C=O)(CH_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 1 до 6.

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

осуществления линкер представляет собой $\text{--PAB-Cit-Val-(C=O)(CH}_2\text{)}_n\text{--}$. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $\text{--PAB-Ala-Val-(C=O)(CH}_2\text{)}_n\text{--}$. В некоторых вариантах осуществления линкер L и химический фрагмент Z, взятые вместе как L-Z, представляют собой



Синтетические способы получения аматоксинов описаны в патенте США № 9676702, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

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

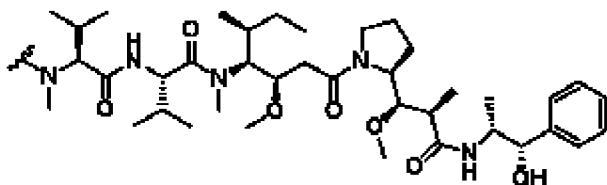
Ауристатины

Антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой ауристатин (патенты США № 5635483; 5780588). Ауристатины представляют собой антимитотические агенты, которые препятствуют динамике микротрубочек, гидролизу ГТФ, ядерному и клеточному делению (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковым действием (патент США № 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). (Патенты США № 5635483; 5780588). Фрагмент лекарственного средства

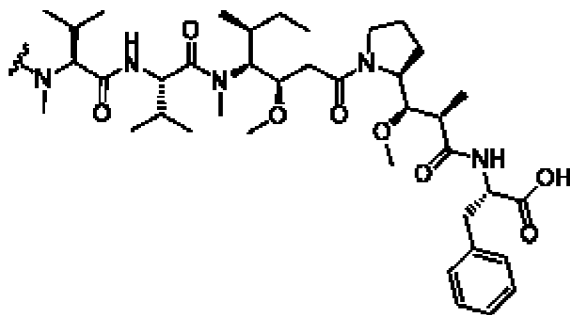
ауристатин может быть присоединен к антителу через N (амино) конец или C (карбоксильный) конец пептидного фрагмента лекарственного средства (WO 02/088172).

Типичные варианты осуществления ауристатина включают связанные с N-концом молекулы монометилауристатина DE и DF, раскрытые в Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленной 28 марта 2004 г., раскрытие которой непосредственно включено посредством ссылки во всей своей полноте.

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



Другим вариантом осуществления ауристатина является MMAF, где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру конъюгата антитело-линкер (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в настоящем документе), как раскрыто в патенте США 2005/0238649:



260

Ауристатины могут быть получены в соответствии со способами: патент США № 5635483; патент США № 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; и Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

Майтансиноиды

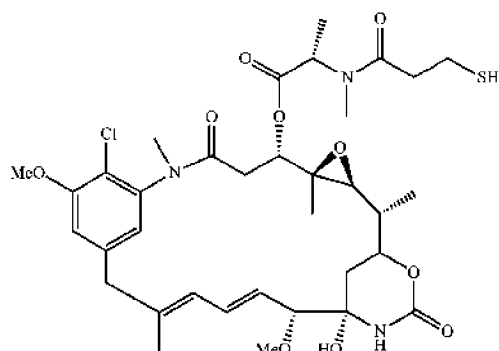
Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой агент, связывающий микротрубочки. В некоторых вариантах реализации агент, связывающий микротрубочки, представляет собой майтансин, майтансиноид или аналог майтансиноида. Майтансиноиды являются ингибиторами митоза, которые связывают микротрубочки и действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтансин был впервые выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Впоследствии было обнаружено, что некоторые микробы также продуцируют майтансиноиды, такие как майтансинол и сложные эфиры С-3 майтансинола (патент США № 4151042). Синтетический майтансинол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США № 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533. Фрагменты майтансиноидного лекарственного средства являются привлекательными фрагментами лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку они: (i) относительно доступны для получения путем ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов ферментации, (ii) поддаются дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации через недисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против различных линий опухолевых клеток.

Примеры подходящих майтансиноидов включают сложные эфиры майтансинола, синтетический майтансинол и аналоги и производные майтансинола. В настоящем документе включены любые цитотоксины, которые ингибируют образование микротрубочек и являются высокотоксичными для клеток млекопитающих, а также майтансиноиды, майтансинол и аналоги и производные майтансинола.

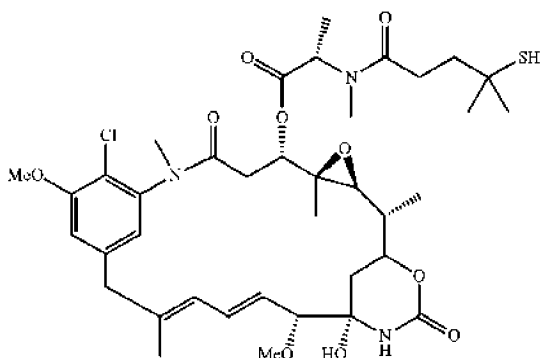
Примеры подходящих сложных эфиров майтансинола включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, и те, которые имеют модификации в других положениях. Такие подходящие майтансиноиды раскрыты в патентах США № 4137230; 4151042; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821;

4322348; 4331598; 4361650; 4362663; 4364866; 4424219 ;4450254; 4322348; 4362663; 4371533; 5208020; 5416064; 5475092; 5585499; 5846545; 6333410; 7276497 и 747379, описание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку оно относится к майтансиноидам и их производным.

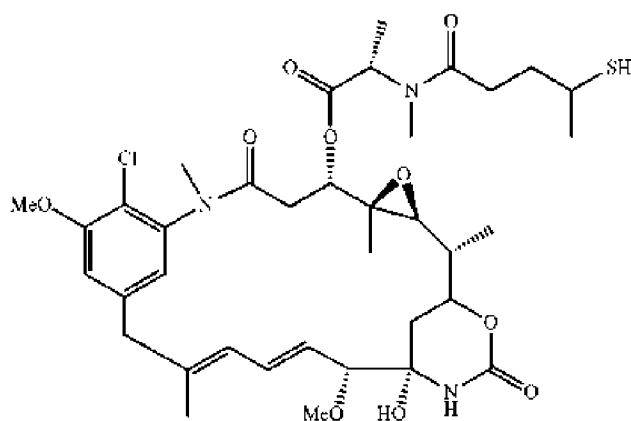
В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению используют тиолсодержащий майтансиноид (DM1), формально называемый N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтансин, в качестве цитотоксического агента. DM1



В другом варианте осуществления в конъюгатах согласно настоящему изобретению используют тиолсодержащий майтансиноид N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин (например, DM4) в качестве цитотоксического агента. DM4 представлен следующей структурной формулой:



Другой майтансиноид, содержащий боковую цепь, которая содержит стерически затрудненную тиоловую связь, представляет собой N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин (обозначаемый DM3), представленный следующей структурной формулой:



Каждый из майтансиноидов, описанный в патенте США № 5208020 и
 325 7276497 также могут быть использованы в конъюгатах согласно настоящему
 изобретению. В этом отношении полное раскрытие 5208020 и 7276697 включено в
 настоящий документ в качестве ссылки.

Многие положения майтансиноидов могут служить в качестве положений
 для ковалентного связывания линкерного фрагмента и, следовательно, антител
 330 или их антигенсвязывающих фрагментов (-L-Z-Ab или -L-Z', как описано в
 настоящем документе). Например, ожидается, что подходящим будут положение
 C-3, имеющее гидроксильную группу, положение C-14, модифицированное
 гидроксиметилом, положение C-15, модифицированное посредством гидрокси, и
 положение C-20, имеющее гидроксильную группу. В некоторых вариантах
 335 осуществления положение C-3 служит в качестве положения для ковалентного
 связывания линкерного фрагмента, а в некоторых конкретных вариантах
 осуществления положение C-3 майтансинола служит в качестве положения для
 ковалентного связывания линкерного фрагмента. В данной области техники
 известно множество линкерных групп для получения конъюгатов антитело-
 340 майтансиноид, включая, например, группы, раскрытые в патентах США №
 5208020, 6441163 и патенте EP № 0425235 B1; Chari et al., Cancer Research
 52:127-131 (1992); и патенте США 2005/0169933 A1, раскрытие которых
 настоящим включено посредством ссылки. Дополнительные связывающие группы
 описаны и приведены в качестве примеров в настоящем документе.

345 Настоящее изобретение также включает различные изомеры и смеси
 майтансиноидов и конъюгатов. Некоторые соединения и конъюгаты согласно
 настоящему изобретению могут существовать в различных стереоизомерных,

энантиомерных и диастереомерных формах. Несколько описаний получения таких конъюгатов антитело-майтансиноид представлены в патентах США № 5208020; 5416064; 6333410; 6441163; 6716821 и 7368565, каждый из которых полностью включен в настоящий документ.

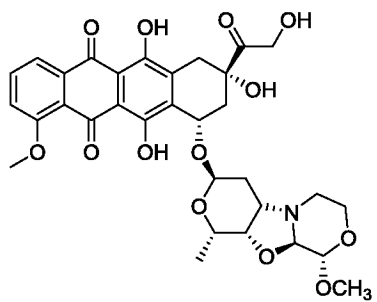
Антрациклины

В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой молекулу антрациклина. Антрациклины представляют собой антибиотические соединения, обладающие цитотоксической активностью. Исследования показали, что антрациклины могут уничтожать клетки с помощью ряда различных механизмов, включая: 1) интеркаляцию молекул лекарственного средства в ДНК клетки, тем самым ингибируя ДНК-зависимый синтез нуклеиновых кислот; 2) продукцию лекарственным средством свободных радикалов, которые затем реагируют с клеточными макромолекулами, вызывая повреждение клеток, или 3) взаимодействие молекул лекарственного средства с клеточной мембраной [см., например, C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. at pp.97-102]. Вследствие их цитотоксического потенциала антрациклины использовали при лечении многих видов рака, таких как лейкемия, карцинома молочной железы, карцинома легких, аденокарцинома яичников и саркомы [см., например, P.H- Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11]. Обычно используемые антрациклины включают доксорубицин, эпирубицин, идарубицин и дауномицин. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой антрациклин, выбранный из группы, состоящей из даунорубицина, доксорубицина, эпирубицина и идарубицина. Репрезентативные примеры антрациклинов включают, помимо прочего, даунорубицин (Cerubidine; Bedford Laboratories), доксорубицин (Adriamycin; Bedford Laboratories, также известный как доксорубицина гидрохлорид, гидроксидаунорубицин и Rubex), эпирубицин (Ellence; Pfizer) и идарубицин (Idamycin; Pfizer Inc.)

Считается, что аналог антрациклина, доксорубицин (ADRIAMYCIN), взаимодействует с ДНК путем интеркаляции и ингибирования развития фермента

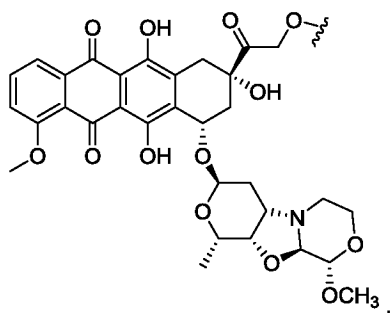
топоизомеразы II, который раскручивает ДНК для транскрипции. Доксорубин стабилизирует комплекс топоизомеразы II после того, как он разорвал цепь ДНК для репликации, предотвращая повторное запечатывание двойной спирали ДНК и тем самым останавливая процесс репликации. Доксорубин и даунорубин (DAUNOMYCIN) являются прототипами цитотоксических природных продуктов антрациклиновых химиотерапевтических средств (Sessa et al., (2007) Cardiovasc. Toxicol. 7:75-79).

Одним неограничивающим примером подходящего антрациклина для применения в настоящем документе является PNU-159682 ("PNU"). PNU проявляет более чем 3000-кратную цитотоксичность по сравнению с исходным неморубицином (Sessa et al., (2007) Cardiovasc. Toxicol. 7:75-79). PNU представлен структурной формулой:



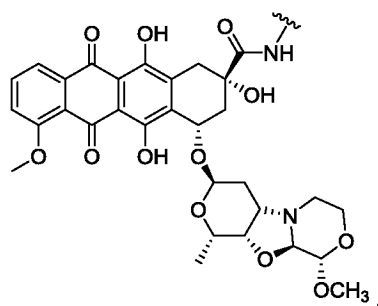
Многие положения на антрациклинах, таких как PNU, могут служить положением для ковалентного связывания связывающего фрагмента и, следовательно, антител против CD45 или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе. Например, линкеры могут быть введены путем модификации боковой цепи гидроксиметилкетона.

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



где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

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



где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к
410 линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

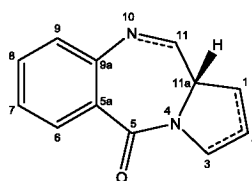
Бензодиазепины

В других вариантах осуществления антитела против CD45 или их
415 антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, содержащим бензодиазепиновый фрагмент, таким как PBD или IGN, как описано в настоящем документе.

Пирролобензодиазепины (PBD)

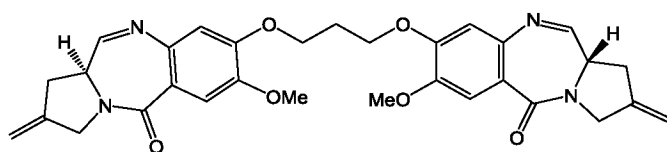
420 В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD45, как описано в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой пирролобензодиазепин («PBD») или цитотоксин, содержащий PBD. PBD представляют собой природные продукты, продуцируемые некоторыми
425 актиномицетами, и было показано, что они представляют собой соединения, селективно алкилирующие ДНК. Цитотоксины PBD включают, но не ограничиваются ими, антрамицин, димерные PBD и те, которые раскрыты, например, в Hartley, JA (2011). "The development of pyrrolobenzodiazepines as
antitumor agents" Expert Opin. Inv. Drug, 20(6), 733-744; и Antonow, D. and Thurston, D.E. (2011) "Synthesis of DNA-interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs)".
430 Chem. Rev. 111: 2815–2864.

PBD имеют общую структуру:



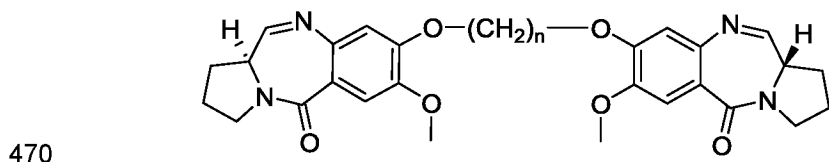
Они различаются количеством, типом и положением заместителей как в
 435 ароматических («А») кольцах, так и в пирроло («С») кольцах, а также по степени
 насыщения кольца С. В В-кольце диазепина имеется либо имин (N=C), либо
 карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe))
 в положении N10-C11. Это положение является электрофильным фрагментом,
 ответственным за алкилирование ДНК. Все известные PBD природного продукта
 440 имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что обеспечивает им
 правосторонний поворот, если смотреть от кольца С к кольцу А. Это обеспечивает
 подходящую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой ДНК В-
 формы, что приводит к плотному прилеганию в месте связывания (Kohn, In
Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-
 445 VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)). Способность PBD
 образовывать аддукты в малой бороздке позволяет им вмешиваться в процессинг
 ДНК, что приводит к противоопухолевой активности.

Ранее было раскрыто, что биологическая активность этих молекул может
 быть потенцирована путем соединения двух звеньев PBD вместе посредством их
 450 С8-гидроксильных функциональных групп через гибкий алкиленовый линкер
 ((Bose, D. S., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D. E., et al.,
J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996)). Считается, что димеры PBD образуют
 повреждения ДНК, селективные по последовательности, такие как палиндромная
 межцепочечная поперечная связь 5'-Pu-GATC-Py-3' (Smellie, M., et al.,
 455 *Biochemistry*, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., *Biochemistry*, 44, 4135-4147),
 которая, как считается, в основном отвечает за их биологическую активность.
 Предпочтительное димерное соединение пирролобензодиазеина было описано в
 Gregson et al. (*Chem. Commun.* 1999, 797-798; "compound 1", и в Gregson et al. (*J.*
Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174; "compound 4a"). Это соединение, также известное
 460 как SG2000, имеет структурную формулу:



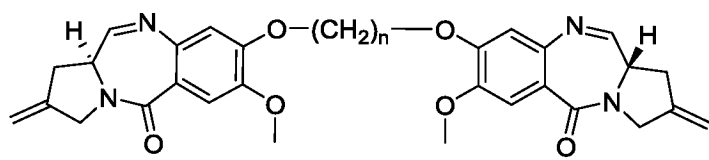
Как правило, модификации пирролидин-алкенового фрагмента обеспечивают «ручку», с помощью которой можно ковалентно связать линкерный фрагмент и, следовательно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (-L-Z' и -L-Z-Ab, соответственно, как описано в настоящем документе). В качестве альтернативы линкер может быть присоединен в положении N10.

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



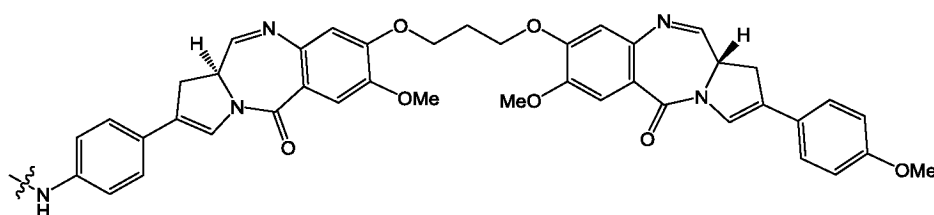
где n представляет собой целое число от 2 до 5. Соединение данной формулы, где n равно 3, известно как DSB-120 (Bose et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4939-4941).

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



где n представляет собой целое число от 2 до 5. Соединение данной формулы, где n равно 3, известно как SJG-136 (Gregson et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 737 – 748). Соединение данной формулы, где n равно 5, известно как DRG-16 (Gregson et al., Med. Chem. 2004;47:1161–1174).

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

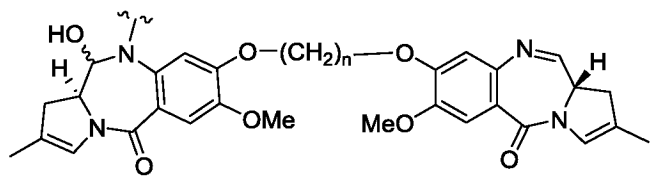


485

где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе. ADC на основе данного PBD раскрыты, например, в Sutherland et al., Blood 2013 122:1455-1463, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

490

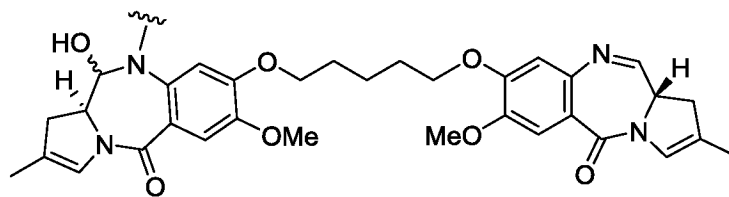
В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер PBD, представленный структурной формулой:



где n равно 3 или 5, и где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

495

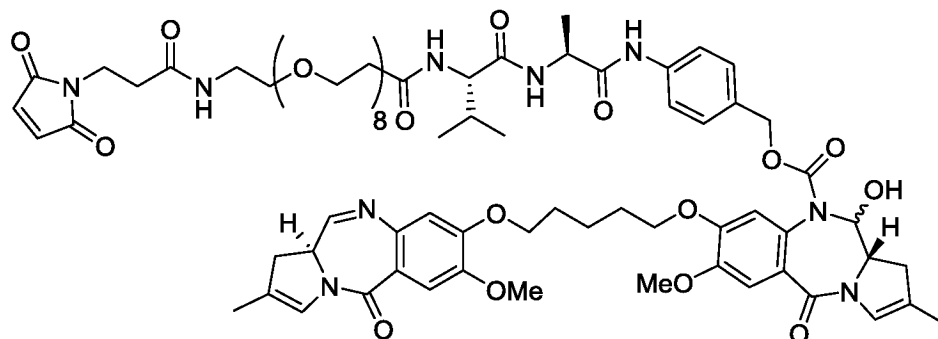
В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой димер PBD, представленный структурной формулой:



где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру ADC, как описано в настоящем документе.

500

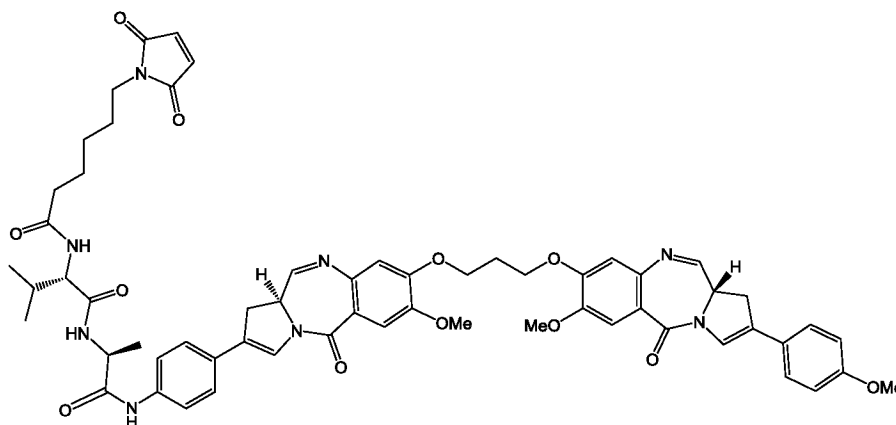
В конкретном варианте осуществления цитотоксин может представлять собой димер PBD, который, взятый вместе с линкером и реакционноспособным фрагментом Z', каждый из которых описан в настоящем документе, может быть представлен структурой:



505

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

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



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

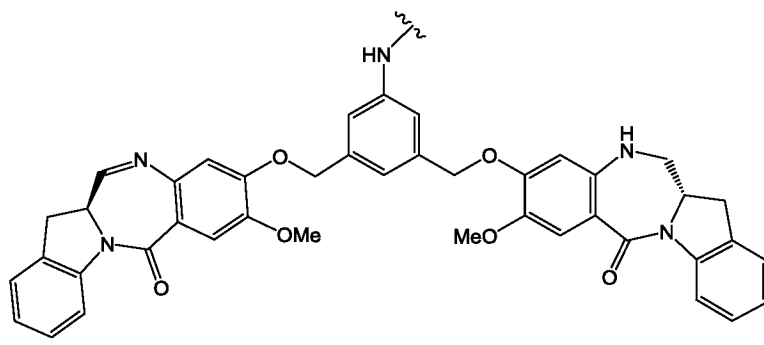
Индолинобензодиазепины (IGN)

520 В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD45, как описано в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой индолинобензодиазепин («IGN») или цитотоксин, содержащий IGN. В некоторых вариантах осуществления цитотоксин IGN
525 представляет собой димер индолинобензодиазепина или псевдодимер индолинобензодиазепина.

Индолинобензодиазепиновые димеры представляют собой относительно новый химический класс цитотоксинов с высокой активностью *in vitro* (значения IC₅₀ в диапазоне низких рМ) по отношению к раковым клеткам. Подобно димеру
530 PBD SJG-136, димеры IGN связываются с малой бороздкой ДНК и ковалентно связываются с остатками гуанина через две иминовые функциональные группы в димере, что приводит к поперечному сшиванию ДНК. Димер IGN (IGN 6; замена

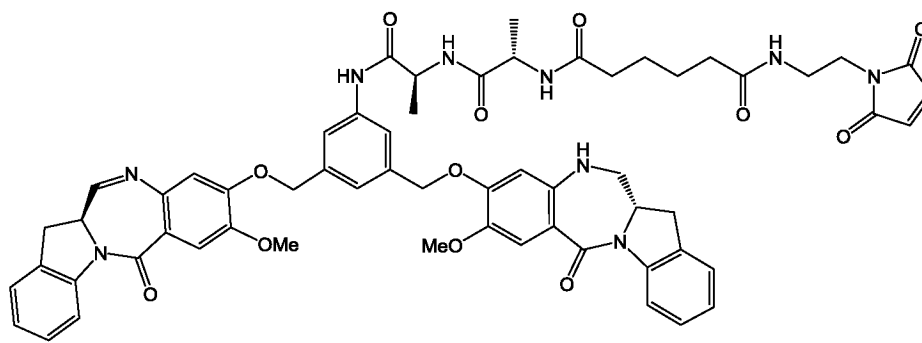
метиленовых групп фрагмента PBD фенильными кольцами) продемонстрировал в 10 раз более высокую активность *in vitro* по сравнению с SJG-136, возможно, из-за более высокой скорости образования аддукта с ДНК IGN (см., например, Miller et al., "A New Class of Antibody-Drug Conjugates with Potent DNA Alkylating Activity" Mol. Cancer Ther. 2016, 15(8), 1870-1878). Напротив, псевдодимеры IGN содержат один реакционноспособный индолинобензодиазепинимин; второй индолинобензодиазепин в димерном цитотоксине присутствует в восстановленной (аминной) форме. Соответственно, псевдодимеры IGN алкилируют ДНК за счет единственного иминового фрагмента, присутствующего в димере, и не сшивают ДНК.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой псевдодимер IGN, имеющий структуру формулы:



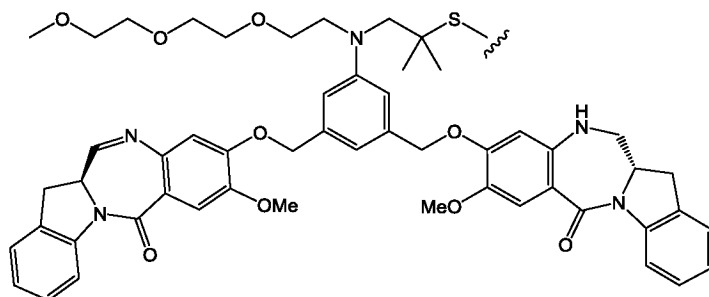
где волнистая линия обозначает точку присоединения линкера.

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



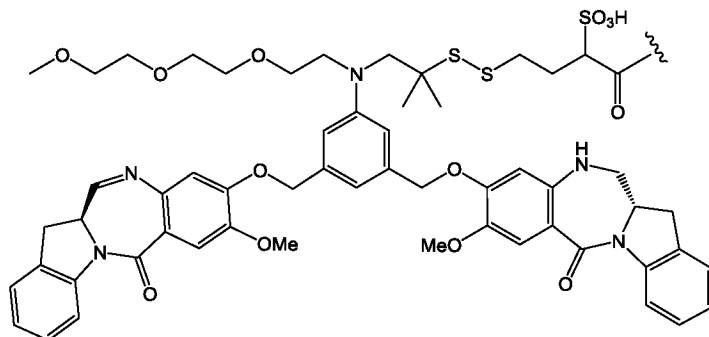
Этот конъюгат цитотоксин-линкер упоминается в настоящем документе как DGN549 и присутствует в ADC IMGN632, оба из которых раскрыты, например, в публикации международной патентной заявки № WO2017004026, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

555 В некоторых вариантах осуществления цитотоксин представляет собой псевдодимер индолинобензодиазепина, имеющий структуру формулы:



560 где волнистая линия обозначает точку присоединения линкера. Этот псевдодимерный цитотоксин IGN упоминается в настоящем документе как DGN462, раскрытый, например, в публикации заявки на патент США № 20170080102, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат цитотоксин-линкер до конъюгации с антителом и включающий химический фрагмент Z, вместе взятые
565 как Cy-L-Z, имеет структуру:



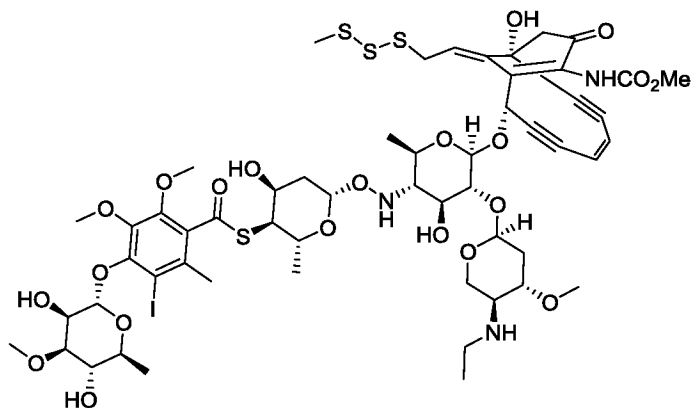
где волнистая линия обозначает точку присоединения к антителу (например, к антителу против CD45 или его фрагменту). Этот конъюгат
570 цитотоксин-линкер присутствует в ADC IMGN779, раскрытом, например, в публикации заявки на патент США № 20170080102, ранее включенной в настоящее описание посредством ссылки.

Калихимицин

575 В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с цитотоксином, который представляет собой ендиновый противоопухолевый

антибиотик (например, калихимицины, озогамицин). Семейство антибиотиков калихимицина способно вызывать разрывы двухцепочечной ДНК в субпикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов семейства калихимицинов см. патенты США № 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701; 5770710; 5773001; и 5877296 (все от компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихимицина, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, те, которые раскрыты, например, в Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998), и вышеупомянутые патенты США от American Cyanamid.

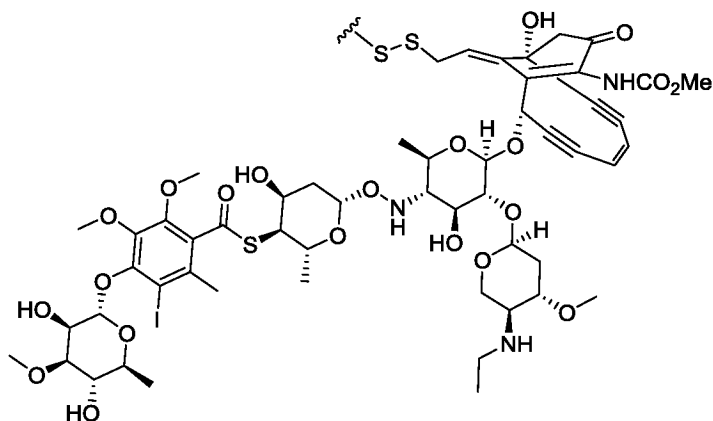
Пример калихимицина обозначен как γ_1 , который в настоящем документе упоминается просто как гамма, и имеет структурную формулу:



В некоторых вариантах осуществления калихимицин представляет собой производное гамма-калихимицина или производное N-ацетил-гамма-калихимицина. Структурные аналоги калихимицина, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, те, которые раскрыты, например, в Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998), и вышеупомянутые патенты США. Калихимицины содержат метилтрисульфидный фрагмент, который может реагировать с соответствующими тиолами с образованием дисульфидов, в то же время вводя функциональную группу, которая подходит для присоединения производного калихимицина к антителу против CD45 или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в настоящем документе, через линкер. Для получения конъюгатов семейства калихимицинов см. патенты США № 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701; 5770710; 5773001; и 5877296 (все от компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихимицина, которые могут быть

использованы, включают, но не ограничиваются ими, те, которые раскрыты, например, в Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998), и вышеупомянутые патенты США от American Cyanamid.

В одном варианте осуществления цитотоксин ADC, как раскрыто в настоящем документе, представляет собой дисульфидное производное калихимицина, представленное формулой:



где волнистая линия обозначает точку присоединения линкера.

Белки, инактивирующие рибосомы (RIP)

В некоторых вариантах осуществления цитотоксин, конъюгированный с антителом против CD45 или его фрагментом, описанным в настоящем документе, представляет собой белок, инактивирующий рибосомы (RIP). Белки, инактивирующие рибосомы, представляют собой ингибиторы синтеза белка, которые действуют на рибосомы, как правило, необратимо. RIP встречаются в растениях, а также в бактериях. Примеры RIP включают, но не ограничиваются ими, сапорин, рицин, абрин, гелонин, экзотоксин *Pseudomonas* (или экзотоксин A), трихосантин, люффин, агглютинин и дифтерийный токсин.

Другим примером RIP, который можно использовать в конъюгатах антител против CD45 и способами, раскрытых в настоящем документе, является шига-токсин (Stx) или шигаподобные токсины (SLT). Шига-токсин (Stx) представляет собой сильнодействующий бактериальный токсин, обнаруженный в *Shigella dysenteriae* 1 и в некоторых серогруппах (включая серотипы O157:H7 и O104:H4) *Escherichia coli* (называемый Stx1 в *E. coli*). В дополнение к Stx1 некоторые штаммы *E. coli* продуцируют второй тип Stx (Stx2), который обладает тем же механизмом действия, что и Stx/Stx1, но отличается по антигенам. SLT

представляет собой исторический термин для аналогичных или идентичных токсинов, продуцируемых *Escherichia coli*. Поскольку были идентифицированы подтипы каждого токсина, токсин-прототип для каждой группы теперь обозначают как Stx1a или Stx2a. Stx1a и Stx2a проявляют различия в цитотоксичности по отношению к различным типам клеток, по-разному связываются с аналогами или миметиками рецепторов, индуцируют дифференциальные ответы хемокинов и имеют несколько отличительных структурных характеристик.

Член семейства шига-токсинов относится к любому члену семейства встречающихся в природе белковых токсинов, которые являются структурно и функционально родственными, в частности, токсины, выделенные из *S. dysenteriae* и *E. coli* (Johannes L, Romer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Например, семейство шига-токсинов включает истинный шига-токсин (Stx), выделенный из *S. dysenteriae* серотипа 1, варианты шигаподобного токсина 1 (SLT1 или Stx1, или SLT-1, или Slт-I), выделенные из серотипов энтерогеморрагической *E. coli*, и варианты шигаподобного токсина 2 (SLT2 или Stx2 или SLT-2), выделенные из серотипов энтерогеморрагической *E. coli*. SLT1 отличается от Stx только одним остатком, и оба они называются вероцитотоксинами или веротоксинами (VT) (O'Brien A et al., Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Хотя варианты SLT1 и SLT2, как сообщается, лишь примерно на 53-60% похожи друг на друга на уровне аминокислотной последовательности, они имеют общие механизмы ферментативной активности и цитотоксичности, общие для представителей семейства шига-токсинов (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Члены семейства шига-токсинов обычно имеют две субъединицы; субъединицу А и субъединицу В. Субъединица В токсина связывается с компонентом клеточной мембраны, известным как гликолипид глоботриаозилцерамид (Gb3). Связывание субъединицы В с Gb3 вызывает индукцию впячиваний мембраны узких канальцев, что приводит к образованию канальцев внутренней мембраны для проникновения бактерий в клетку. Шига-токсин (не образующий поры токсин) переносится в цитозоль через аппарат Гольджи и ЭР. Из аппарата Гольджи токсин поступает в ЭР. Шига-токсины ингибируют синтез белка в клетках-мишенях по механизму, аналогичному механизму действия рицина (Sandvig and van Deurs (2000) *EMBO J* 19(220:5943). После проникновения в клетку субъединица А токсина расщепляет специфичное

адениновое основание из 28S PHK 60S субъединицы рибосомы, тем самым останавливая синтез белка (Donohue-Rolfe et al. (2010) *Reviews of Infectious Diseases* 13 Suppl. 4(7): S293-297).

Используемый в настоящем документе термин «токсин семейства шига-токсинов» относится к любому члену семейства шига-токсинов, встречающихся в природе белковых токсинов (например, токсинов, выделенных из *S. dysenteriae* и *E. coli*), которые являются структурно и функционально родственными. Например, семейство шига-токсинов включает истинный шига-токсин (Stx), выделенный из *S. dysenteriae* серотипа 1, варианты шигаподобного токсина 1 (SLT1 или Stx1, или SLT-1, или Slt-I), выделенные из серотипов энтерогеморрагической *E. coli*, и варианты шигаподобного токсина 2 (SLT2 или Stx2 или SLT-2), выделенные из серотипов энтерогеморрагической *E. coli*. Используемый в настоящем документе термин «субъединица А из токсина семейства шига-токсинов» или «субъединица А токсина семейства шига-токсинов» относится к субъединице А любого члена семейства шига-токсинов, включая шига-токсины или шигаподобные токсины.

В одном варианте осуществления ADC против CD45 содержит антитело против CD45, конъюгированное с субъединицей А токсина семейства шига-токсинов, или частью субъединицы А токсина семейства шига-токсинов, обладающей цитотоксической активностью, т.е. активностью, ингибирующей рибосомы. Цитотоксическая активность субъединицы А шига-токсина включает, например, инактивацию рибосом, ингибирование синтеза белка, активность N-гликозидазы, активность полинуклеотид аденозингликозидазы, активность РНКазы и активность ДНКазы. Неограничивающие примеры анализов эффекторной активности шига-токсина измеряют активность ингибирования синтеза белка, активность депуринизации, ингибирование роста клеток, цитотоксичность, активность релаксации суперскрученной ДНК и активность нуклеазы.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с субъединицей А токсина семейства шига-токсинов или его фрагментом, обладающим активностью, ингибирующей рибосомы. Примером субъединицы А токсина семейства шига-токсинов является субъединица А шигаподобного токсина 1 (SLT-1A), аминокислотная последовательность которой представлена ниже

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVR

700 GIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLS
 GDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFV
 TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHG
 QDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVR
 GITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS (SEQ ID NO:147).

705

Другим примером субъединицы А токсина семейства шига-токсинов является субъединица А шига-токсина (StxA), аминокислотная последовательность которой представлена ниже

710 KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVR
 GIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLS
 GDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFV
 TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHG
 QDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVR
 715 GITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS (SEQ ID NO:148).

Другим примером субъединицы А токсина семейства шига-токсинов является субъединица А шигаподобного токсина 2 (SLT-2A), аминокислотная последовательность которой представлена ниже

720

DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISQGGVSVSVINHLVGGNYISLNVRL
 GLDPYSERFNHLRLIMERNNLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHISVPDVITVSMTT
 DSSYSSLQRIADLERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFRGRSMTRASSRAMLRFVT
 VIAEALRFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTAQDVDLTNLWGRISNVLPYRGEEG
 725 VRIGRISFNLSAILGSVAVILNCHSTGSYSVRSVSQKQKTECQIVGDRAAIKVN
 NVLWEANTIAALLNRKPQDLTEPNQ (SEQ ID NO:149).

При определенных обстоятельствах встречающиеся в природе субъединицы А токсина семейства шига-токсинов могут содержать формы-предшественники, содержащие сигнальные последовательности примерно из 22 аминокислот на их amino-концах, которые удаляются с образованием зрелых субъединиц токсина А семейства шига-токсинов и распознаются специалистом в данной области техники. Цитотоксические фрагменты или укороченные версии

730

субъединицы А токсина семейства шига-токсинов также можно использовать в ADC и способах, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления субъектица А токсина семейства шига-токсинов отличается от природной субъектицы А шига-токсина не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более аминокислотных остатков (но не более того количества, при котором сохраняется по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности). В некоторых вариантах осуществления субъектица А токсина семейства шига-токсинов отличается от природной субъектицы А токсина семейства шига-токсинов не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более аминокислотных остатков (но не более того количества, при котором сохраняется по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности). Таким образом, полипептидная область, полученная из субъектицы А члена семейства шига-токсинов, может содержать добавления, делеции, укорочения или другие изменения исходной последовательности до тех пор, пока по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности с встречающейся в природе субъектицей А токсина семейства шига-токсинов сохраняется.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления субъектица А токсина семейства шига-токсинов содержит или по существу состоит из аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,7% общей идентичности последовательности с встречающейся в природе субъектицей А токсина семейства шига-токсинов, такой как SLT-1A (SEQ ID NO: 147), StxA (SEQ ID NO:148), и/или SLT-2A (SEQ ID NO:149).

Подходящие шига-токсины и RIP, подходящие в качестве цитотоксинов, раскрыты, например, в US20180057544, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD45, содержащий переменные области VH и VL, описанные в настоящем документе (или переменные области, содержащие наборы CDR легкой и тяжелой цепей, описанные в настоящем документе), конъюгируют с токсином с образованием scFv-токсин. Таким примером токсина является шига-токсин, как описано выше.

Дополнительные цитотоксины

770 В других вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие
фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с
цитотоксином, отличным от цитотоксинов, раскрытых в настоящем документе
выше, или в дополнение к ним. Дополнительные цитотоксины, подходящие для
775 применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе,
включают, без ограничения, 5-этинилурацил, абиратерон, ацилфульвен,
адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, алтретамин, амбамустин, амидокс,
амифостин, аминоклевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагелид,
анастрозол, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антареликс,
антидорсализирующий морфогенетический белок-1, антиандроген, рак
780 предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые
олигонуклеотиды, афидиколина глицинат, модуляторы гена апоптоза, регуляторы
апоптоза, апуриновую кислоту, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1,
аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатиридин, производные
баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины,
785 бензоилстауроспорин, производные бета-лактама, бета-алетин, бетакламицин В,
бетулиновую кислоту, ингибиторы bFGF, бикалутамид, бисантрен,
бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен А, бизелезин, бреллат, блеомицин
А2, блеомицин В2, бропиримин, будотитан, бутионин сульфоксимин,
кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина (например, 10-
790 гидроксикамптотецин), капецитабин, карбоксамидаминотриазол,
карбоксиамидотриазол, карзелезин, ингибиторы кazeинкиназы, кастаноспермин,
цекропин В, цетрореликс, хлорины, хлорхиноксалин сульфонамид, цикапрост, цис-
порфирин, кладрибин, кломифен и его аналоги, клотримазол, коллизмицин А,
коллизмицин В, комбретастатин А4, аналоги комбретастатина, конагенин,
795 крамбесцидин 816, кризатол, криптофицин 8, производные криптофицина А,
курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, цитарабин
оксфосфат, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин,
дегидродидемнин В, 2'-дезоксикоформицин (DCF), дезлорелин, дексифосфамид,
дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин,
800 дигидро-5-азацитидин, дигидротаксол, диоксамицин, дифенилспиромустин,
дискодермолид, докозанол, доласетрон, доксифлуридин, дролоксифен,

дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемен, эмитефур, эпотилоны, эпителины, эпристерид, эстрамустин и их аналоги, этопозид, этопозид 4'-фосфат (также называемый этопофос),
 805 экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезеластин, флуастерон, флударабин, фтордаунорубицина гидрохлорид, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, гадолиния тексафирин, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам, гомохаррингтонин (ГГТ),
 810 гиперин, ибандроновую кислоту, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, имидазоакридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, иобенгуан, йододоксориубин, ипомеанол, иринотекан, иропласт, ирсогладин, изобенгазол, ясплакинолид, кахалалид F, ламелларин-N триацетат, ланреотид, лейнамицин, ленограстим, лентинана сульфат, лептолстатин, летрозол,
 815 липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобаплатин, лометрексол, лонидамин, лосоксантрон, локсорибин, луртотекан, лютеция тексафирин, лизофиллин, масопротек, маспин, ингибиторы матриксной металлопротеиназы, меногарил, мербарон, метрелин, метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, мифепристон, милтефозин, миримостим, митрацин, митогуазон, митолактол,
 820 митомицин и его аналоги, митонафид, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, микапероксид B, мирапаторн, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновую кислоту, нилутамид, низамицин, нитруллин, октреотид, окиценон, онапристон, ондансетрон, орацин, ормаплатин,
 825 оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел и их аналоги, палауамин, пальмитоилпризоксин, памидроновую кислоту, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргазу, пельдезин, пентозан полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, феназиномицин, пицибанил, пирарубицин, пиритрексим, подофиллотоксин, порфирамицин, ингибиторы
 830 пуриннуклеозидфосфорилазы, ралтитрексид, ризоксин, роглетимид, рохитукин, рубигинон B1, рубоксил, сафингол, саинтопин, саркофитол A, сарграмостим, собузоксан, сонермин, спарфозиновую кислоту, спикамицин D, спиромустин, стипиамид, сульфинозин, таллимустин, тегафур, темозоломид, тенипозид, талибластин, тиокоралин, тирапазамин, топотекан, топсентин, трицирибин,
 835 триметрексам, верамин, винорелбин, винксалтин, ворозол, зениплатин и

зиласкорб, среди прочих.

Линкеры

Термин «линкер», используемый в настоящем документе, означает
840 двухвалентный химический фрагмент, содержащий ковалентную связь или цепь атомов, которые ковалентно присоединяют антитело против CD45 к цитотоксину с образованием конъюгата антитело против CD45-лекарственное средство (ADC), каждый из которых описан в настоящем документе. Подходящие линкеры имеют два реакционноспособных конца, один для конъюгации с антителом, а другой для
845 конъюгации с цитотоксином. Реакционноспособный конец линкера для конъюгации антитела (реакционноспособный фрагмент, Z') обычно представляет собой сайт, который способен к конъюгации с антителом через тиоловую группу цистеина или аминогруппу лизина на антителе, и поэтому обычно представляет собой тиол-реакционноспособную группу, такую как двойная связь (как в
850 малеимиде), или уходящую группу, такую как хлор, бром, йод или R-сульфанильная группа, или амино-реакционноспособную группу, такую как карбоксильная группа; в то время как реакционноспособный конец линкера для конъюгации антитела обычно представляет собой сайт, который способен к конъюгации с цитотоксином посредством образования амидной связи с основной
855 аминогруппой или карбоксильной группой на цитотоксине, поэтому обычно представляет собой карбоксильную или основную аминогруппу. Когда термин «линкер» используется для описания линкера в конъюгированной форме, один или оба реакционноспособных конца будут отсутствовать (например, реакционноспособный фрагмент Z', преобразованный в химический фрагмент Z)
860 или быть неполными (например, только карбонил карбоновой кислоты) вследствие образования связей между линкером и/или цитотоксином и между линкером и/или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Такие реакции конъюгации дополнительно описаны ниже.

Для конъюгации описанных антител или фрагментов антител с
865 цитотоксической молекулой можно использовать различные линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает единицу лекарственного средства из антитела во внутриклеточной среде. В других вариантах осуществления линкерная единица не расщепляется, и лекарственное средство высвобождается,

870 например, при деградации антитела. Линкеры, применимые для ADC согласно
настоящему изобретению, предпочтительно являются стабильными во
внеклеточной среде, предотвращают агрегацию молекул ADC и сохраняют ADC
легко растворимыми в водной среде и в мономерном состоянии. Перед
транспортировкой или доставкой в клетку ADC предпочтительно является
875 стабильным и остается интактным, то есть антитело остается связанным с
фрагментом лекарственного средства. Линкеры являются стабильными вне
клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри
клетки. Эффективный линкер будет: (i) поддерживать специфичные связывающие
свойства антитела; (ii) обеспечивать внутриклеточную доставку конъюгата или
880 фрагмента лекарственного средства; (iii) оставаться стабильным и интактным, т.е.
не расщепляться, до тех пор, пока конъюгат не будет доставлен или
транспортирован к месту-мишени; и (iv) поддерживать цитотоксический эффект,
эффект уничтожения клеток или цитостатический эффект цитотоксического
фрагмента. Стабильность ADC можно измерить стандартными аналитическими
885 методами, такими как масс-спектропия, ВЭЖХ и метод разделения/анализа
ЖХ/МС. Ковалентное присоединение антитела и лекарственного средства
требует, чтобы линкер имел две реакционноспособные функциональные группы,
т.е. бивалентность с точки зрения реакции. Известны бивалентные линкерные
реагенты, которые можно использовать для присоединения двух или более
890 функциональных или биологически активных компонентов, таких как пептиды,
нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и
репортерные группы, и способы описывают полученные их конъюгаты
(Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p.
234-242).

895 Подходящие расщепляемые линкеры включают те, которые можно
расщепить, например, ферментативным гидролизом, фотолизом, гидролизом в
кислых условиях, гидролизом в щелочных условиях, окислением, дисульфидным
восстановлением, нуклеофильным расщеплением или металлоорганическим
расщеплением (см., например, Leriche et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012),
900 раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки,
поскольку он относится к линкерам, пригодным для ковалентной конъюгации).
Подходящие расщепляемые линкеры могут включать, например, химические
фрагменты, такие как гидразин, дисульфид, тиоэфир или дипептид.

Линкеры, гидролизуемые в кислых условиях, включают, например, гидразоны, семикарбазоны, тиосемикарбазоны, цис-аконитамиды, ортоэфиры, ацетали, кетали и т.п. (См., например, патенты США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661, раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки, поскольку он относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0 приблизительноном pH лизосомы.

Линкеры, расщепляемые в восстанавливающих условиях, включают, например, дисульфид. В данной области техники известны различные дисульфидные линкеры, в том числе, например, такие, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуол), SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. см. также патент США № 4880935), раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации.

Линкеры, подверженные ферментативному гидролизу, могут представлять собой, например, пептидсодержащий линкер, расщепляемый внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая, но не ограничиваясь ими, лизосомальную или эндосомальную протеазу. Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического агента является то, что агент обычно аттенуирован при конъюгировании, а стабильность конъюгатов в сыворотке обычно высока. В некоторых вариантах осуществления длина пептидильного линкера составляет по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Примеры аминокислотных линкеров включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры подходящих пептидов включают те, которые содержат аминокислоты, такие как валин, аланин, цитруллин (Cit), фенилаланин, лизин, лейцин и глицин. Аминокислотные остатки, которые составляют аминокислотный линкерный

компонент, включают остатки, встречающиеся в природе, а также второстепенные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Примеры дипептидов включают валин-цитруллин (vc или val-cit) и аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примеры трипептидов включают глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, такой как Val-Cit, Ala-Val или Phe-Lys, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Arg или Trp-Cit. Линкеры, содержащие дипептиды, такие как Val-Cit или Phe-Lys, раскрыты, например, в патенте США № 6214345, раскрытие которого включено в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. В некоторых вариантах осуществления линкер включает дипептид, выбранный из Val-Ala и Val-Cit.

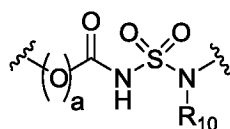
Линкеры, подходящие для конъюгации описанных в настоящем документе антител или фрагментов антител с цитотоксической молекулой, включают линкеры, способные высвобождать цитотоксин в процессе 1,6-отщепления. Химические фрагменты, способные к этому процессу отщепления, включают *p*-аминобензильную (PAB) группу, 6-малеимидогексановую кислоту, pH-чувствительные карбонаты и другие реагенты, как описано в Jain et al., Pharm. Res. 32:3526-3540, 2015, раскрытие которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентного связывания.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает «саморасщепляющуюся» группу, такую как вышеупомянутый PAB или PABC (пара-аминобензилоксикарбонил), которые раскрыты, например, в Carl et al., J. Med. Chem. (1981) 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; W098/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; W02004/032828). Другие подобные химические фрагменты, способные к этому процессу («саморасщепляющиеся линкеры»), включают метиленкарбаматы и гетероарильные группы, такие как аминотиазолы, аминоимидазолы, аминопиримидины и т.п. Линкеры, содержащие такие гетероциклические саморасщепляющиеся группы, раскрыты, например, в публикациях патентов США № 20160303254 и 20150079114 и в патенте США № 7754681; Hay et al. (1999)

Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237; US 2005/0256030; de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830; и US 7223837. В некоторых вариантах осуществления дипептид используют в комбинации с саморасщепляющимся линкером.

975 Линкеры, подходящие для использования в настоящем документе, дополнительно могут включать одну или более групп, выбранных из C₁-C₆ алкилена, C₁-C₆ гетероалкилена, C₂-C₆ алкенилена, C₂-C₆ гетероалкенилена, C₂-C₆ алкинилена, C₂-C₆ гетероалкинилена, C₃-C₆ циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена, гетероарилена и их комбинации, каждый из которых может быть
980 необязательно замещен. Неограничивающие примеры таких групп включают звенья (CH₂)_p, (CH₂CH₂O)_p и -(C=O)(CH₂)_p-, где p представляет собой целое число от 1 до 6, независимо выбранное для каждого случая.

Подходящие линкеры могут содержать группы, обладающие свойствами, повышающими растворимость. Линкеры, включающие звено (CH₂CH₂O)_p
985 (полиэтиленгликоль, ПЭГ), например, могут повышать растворимость, как и алкильные цепи, замещенные остатками амина, сульфоновой кислоты, фосфоновой кислоты или фосфорной кислоты. Линкеры, включающие такие фрагменты, раскрыты, например, в патентах США № 8236319 и 9504756, раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящее описание
990 посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации. Дополнительные группы, повышающие растворимость, включают, например, ацильные и карбамоилсульфамидные группы, имеющие структуру:



995

где a равно 0 или 1; и

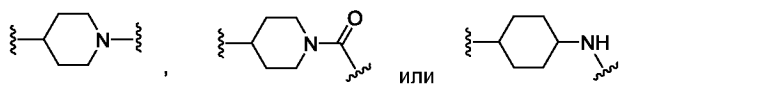
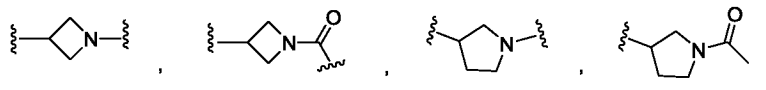
R¹⁰ выбран из группы, состоящей из водорода, C₁-C₂₄ алкильных групп, C₃-C₂₄ циклоалкильных групп, C₁-C₂₄ (гетеро)арильных групп, C₁-C₂₄ алкил(гетеро)арильных групп и C₁-C₂₄ (гетеро)арилалкильных групп, C₁-C₂₄
1000 алкильных групп, C₃-C₂₄ циклоалкильных групп, C₂-C₂₄ (гетеро)арильных групп, C₃-C₂₄ алкил(гетеро)арильных групп и C₃-C₂₄ (гетеро)арилалкильных групп, каждая из которых может быть необязательно замещена и/или необязательно прерывается

1005 одним или более гетероатомами, выбранными из O, S и $NR^{11}R^{12}$, где R^{11} и R^{12} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и C_1 - C_4 алкильных групп; или R^{10} представляет собой цитотоксин, при этом цитотоксин необязательно связан с N через спейсерный фрагмент. Линкеры, содержащие такие группы, описаны, например, в патенте США № 9636421 и публикации заявки на патент США № 2017/0298145, описания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, поскольку они относятся к линкерам, подходящим для ковалентной конъюгации с цитотоксинами и антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

1015 В некоторых вариантах осуществления линкер может включать один или более из гидразина, дисульфида, простого тиоэфира, дипептида, *p*-аминобензильной (PAB) группы, гетероциклической саморасщепляющейся группы, необязательно замещенного C_1 - C_6 алкила, необязательно замещенного C_1 - C_6 гетероалкила, необязательно замещенного C_2 - C_6 алкенила, необязательно замещенного C_2 - C_6 гетероалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_6 алкинила, необязательно замещенного C_2 - C_6 гетероалкинила, необязательно замещенного C_3 - C_6 циклоалкила, необязательно замещенного гетероциклоалкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероарила, группы, повышающей растворимость, ацила, группы $-(C=O)-$ или $-(CH_2CH_2O)_p-$, где p представляет собой целое число от 1 до 6. Специалисту в данной области техники будет понятно, что одна или более из перечисленных групп могут присутствовать в форме бивалентных (бирадикальных) видов, например, C_1 - C_6 алкилена и т.п.

В некоторых вариантах осуществления линкер L содержит фрагмент $^*-L_1L_2-^{**}$, где

1030 L_1 отсутствует или представляет собой $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)-$, $-(CH_2)_mNR^{13}-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$,

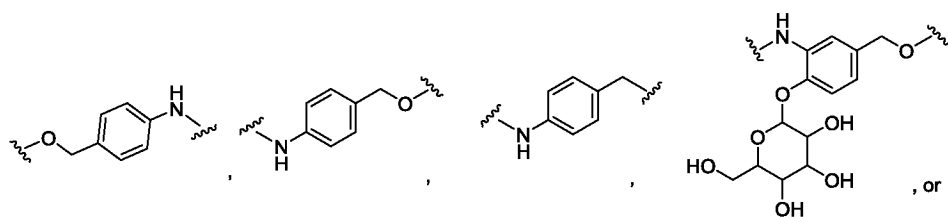


L_2 отсутствует или представляет собой $-(CH_2)_m-$, $-NR^{13}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_m-$, $-X_4$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)X_4$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)-$,

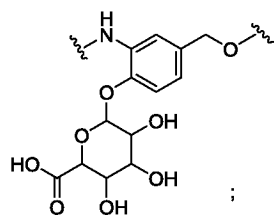
- $((CH_2)_mO)_n(CH_2)_{m-}$, $-((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-NR^{13}((CH_2)_mO)_nX_3(CH_2)_{m-}$, $-$
 1035 $NR^{13}((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-X_1X_2C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_n-$, $-$
 $(CH_2)_mNR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mNR^{13}(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-$
 1040 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_n-$, $-$
 $(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_mNR^{13}(CH_2)_mC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mNR^{13}C(=O)-$, $-(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nX_3(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mX_3((CH_2)_mO)_n(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)-$, $-$
 1045 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_n-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)-$, $-((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-$
 1050 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_mX_3-$, $-C(R^{13})_2(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mC(R^{13})_2NR^{13}-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mNR^{13}-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mNR^{13}C(=O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-$
 $C(R^{13})_2(CH_2)_mNR^{13}C(=O)(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mC(R^{13})_2NR^{13}-$, $-$
 $C(R^{13})_2(CH_2)_mX_3(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(R^{13})_2NR^{13}-$, $-$
 1055 $C(R^{13})_2(CH_2)_mOC(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mNR^{13}C(=O)O(CH_2)_mC(R^{13})_2NR^{13}-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mNR^{13}-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nNR^{13}-$, $-(CH_2)_mNR^{13}-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nNR^{13}-$, $-(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nNR^{13}-$, $-$
 $(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_m(OCH_2CH_2)_n-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mS(=O)_2-$, $-$
 $(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mS(=O)_2-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mS(=O)_2-$, $-(CH_2)_mX_2X_1C(=O)-$, $-$
 1060 $(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nX_2X_1C(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mX_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nX_2X_1C(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mNR^{13}C(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_mC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{13}(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)-$, $-$
 1065 $(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_mX_3(O(CH_2)_m)_nC(=O)-$, $-$
 $(CH_2)_mNR^{13}C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_{m-}$, $-(CH_2)_m(O(CH_2)_m)_nC(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$, $-$
 $(CH_2)_mNR^{13}C(=O)NR^{13}(CH_2)_{m-}$ или $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mNR^{13}C(=O)-$;

где

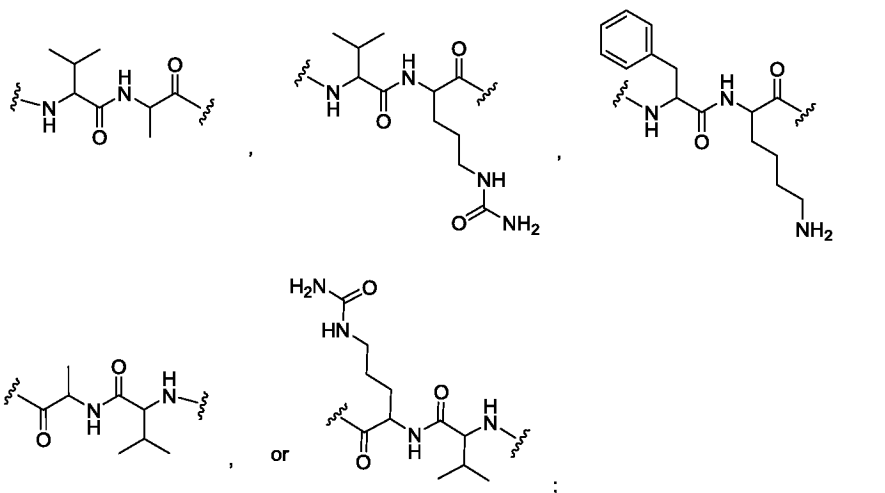
X_1 представляет собой



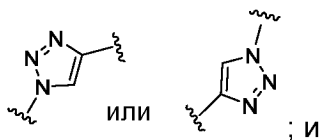
1070



X_2 представляет собой

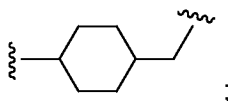


X_3 представляет собой



1075

X_4 представляет собой



где

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

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

1080 п независимо выбран для каждого случая из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14; и

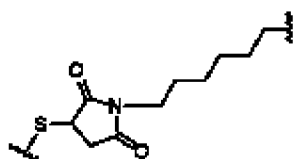
где одинарная звездочка (*) обозначает точку присоединения к цитотоксину (например, аматоксину), а двойная звездочка (**) обозначает точку присоединения к реакционноспособному заместителю Z' или химическому фрагменту Z, при
1085 условии, что L₁ и L₂ оба не отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает р-аминобензильную группу (PAB). В одном варианте осуществления р-аминобензильная группа расположена между цитотоксическим лекарственным средством и сайтом расщепления протеазой в линкере. В одном варианте
1090 осуществления р-аминобензильная группа является частью р-аминобензилоксикарбонильного звена. В одном варианте осуществления р-аминобензильная группа является частью р-аминобензиламидного звена.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB.
1095

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит комбинацию одного или более из пептида, олигосахарида, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_p-$, PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB.
1100

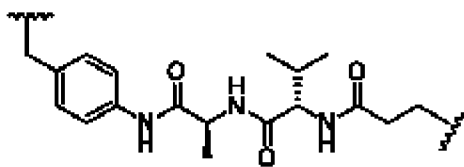
В некоторых вариантах осуществления линкер включает $-((CH_2)_n)$, где n равно 6. В некоторых вариантах осуществления L-Z представляет собой



где S представляет собой атом серы, который представляет собой
1105 реактивный заместитель, присутствующий в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте,

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

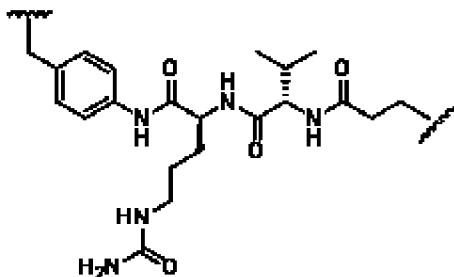
В одном конкретном варианте осуществления линкер содержит структуру



1110

где волнистые линии указывают на точки присоединения к цитотоксину и реакционноспособному фрагменту Z'.

В другом конкретном варианте осуществления линкер содержит структуру



1115

где волнистые линии указывают на точки присоединения к цитотоксину и реакционноспособному фрагменту Z'. Такие линкеры PAB-дипептид-пропионил описаны, например, в публикации патентной заявки № WO2017/149077, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, цитотоксины, раскрытые в WO 2017/149077, включены в настоящий документ посредством ссылки.

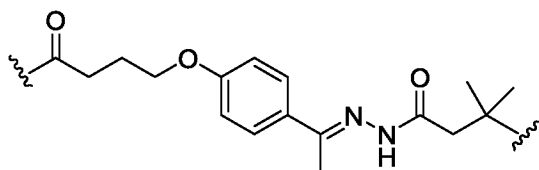
1120

В некоторых вариантах осуществления линкер ADC представляет собой малеимидокапроил-Val-Ala-пара-аминобензил (mc-Val-Ala-PAB).

В некоторых вариантах осуществления линкер ADC представляет собой малеимидокапроил-Val-Cit-пара-аминобензил (mc-vc-PAB).

1125

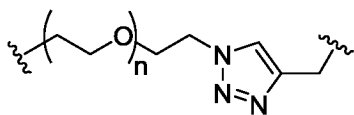
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит:



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

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит группу $((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, где n и m независимо выбраны из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; и гетероарильную группу, где гетероарильная группа представляет собой триазол. В некоторых вариантах осуществления группа $((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$ и триазол вместе содержат

1130



1135 где n равно от 1 до 10, а волнистые линии указывают на точки присоединения к дополнительным линкерным компонентам, химическому фрагменту Z или аматоксину. Другие линкеры, которые можно использовать в способах и композициях, описанных в настоящем документе, описаны в патенте США 2019/0144504, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

1140 Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что любая одна или более химических групп, фрагментов и признаков, раскрытых в настоящем документе, могут быть объединены множеством способов для образования линкеров, пригодных для конъюгации антител и цитотоксинов, как раскрыто в настоящем документе. Дополнительные линкеры, пригодные в
1145 сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2015/0218220, описание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления промежуточное соединение, которое является предшественником линкера, взаимодействует с частью
1150 лекарственного средства в соответствующих условиях. В некоторых вариантах осуществления в лекарственном средстве и/или промежуточном продукте или линкере используются реакционноспособные группы. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным продуктом или дериватизированное
1155 лекарственное средство затем подвергают взаимодействию с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствующих условиях. В качестве альтернативы линкер или промежуточное соединение можно сначала подвергнуть взаимодействию с антителом или дериватизированным антителом, а затем подвергнуть взаимодействию с лекарственным средством или
1160 дериватизированным лекарственным средством. Такие реакции конъюгации теперь будут описаны более полно.

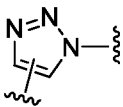
Доступен ряд различных реакций для ковалентного присоединения линкеров или конъюгатов лекарственное средство-линкер к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Подходящие точки присоединения к молекуле
1165 антитела включают аминокислоты лизина, свободные группы карбоновых кислот глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы

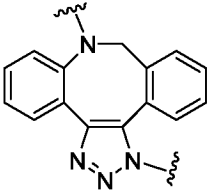
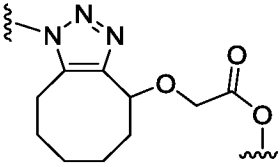
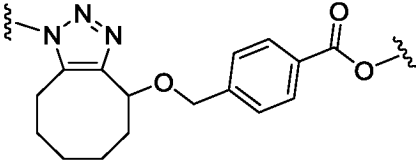
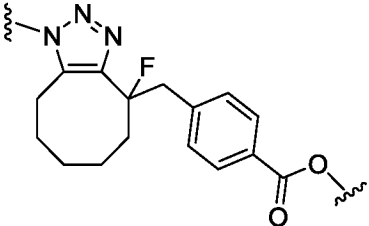
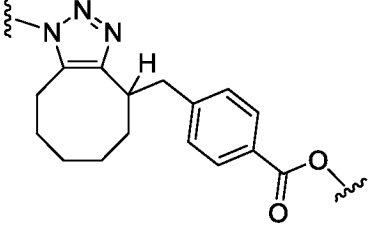
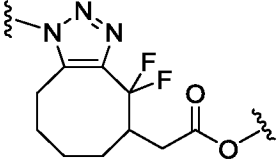
цистеина и различные фрагменты ароматических аминокислот. Например, неспецифичное ковалентное присоединение может быть осуществлено с использованием карбодиимидной реакции для присоединения карбоксильной (или амино) группы соединения к amino (или карбокси) группе фрагмента антитела. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидозфире, также могут быть использованы для связывания аминокруппы соединения с аминокруппой фрагмента антитела. Для присоединения лекарственных средств к связывающим агентам также доступна реакция Шиффа с основанием. Этот способ включает периодатное окисление лекарственного средства, содержащего гликоль или гидроксильные группы, с образованием альдегида, который затем вступает в реакцию со связующим агентом. Присоединение происходит через образование основания Шиффа с аминокруппами связывающего агента. Изотиоцианаты также можно использовать в качестве связывающих агентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим агентам. Другие способы известны специалистам в данной области техники и входят в объем настоящего изобретения.

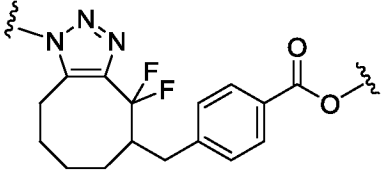
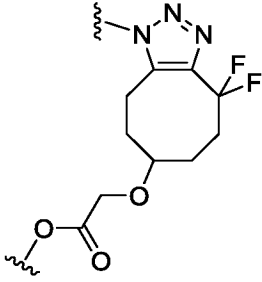
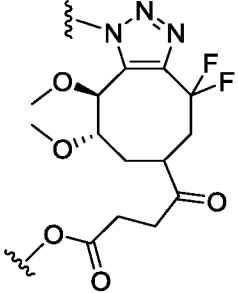
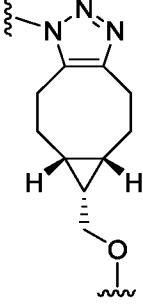
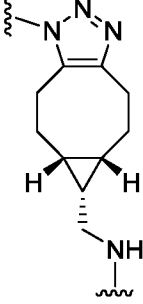
Линкеры, пригодные для конъюгации с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, как описано в настоящем документе, включают, без ограничения, линкеры, содержащие химические фрагменты Z, образованные реакциями сочетания, как показано в Таблице 1 ниже. Волнистые линии обозначают точки присоединения к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту и к цитотоксической молекуле соответственно.

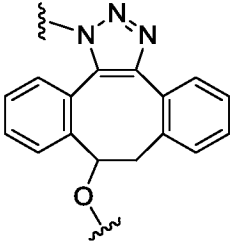
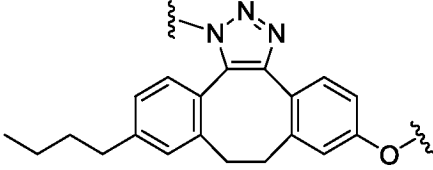
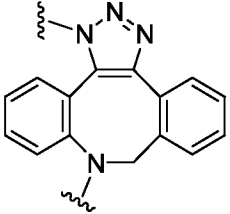
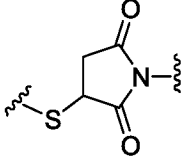
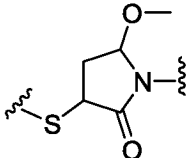
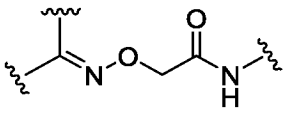
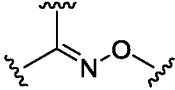
1190

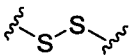
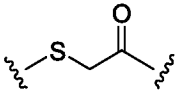
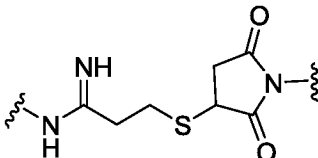
Таблица 1. Примеры химических фрагментов Z, образующихся в результате реакций сочетания при образовании конъюгатов антитело-лекарственное средство

Примеры реакций сочетания	Химический фрагмент Z, образованный реакциями сочетания
[3+2] Циклоприсоединение	

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

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

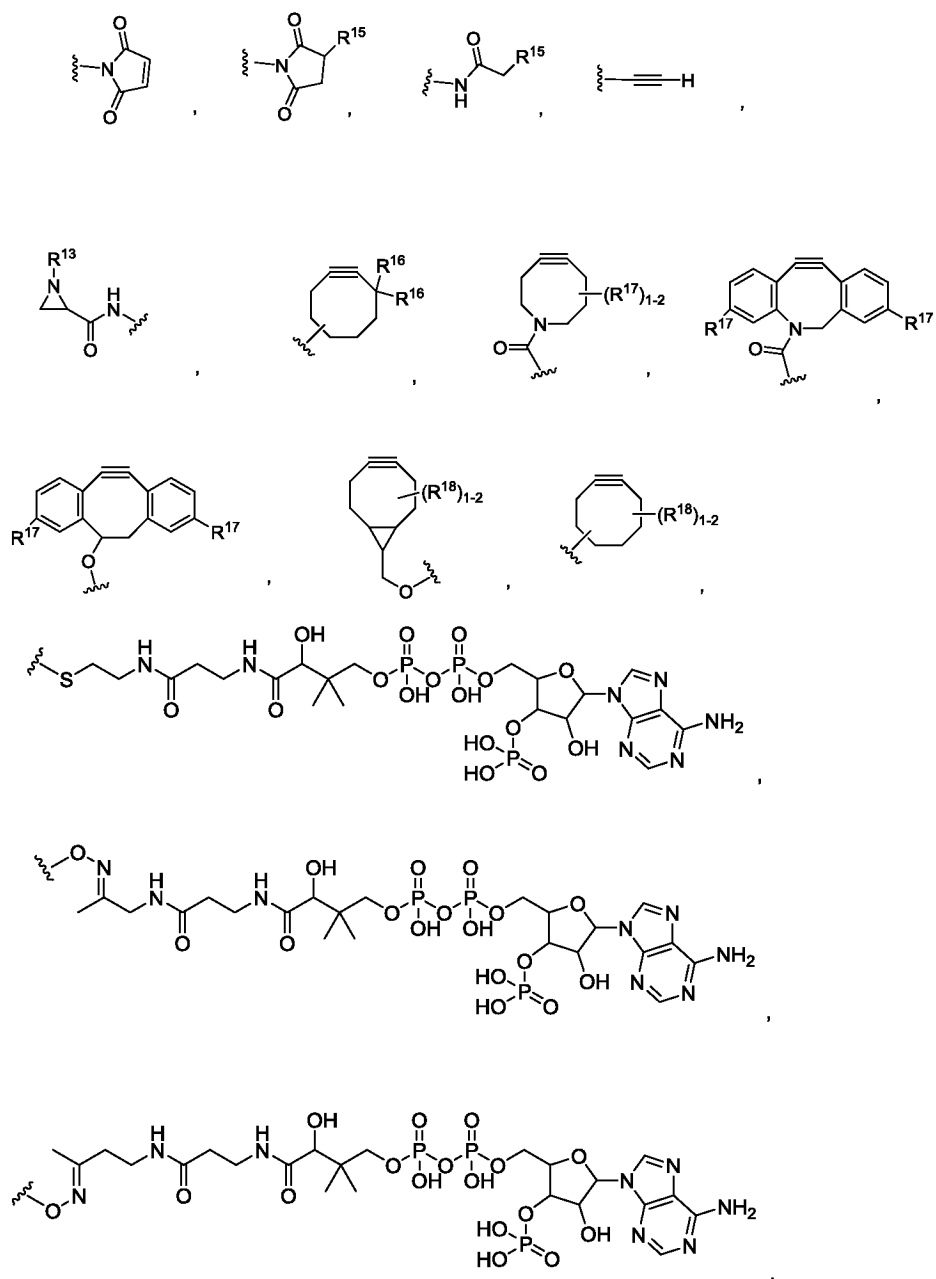
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение, Этерификация	
[3+2] Циклоприсоединение	
Присоединение Михаэля	
Присоединение Михаэля	
Иминовая конденсация, Амидирование	
Иминовая конденсация	

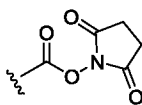
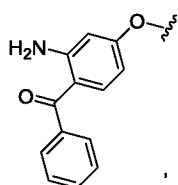
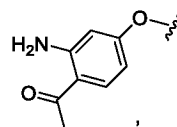
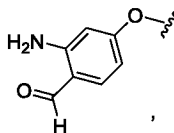
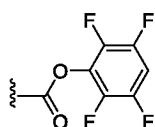
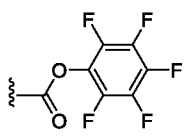
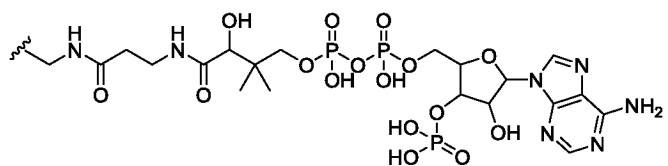
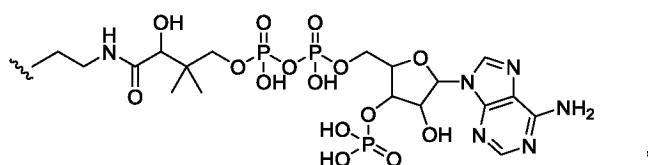
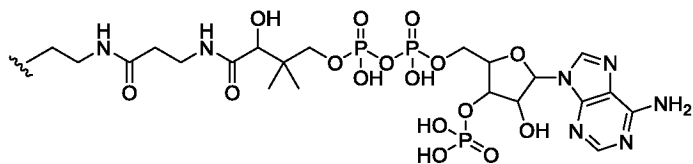
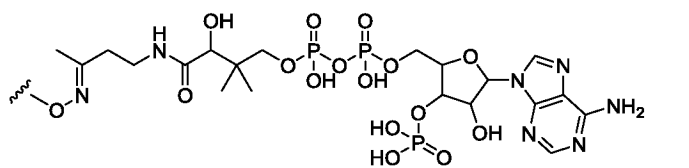
Образование дисульфида	
Алкилирование тиола	
Конденсация, Присоединение Михаэля	

1195

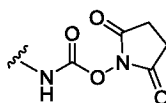
Специалисту в данной области техники будет понятно, что реакционноспособный заместитель Z', присоединенный к линкеру, и реакционноспособный заместитель на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте участвуют в реакции ковалентного связывания с образованием химического фрагмента Z, и распознает реакционноспособный фрагмент Z'. Таким образом, конъюгаты антитело-лекарственное средство, применимые в сочетании с описанными в настоящем документе способами, могут быть образованы реакцией антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, как описано в настоящем документе, линкером или конъюгатом цитотоксин-линкер, включающим реакционноспособный заместитель Z', подходящий для взаимодействия с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с образованием химического фрагмента Z.

В некоторых вариантах осуществления Z' представляет собой - NR¹³C(=O)CH=CH₂, -N₃, -SH, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), - NR¹³S(=O)₂(CH=CH₂), -NR¹³C(=O)CH₂R¹⁴, -NR¹³C(=O)CH₂Br, -NR¹³C(=O)CH₂I, - NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -ONH₂, -C(O)NHNH₂, -CO₂H, -NH₂, -NH(C=O), - NC(=S),





или



где

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

1220

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

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

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

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

1225

R^{18} независимо выбран для каждого случая из H, C_1-C_6 алкила, F,

бензилокси, замещенного посредством $-C(=O)OH$, бензила, замещенного посредством $-C(=O)OH$, C_1 - C_4 алкокси, замещенного посредством $-C(=O)OH$, и C_1 - C_4 алкила, замещенного посредством $-C(=O)OH$.

- 1230 Примеры подходящих реакционноспособных заместителей на линкере и антители или его антигенсвязывающем фрагменте включают пару нуклеофил/электрофил (например, пару тиол/галогеналкил, пару амин/карбонил или пару тиол/ α,β -ненасыщенный карбонил и подобные), пару диен/диенофил (например, пару азид/алкин или пару диен/ α,β -ненасыщенный карбонил, среди
- 1235 прочих) и тому подобное. Реакции связывания между реакционноспособными заместителями с образованием химического фрагмента Z включают, помимо прочего, алкилирование тиола, гидроксилалкилирование, алкилирование амина, конденсацию амина или гидроксиламина, образование гидразина, амидирование, эстерификацию, образование дисульфида, циклоприсоединение (например, [4+2]
- 1240 циклоприсоединение Дильса-Альдера, [3+2] циклоприсоединение Хьюсена, среди прочих), нуклеофильное ароматическое замещение, электрофильное ароматическое замещение и другие реакционные способы, известные в данной области техники или описанные в настоящем документе. Предпочтительно линкер содержит электрофильную функциональную группу для взаимодействия с
- 1245 нуклеофильной функциональной группой антителя или его антигенсвязывающего фрагмента.

- Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, как раскрыто в настоящем документе, включают, без ограничения, нуклеофильные группы, такие как (i) N-
- 1250 концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковой цепи, например лизина, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например цистеина и (iv) гидроксильные или аминогруппы сахара, где антители гликозилировано. Реакционноспособные заместители, которые могут присутствовать в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, как раскрыто в настоящем документе,
- 1255 включают, без ограничения, гидроксильные группы остатков серина, треонина и тирозина; аминогруппы остатков лизина; карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и тиольные фрагменты остатков цистеина, а также пропаргил, азидо, галоарил (например, фторарил), галогетероарил (например, фторгетероарил), галоалкильные и

1260 галогетероалкильные фрагменты не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные заместители, присутствующие в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, как раскрыто в настоящем документе, включают аминные или тиоловые фрагменты. Некоторые антители имеют восстанавливаемые межцепочечные дисульфиды, то
1265 есть цистеиновые мостики. Антителам можно придать реакционноспособность для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстанавливающим агентом, таким как DTT (дитиотреитол). Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически образует два реакционноспособных тиоловых нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антители
1270 посредством реакции лизинов с 2-иминотиоланом (реактив Траута), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут быть введены в антители (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, путем получения мутантных антителей, содержащих один или более ненативных аминокислотных остатков
1275 цистеина). Патент США № US 7521541 описывает создание антителей путем введения реакционноспособных аминокислот цистеина.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный фрагмент Z', присоединенный к линкеру, представляет собой нуклеофильную группу, которая вступает в реакцию с электрофильной группой, присутствующей на антители.
1280 Подходящие электрофильные группы на антители включают, но не ограничиваются ими, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы может реагировать с электрофильной группой на антители и образовывать ковалентную связь с антители. Подходящие нуклеофильные группы включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, amino, гидроксил,
1285 гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой продукт реакции между реакционноспособными нуклеофильными заместителями, присутствующими в антителях или их антигенсвязывающих фрагментах, такими как аминовые и тиоловые фрагменты, и реакционноспособным электрофильным
1290 заместителем Z'. Например, Z' может представлять собой акцептор Михаэля (например, малеимид), активированный сложным эфиром, электронодефицитным карбонильным соединением и альдегидом, среди прочего.

Например, линкеры, подходящие для синтеза ADC, включают, без ограничения, реакционноспособные заместители Z', такие как малеимидные или галоалкильные группы. Они могут быть присоединены к линкеру с помощью таких реагентов, как сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-L-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил иодацетат (SIA), сульфо-SMCC, *m*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS), сульфо-MBS и сукцинимидилиодацетат, среди прочего, описанных, например, в Liu et al., 18:690-697, 1979, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химического конъюгирования.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель Z', присоединенный к линкеру L, представляет собой малеимид, азид или алкин. Примером линкера, содержащего малеимид, является нерасщепляемый линкер на основе малеимидакапроила, который особенно подходит для конъюгации агентов, разрушающих микротрубочки, таких как ауристатин. Такие линкеры описаны Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17:14-24, 2006, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, поскольку оно относится к линкерам для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель Z' представляет собой $-(C=O)-$ или $-NH(C=O)-$, так что линкер может быть присоединен к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту с помощью фрагмента амида или мочевины, соответственно, полученного в результате реакции группы $-(C=O)-$ или $-NH(C=O)-$ с аминогруппой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель представляет собой N-малеимидильную группу, галогенированную N-алкиламидагруппу, сульфонилокси-N-алкиламидагруппу, карбонатную группу, сульфонилгалогенидную группу, тиольную группу или их производное, алкинильную группу, содержащую внутреннюю тройную углерод-углеродную связь, (гетеро)циклоалкинильную группу, бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ильную группу, алкенильную группу, содержащую внутреннюю углерод-углеродную двойную связь, циклоалкенильную группу, тетразинильную группу, азидогруппу, фосфиновую группу, нитрилоксидную группу, нитронную группу, нитрилиминовую группу, диазогруппу, кетонную группу, (О-алкил)гидроксиламино группу, гидразиновую группу, галогенированную N-малеимидильную группу, 1,1-

1330 бис(сульфонилметил)метилкарбонильную группу или их отщепляющие производные, карбонилгалогенидную группу или алленамидную группу, каждая из которых может быть необязательно замещена. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный заместитель содержит циклоалкеновую группу, циклоалкиновую группу или необязательно замещенную (гетеро)циклоалкинильную группу.

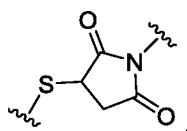
Неограничивающие примеры конъюгатов аматоксин-линкер, содержащих реакционноспособный заместитель Z', подходящий для реакции с реакционноспособным остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, включают, без ограничения, 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбонил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-карбоксипропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(2-(4-(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(4-(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)пирролидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(3-((6-((4-

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

- 1395 аматоксин; 7'C-((4-(2-(малеимидо)ацетил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-
((4-(3-(малеимидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(4-
(малеимидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-
(малеимидо)ацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(4-
(малеимидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(6-(4-
1400 ((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(малеимидо)гексанамидо)метил)азетидин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)азетидин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-((3-((4-
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)метил)азетидин-1-ил)метил)-
1405 аматоксин; 7'C-((3-(2-(4-
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)этил)азетидин-1-ил)метил)-
аматоксин; 7'C-((3-(2-(6-(4-
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)азетидин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(6-(малеимидо)-N-
1410 метилгексанамидо)этил)(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(6-(малеимидо)-
N-метилгексанамидо)бутил)(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(2-(6-
(малеимидо)гексанамидо)этил)азиридин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(2-(6-(4-
((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)этил)азиридин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(6-(6-(2-
1415 (аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)гексаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин;
7'C-(((4-(1-(аминоокси)-2-оксо-6,9,12,15-тетраокса-3-азагептадекан-17-
оил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(2-(2-
(аминоокси)ацетамидо)ацетил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(3-(2-
(аминоокси)ацетамидо)пропаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(4-(2-
1420 (аминоокси)ацетамидо)бутаноил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(2-(6-
(2-(аминоокси)ацетамидо)гексанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин;
7'C-(((4-(2-(2-(2-(аминоокси)ацетамидо)ацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-
аматоксин; 7'C-(((4-(2-(4-(2-(аминоокси)ацетамидо)бутанамидо)этил)пиперидин-1-
ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((4-(20-(аминоокси)-4,19-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-
1425 3,18-диазаэйкозил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-(((2-(6-(2-
(аминоокси)ацетамидо)-N-метилгексанамидо)этил)(метил)амино)метил)-
аматоксин; 7'C-(((4-(6-(2-(аминоокси)ацетамидо)-N-
метилгексанамидо)бутил)(метил)амино)метил)-аматоксин; 7'C-(((3-((6-(4-

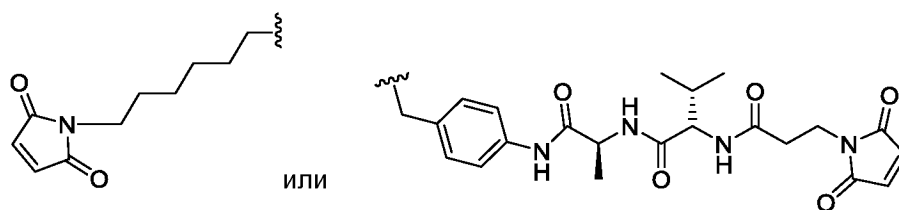
- 1430 ((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)метил)пирролидин-1-ил)-S-метил)-аматоксин; 7'C-((3-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексанамидо)-R-метил)пирролидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперазин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(2-бромацетамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 7'C-((4-(2-(3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропанамидо)этил)пиперидин-1-ил)метил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексил)-аматоксин; 6'O-(5-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)пентил)-аматоксин; 6'O-(2-((6-(малеимидо)гексил)окси)-2-оксоэтил)-аматоксин; 6'O-((6-(малеимидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; 6'O-((6-(4-((малеимидо)метил)циклогексанкарбоксамидо)гексил)карбамоил)-аматоксин; 6'O-1440 (6-(2-бромацетамидо)гексил)-аматоксин; 7'C-(4-(6-(азидо)гексанамидо)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(гекс-5-иноиламино)пиперидин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 7'C-(4-(2-(6-(малеимидо)гексанамидо)гексанамидо)этил)пиперазин-1-ил)-аматоксин; 6'O-(6-(6-(11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексанамидо)гексил)-1445 аматоксин; 6'O-(6-(гекс-5-иноиламино)гексил)-аматоксин; 6'O-(6-(2-(аминоокси)ацетиламидо)гексил)-аматоксин; 6'O-((6-аминоокси)гексил)-аматоксин; и 6'O-(6-(2-иодоацетамидо)гексил)-аматоксин.

- В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z выбран из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления химический фрагмент Z 1450 представляет собой

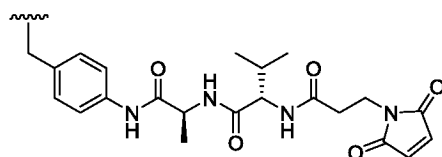


- где S представляет собой атом серы, который представляет собой реактивный заместитель, присутствующий в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, который связывает CD45 (например, из группы - 1455 SH остатка цистеина).

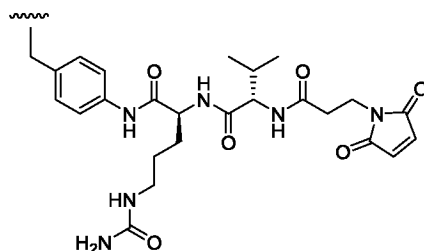
В некоторых вариантах осуществления структура линкер-реакционноспособной группы заместителя L-Z' до конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой:



1460 В некоторых вариантах осуществления аматоксин, раскрытый в настоящем документе, конъюгирован с линкер-реакционноспособным фрагментом -L-Z', имеющим следующую формулу:



1465 В некоторых вариантах осуществления аматоксин, раскрытый в настоящем документе, конъюгирован с линкер-реакционноспособным фрагментом -L-Z', имеющим следующую формулу:



1470 Вышеупомянутые линкерные фрагменты и конъюгаты аматоксин-линкер, среди прочего, применимые в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящем документе, описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2015/0218220 и публикации патентной заявки № WO2017/149077, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1475 *Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство*

1480 В ADC, раскрытых в настоящем документе, антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с одним или более фрагментами цитотоксического лекарственного средства (D), *например*, от примерно 1 до примерно 20 фрагментов лекарственного средства на антитело через линкер L и химический фрагмент Z, как раскрыто в настоящем документе. ADC согласно

настоящему изобретению могут быть получены несколькими способами с использованием реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области техники, включая: (1) реакцию реакционноспособного заместителя антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с бивалентным линкерным реагентом с образованием Ab-Z-L, как описано в настоящем документе выше, с последующей реакцией с фрагментом лекарственного средства D; или (2) реакцию реакционноспособного заместителя фрагмента лекарственного средства с бивалентным линкерным реагентом с образованием D-L-Z' с последующей реакцией с реакционноспособным заместителем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано выше в настоящем документе. Дополнительные способы получения ADC описаны в настоящем документе.

В другом аспекте антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет один или более остатков лизина, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или более сульфгидрильных групп. Затем ADC образуется путем конъюгации через атом серы сульфгидрильной группы, как описано в настоящем документе выше. Реагенты, которые можно использовать для модификации лизина, включают, но не ограничиваются ими, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) и гидрохлорид 2-иминотиолана (реагент Траута).

В другом аспекте антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь одну или более углеводных групп, которые можно химически модифицировать, чтобы они содержали одну или более сульфгидрильных групп. Затем ADC образуется путем конъюгации через атом серы сульфгидрильной группы, как описано в настоящем документе выше.

В еще одном аспекте антитело против CD45 может иметь одну или более углеводных групп, которые могут быть окислены с образованием альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). Затем ADC образуется путем конъюгации через соответствующий альдегид, как описано в настоящем документе выше. Другие протоколы модификации белков для присоединения или ассоциации цитотоксинов описаны в Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), включенном в настоящую заявку в качестве ссылки.

Способы конъюгации фрагментов линкер-лекарственное средство с белками-мишенями клетки, такими как антитела, иммуноглобулины или их

1515 фрагменты, описаны, например, в патенте США № 5208020; патенте США № 6441163; WO2005037992; WO2005081711 и WO2006/034488, все из которых настоящим непосредственно включены посредством ссылки во всей своей полноте.

1520 В качестве альтернативы, слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, может быть получен, например, с помощью рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Длина ДНК может включать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо смежные друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не нарушает желаемых свойств конъюгата.

1525 ADC, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту (например, пациенту-человеку, страдающему иммунным заболеванием или раком) в различных лекарственных формах. Например, описанные в настоящем документе ADC можно вводить пациенту, страдающему иммунным заболеванием или раком, в форме водного раствора, такого как водный
1530 раствор, содержащий один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают агенты, модифицирующие вязкость. Водный раствор можно стерилизовать с применением методов,
1535 известных в данной области техники.

Фармацевтические составы, содержащие ADC против CD45, как описано в настоящем документе, получают путем смешивания таких ADC с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме
1540 лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие
1545 как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно

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

Терапевтические применения

CD45 представляет собой важную молекулу клеточной поверхности, широко экспрессируемую в гемопоэтической и иммунной системах. В настоящем документе описаны антитела против CD45, их фрагменты и ADC против CD45, которые можно использовать для лечения пациентов с состояниями, при которых истощение клеток CD45+ является благоприятным, включая, но не ограничиваясь ими, лейкозы и лимфомы, а также пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз и склеродермия. В настоящее время существует потребность в композициях и способах для стимуляции приживления трансплантатов экзогенных гемопоэтических стволовых клеток таким образом, чтобы мультипотентность и гемопоэтическая функциональность этих клеток сохранялись после трансплантации. Композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, дополнительно обеспечивают решение этой сложной проблемы.

Путем нацеливания на CD45 с помощью антитела против CD45, их связывающих фрагментов и ADC, описанных в настоящем документе, обычно можно истощать как гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), так и лейкоциты (CD45 является панлейкоцитарным маркером). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрен способ обеспечения перезарядки иммунной системы у нуждающегося в этом субъекта. Например, путем введения антитела против CD45 или ADC, описанных в настоящем документе, пациенту, страдающему заболеванием, связанным с лейкоцитами, вызывающими заболевание, например, аутоиммунным заболеванием, лейкоциты, вызывающие заболевание, могут быть

элиминированы (вместе с ГСК), и у пациента затем может быть построена новая иммунная система из трансплантированных впоследствии ГСК.

1585 Дополнительным преимуществом CD45-специфичных антител и ADC, описанных в настоящем документе, является то, что, в отличие от ненаправленной высокотоксичной химиотерапии, эритроциты у пациента не должны быть затронуты, учитывая, что эритроциты обычно не экспрессируют CD45.

1590 Таким образом, в настоящем документе раскрыты способы лечения различных расстройств, таких как заболевания клеточного типа гемопоэтической линии, рак, аутоиммунные заболевания, нарушения обмена веществ и заболевания стволовых клеток, среди прочих. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут (i) непосредственно
1595 истощать популяцию клеток, вызывающих патологию, такую как популяция раковых клеток (например, лейкозных клеток) и аутоиммунных клеток (например, аутореактивных Т-клеток), и/ или (ii) истощать популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, чтобы способствовать приживлению трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток путем
1600 создания ниши, в которую могут вернуться трансплантированные клетки. Вышеупомянутые активности могут быть достигнуты путем введения ADC против CD45, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного связывать эндогенную болезнетворную клетку или гемопоэтическую стволовую клетку. В случае непосредственного лечения заболевания такое введение
1605 может вызвать уменьшение количества клеток, вызывающих представляющую интерес патологию. В случае подготовки пациента к терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток такое введение может вызвать избирательное истощение популяции эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым создавая место в кроветворной ткани, такой как костный
1610 мозг, которое впоследствии может быть заполнено трансплантированными экзогенными гемопоэтическими стволовыми клетками. ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, способные связывать CD45, можно вводить пациенту для осуществления обоих
1615 вышеуказанных действий. ADC, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают антиген CD45, экспрессируемый иммунными клетками, например, гемопоэтическими стволовыми клетками, можно вводить

пациенту, страдающему раком или аутоиммунным заболеванием, для непосредственного истощения популяции раковых клеток или аутоиммунных клеток, а также можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, чтобы способствовать выживанию и потенциалу приживления трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток.

Как описано в настоящем документе, терапию трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток можно проводить субъекту, нуждающемуся в лечении, для заселения или повторного заселения одного или более типов клеток крови. Гемопоэтические стволовые клетки обычно демонстрируют мультипотентность и, таким образом, могут дифференцироваться во множество различных линий крови, включая, помимо прочего, гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты, продуцирующие тромбоциты, тромбоциты), моноциты (например, моноциты, макрофаги), дендритные клетки, микроглии, остеокласты и лимфоциты (например, NK-клетки, В-клетки и Т-клетки). Кроме того, гемопоэтические стволовые дополнительно способны к самообновлению, и, таким образом, могут обеспечивать увеличение дочерних клеток, которые имеют потенциал, эквивалентный материнской клетке, и также проявляют способность повторного введения реципиенту трансплантата, после чего они размещаются в нише гемопоэтических стволовых клеток и восстанавливают продуктивный и устойчивый гемопоэз.

Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки можно вводить пациенту с дефектом или недостаточностью одного или более типов клеток гемопоэтической линии для восстановления дефектной или дефицитной популяции клеток *in vivo*, тем самым лечить патологию, связанную с дефектом или истощением популяции эндогенных клеток крови. Таким образом, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения незлокачественной гемоглобинопатии (например, гемоглобинопатии, выбранной из группы, состоящей из серповидноклеточной анемии, талассемии, анемии Фанкони, апластической анемии и синдрома Вискотта-Олдрича). Дополнительно или в качестве альтернативы, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения

иммунодефицита, такого как врожденный иммунодефицит. Дополнительно или в качестве альтернативы, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения приобретенного иммунодефицита (например, приобретенного иммунодефицита, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ и СПИДа). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения нарушения обмена веществ (например, нарушения обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Херлерса, сфинголипидозов и метакроматической лейкодистрофии).

Дополнительно или в качестве альтернативы, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения злокачественного новообразования или пролиферативного нарушения, такого как гематологический рак, миелопролиферативное заболевание. В случае лечения рака композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту, чтобы истощить популяцию эндогенных гемопоэтических стволовых клеток перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут размещаться в созданной нише на стадии эндогенного истощения клеток и установления продуктивного гемопоэза. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, истощенных во время эрадикации раковых клеток, например, во время системной химиотерапии. Типичные гематологические виды рака, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе композиций и способов, включают, без ограничения, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому, а также другие раковые состояния, включая нейробластому.

Дополнительные заболевания, которые можно лечить с помощью описанных в настоящем документе композиций и способов, включают, без ограничения, дефицит аденозиндезаминазы и тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром гипериммуноглобулина М, болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез,

1685 болезни накопления, большую талассемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз и ювенильный ревматоидный артрит.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для индуцирования толерантности к трансплантату паренхиматозных органов. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно
1690 использовать для истощения или удаления популяции клеток из ткани-мишени (например, для истощения гемопоэтических стволовых клеток из ниши стволовых клеток костного мозга). После такого истощения клеток из тканей-мишеней реципиенту трансплантата может быть введена популяция стволовых клеток или клеток-предшественников от донора органов (например,
1695 гемопоэтических стволовых клеток от донора органов), а после приживления таких стволовых клеток или клеток-предшественников, может быть достигнут временный или стабильный смешанный химеризм, что обеспечивает длительную толерантность к трансплантированным органам без необходимости дополнительных иммунодепрессантов. Например, композиции и
1700 способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для индуцирования толерантности к трансплантату у реципиента трансплантата паренхиматозного органа (например, трансплантата почки, трансплантата легкого, трансплантата печени и трансплантата сердца, среди прочих). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, хорошо подходят
1705 для применения в связи с индукцией толерантности к трансплантату паренхиматозного органа, например, так как небольшой процент временного или стабильного донорского трансплантата достаточен для индуцирования долговременной толерантности к трансплантированному органу.

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе,
1710 можно использовать для непосредственного лечения рака, такого как рак, характеризующийся клетками, которые являются CD45+. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения лейкоза, например, у пациентов, у которых обнаруживаются лейкозные клетки CD45+. За счет истощения CD45+ раковых
1715 клеток, таких как лейкемические клетки, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для непосредственного лечения различных видов рака. Типичные виды рака, которые можно лечить таким

образом, включают гематологические виды рака, такие как острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, множественную миелому, диффузную
 1720 крупноклеточную В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому.

Кроме того, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения аутоиммунных расстройств. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту,
 1725 такому как человек, страдающий аутоиммунным расстройством, чтобы убить CD45+ иммунную клетку. Например, иммунная клетка CD45+ может представлять собой аутореактивный лимфоцит, такой как Т-клетка, экспрессирующая Т-клеточный рецептор, который специфично связывается с аутоантигеном и вызывает иммунный ответ против него. Истоцая
 1730 аутоагрессивные CD45+, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения аутоиммунных патологий, таких как описанные ниже. Дополнительно или в качестве альтернативы, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения аутоиммунного заболевания путем истощения популяции эндогенных
 1735 гемопоэтических стволовых клеток перед терапией трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, и в этом случае трансплантированные клетки могут занять нишу, созданную на стадии истощения эндогенных стволовых клеток и установления продуктивного гемопоэза. Это, в свою очередь, может восстановить популяцию клеток, истощенных во время
 1740 эрадикации аутоиммунных клеток.

Аутоиммунные заболевания, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе композиций и способов, включают, без ограничения, псориаз, псориатический артрит, сахарный диабет 1 типа (диабет 1 типа), ревматоидный артрит (РА), системную волчанку человека (SLE),
 1745 рассеянный склероз (РС), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), лимфоцитарный колит, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, универсальная алопеция, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидных антител (АФС), апластическая анемия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное
 1750 заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный оофорит, болезнь Бало, болезнь Бехчета,

буллезный пемфигоид, кардиомиопатия, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости с иммунной дисфункцией (CFIDS), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, болезнь Крона, рубцовый пемфигоид, 1755 глютенный герпетиформный дерматит, болезнь холодных агглютининов, CREST-синдром, болезнь Дегоса, дискоидную волчанку, вегето-сосудистую дистонию, эндометриоз, первичную криоглобулинемию смешанного типа, фибромиалгию-фибромиозит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, 1760 идиопатическую и/или острую тромбоцитопеническую пурпуру, идиопатический легочный фиброз, нейропатию IgA, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, красный плоский лишай, болезнь Лайма, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), миастению гравис, нейромиотонию, синдром опсоклонус-миоклонус (OMS), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, вульгарную пузырчатку, пернициозную анемию, полихондрит, полимиозит и дерматомиозит, первичный билиарный цирроз, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, первичную агаммаглобулинемию, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром 1770 Шегрена, синдром ригидности, артериит Такаясу, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный артериит»), язвенный колит, коллагенозный колит, увеит, васкулит, витилиго, вульводинию («вульварный вестибулит») и гранулематоз Вегенера.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат является 1775 аллогенным. В некоторых вариантах трансплантат является аутологичным.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат представляет собой трансплантат костного мозга, трансплантат периферической крови или трансплантат пуповинной крови.

В некоторых вариантах осуществления трансплантат включает 1780 гемопоэтические клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки).

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, трансплантат может представлять собой трансплантат любого паренхиматозного органа или кожи. В некоторых вариантах осуществления трансплантат выбран из группы, состоящей из трансплантата почки, 1785 трансплантата сердца, трансплантата печени, трансплантата поджелудочной

железы, трансплантата легкого, трансплантата кишечника и трансплантата кожи.

Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту (например, пациенту-человеку, страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток) в различных лекарственных формах. Например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту, страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, в форме водного раствора, такого как водный раствор, содержащий один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают агенты, модифицирующие вязкость. Водный раствор можно стерилизовать с применением методов, известных в данной области техники.

Фармацевтические составы, содержащие антитело против CD45 или его конъюгаты (например, ADC, как описано в настоящем документе), получают путем смешивания такого антитела или ADC с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы,

- 1820 включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).
- 1825 Антитела, антигенсвязывающие фрагменты или ADC, описанные в настоящем документе, можно вводить различными путями, такими как пероральный, трансдермальный, подкожный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, внутриглазной или парентеральный. Наиболее подходящий способ введения в каждом конкретном случае будет зависеть от конкретного
- 1830 вводимого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пациента, способов получения фармацевтического состава, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста пациента, массы тела, пола, тяжести излечиваемых заболеваний, диеты пациента и скорости выделения пациента.
- 1835 Эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, может находиться в диапазоне, например, от примерно 0,001 до примерно 100 мг/кг массы тела при однократном (например, болюсном) введении, многократном введении или непрерывном введении, или для достижения оптимальной концентрации в сыворотке
- 1840 (например, концентрации в сыворотке 0,0001-5000 мкг/мл) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Дозу можно вводить один или более раз (например, 2-10 раз) в сутки, неделю или месяц субъекту (например, человеку), страдающему раком, аутоиммунным заболеванием или проходящему подготовительную терапию при подготовке к приему трансплантата
- 1845 гемопоэтических стволовых клеток. В случае проведения процедуры подготовки перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых
- 1850 клеток, например, от 1 часа до 1 недели (например, за 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 суток, 6 суток или 7 суток) или более до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических

стволовых клеток.

- 1855 Используя раскрытые в настоящем документе способы, врач в данной области техники может ввести пациенту-человеку, нуждающемуся в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, ADC, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные связывать CD45, экспрессируемый гемопоэтическими стволовыми клетками. Таким образом, популяция
- 1860 эндогенных гемопоэтических стволовых клеток может быть истощена перед введением трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, чтобы способствовать приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Антитело может быть ковалентно конъюгировано с токсином, таким как цитотоксическая молекула, описанная в настоящем документе или известная в
- 1865 данной области техники. Например, антитело против CD45 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ковалентно конъюгированы с цитотоксином, таким как экзотоксин А псевдомонад, дебуганин, дифтерийный токсин, аматоксин, такой как β -аманитин, α -аманитин, сапорин, майтансин, майтансиноид, ауристатин, антрациклин, калихимицин, иринотекан, SN-38,
- 1870 дуокармицин, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиаземина, индолинобензодиазепин, димер индолинобензодиаземина или их вариант. Это конъюгирование может быть осуществлено с использованием методов образования ковалентной связи, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий
- 1875 фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело могут быть впоследствии введены пациенту, например, путем внутривенного введения, перед трансплантацией экзогенных гемопоэтических стволовых клеток (таких как аутологичные, сингенные или аллогенные гемопоэтические стволовые клетки) пациенту.
- 1880 Антитело против CD45, его антигенсвязывающий фрагмент или ADC можно вводить в количестве, достаточном для снижения количества клеток-мишеней, экспрессирующих CD45. Например, антитело против CD45, его антигенсвязывающий фрагмент или ADC можно вводить в количестве, достаточном для снижения количества эндогенных клеток CD45+ в костном
- 1885 мозге и/или в периферической крови, например, примерно на 10 %, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45, его антигенсвязывающий фрагмент или

ADC можно вводить в количестве, достаточном для снижения количества эндогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Уменьшение числа гемопоэтических стволовых клеток можно контролировать с использованием обычных методов, известных в данной области техники, таких как FACS-анализ клеток, экспрессирующих характерные поверхностные антигены гемопоэтических стволовых клеток, в образце крови, взятом у пациента с различными интервалами во время подготовки. Например, квалифицированный врач в данной области техники может взять образец крови у пациента в различные моменты времени во время подготовительной терапии и определить степень снижения количества эндогенных гемопоэтических стволовых клеток путем проведения FACS-анализа для выяснения относительных концентраций гемопоэтических стволовых клеток в образце с использованием антител, которые связываются с маркерными антигенами гемопоэтических стволовых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, когда концентрация гемопоэтических стволовых клеток достигает минимального значения в ответ на кондиционирующую терапию с использованием антитела против CD45, его антигенсвязывающего фрагмента или ADC, врач может завершить кондиционирующую терапию и начать подготовку пациента для терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Антитело против CD45, его антигенсвязывающий фрагмент или ADC можно вводить пациенту в форме водного раствора, содержащего один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как агент, модифицирующий вязкость. Водный раствор можно стерилизовать с использованием методов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе, например, от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг до введения пациенту трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг. В одном варианте осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить

- пациенту в дозе от примерно 0,15 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг. В одном варианте осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе от примерно 0,15 мг/кг до примерно 0,25 мг/кг. В одном варианте осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе от примерно 0,2 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг. В одном варианте осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить
- 1925 пациенту в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе примерно 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг или 1,0 мг/кг.
- 1930
- 1935 В других вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат лекарственное средство-антитело можно вводить пациенту в дозе от примерно 0,001 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 9,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 9 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 8,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 7,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 7 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 6,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 5,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 4,5 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 4 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 3,5 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 3 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 9 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 7 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 4 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до
- 1940 примерно 3 мг/кг.
- 1945
- 1950 В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45, его антигенсвязывающий фрагмент или ADC, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту во время, которое оптимально способствует приживлению экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от примерно 1 часа до примерно недели (например, примерно за 1 час, 2 часа, 3
- 1955

часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 суток, 6 суток или 7 суток) или более до введения трансплантата экзогенных гемопоэтических стволовых клеток.

1960

После завершения подготовительной терапии пациент может получить инфузию (например, внутривенную инфузию) экзогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, от того же врача, который проводил кондиционирующую терапию, или от другого врача. Врач может ввести

1965

пациенту инфузию аутологичных, сингенных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, например, в дозе от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^9 гемопоэтических стволовых клеток/кг. Врач может контролировать приживание трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, например, путем взятия образца крови у пациента и определения

1970

увеличения концентрации гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии (таких как мегакариоциты, тромбоциты, тромбоциты, эритроциты, тучные клетки, миелобласты, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, микроглии, гранулоциты, моноциты, остеокласты, антигенпрезентирующие клетки, макрофаги, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты) после введения трансплантата.

1975

Этот анализ можно проводить, например, в период от примерно 1 часа до примерно 6 месяцев или более после терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (например, примерно через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12

1980

часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделю, 22 недели, 23

1985

недели, 24 недели и более). Обнаружение того, что концентрация гемопоэтических стволовых клеток или клеток гемопоэтической линии увеличилась (например, примерно на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 500% или более) после трансплантационной терапии относительно концентрации клеток

- 1990 соответствующего типа перед трансплантационной терапией указывает на то, что лечение антителом против CD45 или его антигенсвязывающим фрагментом или ADC успешно способствует приживлению трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Вышеизложенное можно также использовать в терапии, относящейся к клеткам CD45; истощение, например, истощение ГСК и
- 1995 иммунных клеток для лечения аутоиммунного заболевания или для лечения гематологического рака.

Приживление трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток вследствие введения антитела против CD45, его антигенсвязывающих фрагментов или ADC может проявляться в различных эмпирических измерениях. Например, приживление трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток можно оценить путем оценки количества конкурентных репопуляционных единиц (CRU), присутствующих в костном мозге пациента после введения антитела против CD45 или его антигенсвязывающего фрагмента и последующего введения трансплантата гемопоэтических

2000 стволовых клеток. Кроме того, можно наблюдать приживление трансплантата гемопоэтических стволовых клеток путем включения репортерного гена, такого как фермент, который катализирует химическую реакцию с образованием флуоресцентного, хромофорного или люминесцентного продукта, в вектор, которым были трансфицированы донорские гемопоэтические стволовые клетки,

2005 и последующего мониторинга соответствующего сигнала в ткани, которую заняли гемопоэтические стволовые клетки, такой как костный мозг. Можно также наблюдать приживление гемопоэтических стволовых клеток путем оценки количества и выживаемости гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, например, как определено методами анализа

2010 сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS), известными в данной области техники. Приживление можно также определить путем измерения количества лейкоцитов в периферической крови в посттрансплантационном периоде и/или путем измерения восстановления клеток костного мозга донорскими клетками в образце аспирата костного мозга.

2020

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники описание того, как композиции и

способы, описанные в настоящем документе, можно применять, получать и
 2025 оценивать, и предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения
 и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего
 изобретения считают своим изобретением.

Пример 1. Идентификация антител против CD45 Ab1-Ab7

2030 Полностью человеческую библиотеку подвергали скринингу и
 идентифицировали антитела Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 и Ab7 против CD45
 человека. Каждое из вышеуказанных антител было способно
 интернализироваться на экспрессирующих CD45 клетках. Дополнительные
 сведения о скрининге библиотеки и полученных антителах представлены в
 2035 следующих примерах.

Дрожжевой дисплей

Библиотеку дрожжевого дисплея, которая отображает полностью
 человеческие антитела (природные или синтетические), подвергали скринингу
 на связывание с эктодоменом CD45 человека (изоформа CD45RABC; Uniprot:
 2040 P08575-3) и CD45 примата, отличного от человека (NHP). Отбирали дрожжевые
 клетки, кодирующие антитела, связывающиеся с рекомбинантным антигеном
 CD45. Последовательности нуклеиновых кислот, представляющие антитела из
 выбранных дрожжевых клеток, выделяли в соответствии с методами,
 известными в данной области техники.

2045 В частности, скрининг проводили для идентификации перекрестно-
 реактивных антител против CD45 человека и NHP. После первого скрининга
 получили примерно 55 антител, но они связывались только с человеческим
 CD45 и являлись перекрестно-реактивными на антиген NHP CD45. После
 второго скрининга успешно получили 82 человеческих реактивных клона, 17 из
 2050 которых были реактивными в отношении CD45 человека и макака-резус, из
 которых 8 были тройными перекрестно-реактивными в отношении
 рекомбинантных антигенов CD45 человека, макака-резус и яванского макака.

Из восьми тройных перекрестно-реактивных (реакционноспособных в
 отношении CD45 человека, макака-резус, яванского макака) антител четыре
 2055 человеческих IgG-антитела с различными последовательностями тяжелой цепи
 CDR3 были выбраны для нескольких раундов созревания аффинности для
 дальнейшего улучшения аффинности путем диверсификации

последовательностей в CDR1, CDR2, CDR3 в тяжелой и легкой цепях и отбора по улучшенной аффинности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Всего после созревания аффинности четырех введенных антител было идентифицировано в общей сложности 55 человеческих IgG-антител с улучшенной аффинностью и вариантными последовательностями. Из четырех родительских антител, введенных в процесс созревания аффинности, только одно антитело генерировало дочерние варианты, которые были подтверждены как истинные перекрестно-реактивные клоны на живых клетках с помощью анализов связывания, проведенных на периферических мононуклеарных клетках человека и яванского макака (PBMC) (см. фиг. 1).

Как показано на фиг. 1, дочерние варианты, полученные из Ab1, имели улучшенное связывание с человеческим CD45 по сравнению с родительским антителом, что оценивали с помощью анализа связывания Octet. Кроме того, дочерние варианты с созревшей аффинностью, полученные из Ab1, показали межвидовую перекрестную реактивность с CD45 человека и CD45 яванского макака (фиг. 1). Напротив, антитела, полученные из трех других родительских антител, были слабо перекрестно-реактивными (фиг. 1).

Экспрессировали выбранные дочерние варианты, полученные из Ab1, и полученные антитела подвергали дополнительному скринингу для идентификации антител против CD45, которые были способны интернализироваться на экспрессирующих CD45 клетках. Примеры способов и реагентов, подходящих для использования в создании и скрининге библиотек дисплеев антител, можно найти, например, в Boder E.T. and Wittrup K.D., Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods Enzymol*, 328:430-44 (2000) и Boder E.T. and Wittrup K.D., Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nat Biotechnol*. 15(6):553-7 (June 1997).

В ходе описанного выше способа скрининга пять антител IgG человека были отобраны на основе желаемых свойств связывания антигена и живых клеток, включая одно антитело, идентифицированное до созревания аффинности (Ab1), и четыре антитела после созревания аффинности (Ab2, Ab3, Ab4 и Ab6). Последующие сайт-специфичные замены были введены в Ab4 для получения Ab5. Точно так же сайт-специфичные замены были введены в

Ab3 для получения Ab7. Аминокислотные последовательности вариабельных областей и областей CDR тяжелой и легкой цепей семи выбранных антител представлены в таблице 27. Семь антител включают следующее: антитело 1 (Ab1), антитело 2 (Ab2), антитело 3 (Ab3), антитело 4 (Ab4), антитело 5 (Ab5), антитело 6 (Ab6) и антитело 7 (Ab7).

Дальнейшая характеристика Ab1-7 представлена в примерах 2-14.

Пример 2. *In vitro* анализ стабильности антител против CD45

Стабильность антител, идентифицированных в примере 1, оценивали при различных стрессовых условиях. Эти исследования выявили аминокислоты каркаса VH/VL и CDR, которые могут быть подвержены образованию посттрансляционных модификаций, которые могут повлиять на гетерогенность и/или связывание антител.

Двухнедельный анализ стабильности проводили путем инкубации Ab3 и Ab4 при 4°C, 25°C и 40°C в течение 15 суток, после чего антитела анализировали с помощью хроматографии гидрофильных взаимодействий (HIC). Вкратце, 25 мкг указанного антитела инъецировали в колонку Tosoh TSKgel Phenyl-5PW 7,5 мм ID x 7.5 см 10-микрон (каталожный номер 07573) в системе Waters ARC ВЭЖХ/СВЭЖХ. Профили элюирования HIC антител демонстрировали относительно гидрофильный предварительный пик, который увеличивался в зависимости от термического стресса. Этот гидрофильный предварительный пик указывал на потенциальное место посттрансляционной модификации (например, окисления или дезамидирования). Затем было проведено картирование пептидов, чтобы определить, какие аминокислоты были модифицированы в каждом антителе при воздействии стресса (высокий pH, низкий pH и окислительный стресс). Анализ пептидного картирования идентифицировал потенциальный сайт дезамидирования аспарагина в CDR-L1 (положение N30) в ответ на условия с высоким pH (например, pH 8 или выше).

Сравнение других клонов, идентифицированных после созревания аффинности, показало, что серин может быть допустимым в положении N30 CDR-L1. Соответственно, были созданы варианты Ab3 и Ab4, в которых аспарагин в CDR-L1 (например, в положении 30B) был заменен серином. Полученные антитела были названы Ab7 и Ab5 соответственно. Предварительный пик, соответствующий дезамидированным соединениям, не

наблюдался в профиле HIC Ab5 после воздействия обработки с высоким pH, что подтверждает, что эта замена удаляет этот потенциальный участок дезамидирования.

2130 **Пример 3. *In vitro* анализ связывания антител против CD45**

Антитела, описанные в примерах 1 и 2, исследовали для определения их характеристик связывания в отношении CD45 человека и для оценки их способности перекрестно реагировать с CD45 макака-резус и яванского макака.

Исследования связывания антител проводили при 25°C в 1x PBS с
 2135 добавлением 0,1% мас./об. бычьего сывороточного альбумина с помощью Pall ForteBio Octet Red96 с использованием интерферометрии биослоя (BLI). Каждое очищенное человеческое антитело иммобилизовали на биосенсорах против Fc человека (AHQ; Pall ForteBio 18-5001) и инкубировали с 50 нМ очищенного эктодомена CD45 человека, макака-резус или яванского макака
 2140 для получения клонов Ab2-Ab7 с созревшей аффинностью, а также 100 нМ CD45 человека и 300 нМ эктодомена CD45 макака-резус или яванского макака для родительского клона Ab1.

Кажущуюся моновалентную аффинность (K_D), кажущуюся скорость ассоциации (K_{ON}) и кажущуюся скорость диссоциации (K_{OFF}) определяли путем
 2145 локального полной подгонки с моделью связывания 1:1, рассчитанной с помощью программного обеспечения для анализа данных ForteBio версии 10 каждого IgG с очищенным человеческим эктодоменом CD45 яванского макака или резуса. K_D , K_{ON} и K_{dis} каждого антитела показаны в таблице 2. Дочерние клоны с созревшей аффинностью (Ab 2-Ab 7) демонстрировали улучшенное
 2150 связывание с CD45 человека по сравнению с родительским клоном Ab1. Кроме того, эти результаты показывают, что замена N_30_S в Ab5 и Ab7 не изменяет связывание CD45. Примечательно, что каждое из выбранных антител Ab2-Ab7 было способно перекрестно реагировать с CD45 человека, яванского макака и макака-резус. Связывание было подтверждено с помощью:

2155

Таблица 2. Моновалентная аффинность (K_D), кажущаяся скорость ассоциации (K_{ON}) и кажущаяся скорость диссоциации (K_{OFF} или K_{dis}) указанных IgG к эктодомону CD45 человека, эктодомону CD45 яванского макака или эктодомону CD45 макака-резус

2160

	CD45 человека			CD45 яванского макака			CD45 макака-резус		
	Kd (M)	Kon(1/Mc)	Kdis(1/c)	Kd (M)	Kon(1/Mc)	Kdis(1/c)	Kd (M)	Kon(1/Mc)	Kdis(1/c)
				Отсутств ие связа ыва ния			Отсутств ие связа ыва ния		
Ab1	1,09E-07	4,58E+05	4,99E-02						
Ab2	1,15E-10	2,45E+05	2,80E-05	1,08E-09	1,19E+05	1,29E-04	1,42E-09	1,35E+05	1,92E-04
Ab4	1,39E-11	2,36E+05	3,28E-06	7,21E-10	1,10E+05	7,89E-05	8,67E-10	1,18E+05	1,02E-04
Ab5*	1,44E-10	2,33E+05	3,36E-05	1,40E-09	1,17E+05	1,64E-04	1,71E-09	1,13E+05	1,93E-04
Ab6*	7,16E-11	2,42E+05	1,73E-05	1,30E-09	1,18E+05	1,54E-04	1,44E-09	1,22E+05	1,75E-04
Ab3	8,66E-10	2,60E+05	2,25E-04	1,61E-09	1,20E+05	1,92E-04	1,65E-09	1,35E+05	2,22E-04
Ab7*	2,33E-09	2,64E+05	6,15E-04	4,24E-09	1,27E+05	5,37E-04	4,39E-09	1,24E+05	5,44E-04

*Клоны с аминокислотной заменой N_S

Пример 4. *In vitro* активность антител против CD45 в отношении связывания клеток REH и PBMC

2165 В этом примере оценивали связывание *in vitro* клеток REH и PBMC
выбранными антителами против CD45, идентифицированными в примерах 1 и
2 (Ab5 и Ab7). Fc-область каждого антитела была модифицирована
аминокислотными заменами D265C LALA H435A.

2170 Клетки REH-1 (В-клеточная линия клеток неходжкинской лимфомы,
ATCC № CRL-3004) или первичные мононуклеарные клетки периферической
крови человека или яванского макака (PBMC) в культуральной среде
инкубировали с титрованными дозами Ab5 и Ab7 в течение ночи при 37°C.
Связанное антитело против CD45 обнаруживали с помощью флуоресцентно
меченного вторичного антитела AF488 против IgG человека с использованием
2175 проточной цитометрии. IC50 определяли путем подгонки данных с помощью
GraphPad Prism.

2180 Как показано в таблице 3 и на фиг. 2, Ab5 и Ab7 показали сходные
значения IC50 между PBMC человека и яванского макака, демонстрируя
перекрестно-реактивное связывание с CD45 человека и яванского макака на
живых клетках. Антитела также продемонстрировали сильное связывание с
клеточной линией REH-1, экспрессирующей CD45 человека.

Таблица 3. EC50 (нМ)

Антитело	REN	Человека	Яванского макака
Ab5 (D265C LALA H435A)	0,3	1,4	1,3
Ab7 (D265C LALA H435A)	0,2	1,0	1,3

Пример 5. Картирование эпитопов

Эпитоп, связанный антителом против CD45, идентифицированный в примерах 1 и 2 (Ab5), картировали с использованием масс-спектрометрии перекрестных связей. Эксперименты по сшиванию позволяют проводить прямой анализ нековалентного взаимодействия с помощью масс-спектрометрии High-Mass MALDI. Путем смешивания образца белка, содержащего нековалентные взаимодействия, со специально разработанной сшивающей смесью (Bich, C et al. Anal. Chem., 2010, 82 (1), pp 172–179), можно специфично обнаружить нековалентный комплекс с высокой чувствительностью. Ковалентное связывание, возникающее в результате сшивания, позволяет взаимодействующим частицам выжить в процессе подготовки образца и ионизации MALDI. Специальная система обнаружения High-Mass позволяет охарактеризовать взаимодействие в диапазоне High-Mass.

Для определения эпитопа Ab5 с высоким разрешением белковый комплекс инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному расщеплению. Белковый комплекс представлял собой вариант антитела Ab5 (имеющий тот же эпитоп, что и Ab5), связанный с CD45 человека. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-LTQ-Orbitrap MS), а полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения XQuest и Stavrox.

После протеолиза трипсином, химотрипсином, ASP-N, эластазой и термолизином белкового комплекса CD45/Ab5 с дейтерированным d0d12, анализ nLC-orbitrap MS/MS показал, что эпитоп Ab5 включает остатки в пептидах TEKDCNLNLDKNLIKDYDLQNLK (SEQ ID NO:114) и RPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESH (SEQ ID NO:116) и, в частности, взаимодействует с аминокислотами на CD45 человека, соответствующими

405T, 407K, 419Y, 425K, 481R, 505R и 509H в SEQ ID NO:113 (фрагмент изоформы CD45, соответствующий NP_002829.3). Эти результаты проиллюстрированы на фиг. 3, где показаны аминокислотные фрагменты CD45, соответствующие SEQ ID NO: 115 и 117, которые охватывают эпитоп Ab5 (например, эпитоп, как описано в SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 116) и конкретные сайты взаимодействия.

CD45 включает муциноподобный домен, фибронектинподобный домен d1-d4, а также трансмембранный и фосфатазный домены. Основываясь на настоящих результатах, Ab5, по-видимому, взаимодействует с d3 и d4 фибронектинподобного домена CD45. Остатки 405T, 407K, 419Y, 425K и 505R эпитопа Ab5 сохраняются в CD45 человека, яванского макака и макака-резус, что согласуется со способностью Ab5 (и клонов, полученных из Ab1) связываться с CD45 человека, макака-резус и яванского макака.

2225 **Пример 6. Клеточная интернализация конъюгата антитела против CD45**

Для этого исследования антитело против CD45, идентифицированное в примерах 1 и 2 (Ab5), оценивали в анализе интернализации *in vitro* в клетках костного мозга человека. Ab5, имеющее модифицированную Fc-область (D265C LALA H435A), конъюгировали с аматоксином (аматоксином 1 (AM1)) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (Ab5-AM1). AM1, используемый повсюду, если не указано иное, представлен описанной в настоящем документе формулой VI.

ADC против CD45 конъюгировали с красителем rHAb, который является водорастворимым, ярким, светочувствительным и pH-реактивным. После интернализации конъюгированное антитело может перемещаться к кислой эндосоме/лизосоме, где краситель rHAb излучает при 563 нМ и может быть обнаружен с помощью проточной цитометрии. Используя этот метод, интернализацию ADC Ab5-AM1 оценивали в CD34+ клетках костного мозга человека.

Этот анализ проводили путем инкубации CD34+ клеток костного мозга человека на льду в течение двух часов с насыщающей концентрацией ADC в течение 0, 2, 24, 48 или 72 часов. Уровни rHAb (измеренные с помощью gMFI) оценивали с течением времени (фиг. 4; левая панель). По истечении времени молекулу анти-IgG, меченную флуорофором, использовали для оценки

2245 связанного поверхностного hlgG1 с помощью проточной цитометрии. Изотипический IgG, конъюгированный с аматоксином 1 (изотип-AM1), который не связывается с клетками CD34+ человека, был включен в качестве неинтернализующего контроля. Поскольку момент времени 0 ч представляет собой насыщенное связывание CD45, процент интернализованного ADC
 2250 рассчитывали путем сравнения средноточечной геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI) связанного поверхностного IgG в каждый момент времени с gMFI того же ADC в 0 часов (фиг. 4; правая панель).

Как показано на фиг. 4, уровень обнаруженных pHAb в клетках со временем увеличивался (фиг. 4, левая панель), что соответствовало
 2255 увеличению процента интернализации ADC с течением времени (фиг. 4, правая панель). Процент интернализации Ab5-AM1 был заметно выше по сравнению с таковым для конъюгата «изотип-AM1», что указывает на то, что Ab5-AM1 интернализуется CD34+ клетками костного мозга человека, в то время как изотипический контроль не интернализуется. Эти результаты показывают, что
 2260 Ab5-AM1 интернализуется CD34+ клетками костного мозга человека.

Пример 7. Анализ конъюгатов антител против CD45 с использованием киллинг-анализов в отношении клеточных линий *in vitro*

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) антител против
 2265 CD45, идентифицированные в примерах 1 и 2 (Ab2-Ab7), оценивали в отношении киллинга *in vitro* Jurkat (клеточная линия острого Т-клеточного лейкоза, ATCC № TIB-152), SKNO-1 (клеточная линия острого миелоидного лейкоза JCRB1170) и REH-1 (клеточная линия В-клеточной неходжкинской лимфомы, ATCC No. CRL-3004) и клеточной линии с нокаутом REH CD45 -/-.
 2270 Антитела к CD45, которые имели модифицированную Fc-область (D265C LALA H435A или D265C.LALA.H435A-SG3249), были конъюгированы с одним из двух аматоксинов (аматоксин 1 (AM1) или аматоксин 2 (AM2)) или PBD (тезирин) для образования ADC. AM2, используемый в настоящем документе, если не указано иное, представлен формулой III, где X представляет собой S.

2275 Для киллинг-анализа *in vitro* с использованием клеточных линий клетки выращивали в соответствии с рекомендациями ATCC. Более конкретно, клетки культивировали в течение семи суток в присутствии CD45-ADC или конъюгата «изотипический контроль-ADC». Жизнеспособность клеток затем измеряли с

2280 помощью анализа Cell-titer Glo, который измеряет содержание аденозинтрифосфата (АТФ), соответствующее живым клеткам. После киллинг-анализа клеточной линии количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC50 с использованием GraphPad Prism.

2285 Результаты, описанные в таблицах 4 и 5 и на фиг. 5А и 5В показывают, что каждый из протестированных ADC против CD45 был эффективен в отношении киллинга экспрессирующих CD45 клеточных линий (например, клеток Jurkat, REH-1 или SKNO-1) *in vitro*.

Таблица 4. Киллинг-анализ клеточных линий Jurkat, REH и SKNO-1 *in vitro* – значения IC50

ADC	Jurkat	REH (CD45+)	SKNO-1	REH CD45-/-
	IC50	IC50	IC50	IC50
Ab5-AM1 D265C.LALA.H435A	5,8E-10	4,3E-11	9,10E-11	H/O
Ab4-AM2 D265C.LALA.H435A	3,80E-10	6,6E-11	2,378E-10	-

2290

Таблица 5. Киллинг-анализ клеточной линии REH *in vitro* – значения IC50

ADC	REH IC50 (M)
Ab4-AM2 (D265C.LALA.H435A)	6,6E-11
Ab4-AM1 (D265C.LALA.H435A)	2,8E-10
Ab5-AM1 (D265C.LALA.H435A)	4,3E-11
Ab6-AM1 (D265C.LALA.H435A)	2,5E-10
Ab3-AM1 (D265C.LALA.H435A)	4,8E-11
Ab7-AM1 (D265C.LALA.H435A)	6,9E-11
Ab5-PBD (D265C.LALA.H435A-SG3249)	2,3E-12

Пример 8. Анализ конъюгатов антител против CD45 с использованием киллинг-анализов PBMC и ГСК *in vitro*

2295 Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) антител против CD45, идентифицированные в примерах 1 и 2 (Ab2-Ab7), оценивали в отношении киллинга первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека или яванского макака (PBMC) или гемопоэтических стволовых клеток

человека (ГСК) *in vitro*. Антитела против CD45, которые имели модифицированную Fc-область (D265C LALA H435A или D265C.LALA.H435A-SG3249), были конъюгированы с одним из двух аматоксинов (аматоксин 1 (AM1) или аматоксин 2 (AM2)), или с PBD, для образования ADC в этом исследовании.

PBMC представляют собой экспрессирующие CD45 клетки, состоящие из гетерогенной клеточной популяции лимфоцитов (Т-клетки, В-клетки, природные клетки-киллеры) и моноцитов. Для киллинг-анализа *in vitro* с использованием клеточных линий PBMC культивировали в среде RPMI 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой в течение семи суток в присутствии CD45-ADC или конъюгата «изотипический контроль-ADC». Жизнеспособность клеток затем измеряли с помощью анализа Cell-titer Glo. После киллинг-анализа в отношении PBMC количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC₅₀ с использованием GraphPad Prism.

Результаты, описанные на фиг. 6А и в таблице 6, показывают, что каждый из анти-CD45-ADC был эффективен при киллинге PBMC человека и яванского макака *in vitro*. Типичные графики, изображающие киллинг Ab5-AM1 человека и яванского макака, показаны на фиг. 6А и в таблице 7. Ab5-AM1 демонстрировал сильный киллинг первичных PBMC с IC₅₀ 8,5 пМ для PBMC человека и IC₅₀ 9,1 пМ для PBMC яванского макака, что указывает на то, что PBMC человека и яванского макака были одинаково чувствительны к Ab5-AM1.

Таблица 6. Киллинг-анализ клеточных линий *in vitro* – значения IC₅₀

ADC, полученные из Ab1	IC ₅₀ PBMC человека (M)
Ab2-AM2 (D265C LALA H435A)	5,5E-12
Ab3-AM2 (D265C LALA H435A)	1,0E-09
Ab4-AM2 (D265C.LALA.H435A)	2,5E-11
Ab2-AM1 (D265C.LALA.H435A)	1,1E-11
Ab4-AM1 (D265C.LALA.H435A)	2,6E-11
Ab5-AM1 (D265C.LALA.H435A)	8,5E-12
Ab6-AM1 (D265C.LALA.H435A)	3,0E-11
Ab3-AM1 (D265C.LALA.H435A)	7,1E-12

Ab7-AM1 (D265C.LALA.H435A)	3,7E-12
Ab5-PBD (D265C.LALA.H435A-SG3249)	1,3E-10

Таблица 7. Киллинг-анализ клеток PBMC человека и яванского макака *in vitro* с использованием Ab5-AM1 – значения IC50

ADC	CD34+CD90+	PBMC человека	PBMC яванского макака
	IC50	IC50	IC50
Ab5-AM1 D265C LALA H435A	4,9E-10	8,5E-12	9,1E-12
Изотип-AM1 D265C LALA H435A	1,0E-07	1,0E-07	1,0E-07

2325

Для киллинг-анализа *in vitro* с использованием ГСК человека первичные CD34⁺ клетки костного мозга человека культивировали в течение 5 суток с Ab2-AM2, Ab4-AM2, Ab5-AM1 или конъюгатом «изотип-ADC». Количество живых CD34+CD90+ ГСК определяли с помощью проточной цитометрии в зависимости от концентрации антител. Как показано на фиг. 6B, Ab5-AM1 демонстрировал

2330 сильный киллинг ГСК человека с IC₅₀ 0,49 нМ. Как показано на фиг. 6C и обобщено в таблице 8, Ab2-AM2 и Ab4-AM2 также убивают ГСК *in vitro*.

Таблица 8. Киллинг-анализ клеток ГСК *in vitro* – значения IC50

ADC	DAR	CD34 CD90 (IC50 нМ)
Ab2-AM2 D265C.LALA.H435A	1,8	14
Ab4-AM2 D265C.LALA.H435A	1,6	9
Изотип-AM2 D265C.H435A	2	

2335

Пример 9. Анализ активности ADC против CD45 киллинга клеток на стимулированных делящихся по сравнению с нестимулированными неделящимися PBMC *in vitro*

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), включающий

2340 антитело против CD45, описанное в примере 1 (Ab2), оценивали на его способность киллинга стимулированных и нестимулированных первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) *in vitro*. Для

этого исследования Ab2, имеющее модифицированную Fc-область (D265C LALA H435A), конъюгировали с аматоксином 2 (AM2)) с образованием Ab2-AM2.

2345 Криоконсервированные PBMC человека размораживали и разделяли на две части. Половину клеток стимулировали гранулами CD3 CD28 Dyna при соотношении клеток к гранулам 2:1, а другую половину клеток не стимулировали. Обе клетки высевали в 384-луночный планшет по 5000 клеток/лунку и обрабатывали ADC в течение четырех суток, после чего

2350 жизнеспособность клеток измеряли с помощью Cell Titer-Glo.

Результаты, описанные на фиг. 7, показывают, что ADC против CD45 с полезной нагрузкой аматоксина 2 эффективно убивало как нестимулированные (неделящиеся), так и стимулированные (делящиеся) CD45, экспрессирующие PBMC человека *in vitro*. В приведенной ниже таблице 9 представлены

2355 дополнительные данные, определяющие количественные значения EC50, полученные в этом киллинг-анализе клеток.

Таблица 9. Киллинг-анализ ГСК PBMC *in vitro* (стимулированные и нестимулированные) – значения IC50

ADC	Нестимулированные PBMC- IC50	Стимулированные PBMC – IC50	Кратное различие
Ab2-AM2 D265C LALA H435A	1,26E-11	2,66E-10	21

2360

Пример 10. Анализ ADC против CD45 с использованием анализа *in vitro* макрофагов на основе первичных моноцитов

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), включающий антитело против CD45, описанное в примере 1 (Ab6), оценивали в отношении

2365 киллинга *in vitro* первичных макрофагов, происходящих из моноцитов. Для этого исследования Ab6, имеющее модифицированную Fc-область (D265C LALA H435A), конъюгировали с аматоксином 1 (AM1)) с образованием Ab6-AM1.

PBMC человека высевали и дифференцировали с использованием рекомбинантного M-CSF в течение 7 суток. Затем эти клетки поднимали,

2370 оценивали на наличие маркеров макрофагов и высевали в плоскодонный 384-луночный планшет в количестве 5×10^3 клеток/лунку для киллинг-анализа клеток. Клетки обрабатывали 10-точечным разведением Ab6-AM1 в течение

шести суток, после чего их жизнеспособность оценивали с помощью Cell Titer Glo.

2375 Как показано на фиг.8, макрофаги, полученные из моноцитов человека, были чувствительны к киллингу Ab6-AM1.

Пример 11. Анализ стабильности конъюгатов антител против CD45 в сыворотке с использованием киллинг-анализа клеток *in vitro*

2380 Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), включающий антитело против CD45, описанное в примерах 1 и 2 (Ab5), оценивали на его стабильность в сыворотке. Для этого исследования Ab5 конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) для образования ADC.

2385 ADC предварительно инкубировали в сыворотке человека или яванского макака при 37°C в течение 0 или 72 часов. После инкубации в сыворотке ADC титровали и добавляли к клеткам REN в культуральной среде для роста. Клетки инкубировали в течение 7 суток, и оценивали жизнеспособность клеток с помощью Cell-Titer-Glo.

2390 Как показано на фиг. 9, Ab5-AM1 демонстрировал аналогичный киллинг после 72 часов инкубации в сыворотке человека или яванского макака по сравнению с 0 часов, что указывает на стабильность ADC в сыворотке человека и яванского макака.

Пример 12. Анализ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и истощения иммунных клеток *in vivo* с использованием ADC против CD45 с коротким периодом полувыведения у гуманизированных мышей NSG

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) выбранных антител против CD45, идентифицированных в примерах 1 и 2 (Ab2, Ab3, Ab5 и Ab7), оценивали на предмет *in vivo* истощения ГСК и иммунных клеток у гуманизированных мышей NSG (Jackson Laboratories). В этом исследовании Ab2, Ab3, Ab5 и Ab7, имеющие модификации в Fc-области (т. е. аминокислотные замены D265C LALA H435A), были конъюгированы с одним из двух аматоксинов (аматоксин 1 (AM1) или аматоксин 2 (AM2)) для образования ADC (Ab2-AM2, Ab3-AM2, Ab5-AM1, Ab7-AM1). Аминокислотную замену H435A в Fc-области вводили для уменьшения периода полувыведения каждого антитела.

Ab5-AM1 и Ab7-AM1 вводили в виде однократной инъекции 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг гуманизированной мышинной модели. Ab2-AM2 (DAR 1.8) и Ab3-AM2 (DAR 2.0) вводили гуманизированной мышинной модели в виде однократной инъекции 1 мг/кг, 2 мг/кг или 3 мг/кг. Костный мозг собирали на 14-й сутки, и определяли абсолютное количество клеток CD34+ с помощью проточной цитометрии. Кровь также собирали на 7 и 14 сутки и исследовали с помощью проточной цитометрии.

Процент человеческих CD3+ Т-клеток, CD19+ В-клеток и CD33+ миелоидных клеток у обработанных или контрольных обработанных мышей по отношению к исходному уровню показан на фиг. 10А. Гуманизированные мыши NSG, обработанные Ab2-AM2 и Ab3-AM2, показали значительное истощение человеческих CD3+ Т-клеток, CD19+ В-клеток и CD33+ миелоидных клеток по сравнению с исходным уровнем после однократного введения схемы лечения (фиг. 10А). Эти результаты показывают, что Ab2-AM2 и Ab3-AM2 истощают иммунные клетки (миелоидные, Т-клетки и В-клетки).

Кроме того, как показано на фиг. 10В-10Е, гуманизированные мыши NSG, получавшие однократную инъекцию 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг ADC Ab2-AM2, Ab3-AM2, Ab5-AM1 или Ab7-AM1 показали значительное истощение клеток-мишеней CD45 человека, включая ГСК человека, в периферической крови и костном мозге через 14 суток после однократного введения ADC по сравнению с контролем.

Эти результаты показывают, что выбранные ADC против CD45 с коротким периодом полувыведения эффективно истощают клетки-мишени человека на периферии и в костном мозге дозозависимым образом.

Пример 13: Конъюгаты лекарственного средства аматоксина и антитела против CD45 с коротким периодом полувыведения эффективно истощают ГСК и иммунные клетки приматов, отличных от человека, *in vivo*

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) выбранных антител против CD45, описанных в примерах 1 и 2 (Ab4, Ab5 и Ab7), оценивали *in vivo* на истощение ГСК и иммунных клеток у приматов, отличных от человека (NHP). В этом исследовании Ab4, Ab5 и Ab7, имеющие модификации в Fc-области (т. е. аминокислотные замены D265C LALA H435A в Fc-области), конъюгировали с аматоксином 1 (AM1) с образованием ADC (Ab4-AM1, Ab5-AM1, Ab7-AM1). Модификации в Fc-области были введены для уменьшения периода полувыведения каждого антитела.

ГСК NHP и ослабление иммунитета оценивали у самцов яванских макаков в однократных возрастающих дозах (3/группа). Содержание ГСК в костном мозге и иммунодефицит в периферической крови и костном мозге контролировали с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 11A, целевое дозозависимое снижение ($\geq 90\%$ истощения) лимфоцитов наблюдалось в периферической крови через 72 часа после введения ADC против CD45 (Ab5-AM1 и Ab7-AM1 в дозе 0,5 мг/кг или 2 мг/кг). Кроме того, в костном мозге на 7-й сутки после введения ADC против CD45 (Ab4-AM1 в дозе 1 мг/кг и Ab5-AM1 в дозе 0,5 и 2 мг/кг; фиг. 11B) наблюдалось целевое дозозависимое снижение количества лейкоцитов, ГСК и лимфоцитов.

Эти результаты показывают, что ADC против CD45 с коротким периодом полувыведения Ab4-AM1, Ab5-AM1 и Ab7-AM1 демонстрировали эффективную элиминацию ГСК NHP и иммунных клеток *in vivo*.

Пример 14: Анализ фармакокинетики и стабильность в сыворотке конъюгатов антитело-лекарственное средство против CD45 с коротким периодом полувыведения у NHP

Фармакокинетику конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), включающих антитело против CD45, описанное в примере 1 (Ab4), оценивали на приматах, отличных от человека. В этом исследовании Ab4, имеющее модификации в Fc-области (т.е. аминокислотные замены D265C LALA H435A в Fc-области), конъюгировали с одним из двух аматоксинов (аматоксин 1 (AM1) или аматоксин 2 (AM2)) с образованием ADC (Ab4-AM1, Ab4-AM2). Модификации в Fc-области были введены для уменьшения периода полувыведения антитела.

Коммерчески доступный набор ELISA был адаптирован для измерения концентрации лекарственного средства в плазме у самцов яванских макаков. Вкратце, планшеты покрывали захватывающим антителом против IgG человека. Образцы и стандарты (ADC) разводили в пределах динамического диапазона анализа в разбавителе и инкубировали на планшетах. После инкубации планшеты инкубировали с анти-IgG-HRP (для расчета общего количества антител) или с анти-аматоксином-HRP (для расчета ADC). Наконец, добавляли субстрат HRP TMB, а затем стоп-раствор. Интенсивность окраски была прямо пропорциональна количеству связанного IgG (для расчета общего количества антител) или IgG/аматоксина (для расчета ADC).

Как показано на фиг. 12, наложение ФК, основанной на обнаружении антиаматоксина, с ФК, основанной на обнаружении анти-IgG, указывало на то, что ADC был стабилен в сыворотке. Результаты фармакокинетического анализа далее обобщены в Таблице 10. ADC против CD45 быстро выводится с периодом полувыведения 3,2-7,4 часа, что указывает на короткий период полувыведения ADC *in vivo*.

Таблица 10. Сводные данные ФК

ADC	Доза	AUCinf / Доза	Cmax / Доза	Tmax	Период полувыведения	CL	Vss
	(мг/кг)	(ч*кг*мкг/мл/мг)	(кг*мкг/мл/мг)	(ч)	(ч)	(мл/ч/кг)	(мл/кг)
Ab4-AM2	1	136	14,7	0,083	7,40	7,35	81,8

Ab4-AM1	1	96,6	16,5	0,083	3,21	10,4	54,3
---------	---	------	------	-------	------	------	------

Пример 15. Получение гуманизированных моноклональных антител против CD45

2490 CD45 человека (в частности, внеклеточную область CD45 человека RO) использовали для иммунизации крыс с получением антител против CD45 человека. Были созданы клеточные линии, экспрессирующие CD45RO человека, полноразмерный CD45 человека (RABC), RABC яванского макака и CD45 RABC мыши, и связывание 216 клонов антител с CD45 оценивали с
2495 помощью проточной цитометрии.

Были проведены эксперименты по связыванию путем интерферометрии биослоя Octet (BLI) для выявления перекрестно-реактивных mAb. Клоны отбирали на основе способности антитела связывать CD45RO и CD45RABC человека, а также CD45RABC примата, отличного от человека (яванского
2500 макака). Три клон (родительский клон А, родительский клон В и родительский клон С) были идентифицированы как обладающие хорошей перекрестной реактивностью в отношении CD45 RABC человека и приматов, отличных от человека. Последовательности родительских клонов А, В и С описаны в международной публикации № WO 2020/092654 А1 (например, см. SEQ ID NO:
2505 1-30 в WO 2020/092654 А1), которая настоящим включена посредством ссылки во всей ее полноте.

Гуманизацию и созревание аффинности применяли для каждого из трех выбранных перекрестно-реактивных mAb. Было получено 13 гуманизированных клонов из родительского клон А, 11 гуманизированных клонов из
2510 родительского клон В и 5 гуманизированных клонов из родительского клон С.

Гуманизированные клоны и клоны с созревшей аффинностью из родительских клонов А, В и С также тестировали на неспецифичное связывание со смесью мембранных и цитозольных белков с использованием анализа связывания с полиспецифичным реагентом (PSR), в котором
2515 оценивали неспецифичное связывание лизата биотинилированных клеток с каждым антителом. Результаты описаны на фиг. 13. Как показано на фиг. 13, гуманизированные варианты родительского клон А и варианты с созревшей аффинностью имели низкий уровень неспецифичного связывания (о чем свидетельствует низкий показатель PSR). Гуманизированные варианты

2520 родительских клонов В и С обычно имели более высокие уровни неспецифичного связывания. Однако после созревания аффинности были отобраны варианты, которые имели заметно сниженные уровни неспецифичного связывания, сравнимые с уровнями, наблюдаемыми с вариантами клона А (фиг. 13).

2525 Гуманизированные клоны и клоны с созревшей аффинностью впоследствии экспрессировали в виде антител IgG1 и тестировали на связывание и активность против клеток CD45 человека. Степень моновалентного связывания AbA, AbB и AbC с CD45 RABC человека, CD45 RABC яванского макака и CD45RABC макака-резус оценивали с помощью BLI, а
2530 связывание с PBMC человека и яванского макака подтверждали с помощью проточной цитометрии.

В результате этого процесса скрининга были отобраны 3 гуманизированных антитела IgG1 на основе желаемых характеристик, включая перекрестную реактивность с CD45 человека и яванского макака и низкое
2535 неспецифичное связывание. Эти антитела включают AbA (гуманизированный вариант родительского клона А с созревшей аффинностью), AbB (вариант родительского клона В с созревшей аффинностью) и AbC (вариант родительского клона С с созревшей аффинностью). Аминокислотные последовательности варьируемых областей и областей CDR тяжелой и легкой
2540 цепей 3 выбранных антител представлены в таблице 27.

Пример 16. *In vitro* анализ связывания антител против CD45

Гуманизированные антитела против CD45 и антитела с созревшей аффинностью, описанные в примере 15 (AbA, AbB и AbC), исследовали для
2545 определения их характеристик связывания в отношении CD45 человека и их способности перекрестно реагировать с CD45 яванского макака (супо). Для оценки степени моновалентного связывания гуманизированных клонов с CD45 RABC человека и CD45 RABC яванского макака каждый из AbA, AbB и AbC, а
2550 также соответствующие родительские клоны А, В и С, оценивали с помощью интерферометрии биослоя OCTET (BLI).

Вкратце, исследования связывания антител проводили при 25°C в 1x PBS с добавлением 0,1% масс./об. бычьего сывороточного альбумина с PALL

FORTEBIO OCTET RED96 с использованием интерферометрии биослоя (BLI).

2555 Каждое очищенное антитело иммобилизовали на биосенсорах против человеческого Fc (AHQ; PALL FORTEBIO 18-5001) и инкубировали со 100 нМ очищенного человеческого или 300 нМ эктодомена CD45 яванского макака.

2560 Кажущуюся моновалентную аффинность (K_D), кажущуюся скорость ассоциации (K_{ON}) и кажущуюся скорость диссоциации (K_{DIS} или K_{OFF}) определяли путем локального полной подгонки с моделью связывания 1:1, рассчитанной с помощью программного обеспечения для анализа данных FORTEBIO версии 10. K_D , K_{ON} и K_{DIS} для каждого антитела к очищенному эктодомену CD45 человека или яванского макака показаны в таблице 11. Как описано в таблице 11, аффинность связывания гуманизированных клонов AbA и AbB была аналогична аффинности связывания соответствующих родительских клонов A и B, в то время как гуманизированный клон AbC показал более чем 4-кратное улучшение аффинности по сравнению с родительским клоном C. Каждое из выбранных гуманизированных антител AbA, AbB и AbC было способно перекрестно реагировать с CD45 человека и яванского макака.

2570 Кроме того, гуманизированное антитело AbB и антитело с созревшей аффинностью имело значительно улучшенный показатель полиспецифичного связывания (фиг. 13), что указывает на то, что AbB имело значительно более низкое связывание с неспецифичным антигеном по сравнению с родительским клоном B.

2575

ТАБЛИЦА 11. K_D , K_{ON} и K_{DIS} указанных IgG к эктодомену CD45 человека или яванского макака

Антитело	CD45 человека			CD45 яванского макака		
	K_D (M)	K_{ON} (1/Mc)	K_{DIS} (1/c)	K_D (M)	K_{ON} (1/Mc)	K_{DIS} (1/c)
Родительский клон A	2,85E-09	5,19E+04	1,48E-04	2,41E-08	1,12E+04	2,70E-04
AbA	3,60E-09	5,03E+04	1,81E-04	3,41E-08	9,44E+03	3,22E-04
Родительский клон B	5,12E-09	4,13E+04	2,12E-04	2,75E-08	1,34E+04	3,67E-04
AbB	5,46E-09	4,38E+04	2,39E-04	5,15E-08	8,16E+03	4,20E-04

Родительский клон С	1,20E-08	3,31E+04	3,97E- 04	1,08E- 07	9,80E+03	1,06E-03
AbC	2,93E-09	5,08E+04	1,49E- 04	2,53E- 08	1,11E+04	2,82E-04

Пример 17. Активность антител против CD45 в отношении связывания клеток PBMC *in vitro*

Гуманизированные антитела против CD45 и антитела с созревшей аффинностью, описанные в примере 15 (AbA, AbB, AbC), оценивали на связывание с CD45-экспрессирующими клетками. С этой целью первичные мононуклеарные клетки периферической крови человека или яванского макака (супо) в среде для культивирования клеток инкубировали с титрованными дозами антител против CD45 в течение ночи при 37°C. Вкратце, использовали четыре точки концентрации антител против CD45 с максимальной концентрацией 6,25 нМ, которую разводили в 4 раза ниже, чтобы получить логарифмическую фазу кривой доза-ответ. Связанное антитело против CD45 обнаруживали с помощью флуоресцентно меченного вторичного антитела AF488 против IgG человека с использованием проточной цитометрии. IC50 определяли путем подгонки данных с помощью GRAPHPAD PRISM. Изотипический IgG использовали в качестве контроля.

Используя описанный выше способ, определяли активность связывания PBMC гуманизированных клонов AbA, AbB и AbC. Результаты представлены на фиг. 14 и в таблице 12. Как показано на фиг. 14, по сравнению с изотипическим контролем гуманизированные клоны AbA, AbB и AbC показали сильное связывание как с PBMC человека, так и с PBMC яванского макака. Кроме того, как описано на фиг. 14 и в таблице 12, AbA, AbB и AbC связывали CD45 при низкой EC₅₀ в нМ для каждого типа клеток, демонстрируя, таким образом, перекрестно-реактивное связывание с CD45 человека и яванского макака на живых клетках. Однако общий более высокий сигнал связывания наблюдался у PBMC человека по сравнению с PBMC яванского макака.

Таблица 12. Связывание гуманизированных клонов с PBMC человека или яванского макака

Клон	EC50	EC50 человека	Кратность для яванского
------	------	---------------	-------------------------

антитела	яванского макака (нМ)	(нМ)	макака относительно человека
AbA	1,25	0,58	2,2
AbB	1,12	0,67	1,7
AbC	0,88	0,51	1,7

Затем, используя описанный выше способ, связывание гуманизированных клонов AbA, AbB и AbC с PBMC человека и яванского макака сравнивали со связыванием соответствующих родительских клонов А, В и С. Как показано в таблице 13, связывание гуманизированных клонов AbA и AbB с PBMC человека и яванского макака было сходно с таковым для соответствующих родительских клонов А и В, в то время как гуманизированный клон AbC демонстрировал улучшение связывания по сравнению с родительским клоном С.

Таблица 13. Связывание гуманизированных клонов и родительской химеры с PBMC человека или яванского макака

Антитело	EC50 человека (нМ)	EC50 яванского макака (нМ)	Кратность для яванского макака относительно человека
Родительский клон А	0,63	1,92	3,1
AbA	0,78	1,37	1,8
Родительский клон В	0,85	1,52	1,8
AbB	0,76	1,42	1,9
Родительский клон С	0,98	1,98	2,0
AbC	0,64	1,34	2,1
Изотип	н/о	н/о	

Затем, используя описанный выше способ, определяли связывающую активность PBMC Fc-вариантов гуманизированных клонов AbA (т.е. AbA_D265C_LALA_H435A), AbB (т.е., AbB_D265C_LALA_H435A), и AbC (т.е., AbC_D265C_LALA_H435A). Эти антитела содержат замены Fc D265C, L234A/L235A ("LALA") и H435A. Результаты представлены в таблице 14. По сравнению с изотипическим контролем Fc-варианты гуманизированных клонов

показали сильное связывание с PBMC человека и PBMC яванского макака. Кроме того, как показано в Таблице 14, Fc-варианты гуманизированных клонов связывали CD45 при низкой EC_{50} в нМ в каждом типе клеток, демонстрируя, таким образом, перекрестно-реактивное связывание с CD45 человека и яванского макака на живых клетках. Однако общий более высокий сигнал связывания наблюдался у PBMC человека по сравнению с PBMC яванского макака. Таким образом, результаты, описанные в таблице 14, показывают, что модификации D265C, L234A/L235A (LALA) и H435A не влияют на связывание PBMC гуманизированных клонов.

Таблица 14. Связывание Fc-вариантов гуманизированных клонов с PBMC человека или яванского макака

Антитело	EC_{50} яванского макака (нМ)	EC_{50} человека (нМ)	Соотношение яванский макак/человек
AbA_D265C_LALA_H435A	3,4	2,3	1,49
AbB_D265C_LALA_H435A	2,9	2,2	1,36
AbC_D265C_LALA_H435A	3,3	2,2	1,49

Пример 18. Картирование эпитопа AbA

Эпитоп, связанный AbA, картировали с помощью масс-спектрометрии перекрестных связей. Эксперименты по сшиванию позволяют проводить прямой анализ нековалентного взаимодействия с помощью масс-спектрометрии High-Mass MALDI. Путем смешивания образца белка, содержащего нековалентные взаимодействия, со специально разработанной сшивающей смесью ((Bich et al., *Anal Chem* 82:172–179 (2010)), можно специфично обнаружить нековалентный комплекс с высокой чувствительностью, как описано в примере 5 выше.

Для определения эпитопа AbA с высоким разрешением белковый комплекс инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному расщеплению. Белковый комплекс представлял собой вариант антитела AbA (имеющий тот же эпитоп, что и AbA), связанный с CD45 человека. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-

LTQ-Orbitrap MS), а полученные данные анализировали с использованием
 2655 программного обеспечения XQUEST и STAVROX.

После протеолиза трипсином, химотрипсином, ASP-N, эластазой и
 термолизином белкового комплекса CD45/AbA с дейтерированным d0d12,
 анализ nLC-orbitrap MS/MS показал, что эпитоп AbA включает остатки в
 пептидах RNGPHERYHLEVEAGNT (SEQ ID NO:118) и, в частности,
 2660 взаимодействует с аминокислотами на CD45 человека, соответствующими
 486R, 493Y и 502T в SEQ ID NO:113 (фрагмент изоформы CD45,
 соответствующий NP_002829.3). Эти результаты проиллюстрированы на фиг.
 15. Фиг. 15 описывает аминокислотный фрагмент, содержащий эпитоп AbA, в
 частности, область RNGPHERYHLEVEAGNT (SEQ ID NO:118).

2665 Основываясь на настоящих результатах, AbA взаимодействует с
 доменом фибронектина d4 CD45, который является консервным среди
 альтернативно сплайсированных изоформ CD45 (например, RO, RA, RB, RC,
 RABC и т. д.). Остатки 493Y и 502T эпитопа AbA сохраняются в CD45 человека,
 яванского макака и макака-резус, что согласуется с межвидовой реактивностью
 2670 AbA.

Пример 19. Интернализация Fc-варианта AbA (AbA_D265C_LALA_H435A) ADC

2675 Fc-вариант AbA («AbA_D265C_LALA_H435A») конъюгировали с
 аматоксином (AM1) с образованием конъюгата антитело-лекарственное
 средство (ADC) («AbA_D265C_LALA_H435A-AM1»). Интернализирующую
 способность AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 оценивали в анализе
 интернализации антител *in vitro*.

Для этого анализа ADC против CD45 конъюгировали с красителем rHAb.
 2680 После интернализации конъюгированное антитело/ADC перемещается в
 кислую эндосому/лизосому, где краситель rHAb может быть обнаружен с
 помощью проточной цитометрии в канале PE, как описано выше. Используя
 этот способ, интернализацию ADC аматоксина AbA_D265C_LALA_H435A
 оценивали *in vitro* с использованием CD34+ клеток костного мозга человека.

2685 CD34+ клетки костного мозга человека инкубировали на льду в течение
 двух часов с насыщающей концентрацией ADC в течение 0, 2, 24, 48 или 72
 часов. Уровень rHAb (измеренный с помощью gMFI) оценивали с течением

времени. По истечении времени молекулу анти-IgG, меченную флуорофором, использовали для оценки связанного поверхностного IgG1 человека (hIgG1) с помощью проточной цитометрии. Изотипический IgG, конъюгированный с аматоксином 1 (изотип-AM1), который не связывается с клетками CD34+ человека, был включен в качестве неинтернализующего контроля. Поскольку момент времени 0 ч представляет собой насыщенное связывание CD45, процент интернализированного ADC рассчитывали путем сравнения срезоток геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI) связанного поверхностного IgG в каждый момент времени с gMFI того же ADC в 0 часов. Результаты представлены на фиг. 16.

Как показано на фиг. 16, уровень обнаруженных pHAb в клетках со временем увеличивался (фиг. 16, левая панель), что соответствовало увеличению процента интернализации ADC с течением времени (фиг. 16, правая панель). Процент интернализации AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 ADC был заметно выше по сравнению с таковым для конъюгата «изотип-AM1», что указывает на то, что AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 интернализуется CD34+ клетками костного мозга человека, в то время как изотипический контроль не интернализуется.

Пример 20. Анализ ADC CD45 с использованием киллинг-анализов клеточных линий *in vitro*

Fc-варианты AbA (например, AbA_D265C_LALA_H435A, AbA_D265C_LALA_IHH и AbA_S239C_LALA_IHH) конъюгировали с пирролобензодиазепином (PBD) или с одним из двух аматоксинов, т. е. аматоксином 1 (AM1) или аматоксином 2 (AM2), с образованием следующих ADC: AbA_D265C_LALA_IHH-PBD, AbA_S239C_LALA_IHH-PBD, AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2. В следующем примере описаны киллинг-анализы клеток *in vitro* для проверки способности этих ADC к киллингу CD45-положительных линий раковых клеток, таких как SKNO-1 (клеточная линия острого миелоидного лейкоза JCRB1170), Jurkat (клеточная линия острого Т-клеточного лейкоза, ATCC No. TIB-152) и REH-1 (клеточная линия В-клеточной неходжкинской лимфомы, ATCC № CRL-3004) *in vitro*.

Для киллинг-анализа *in vitro* с использованием клеточных линий SKNO-1, Jurkat и REH-1 клетки выращивали в соответствии с рекомендациями ATCC. Более конкретно, клетки культивировали (в среде RPMI-1640 (1X) с добавлением 10% FBS и 1% Pen-Strep) в течение семи суток в присутствии ADC CD45 (например, AbA_D265C_LALA_IHH-PBD, AbA_S239C_LALA_IHH-PBD, AbA_D265C_LALA_H435A-AM1) или AbA_D265C_LALA_H435A-AM2), или конъюгата «изотипический контроль-ADC», то есть изотипического IgG1, конъюгированного с аматоксином («изотип-AM»), или изотипического IgG1, конъюгированного с PBD («изотип-PBD»). Жизнеспособность клеток затем измеряли с помощью анализа CELL-TITER GLO, который измеряет содержание аденозинтрифосфата (АТФ), соответствующее живым клеткам. Процент живых клеток (ось ординат) измеряли с помощью CELL-TITER GLO (CTG) в зависимости от концентрации антител (ось абсцисс). После киллинг-анализа клеточной линии количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC50 с использованием GRAPHPAD PRISM. Результаты описаны в таблице 15.

Как описано в Таблице 15, каждый из различных протестированных ADC против CD45 был эффективен в отношении киллинга экспрессирующих CD45 клеточных линий (т.е. клеточных линий SKNO-1, Jurkat и REH-1) *in vitro*.

Таблица 15. Киллинг-анализы клеточных линий *in vitro*

	SKNO-1 (Пассаж 8.1)		Jurkat		REH (Пассаж 6.1)	
		% Эфф екти внос ти		% Эфф екти внос ти		% Эфф екти внос ти
ADC	IC50		IC50		IC50	
AbA_D265C_LALA_IHH-PBD	8,185E-10	99,0	3,60E-10	99,8	4,20E-11	100,0
AbA_S239C_LALA_IHH-PBD	7,142E-10	99,2	3,70E-10	99,6	4,0E-11	99,9
«Изотип-PBD»	9,624E-09	99,5	1,20E-08	98,9	3,80E-09	99,8
AbA_D265C_LALA_H435A-AM2	6,071E-10	98,8	4,2E-10	99,5	1,20E-10	99,8
AbA_D265C_LALA_H435A-AM1	1,365E-09	75,0	1,10E-09	98,0	3,60E-10	98,6
«Изотип-AM»				-17,0		-1,7
Холостой				-15,3		-5,1

Пример 21. Анализ ADC CD45 с использованием киллинг-анализов PBMC *in vitro*

2745 Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) гуманизированных антител против CD45, описанных в примере 15, оценивали на способность к киллингу первичных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) *in vitro*.

2750 Fc-вариант AbA, AbA_D265C_LALA_H435A, был конъюгирован с аматоксинами AM1 или AM2 с образованием ADC AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 и AbA_D265C_LALA_H435A-AM2. Способность этих ADC к киллингу первичных PBMC человека или яванского макака оценивали с помощью киллинг-анализов PBMC *in vitro*. PBMC представляют собой экспрессирующие CD45 клетки, состоящие из гетерогенной клеточной популяции лимфоцитов (Т-клетки, В-клетки, природные клетки-киллеры) и моноцитов. Для киллинг-анализа *in vitro* с использованием PBMC человека или яванского макака, PBMC культивировали в среде RPMI-1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой в течение семи суток в присутствии ADC CD45 или конъюгата «изотипический контроль-ADC», т.е. изотипического антитела IgG1, конъюгированного с AM1 (2755 «изотип-AM1»), или изотипического IgG1, конъюгированного с AM2 («изотип-AM2»). Затем жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа CELL-TITER GLO (CTG). После киллинг-анализа PBMC количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC50 с использованием GRAPHPAD PRISM. Результаты описаны на фиг. 17A-17B, в таблице 16 и (2760 таблице 17.

2765 Как описано на фиг. 17A-17B, в таблице 16 и таблице 17, каждый из AM1-конъюгированных или AM2-конъюгированных ADC против CD45 был эффективен в отношении киллинга PBMC человека и яванского макака *in vitro*. В таблицах 16 и 17 ниже предоставлены дополнительные данные, относящиеся (2770 к количественной оценке киллинг-анализа клеток. Как видно из фиг. 17A-17B, в таблице 16 и таблице 17, PBMC человека и яванского макака были одинаково чувствительны к ADC CD45, конъюгированному с AM1, и ADC CD45, конъюгированному с AM2.

2775 **ТАБЛИЦА 16.** Киллинг-анализы PBMC *in vitro*: ADC, конъюгированные с AM1

ADC	PBMC человека	PBMC яванского макака
-----	---------------	-----------------------

	IC50	% Эффективн ости	IC50	% Эффективн ости
AbA_D265C_LALA_H435A-AM1	1,2E-11	99,0	2,3E-11	97,4
«Изотип-AM1»		33,8		29,8

ТАБЛИЦА 17. Киллинг-анализы PBMC *in vitro*: ADC, конъюгированные с AM2

ADC	IC50 PBMC яванского макака (M)	IC50 PBMC человека (M)
AbA_D265C_LALA_H435A-AM2	8,0E-13	5,0E-13
«Изотип-AM2»	1,0E-7	1,0E-7

Кроме того, Fc-вариант AbA был конъюгирован с PBD (AbA_D265C_LALA_IHH-PBD), а Fc-вариант AbC был конъюгирован с AM1 (AbC_D265C_LALA_H435A-AM1). Оценивали способность этих ADC вместе с ADC, описанными в предыдущих параграфах (AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 и AbA_D265C_LALA_H435A-AM2), к киллингу первичных PBMC человека и линии клеток REN. Результаты представлены в таблице 18 ниже.

Как описано в таблице 18, ADC, конъюгированные с PBD, проявляли более высокую эффективность в отношении клеток REN, в то время как ADC, конъюгированные с AM1 или AM2, проявляли более высокую эффективность в отношении PBMC.

ТАБЛИЦА 18. Киллинг-анализы клеток *in vitro* ADC, конъюгированные с AM1, AM2 или PBD

Гуманизированные ADC	Полезная нагрузка	REN IC50 (M)	IC50 PBMC человека (M)
AbA_D265C_LALA_H435A-AM2	AM2	1,6E-10	3,3E-11
AbA_D265C_LALA_H435A-AM1	AM1	7,1E-10	1,2E-11
AbC_D265C_LALA_H435A-AM1	AM1	4,2E-10	6,5E-11
AbA_D265C_LALA_IHH-PBD	PBD	4,2E-11	5,3E-08

Затем конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) гуманизированных антител против CD45, описанные в примере 15, тестировали

на способность уничтожать стимулированные и нестимулированные первичные PBMC человека *in vitro*. Кримоконсервированные PBMC человека размораживали и разделяли на две части. Половину клеток стимулировали гранулами CD3 CD28 DYNA BEADS при соотношении клеток к гранулам 2:1, а другую половину клеток не стимулировали. Как стимулированные, так и нестимулированные клетки высевали в 384-луночный планшет в концентрации 5000 клеток на лунку и обрабатывали ADC CD45 (AbA_D265C_LALA_H435A-AM2) или конъюгатом «изотипический контроль-ADC» («Изотип-AM2») в различных концентрациях в течение 4 суток, после чего жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа CELL TITER-GLO (CTG). После киллинг-анализа клеток количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC50 с использованием GRAPHPAD PRISM. Репрезентативные результаты описаны в таблице 19.

Как описано в Таблице 19, AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 эффективно уничтожает как нестимулированные (неделящиеся), так и стимулированные (делящиеся) CD45-экспрессирующие PBMC человека *in vitro*.

ТАБЛИЦА 19. Киллинг-анализы PBMC *in vitro*: ADC, конъюгированные с AM1, PBD или IGN

CD45 ADC	IC50		
	Нестимулированные	Стимулированные	Кратное различие
AbA_D265C_LALA_H435A-AM2	1,73E-11	5,38E-10	31

Пример 22. Анализ ADC CD45 с использованием киллинг-анализов ГСК *in vitro*

Затем конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) выбранных антител IgG против CD45 человека, описанных в примере 15, тестировали на способность к киллингу гемопоэтических стволовых клеток человека (ГСК) *in vitro*.

Fc-варианты AbA конъюгировали с AM1, AM2 или PBD с образованием ADCs AbA_D265C_LALA_H435A-AM1, AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 и AbA_D265C_LALA_IHH-PBD соответственно. Оценивали способность этих ADC

к киллингу ГСК костного мозга человека (BM). CD34+ клетки BM человека культивировали в среде SFEM с SCF, IL-6, FLT3 и TPO в течение 5 суток в присутствии одного из вышеуказанных ADC или в присутствии конъюгата «изотипический контроль-ADC», содержащего изотипическое контрольное антитело, связанное с AM1 (изотип-AM1), AM2 («изотип-AM2») или PBD («изотип-PBD»). Жизнеспособность CD34+CD90+ ГСК BM человека измеряли с помощью 7-AAD. После киллинг-анализа клеток количественно определяли уровень цитотоксичности и рассчитывали значения IC50 с использованием GRAPHPAD PRISM. Результаты описаны на фиг. 18, на которой представлены репрезентативные результаты, показывающие киллинг человеческих CD34+CD90+BM ГСК с помощью ADC AbA, конъюгированных с AM1, AM2 или PBD. Значения IC50 представлены в таблице 20 и таблице 21.

Эти результаты подтверждают, что ADC AbA эффективно убивают ГСК костного мозга человека.

ТАБЛИЦА 20. Киллинг-анализ BM ГСК *in vitro*: ADC, конъюгированные с AM1 или PBD

ADC	CD34+CD90+	
	IC50	% Эффективности
AbA_D265C_LALA_IHH-PBD	2,94E-11	99,5
«Изотип-PBD»	1,69E-09	99,7
AbA_D265C_LALA_H435A-AM1	3,72E-10	86,5
«Изотип-AM1»	N/O	25,2

ТАБЛИЦА 21. Киллинг-анализ BM ГСК *in vitro*: ADC, конъюгированные с AM2

ADC	DAR	CD34CD90 (IC50 пМ)
AbA_D265C_LALA_H435A-AM2	2,2	280
«Изотип-AM2»	2	

Пример 23. Анализ ADC CD45 с использованием *in vitro* анализов первичных макрофагов, полученных из моноцитов (MDM)

Затем конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий Fc-вариант AbA, конъюгированный с AM1 (AbA_D265C_LALA_H435A-AM1),

тестировали на способность к киллингу макрофагов, происходящих из моноцитов человека (MDM), *in vitro*. Вкратце, PBMC человека высевали и дифференцировали с использованием рекомбинантного M-CSF в течение 7 суток. Затем эти клетки поднимали, оценивали на наличие маркеров макрофагов и высевали в плоскодонный 384-луночный планшет в концентрации 5×10^3 клеток/лунку для киллинг-анализа C100. Затем клетки обрабатывали 10-точечными разведениями CD45 ADC (т. е. AbA_D265C_LALA_H435A-AM1) или конъюгатом «изотипический контроль-ADC», т. е. изотипического IgG1, конъюгированного с аматоксином 1 («изотип-AM1»), в течение 7 суток, после чего их жизнеспособность оценивали с помощью анализа CELL TITER GLO (CTG). Результаты представлены на фиг. 19.

Как показано на фиг. 19, MDM человека были чувствительны к киллингу посредством AbA_D265C_LALA_H435A-AM1.

Пример 24. *In vivo* эффективность анти-CD45-PBD ADC на гуманизированной мышинной модели NSG

В этом примере оценивали конъюгат антитела против CD45 с лекарственным средством (ADC), содержащий антитело, способное специфично связывать CD45 человека (AbA), конъюгированное с цитотоксином PBD (тезирин), который оценивали в этом примере («CD45-PBD»). Антитело против CD45 в ADC включало аминокислотные замены L234A L235A D265C и H435A в Fc-области.

CD45-PBD оценивали на его способность истощать лимфоциты периферической крови, ГСК костного мозга (BM) или зрелые одиночные положительные (SP) тимоциты у гуманизированных мышей NSG (фиг. 20). Мышам hNSG вводили указанные разовые дозы либо носителя (PBS), либо изотипического контрольного антитела, конъюгированного с PBD («Iso-PBD»), либо CD45-PBD. CD45-PBD вводили мышам в разовой дозе 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг ADC. Iso-PBD вводили мышам в разовой дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг ADC.

Периферическую кровь собирали в Сутки 0, Сутки 7 и Сутки 14, и оценивали общее содержание гемопозитических клеток человека ($h\beta_2M^+$), содержание миелоидных клеток ($CD33^+$), содержание В-клеток ($CD19^+$) и

содержание Т-клеток (CD3⁺). Результаты исследований периферической крови представлены на фиг. 20. Эти результаты показывают, что дозозависимое истощение клеток человека достигалось в периферической крови при переносимых дозах CD45-PBD. Дозы CD45-PBD, превышающие или равные 3 мг/кг, не были переносимыми.

Для оценки истощения костного мозга образцы костного мозга собирали у мышей на 14-й сутки после лечения и оценивали на содержание человеческих клеток-предшественников/ГСК. Результаты исследований костного мозга описаны на фиг. 21 и представлены в виде процентного содержания человеческих клеток («Процент») или абсолютного числа клеток на бедренную кость («Подсчет»). Эти результаты показали, что CD45-PBD опосредует целенаправленное, дозозависимое и глубокое истощение человеческих клеток-предшественников и ГСК в костном мозге после лечения CD45-PBD. Конъюгат «изотип-PBD» имел значительную платформенную токсичность в костном мозге при повышенных дозах 3 мг/кг и 6 мг/кг.

Затем оценивали истощение двойных положительных (DP) тимоцитов и зрелых одиночных положительных (SP) тимоцитов с помощью CD45-PBD. Мышей hNSG рандомизировали и обрабатывали возрастающими дозами конъюгата «изотип-PBD», CD45-PBD или носителя (PBS). Результаты исследования истощения тимоцитов показаны на фиг. 22. У животных, получавших CD45-PBD, наблюдалось дозозависимое истощение клеток CD45+ человека и двойных положительных (DP) тимоцитов человека. Неполное целенаправленное истощение зрелых тимоцитов CD4 и CD8 SP наблюдалось при переносимых дозах CD45-PBD. Истощение двойных положительных (DP) тимоцитов, наблюдаемое при повышенных дозах конъюгата «изотип-PBD», согласуется с известной платформенной токсичностью PBD.

Пример 25: *In vivo* эффективность анти-CD45-IGN ADC на гуманизированной мышинной модели NSG

В этом примере оценивали конъюгат антитела против CD45 с лекарственным средством (ADC), содержащий антитело, способное специфично связывать CD45 человека (AbA), конъюгированное с цитотоксином IGN (DGN549), который оценивали в этом примере («CD45-IGN»). Антитело

2915 против CD45 в ADC включало аминокислотные замены L234A L235A D265C и H435A в Fc-области.

Мышам hNSG вводили разовые дозы либо носителя (PBS), либо изотипического контрольного антитела, конъюгированного с IGN («Iso-IGN»), либо CD45-IGN. CD45-IGN вводили мышам в разовой дозе 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3
2920 мг/кг или 6 мг/кг ADC. Iso-IGN вводили мышам в разовой дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг ADC.

Периферическую кровь собирали в Сутки 0, Сутки 7 и Сутки 14, и оценивали общее содержание гемопозитических клеток человека ($h\beta_2M^+$), содержание миелоидных клеток ($CD33^+$), содержание В-клеток ($CD19^+$) и
2925 содержание Т-клеток ($CD3^+$). Результаты исследований периферической крови представлены на фиг. 23. Эти результаты показывают, что дозозависимое истощение клеток человека было достигнуто в периферической крови после введения однократной дозы CD45-IGN. CD45-IGN хорошо переносился во всех испытанных дозах.

Истощение костного мозга оценивали путем сбора образцов костного мозга у мышей на 14-й сутки после обработки. Образцы оценивали на содержание человеческих клеток-предшественников/ГСК. Результаты исследований костного мозга описаны на фиг. 24 и представлены в виде процентного содержания человеческих клеток («Процент») или абсолютного
2935 числа клеток на бедренную кость («Подсчет»). Эти результаты показали, что CD45-IGN опосредует целенаправленное, дозозависимое и глубокое истощение человеческих клеток-предшественников и ГСК в костном мозге после лечения CD45-IGN. «Изотип-IGN» не оказывал значительного эффекта ни в одной тестируемой дозе.

Также оценивали истощение двойных положительных (DP) тимоцитов и зрелых одиночных положительных (SP) тимоцитов с помощью CD45-IGN. Мышей hNSG рандомизировали и обрабатывали возрастающими дозами конъюгата «изотип-IGN», CD45-IGN или контрольного носителя (PBS). Результаты исследования истощения тимоцитов показаны на фиг. 25. У
2945 животных, получавших CD45-IGN, наблюдалось дозозависимое истощение клеток CD45+ человека и двойных положительных (DP) тимоцитов человека. Кроме того, нацеливание через CD45-IGN приводило к более глубокому истощению тимоцитов CD4 и CD8 SP по сравнению с конъюгатом «изотип-IGN»

2950 в соответствующих дозах, демонстрируя, что ADC CD45-IGN обеспечивают надежное и целенаправленное истощение тимоцитов человека.

Пример 26. CD45 ADC истощают ГСК и иммунные клетки приматов, отличных от человека, (NHP) *in vivo*

2955 Конъюгат антитело-лекарство против CD45 (ADC), содержащий антитело, способное специфично связывать человеческий CD45 (AbA), тестировали на способность истощать гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и иммунные клетки приматов, отличных от человека, (NHP) *in vivo*. Fc-вариант AbA, содержащий модификацию H435A в Fc-области для уменьшения времени полувыведения (AbA_D265C_LALA_H435A), был конъюгирован с аматоксином

2960 AM1 или аматоксином AM2 с образованием CD45 ADCs AbA_D265C_LALA_H435A-AM1 ("CD45 ADC-AM1") и AbA_D265C_LALA_H435A-AM2 ("CD45 ADC-AM2"), соответственно. Эффективность этих CD45 ADC в отношении истощения ГСК и иммунных клеток была протестирована в NHP *in vivo*.

2965 Самцам яванских макаков вводили однократную инъекцию 1 мг/кг CD45 ADC-AM1, CD45 ADC-AM2 или контрольного носителя (PBS). Содержание ГСК в костном мозге и истощение иммунных клеток в периферической крови контролировали с помощью проточной цитометрии в указанные моменты времени. Гематологические и клинические биохимические показатели

2970 оценивались на протяжении всего исследования. Результаты представлены на фиг. 26.

Как показано на фиг. 26, целенаправленное истощение лейкоцитов, ГСК и лимфоцитов наблюдалось в BM NHP после обработки CD45 ADC. В заключение, ADC CD45 ADC-AM1 и CD45 ADC-AM2, содержащие AbA с

2975 модификациями в Fc-области для уменьшения периода полувыведения антитела, продемонстрировали сильную элиминацию ГСК NHP и иммунных клеток *in vivo*.

Пример 27. Фармакокинетический анализ и стабильность CD45 ADC в сыворотке у NHP

2980

ADC, содержащие антитело AbA против CD45, тестировали для оценки стабильности в сыворотке и фармакокинетики у приматов, отличных от

человека. Коммерчески доступный набор ELISA был адаптирован для измерения концентрации лекарственного средства CD45 ADC-AM1 и CD45
2985 ADC-AM2 (описано в примере 26) в плазме у самцов яванских макаков.

Вкратце, планшеты для ELISA покрывали захватывающим антителом против IgG человека. Образцы плазмы и стандарты (CD45 ADC) разводили в пределах динамического диапазона анализа в разбавителе и инкубировали на планшетах. После инкубации планшеты инкубировали с анти-IgG-HRP (для
2990 расчета общего количества антител) или с анти-аматоксином-HRP (для расчета CD45 ADC). Наконец, добавляли субстрат HRP TMB, а затем стоп-раствор. Интенсивность окраски была прямо пропорциональна количеству связанного IgG (для расчета общего количества антител) или IgG/аматоксина (для расчета CD45 ADC, конъюгированного с AM1 или AM2). Результаты описаны на фиг. 27
2995 и в таблице 22.

Наложение ФК, основанной на обнаружении анти-аматоксина, с ФК, основанной на обнаружении анти-IgG, указывает на то, что ADC были стабильны в сыворотке *in vivo* у NHP. ADC CD45 быстро выводились с периодом полувыведения 3,79-14,4 ч, что указывает на то, что ADC CD45
3000 имели короткий период полувыведения *in vivo*.

ТАБЛИЦА 22. Средняя ФК CD45 ADC

ADC	Доза	AUCinf / Доза	Cmax / Доза	Tmax	Период полувыведения	CL	Vss
	(мг/кг)	(ч*кг*мкг/мл/мг)	(кг*мкг/мл/мг)	(ч)	(ч)	(мл/ч/кг)	(мл/кг)
CD45 ADC-AM2	1	143	22,9	0,083	14,4	8,20	76,8
CD45 ADC-AM1	1	122	18,7	0,083	3,79	8,46	44,2

Пример 28. Однократная доза AbA-AM оказывает циторедуктивное действие на опухоли, полученные у пациента, и продлевает
3005 выживаемость за пределы стандартов лечения в нескольких доклинических моделях гематологических злокачественных новообразований

Подход нацеливающего конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), описанный в данном примере, предназначен для повышения безопасности текущих протоколов подготовки путем специфического истощения клеток CD45+. В этом исследовании применяли ADC с коротким периодом полувыведения, направленный против CD45 человека, содержащий AbA, конъюгированный с аматоксином (AbA-AM1). CD45 может быть мишенью для подготовки allo-HSCT, поскольку он экспрессируется на всех гемопоэтических клетках (кроме эритроцитов, плазматических клеток и тромбоцитов) и на большинстве гематологических злокачественных новообразований. Учитывая их направленную специфичность, анти-CD45-AM может обеспечить двойную пользу для пациентов с лейкозом, сочетая эффективную подготовку для HSCT с истощением опухолевых клеток, несущих мишени.

Чтобы продемонстрировать, что AbA-AM обладает антилейкозной активностью, ADC тестировали на мышинных моделях ксенотрансплантатов с лейкозом человека. Группа моделей была оценена для имитации не подвергавшегося лечению и рефрактерного заболевания: модели ксенотрансплантата (PDX), полученные от пациентов с AML (от пациентов, ранее не получавших лечение, и пациентов с рецидивом после аллогенной HCT; все FLT-3+NPM1+), BCE клетки из иммортализованной клеточной линии (REH- Luc) и модель ксенотрансплантата пациента (PDX) T-ALL (от пациента с прогрессирующим заболеванием после химиотерапии DHAP).

AML № 1 был получен от пациента, ранее не получавшего лечения (J000106134), а AML № 2 был получен от получавшего предварительное лечение пациента с рецидивом тяжелой формы после аллогенной HSCT (J000106132), T-ALL был получен от пациента с прогрессированием после химиотерапии DHAP. ALL, полученный из клеточной линии, трансдуцировали для экспрессии люциферазы светлячка. Клетки каждого типа опухоли системно инокулировали иммунодефицитным мышам (NSG-SGM3 или NSG).

Лечение начинали, когда периферическая опухолевая нагрузка PDX (n=3-5/группа) и CDX у мышей достигала 2-16% бластов в периферической крови или на 5-й сутки после имплантации для модели REH-luc (n=10/группа). Разовые дозы анти-CD45-ADC (1, 3, 6 или 10 мг/кг) сравнивали с носителем (PBS) или конъюгатом «изотип-AM1» (6 или 10 мг/кг) и сравнивали с клинически подтвержденным стандартом схемы лечения Ara-c (30 мг/кг QDx5, в/в),

дексаметазона (5 мг/кг Q3Dx9, в/б) или доксорубицина (3 мг/кг QWx3, в/в). Опухолевая нагрузка в ходе исследования показана на фиг. 28.

3045 В модели ALL человека, полученной из модельной клеточной линии REN-люциферазы (CDX), однократные дозы AbA-AM1 хорошо переносились и оказывали циторедуктивное действие, что приводило к задержке роста опухоли и увеличению сресуток выживаемости как минимум вдвое (в 2,2-2,8 раза) по сравнению с носителем (PBS), конъюгатом «изотип-AM1» или стандартом лечения (SoC) доксорубицином (фиг. 28; нижняя левая панель и фиг. 29B). Как

3050 показано на фиг. 29A и в таблице 23, однократная инъекция AbA-AM1 (1, 3 или 10 мг/кг) на 5-й сутки после инокуляции ALL приводила к увеличению выживаемости в среднем на 55-66 суток по сравнению с обработанными PBS или контролем или конъюгатом «изотип-ADC», и аналогичен доксорубицину,

3055 который используется в клинической практике в качестве стандарта лечения для ALL (n=10 мышей/группа). Сигнал биолюминесценции измеряли с помощью системы визуализации IVIS (PerkinElmer). Свечение (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего) регистрировали в течение времени исследования. Репрезентативные псевдоцветные изображения сигнала

3060 биолюминесценции были получены на 22-23 сутки после имплантации для всех групп обработки, как показано на фиг. 29C.

Таблица 23. Медианная выживаемость в модели ксенотрансплантата REN-люциферазы ALL

Группы обработки		Медианная выживаемость (Дни после имплантации)
PBS		23 [‡]
3 мг/кг QWx3 Доксорубицин		50 [†]
1 мг/кг	CD45-ADC (AbA-AM)	49 [†]
3 мг/кг		52 [†]
10 мг/кг		66 ^{†‡}
10 мг/кг		24 [‡]

3065 логарифмический ранговый критерий $^{\dagger}p \leq 0,001$ по сравнению с PBS или конъюгатом «изотип-ADC»; $^{\ddagger}p < 0,05$ по сравнению с доксорубицином

В модели ксенотрансплантата, полученного от пациента (PDX) T-ALL,

однократная инъекция CD45-ADC с коротким периодом полувыведения (AbA-AM1 в дозе 3 или 6 мг/кг) на 5-й сутки после прививки T-ALL приводила к увеличению выживаемости, в среднем 66-67 суток по сравнению с контрольными животными, обработанными PBS (28 суток), или конъюгатом «изотип-ADC» (28 суток), или дексаметазоном (47 суток, n=5 мышей/группу; фиг. 30А и таблица 24). Кроме того, как показано на фиг. 30В, лечение AbA-AM1 значительно снижало периферическую опухолевую нагрузку, что приводило к замедлению роста опухоли по сравнению с носителем, конъюгатом «изотип-ADC» и сравнимо с двумя клинически подтвержденными стандартами лечения (Ara-C и дексаметазон соответственно) в модели T-ALL PDX. Эти результаты показывают, что лечение однократной дозой CD45-ADC с коротким периодом полувыведения снижает количество клеток периферического лейкоза, что приводит к задержке роста опухоли и приводит к удвоению медианы выживаемости.

Таблица 24. Медианная выживаемость в модели T-ALL PDX

Группы обработки		Медианная выживаемость (Дни после имплантации)
PBS		28 ^{†‡}
30 мг/кг QDx5 AraC		77* [†]
5 мг/кг Q3Dx9 Дексаметазон		47* [‡]
3 мг/кг	CD45-ADC (AbA-AM)	66* [†]
6 мг/кг		67* [†]
6 мг/кг	«Изотип-ADC»	28* ^{†‡}

логарифмический ранговый критерий $p \leq 0,009$ по сравнению с *PBS или конъюгатом «изотип-ADC»; †Дексаметазон; ‡ по сравнению с Ara-C

В моделях ксенотрансплантатов (PDX) пациентов с AML, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения, и пациентов с рецидивом после аллогенной НСТ, лечение начинали, когда на периферии обнаруживалось 2–16% бластов (n = 3–5 мышей/группа/модель AML PDX). Мышам вводили однократную внутривенную дозу анти-человеческого CD45-ADC (AbA-AM), конъюгата «изотип-ADC» или носителя (PBS). Ara-c вводили внутривенно один раз в сутки в течение пяти суток подряд. Как показано на фиг. 31А и 31В (и

3095 таблицы 25 и 26), мыши PDX AML, получавшие однократную внутривенную
 дозу ADC (анти-CD45-ADC (AbA-AM), конъюгат «изотип-ADC»), носитель (PBS),
 в результате демонстрировали более длительное выживание реципиентов
 анти-CD45-ADC по сравнению с контролями PBS. Далее, как показано на фиг.
 3100 31C и 31D, однократная доза CD45-ADC с коротким периодом полувыведения
 эффективно снижает опухолевую нагрузку клеток острого миелоидного лейкоза
 человека в двух моделях ксенотрансплантатов, полученных от пациентов, по
 сравнению с носителем (PBS) или конъюгатом «изотип-ADC», и была сравнима
 с клинически утвержденной стандартной схемой лечения (Ara-c).

3105 **Таблица 25.** Медианная выживаемость в модели PDX (AML #1)

Группы обработки		Медианная выживаемость (Дни после имплантации)
PBS		76 [‡]
30 мг/кг QDx5 Ara-C		97 [†]
3 мг/кг	CD45-ADC	150 ^{†‡}
10 мг/кг		151 ^{†‡}
10 мг/кг	«Изотип-ADC»	84 [‡]

логарифмический ранговый критерий [†] p<0,02 по сравнению с PBS или
 конъюгатом «изотип-ADC»; [‡] p<0,005 по сравнению с Ara-C

Таблица 26. Медианная выживаемость в модели PDX (AML #2)

Группы обработки		Медианная выживаемость (Дни после имплантации)
PBS		45 ^{†*}
30 мг/кг QDx5 Ara-C		60 ^{†‡}
3 мг/кг	CD45-ADC	55 [†]
10 мг/кг		83 ^{†‡*}
10 мг/кг	«Изотип-ADC»	49 ^{†*}

3110 логарифмический ранговый критерий [†] p<0,008 по сравнению с PBS; [‡] p<0,008
 по сравнению с конъюгатом «изотип-ADC»; ^{*} p<0,012 по сравнению с Ara-C.

Эти результаты продемонстрировали, что однократное введение CD45-
 ADC с коротким периодом полувыведения (AbA-AM) хорошо переносится и

3115 способно снижать опухолевую нагрузку за счет мощного нацеливания на лейкозные клетки в нескольких моделях ксенотрансплантатов (ALL, T-ALL, AML) и значительно увеличивает среднюю выживаемость установленных моделей ксенотрансплантатов лейкоза (клеточная линия и полученная от пациента) по сравнению с контролем и клинически подтвержденными стандартами лечения.

3120 Лечение AbA-AM в PDX AML и T-ALL значительно уменьшило периферическую опухолевую нагрузку, что привело к задержке роста опухоли по сравнению с носителем, конъюгатом «изотип-AM» и сравнимо с двумя клинически подтвержденными стандартами лечения (Ara-C и дексаметазон соответственно; фиг. 28). Поскольку ADC был разработан для показаний к трансплантации, он имел уменьшенный период полувыведения по сравнению с контрольными антителами дикого типа (16 часов против 79 часов).

3125 Эти данные в моделях гуманизированных мышинных ксенотрансплантатов демонстрируют, что AbA-AM ADC с коротким периодом полувыведения является мощным направленным противолейкозным средством. Эти негенотоксичные ADC могут быть полезны для снижения нагрузки болезни и индукции длительных ремиссий у пациентов после трансплантации, особенно у тех, кто получает подготовку с пониженной интенсивностью и подвержен высокому риску рецидива.

3135

Последовательности, на которые имеются ссылки в данном раскрытии, представлены в таблице 27.

Таблица 27. ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ NO	ID	Описание	Последовательность
1		Вариабельная область тяжелой цепи Ab1 (CDR выделены жирным шрифтом)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GQYYYDSSRYGEVAFDIWGQGTMVTVSS
2		Ab1-HC CDR1	FTFSSYSMN
3		Ab1-HC CDR2	YISSSSSTIYYADSVKG
4		Ab1-HC CDR3	ARGGQYYYDSSRYGEVAFDI
5		Вариабельная область легкой цепи Ab1 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSG YNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTP PFTFGGGTKVEIK

	жирным шрифтом)	
6	Ab1-LC CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD
7	Ab1-LC CDR2	LGSNRAS
8	Ab1-LC CDR3	MQRRRTPPFT
9	Тяжелая цепь Ab1 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYS</u> <u>MNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKG</u> <u>RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u> <u>GQYYYDSSRYGEVAFDIWGGQGTMTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> <u>VSWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD</u> <u>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
10	Легкая цепь Ab1 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	<u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNG</u> <u>YNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRF</u> <u>SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRT</u> <u>PFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES</u> <u>VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV</u> <u>THQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
11	Вариабельная область тяжелой цепи Ab2 (CDR выделены жирным шрифтом)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS</u> <u>MNWVRQAPGKGLEWVSYISLSGATIHADSVKG</u> <u>RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u> <u>GQYYYDSSDYGEVAFDIWGGQGTMTVSS</u>
12	Ab2-HC CDR1	FTFEAYSMN
13	Ab2-HC CDR2	YISLSGATIHADSVKG
14	Ab2-HC CDR3	ARGGQYYYDSSDYGEVAFDI
15	Вариабельная область легкой цепи Ab2 (CDR выделены жирным шрифтом)	<u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVSN</u> <u>GYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDRFS</u> <u>SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRT</u> <u>PFSGGGTKVEIK</u>
16	Ab2-LC CDR1	RSSQSLVSNNGYNYLD
17	Ab2-LC CDR2	FGSSRAS
18	Ab2-LC CDR3	MQRRRTPPWS
19	Тяжелая цепь Ab2 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS</u> <u>MNWVRQAPGKGLEWVSYISLSGATIHADSVKG</u> <u>RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u> <u>GQYYYDSSDYGEVAFDIWGGQGTMTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> <u>VSWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u>

		<u>VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD</u> <u>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
20	Легкая цепь Ab2 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVSNGY NYLDWYLQKPGQSPQQLLIYFGSSRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPW SFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
21	Вариабельная область тяжелой цепи Ab3 (CDR выделены жирным шрифтом)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGGYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISISGATITYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GQYYYDSSDYGEVAFDIWGQGTMTVTVSS
22	Ab3-HC CDR1	FTFGGYSMN
23	Ab3-HC CDR2	YISISGATITYADSVKG
24	Ab3-HC CDR3	ARGGQYYYDSSDYGEVAFDI
25	Вариабельная область легкой цепи Ab3 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVSNGY NYLDWYLQKPGQSPQQLLIYFGSSRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPP FTFGGGTKVEIK
26	Ab3-LC CDR1	RSSQSLVSNGYNYLD
27	Ab3-LC CDR2	FGSSRAS
28	Ab3-LC CDR3	MQRRRTPPFT
29	Тяжелая цепь Ab3 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGGYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISISGATITYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GQYYYDSSDYGEVAFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
30	Легкая цепь Ab3 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVSNGY NYLDWYLQKPGQSPQQLLIYFGSSRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPP FTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
31	Вариабельная область тяжелой цепи Ab4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISLSGATIHADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG

	(CDR выделены жирным шрифтом)	GQYYTSSDYGEVAFDIWGQGTMTVSS
32	Ab4-HC CDR1	FTFEAYSMN
33	Ab4-HC CDR2	YISLSGATIHADSVKG
34	Ab4-HC CDR3	ARGGQYYTSSDYGEVAFDI
35	Вариабельная область легкой цепи Ab4 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVSNKY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPW SFGGGTKVEIK
36	Ab4-LC CDR1	RSSQSLVSNKYNYLD
37	Ab4-LC CDR2	FGSSRAS
38	Ab4-LC CDR3	MQRRRTPWS
39	Тяжелая цепь Ab4 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS MNWRQAPGKGLEWVS YISLSGATIHADSVKG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARG GQYYTSSDYGEVAFDIWGQGTMTVSSASTKG <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</u> <u>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>EVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
40	Легкая цепь Ab4 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVSNKY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPW SFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA <u>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV</u> <u>TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
41	Вариабельная область тяжелой цепи Ab5 (CDR выделены жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS MNWRQAPGKGLEWVS YISLSGATIHADSVKG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARG GQYYTSSDYGEVAFDIWGQGTMTVSS
42	Ab5-HC CDR1	FTFEAYSMN
43	Ab5-HC CDR2	YISLSGATIHADSVKG
44	Ab5-HC CDR3	ARGGQYYTSSDYGEVAFDI
45	Вариабельная область легкой цепи Ab5 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVSSGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPW SFGGGTKVEIK
46	Ab5-LC CDR1	RSSQSLVSSGYNLYD
47	Ab5-LC CDR2	FGSSRAS
48	Ab5-LC CDR3	MQRRRTPWS
49	Тяжелая цепь Ab5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYS

	(CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	MN WVRQAPGKGLEWVS YISLSG AT HI YAD SVKG RFTISRDN AKNS LYLQ MNSL RAEDTAVYY CARG GQ YYY TSSDYGE VAFDIWGQGTMTVSS ASTKG <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</u> <u>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>EVTCVVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
50	Легкая цепь Ab5 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQSLVSSGY NYLD WYLQKPGQSPQ LLIYFGSS RASGV PDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCMQRRRTPW SFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA <u>SVVCLLN</u> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV <u>TEQDSK</u> DSTYSLSS TLT LSKADYEKHKVYACEVT <u>HQGLSS</u> PVT KSFNRGEC
51	Вариабельная область тяжелой цепи Ab6 (CDR выделены жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFEAYS MN WVRQAPGKGLEWVS YISLSG AT HI YAD SVKG RFTISRDN AKNS LYLQ MNSL RAEDTAVYY CARG GQ YYY TSSDYGE VAFDIWGQGT LVTVSS
52	Ab6- HC CDR1	FTFEAYSMN
53	Ab6- HC CDR2	YISLSGAT HI YAD SVKG
54	Ab6- HC CDR3	ARGG Q YYY TSSDYGE VAFDI
55	Вариабельная область легкой цепи Ab6 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVLTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQSLVSSGYN YLD WYLQKPGQSPQ LLIYFGSS RASGV PDRFS G GSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCMQRRRTPWS FGG G TKVEIK
56	Ab6- LC CDR1	RSSQSLVSSGY NYLD
57	Ab6- LC CDR2	FGSSRAS
58	Ab6- LC CDR3	MQRRRTPWS
59	Тяжелая цепь Ab6 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFEAYS MN WVRQAPGKGLEWVS YISLSG AT HI YAD SVKG RFTISRDN AKNS LYLQ MNSL RAEDTAVYY CARG GQ YYY TSSDYGE VAFDIWGQGT LVTVSSASTKG <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</u> <u>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>EVTCVVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
60	Легкая цепь Ab6	DIVLTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQSLVSSGYN

	(CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	YLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPWS FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT <u>EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u> <u>QGLSSPVTKSFNREGC</u>
61	Вариабельная область тяжелой цепи Ab7 (CDR выделены жирным шрифтом)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGGYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISISGATITYADSVKG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GQYYYDSSDYGEVAFDIWGQGTMTVTVSS
62	Ab7-HC CDR1	FTFGGYSMN
63	Ab7-HC CDR2	YISISGATITYADSVKG
64	Ab7-HC CDR3	ARGGQYYYDSSDYGEVAFDI
65	Вариабельная область легкой цепи Ab7 (CDR выделены жирным шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVSSGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDRFS SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPP FTFGGGTKVEIK
66	Ab7-LC CDR1	RSSQSLVSSGYNYLD
67	Ab7-LC CDR2	FGSSRAS
68	Ab7-LC CDR3	MQRRRTPPFT
69	Тяжелая цепь Ab7 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGGYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISISGATITYADSVKG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GQYYYDSSDYGEVAFDIWGQGTMTVTVSSASTK <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> <u>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD</u> <u>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
70	Легкая цепь Ab7 (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVSSGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDRFS SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRRRTPP FTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA <u>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV</u> <u>TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNREGC</u>
71	Вариабельная область тяжелой цепи AbA (CDR выделены жирным шрифтом)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYW MTWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGSIYYPDRVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDE RWAGAMDAWGQGT TTVTVSS
72	AbA-HC CDR1	FTFN NYWMT
73	AbA-HC CDR2	SISSSGGSIYYPDRVKG
74	AbA-HC CDR3	ARDERWAGAMDA

75	Вариабельная область легкой цепи AbA (CDR выделены жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK KASQNINKNLD WYQQKPGKAPKLLI YETNNL QTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCY QHNSR FTFGQGT KLEIK
76	AbA-LC CDR1	KASQNINKNLD
77	AbA-LC CDR2	ETNNLQT
78	AbA-LC CDR3	YQHNSRFT
79	Тяжелая цепь AbA (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNNYW MTWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGSIYYPDRVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSL R AEDTAVYYCARDE RWAGAMDAWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAP <u>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> <u>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT</u> <u>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVC</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA</u> <u>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE</u> <u>ALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
80	Легкая цепь AbA (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK KASQNINKNLD WYQQKPGKAPKLLI YETNNL QTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCY QHNSR FTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN <u>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</u> <u>PVTKSFNRGEC</u>
81	Вариабельная область тяжелой цепи AbB (CDR выделены жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNFW MAWIRQAPGKGLEWVA SISSSGGSIYYPDSVKD RFTISRDN SKNTLYLQMNSL R AEDTAVYYCVKFH HYSGGGDAWGQGT LVTVSS
82	AbB-HC CDR1	FTFTNFWMA
83	AbB-HC CDR2	SISSSGGSIYYPDSVKD
84	AbB-HC CDR3	VKFHHYSGGGDA
85	Вариабельная область легкой цепи AbB (CDR выделены жирным шрифтом)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK KASQNINKYLD WYQQKPGKAPKLLI HYTNNL HGTGIPSRFSGSGS GTDYTLTISLQPEDFATYYCL QHSSR WTFGGG TKVEIK
86	AbB-LC CDR1	KASQNINKYLD
87	AbB-LC CDR2	YTNNLHT
88	AbB-LC CDR3	LQHSSRWT
89	Тяжелая цепь AbB (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNFW MAWIRQAPGKGLEWVA SISSSGGSIYYPDSVKD RFTISRDN SKNTLYLQMNSL R AEDTAVYYCVKFH HYSGGGDAWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP <u>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> <u>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT</u>

		<u>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVC</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA</u> <u>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
90	Легкая цепь AbB (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKYLD</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIHTGNLPSRFSGSGS</u> <u>GTDTLTISLQPEDFATYYCLQHSSRWTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> <u>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFNRGEC</u>
91	Вариабельная область тяжелой цепи AbC (CDR выделены жирным шрифтом)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNY</u> <u>WMTWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGSIYYPDSV</u> <u>KDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCA</u> <u>RLYYYDGGGDAWGQGLTVTVSS</u>
92	AbC-HC CDR1	FTFNNYWMT
93	AbC-HC CDR2	SISSSGGSIYYPDSVKD
94	AbC-HC CDR3	ARLYYYDGGGDA
95	Вариабельная область легкой цепи AbC (CDR выделены жирным шрифтом)	<u>GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYLD</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYNTNNLHTGNLPSRFSGSGS</u> <u>GTDTLTISLQPEDFATYYCLQHISRWTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>
96	AbC-LC CDR1	KASQDINKYLD
97	AbC-LC CDR2	NTNNLHT
98	AbC-LC CDR3	LQHISRWT
99	Тяжелая цепь AbC (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута; D265C.LALA.H435A)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNY</u> <u>WMTWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGSIYYPDSV</u> <u>KDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCA</u> <u>RLYYYDGGGDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNS</u> <u>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP</u> <u>CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV</u> <u>VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH</u> <u>EALHNAYTQKSLSLSPGK</u>
100	Легкая цепь AbC (CDR выделены жирным шрифтом; константная область подчеркнута)	<u>GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYLD</u> <u>WYQQKPGKAPKLLIYNTNNLHTGNLPSRFSGSGS</u> <u>GTDTLTISLQPEDFATYYCLQHISRWTFGGGT</u> <u>KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN</u> <u>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</u>

		<u>PVTKSFNRGEC</u>
101	Константная область легкой цепи IgG	RTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
102	Константная область тяжелой цепи IgG WT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	Константная область тяжелой цепи IgG (D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	Константная область тяжелой цепи IgG (L234A / L235A / D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	Константная область тяжелой цепи IgG (H435A / D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
106	Константная область тяжелой цепи IgG (L234A / L235A / H435A / D265C)*	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

			HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
107	Изоформа человека доступа P08575-8)	CD45RA (номер Uniprot)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTG LTTAKMPVPLSSDPLPHTHTAFSPASTFEREND FSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLNASAFNTTDAY LNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKY ANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCT NNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPP GVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDT QNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCD EILYNNHKFTNASKIIKTDGSPGEPQIIFCRSEAA HQQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDK NLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAA MCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMSTSDNSMHVKCR PPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDF RVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTS YNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSC NLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKR KIADEGRFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQ KNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYID GFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATV IVMVTRCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDV VVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHI QFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSG PIVVHCSAGVGRGTGYIGIDAMLEGLEAENKVDV YGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQF GETEVNLSLHPYLHNMKKRDPPEPSPLEAEF QRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYD YNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEP SKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQ MIFQRKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKQT YGDIEVDLKDTSSTYTLRVFELRHSKRKDSRT VYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQLPQ KNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLN LLESAETEEVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQY QFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEV DKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTS GTEGPEHSVNGPASPALNQGS
108	Изоформа человека доступа NP_563578.2)	CD45RO (номер NCBI)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTD AYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDE KYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNT CTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDV PPGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTC DTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKC DSEILYNNHKFTNASKIIKTDGSPGEPQIIFCRSE AAHQQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNL DKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGS AAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMSTSDNSMHVK

		CRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKN CDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHH STSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKR SCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETY KRKIADEGRFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFN QNKNNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINAS YIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQK ATVIVMVTRCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFG DVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKKATGREVT HIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFS GPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVD VYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQ FGETEVNLSLHPYLNHNMKKRDPPSEPSPLEAEF QRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYD YNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEP SKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQ MIFQRKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEQKQT YGDIEVDLKDTSSTYTLRVFELRHSHKRKDSRT VYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQ KNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLN LLESAETEEVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQY QFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEV DKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTS GTEGPEHSVNGPASPALNQGS
109	Изоформа CD45RB человека (номер доступа NCBI XP_006711537.1)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTG VSSVQTPHLPHTADSQTPTSAGTDTQTFSGSAAN AKLNPTPGSNAISDAYLNASETTTLSPSGSAVIST TTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKL NVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISH NSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADT TICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEI KLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDF GSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFT LCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLS LHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNM TVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVE AGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYF HNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIA LLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQL MNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAEFQSIPRV FSKFPIKEARKPFNQNKNNRYVDILPYDYNRVELS EINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDET VDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNRNKCAEY WPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLN VNNKKEKATGREVT HIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFS GPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVD VYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQ FGETEVNLSLHPYLNHNMKKRDPPSEPSPLEAEF QRLPSYRSWRTQHIGNQEE NKSNNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHD

		SDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIA AQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGD QEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLR VFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPK ELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCR DGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALR KARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQVKK NNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKL PEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQ GS
110	Изоформа CD45RAB человека (номер доступа NCBI XP_006711535.1)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTG LTTAKMPSVPLSSDPLPHTHTTAFSPASTFEREND FSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLNASAFNTTGVS SVQTPHLPTHADSQTSPSAGTDTQTFSGSAANAK LNPTPGSNAISDAYLNASETTTLSPPSGSAVISTTTI ATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNV NENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNS CTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTIC LKWKNIEFTTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLE NLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIITDFGSP GEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYI KETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAY IIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSM TSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNT LVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGD YPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLALIIVTSIALLVVL YKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVE PIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKF PIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGD AGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDFF WRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNRNKAHEYWPS MEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKK EKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRR VNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAMLE GLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILI HQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDP SEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSK NRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDES SDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGP LKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICA QYWGEKGQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFEL RHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELIS MIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGS QQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKAR PGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNH QEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEA KEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS
111	Изоформа CD45RBC человека (номер	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTG VSSVQTPHLPTHADSQTSPSAGTDTQTFSGSAAN

	доступа NCBI XP_006711536.1)	AKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLT TTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASE TTTLSPSGSAVISTTTTIATTPSKPTCDEKYANITVD YLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVH NLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKF QLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYR FQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNH KFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVIT WNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKVD LQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTT KSAPPSQVWNMTVSMSTSDNSMHVKCRPPRDRN GPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQ YSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALI AFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQE LVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRL FLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDIL PYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRK YIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRC EEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQH KRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPD HGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSA GVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLR RQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLS ELHPYLHNMMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRS WRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKH ELEMSESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFI MSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVK VIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDL KDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYT NWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQLPQKNSSEGN KHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETE EVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIA STYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDA NCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEH SVNGPASPALNQGS
112	Изоформа CD45RABC человека (номер доступа NCBI NP_002829.3)	MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTG LTTAKMPSPVPLSSDPLPHTHTTAFSPASTFEREND FSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLNASAFNTTGVS SVQTPHLPTHADSQTPSAGTDTQTFSGSAANAK LNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTTL SLAHHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTT LSPSGSAVISTTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLY NKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNLT ECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLH DCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQC GNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFT NASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNP PQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKVDLQNL KPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSA PPSQVWNMTVSMSTSDNSMHVKCRPPRDRNGP

		HERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYS TDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAF LAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELV ERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFL AEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPY DYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIA AQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEE NRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRC PDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGV PEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVG RTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQR CLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELH PYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRT QHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSY WKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVM LTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIENVLDKDT DKSSTYTLRVFELRHRSKRKDSRTVYQYQYTNWS VEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHH KSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLESAETEEVV DIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIAS PAQNGQVKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANC NPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVN GPASPALNQGS
113	Антиген CD45RABC человека (фрагмент изоформы CD45RABC человека)	QSPTPSPTGLTTAKMPSVPLSSDPLPHTTAFSP ASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSL DNA SAFNTTGVS SVQTPHLPHTADSQTSPSAGTDTQT FSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPT DPVSPLTTTTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTSD AYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDE KYANITVDYLYNKETKLFTAKLVNENVECGNNT CTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDV PPGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTC DTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKC DSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSE AAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNL DKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGS AAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVK CRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKN CDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHH STSYNSK
114	Фрагмент 1 CD45	TEKDCLNL DKNLIKYDLQNLK
115	Фрагмент 2 CD45	CYIKETEKDCLNL DKNLIKYDLQNLKPYTKY
116	Фрагмент 3 CD45	RPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESH
117	Фрагмент 4 CD45	CRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHK

118	Фрагмент 5 CD45	RNGPHERYHLEVEAGNT
119	Консенсусная последовательность CDR1 варибельной области тяжелой цепи (Ab 1-7)	FTF(S/E/G)(S/A/G)YSMN
120	Консенсусная последовательность CDR2 варибельной области тяжелой цепи (Ab 1-7)	YIS(S/L/I)S(S/G)(S/A)TI(Y/H/T)YYADSVKG
121	Консенсусная последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи (Ab 1-7)	ARGGQYYY(D/T)SS(R/D)YGEVAFDI
122	Консенсусная последовательность CDR1 варибельной области легкой цепи (Ab 1-7)	RSSQSLL(H/-)SNGYNYLD
123	Консенсусная последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи (Ab 1-7)	(L/F)GS(N/S)RAS
124	Консенсусная последовательность CDR3 варибельной области легкой цепи (Ab 1-7)	MQRRRTP(P/W)(F/S)(T/F)
125	Варибельная область тяжелой цепи Ab1 (Нуклеиновая кислота)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTAT AGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGT AGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAGCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGC GCCAGAGGTGGACAATACTACTACGACAGCAG CAGATACGGTGAGGTAGCATTTCGACATATGGG GTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA

126	Варибельная область легкой цепи Ab1 (Нуклеиновая кислота)	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTG CCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTC CTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTA ATGGATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGA AGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT TTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGA CAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATT TTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG GATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGAGAAG ACGCACTCCTCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGA CCAAGGTTGAGATCAAA
127	Варибельная область тяжелой цепи Ab2 (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTTGTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCCAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCGAAGCGTA TTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCCCCCGGAA AGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATTAGCCTG TCGGGGGCCACCATCCATTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGGACAAC GCCAAGAACCTCCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGGTGGCCAGTACTACTACGACTC AAGCGACTACGGCGAAGTGGCATTTCGATATCT GGGGACAGGGGACCATGGTCACCGTCAGCTC C
128	Варибельная область легкой цепи Ab2 (Нуклеиновая кислота)	GATATCGTGATGACACAGTCCCCTCTGTCCCT CCCTGTGACCCCCGGAGAACCAGCCTCTATTT CCTGCCGGTCTCCCAATCCCTGGTGTCCAAC GGTTATAACTACCTGGATTGGTACTTGCAAAAG CCCGGACAGAGCCCCCAGCTGCTCATCTACTT CGGAAGCTCACGCGCGAGCGGGGTGCCGGAT AGGTTTTCGGGATCCGGAAGCGGCACCGACTT CACGCTGAAGATCTCGAGAGTCGAGGCCGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCGGC GGCGCACCCCCTGGTCCTTCGGCGGCGGAAC TAAGGTCGAGATCAAG
129	Варибельная область тяжелой цепи Ab3 (Нуклеиновая кислота)	CAAGTGCAGCTTGTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCAAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCGGCGGATA TTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCCCCCGGAA AGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATTAGCATC TCGGGGGCCACCATCACTTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGGACAAC GCCAAGAACCTCCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGGTGGCCAGTACTACTACGACTC AAGCGACTACGGCGAAGTGGCATTTCGATATCT GGGGACAGGGGACCATGGTCACCGTCAGCTC

		C
130	Вариабельная область легкой цепи Ab3 (Нуклеиновая кислота)	GATATCGTGATGACACAGTCCCCTCTGTCCCT CCCTGTGACCCCCGGAGAACCAGCCTCTATTT CCTGCCGGTCCTCCCAATCCCTGGTGTCCAAC GGTTATAACTACCTGGATTGGTACTTGCAAAAG CCCGGACAGAGCCCCCAGCTGCTCATCTACTT CGGAAGCTCACGCGCGAGCGGGGTGCCGGAT AGGTTTTCGGGATCCGGAAGCGGCACCGACTT CACGCTGAAGATCTCGAGAGTCGAGGCCGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCGGC GGCGCACCCCGCCCTTCACCTTCGGCGGCGG AACTAAGGTTCGAGATCAAG
131	Вариабельная область тяжелой цепи Ab4 (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTTGTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCCAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCGAAGCGTA TTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCCCCCGGAA AGGGCCTGGAATGGGTGTCTGATACATTAGCCTG TCGGGGGGCCACCATCCATTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGGACAAC GCCAAGAAGTCCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGGTGGCCAGTACTACTACACCTCA AGCGACTACGGCGAAGTGGCATTTCGATATCTG GGGACAGGGGACCATGGTCAACCGTCAGCTCC
132	Вариабельная область легкой цепи Ab4 (Нуклеиновая кислота)	GATATCGTGATGACACAGTCCCCTCTGTCCCT CCCTGTGACCCCCGGAGAACCAGCCTCTATTT CCTGCCGGTCCTCCCAATCCCTGGTGTCCAAC GGTTATAACTACCTGGATTGGTACTTGCAAAAG CCCGGACAGAGCCCCCAGCTGCTCATCTACTT CGGAAGCTCACGCGCGAGCGGGGTGCCGGAT AGGTTTTCGGGATCCGGAAGCGGCACCGACTT CACGCTGAAGATCTCGAGAGTCGAGGCCGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCGGC GGCGCACCCCGTGGTCCCTTCGGCGGCGGGAAC TAAGGTTCGAGATCAAG
133	Вариабельная область тяжелой цепи Ab5 (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTTGTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCCAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCGAAGCGTA TTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCCCCCGGAA AGGGCCTGGAATGGGTGTCTGATACATTAGCCTG TCGGGGGGCCACCATCCATTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGGACAAC GCCAAGAAGTCCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGGTGGCCAGTACTACTACACCTCA AGCGACTACGGCGAAGTGGCATTTCGATATCTG GGGACAGGGGACCATGGTCAACCGTCAGCTCC

134	Варибельная область легкой цепи Ab5 (Нуклеиновая кислота)	GATATCGTGATGACACAGTCCCCTCTGTCCCT CCCTGTGACCCCCGGAGAACCAGCCTCTATTT CCTGCCGGTCCTCCCAATCCCTGGTGTCTCTCG GGTTATAACTACCTGGATTGGTACTTGCAAAAG CCCGGACAGAGCCCCCAGCTGCTCATCTACTT CGGAAGCTCACGCGCGAGCGGGGTGCCGGAT AGGTTTTCGGGATCCGGAAGCGGCACCGACTT CACGCTGAAGATCTCGAGAGTCGAGGCCGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCGGC GGCGCACCCCCTGGTCCTTCGGCGGCGGAAC TAAGGTCGAGATCAAG
135	Варибельная область тяжелой цепи Ab6 (Нуклеиновая кислота)	GAGGTGCAGCTGGTTCGAAAGCGGAGGAGGGC TGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGCGGCTCTCA TGTGCCGCCTCCGGCTTTACCTTCGAAGCCTA CTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCTCCCGGGA AGGGACTGGAATGGGTTCAGCTACATTTCTGCTG TCCGGAGCCACCATCCACTACGCTGACTCAGT TAAGGGACGCTTCACCATCTCCCGGGATAATG CAAAGAACTCCCTGTACCTCCAAATGAATTCAC TGAGGGCCGAGGACACTGCCGTGTACTACTGC GCCCCGGGGAGGTCAATACTATTACACCTCCTC CGACTACGGCGAAGTGGCCTTCGATATCTGGG GCCAAGGAACCCTCGTGACTGTCTCCTCC
136	Варибельная область легкой цепи Ab6 (Нуклеиновая кислота)	GACATCGTGCTGACCCAGTCACCGCTTTCCTT GCCCGTGA CTCTGGGGAACCGGCCTCCATTT CGTGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGGTGTCTCTCC GGCTACAATTACCTGGATTGGTACCTCCAAAA GCCCCGACAGTCCCCACAACCTGCTCATCTACT TCGGGAGCTCAAGGGCCTCAGGAGTGCCGGA TCGCTTCTCGGGTTCCGGAAGCGGGACTGACT TCACTCTGAAATCAGCCGCGTGGAAGCAGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCGCA GGAGAACCCCCTGGTCCTTTGGCGGTGGAAC GAAGGTCGAAATCAAG
137	Варибельная область тяжелой цепи Ab7 (Нуклеиновая кислота)	CAAGTGCAGCTTGTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCAAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCGGCGGATA TTCCATGAACTGGGTTCAGACAGGCCCCCGGAA AGGGCCTGGAATGGGTGTCTGATATTAGCATC TCGGGGGGCCACCATCACTTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGGACAAC GCCAAGAACTCCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGGTGGCCAGTACTACTACGACTC AAGCGACTACGGCGAAGTGGCATTTCGATATCT GGGGACAGGGGACCATGGTCACCGTCAGCTC C

138	Варибельная область легкой цепи Ab7 (Нуклеиновая кислота)	GATATCGTGATGACACAGTCCCCTCTGTCCCT CCCTGTGACCCCCGGAGAACCAGCCTCTATTT CCTGCCGGTCCTCCCAATCCCTGGTGTCTCTCC GGTTATAACTACCTGGATTGGTACTTGCAAAAG CCCGGACAGAGCCCCCAGCTGCTCATCTACTT CGGAAGCTCACGCGCGAGCGGGGTGCCGGAT AGGTTTTCGGGATCCGGAAGCGGCACCGACTT CACGCTGAAGATCTCGAGAGTCGAGGCCGAG GACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCGGC GGCGCACCCCGCCCTTCACCTTCGGCGGCGG AACTAAGGTCGAGATCAAG
139	Варибельная область тяжелой цепи AbA (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTTCTGGAGTCCGGTGGCGGAC TGGTCCAGCCGGGCGGATCTCTGAGACTTTTCG TGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCAACAATA TTGGATGACCTGGGTCAGACAGGCCCCCGGA AAGGGCCTGGAATGGGTGTCTCAATTAGCTC CTCGGGGGGATCCATCTACTACCCTGATCGCG TGAAGGGCCGTTTACAATCTCCCGGGACAAC AGCAAGAACACCCTCTACCTCCAAATGAACAG CCTGCGCGCTGAGGACACTGCTGTGTACTATT GCGCGAGGGACGAGAGATGGGCCGCGCAAT GGATGCCTGGGGACAGGGGACCACCGTCACC GTCAGCTCC
140	Варибельная область легкой цепи AbA (Нуклеиновая кислота)	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCATCATCCCT GTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACGATC ACTTGCAAAGCCAGCCAGAATATCAACAAGAA CCTGGATTGGTACCAACAGAAGCCGGGGAAG GCCCCTAAGCTGCTGATCTACGAAACCAACAA CTTGCAAACCTGGCGTGCCGTCAAGGTTACGCG GTTCCGGGTCGGGCACCGACTTCACCCTGACC ATTTCTCTCGCTGCAACCCGAGGACTTCGCGAC CTACTACTGCTATCAGCACAACAGCCGGTTCA CCTTCGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAG
141	Варибельная область тяжелой цепи AbB (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGCC TTGTGCAACCGGGAGGATCCCTGCGGCTCTCC TGCGCCGCATCAGGCTTCACGTTACCAACTT TTGGATGGCCTGGATTAGACAGGCACCGGGG AAGGGACTGGAATGGGTGGCGTCCATTAGCTC GTCCGGAGGATCCATCTACTATCCTGACTCAG TGAAGGACAGGTTTACCATCTCCCGGGACAAC AGCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACTC GCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGTGAAGTTCCATCACTACTCCGGCGGAGG AGATGCCTGGGGACAGGGTACTCTCGTGACTG TGTCGTCC
142	Варибельная область легкой цепи	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCTCCCT GTCCGCGTCTGTGGGCGACCGCGTGACCATTA

	AbВ (Нуклеиновая кислота)	CGTGCAAAGCTTCCCAGAACATTAACAAGTAC CTGGATTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGC CCCCAAGCTGTTGATCCACTACACAAACAACCT CCACACTGGTATCCCGTCCCGGTTCTCGGGGT CCGGATCGGGAACTGACTACACCCTGACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTCCGCCACCTA TACTGCCTGCAACACTCCTCGCGCTGGACCT TCGGCGGGGGTACTAAGGTGAGATCAAG
143	Варибельная область тяжелой цепи AbC (Нуклеиновая кислота)	GAAGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGTGGAGGCC TTGTGCAACCGGAGGATCCCTGCGGCTCTCC TGCGCCGCATCAGGCTTCACGTTCAACAATA CTGGATGACTTGGGTGAGACAGGCACCGGGG AAGGGACTGGAATGGGTGTCCAGCATTAGCTC GTCCGGAGGATCCATCTACTATCCGGACTCAG TGAAGGACAGGTTTACCATCTCCCGGGACAAC GCAAAGAACTCCCTGTACCTCCAAATGAACTC GCTGCGCGCCGAGGACATGGCCGTGTACTAC TGCGCGAGGCTGTACTACTACGATGGGGGGG GCGATGCCTGGGGACAGGGAACCCTAGTGAC TGTGTCGTCC
144	Варибельная область легкой цепи AbC (Нуклеиновая кислота)	GGAATCCAGATGACACAGAGCCCGTCTAGCCT GTCAGCATCCGTGGGGGACAGGGTCACCATC ACCTGTAAAGCCAGCCAGGATATTAACAAGTA CCTGGACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAG GCCCCGAAGCTCCTGATCTACAACACCAACAA CTTGACACCCGGAATTCCGTCCCGCTTTTCGG GATCGGGATCCGGGACCGATTACACCCTGACT ATCTCCTCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCAC TACTATTGCCTCCAACACATTTCCCGGTGGAC TTTCGGCGGCGGCACCAAGGTCGAGATCAAG
145	CD45 яванского макака	MTMCLWLKLLAFVFAFLDTEVFVTGQGSTLSPTG RRTTKMPSPVPLSSDPLPHTTAFSPASISEREND FSETTPSLSSDNTSTQVSPDSLNASAFNTTGV SALTPHLPHTADSQTPTSTGDTQTPSGSAANTTL SPTPRSNDISDVPGERSTASTFPTDPIPLATTLIP ARNSSAALPARTSNTTITANTSVSYLNASETTTPS PSGSTVISTPTIATTTSKPTCAEKYATIPVDYLYNN KTKLFTAKLNVNENVECTNNNHTHNICTNNEVLN LPECKEMNVFVSHNSCTDRHKELKLDVPPEVEK FQLDDCTPDVEANTTICLKWKIETFACDKSKITYR FQCGNKTYNKEGIYLENLEPEYEEKDSEILYNN HKYINITKLIKDFGIPGQPQNVVCRHEDAHQGV TWNPPQRSFHNFTLCYVNKPAKKCLILDKHLTTY HLQNLKPYTNYSLSLHAYIIAKVQRNGTAATCNFT TESAPPSQVQNMIVSTSDNSMHVKCEVPRDVNG PTGLYHLEVEAGNTLVRNLSQSKCDFSVNNLQY STYYNLKAYYHNGKYSGEVPILRESTSYNSKALIA FLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQEL

		VERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFL LAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILP YDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYI AAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEE GNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDIVVKINQHKRC PDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGV PEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVG RTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQR CLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELH PYLHNMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRT QHIGNQEENKNKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESDHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSY WKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVM LTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDMKDT NKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWS VEQLPAEPKELVSLIQVLKEKLPQKNFSEGNKHH KSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLESAETEEVV DIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDIIASTYP AQNGQVKKNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCV NPLGATEKLPEAKEQATGSEPTSGTEGPEHSVN GPASPALNQGS
146	CD45 макака резус	MTMCLWLKLLAFVFAFLDTEVFVTGQGSTLSPTG RRTTKMPSVPLSSDPLPHTTTAFSPASISEREND FSETTPSLSSDNTSTHVSPDSLNASAFNTTGVS SALTPHLPHTADSQTPSTGTDQTTPSGSAANTTL SPTPRSDISDVPGERSTASTFPTDPIPLATTLP ARNSSAALPARTSNTTITANTSVSYLNASETTTPS PSGSTVISTPTIATTTSKPTCAEKYATIPVDYLYNN KTKLFTAKLNVNENVECTNNNHTHNICTNNEVLN LPECKEMNVFVSHNSCTDRHKELKLDVPPEVEK FQLDDCTPDVEANTTICLKWKIETFACDKSKITYR FQCGNKTYNKEGIYLENLEPEYEEKCDSEILYNN HKYINITKLIKTDGIPGQPQNVVCRHEDAHQGVI TWNPPQRSFHNFTLCYVSKTAKKCLSLDKHLTTY HLQNLKPYTNYSLSLHAYIIAKVQRNGTAATCNFT TESAPPSQVQNMIVSTSDNSMRVKCEAPRDVNG PTELYLLEVEAGNTLVRNLSQSECDFSVNNLQYS TYYNLKAYYHNGKYSGEPVILRESTSYNSKALIAF LAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELV ERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFL AEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPY DYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIA AAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEE NRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRC PDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGV PEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVG RTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQR CLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELH PYLHNMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRT QHIGNQEENKNKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESDHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSY

		WKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVM LTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDMKDT NKSSTYTLRVFELRHRSKRKDSRTVYQYQYTNWS VEQLPAEPKELVSLIQVLKEKLPQKNSSEGNKHH KSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVV DIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDIIASTYP AQNGQVKKNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCV NPLGATEKLPEAKEQATGSEPTSGTEGPEHSVN GPASPALNQGS
147	Субъединица шигаподобного токсина 1 (SLT-1A) A	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGT SLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIV ERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFR QIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL NCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
148	Субъединица шига-токсина (StxA) A	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGT SLLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIV ERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFR QIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL NCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
149	Субъединица шигаподобного токсина 2 (SLT-2A) A	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISQGG VSVSVINHVLGNGYISLNVRLDPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHISVPDITV SMTTDSYSSSLQRIADLERTGMQIGRHSVLGSYL DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIAELRFRQI QRGFRPALSEASPLYTMTAQDVDLTNLWGRISN VLPEYRGEEGVRIGRISFNSLSAILGSVAVILNCH STGSYSVRSVSQKQKTECQIVGDRAAIKVVNNVL WEANTIAALLNRKPQDLTEPNQ
150	Варибельная область тяжелой цепи Ab2 (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCGAAGCATAT AGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTCTC AGTGGTGCCACCATACTACGCAGACTCTGT GAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACG CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTATTACTG CGCCAGAGGTGGACAATACTACTACGACAGCA GTGATTACGGTGAGGTAGCATTTCGACATATGG GGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
151	Варибельная область легкой цепи Ab2 (Альтернативная	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTG CCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTC CTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTGGTCAGTAATG

	последовательность нуклеиновой кислоты)	GATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGC CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTTC GGTTCTTCCCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA TGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGAGAAGAC GCACTCCTTGGTCTTTTGGCGGAGGGACCAAG GTTGAGATCAAA
152	Вариабельная область тяжелой цепи Ab3 (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTCGGAGGATA TAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATACATTAGTAT CAGTGGTGGCCACCATAACCTACGCAGACTCTG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAAC GCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGGTGGACAATACTACTACGACAG CAGCGATTATGGTGAGGTAGCATTTCGACATAT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
153	Вариабельная область легкой цепи Ab3 (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTG CCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTC CTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTGGTCAGTAATG GATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGC CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTTC GGTTCTTCCCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA TGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGAGAAGAC GCACTCCTCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA
154	Вариабельная область тяжелой цепи Ab4 (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTCGAAGCATAT AGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATACATTAGTCTC AGTGGTGGCCACCATACTACGCAGACTCTGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACG CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTATTACTG CGCCAGAGGTGGACAATACTACTACACGAGCA GTGATTACGGTGAGGTAGCATTTCGACATATGG GGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
155	Вариабельная область легкой цепи Ab4 (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTG CCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTC CTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTGGTCAGTAATG GATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGC CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTTC GGTTCTTCCCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA

		TGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGAGAAGAC GCACTCCTTGGTCTTTTGGCGGAGGGACCAAG GTTGAGATCAAA
156	Варибельная область тяжелой цепи AbA (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAATAATTAT TGGATGACATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTTCC AGTGGTGGTAGCATTTACTACCCCGACAGGGT GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACT GCGCAAGAGACGAGAGATGGGCAGGTGCTAT GGATGCCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCA
157	Варибельная область легкой цепи AbA (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGCAAAGGCAAGTCAGAATATTAACAAGAATT TAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATGAGACGAATAACTTG CAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACT ACTGTTATCAGCATAATTCTAGATTTACTTTTGG CCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
158	Варибельная область тяжелой цепи AbB (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAATTTT TGGATGGCGTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTGCGAAGTATTAGTTCA AGTGGTGGTAGCATCTACTACCCTGACTCCGT GAAGGACCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACT GCGTCAAGTTTCACTACTATTCAGGCGGCGGC GATGCTTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
159	Варибельная область легкой цепи AbB (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGCAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTATT TAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCCATTACACTAACAACCTTG CACACCGGGATTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCTGCAGCACAGTTCCAGATGGACATTGCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
160	Варибельная область тяжелой цепи AbC (Альтернативная	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATAACTAT TGGATGACGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA

	последовательность нуклеиновой кислоты)	AGGGGCTGGAGTGGGTTTCATCCATTAGTAGT AGTGGCGGTAGTATATACTACCCTGACTCTGT GAAGGATCGATTACCATCTCCAGAGACAATG CCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCTGAGGACATGGCGGTGTACTACTG CGCCAGGTTGTACTACTACGACGGGGGAGGG GATGCGTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
161	Вариабельная область легкой цепи AbC (Альтернативная последовательность нуклеиновой кислоты)	GGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAAGTATT TAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTACAATACAAACAATTTG CATAAGGGATCCCATCAAGGTTTCAGTGGGAAG TGGATCTGGGACAGATTATACTCTTACCATCAG CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACATATTA CTGTCTTCAACACATATCTAGATGGACGTTTCGG CGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

3140

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же

3145 степени, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дополнительные модификации, и настоящая заявка предназначена для охвата

3150 любых вариантов, применений или адаптаций настоящего изобретения, следующих, в целом, принципам настоящего изобретения и включая такие отклонения от изобретения, которые относятся к известной или общепринятой практике в области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше и вытекающим из

3155 объема формулы изобретения.

Другие варианты осуществления входят в формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее:

(а) переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:3, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:4; и переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:6, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:7; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:8;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:12, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:13, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:14; и переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:17; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:18;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:22, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:23, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:24; и переменную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:26, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:27; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:28;

CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:98.

2. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:119, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:120, и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:121; и вариабельную область легкой цепи, содержащую домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:122, домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:123; и домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:124.

3. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, содержащее

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:5;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:15;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:35;

(е) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:45;

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:51, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:55;

(g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:61, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:65;

(h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:75;

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:85; или

(j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:91, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:95.

4. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-3, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержит Fc-область.

5. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по п. 4, где Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 человека или Fc-область IgG4 человека.

6. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-5, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
7. Выделенное антитело против CD45 по любому из пп. 1-6, где указанное антитело представляет собой интактное антитело, содержащее константную область.
8. Выделенное антитело против CD45 по любому из пп. 1-7, где указанное антитело представляет собой IgG.
9. Выделенное антитело против CD45 по п. 8, где IgG представляет собой IgG4.
10. Выделенное антитело против CD45 по любому из пп. 1-9, где указанное антитело содержит константную область, и при этом указанная константная область содержит по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L235A, D265C, H310A и H435A (нумерация согласно индексу EU).
11. Выделенное антитело против CD45 по п. 10, где константная область содержит аминокислотные замены L234A, L235A и D265C (нумерация согласно индексу EU).
12. Выделенное антитело против CD45 по любому из пп. 1-11, содержащее константную область, при этом указанная константная область содержит
 - (а) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106; и
 - (b) аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:101.
13. Выделенное антитело против CD45, содержащее

(a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:9, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:10;

(b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:20;

(c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:29, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:30;

(d) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:40;

(e) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:50;

(f) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:60;

(g) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:69, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:70;

(h) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:79, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:80;

(i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:89, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:90; или

(j) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO:99, и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO:100.

14. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть, которое специфично связывается с CD45 человека на эпитопе, расположенном внутри фрагмента 1 CD45 (SEQ ID NO:114), фрагмента 2 CD45 (SEQ ID

NO:115), фрагмента 3 CD45 (SEQ ID NO:116), фрагмента 4 CD45 (SEQ ID NO:117) и/или фрагмента 5 CD45 (SEQ ID NO:118).

15. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по п. 14, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с

(а) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 2 CD45, и эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 4;

(b) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 1 CD45, и эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 3 CD45; или

(с) эпитопом CD45 человека, расположенным внутри фрагмента 5 CD45.

16. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по п. 14 или 15, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с

(а) одним или более остатками, выбранными из группы, состоящей из 405T, 407K, 419Y, 425K, 481R, 505R и 509H в CD45 человека (пронумерованы на основании SEQ ID NO:113); или

(b) одним или более остатками, выбранными из группы, состоящей из 486R, 493Y и 502T в CD45 человека (пронумерованы на основании SEQ ID NO:113).

17. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-16, которое специфично связывается с CD45 человека или перекрестно реагирует с CD45 яванского макака.

18. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-17, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с CD45 человека со скоростью диссоциации (K_{OFF}) от 1×10^{-2} до 1×10^{-3} , от 1×10^{-3} до 1×10^{-4} , от 1×10^{-4} до 1×10^{-5} , от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} , от 1×10^{-6} до 1×10^{-7} или от 1×10^{-7} до 1×10^{-8} , согласно измерениям с помощью интерферометрии биослоя (BLI).

19. Выделенное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп. 1-18, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с CD45 человека с K_D примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее или примерно 0,1 нМ или менее, как определено с помощью интерферометрии биослоя (BLI).

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-19, и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-13.

22. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 21.

23. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 21 или вектор по п. 22.

24. Клетка-хозяин по п.23, где указанная клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку HEK293T.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-19, для применения в истощении популяции клеток CD45+ у пациента-человека.

26. Способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, включающий введение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп. 1-19 пациенту-человеку.

27. Способ по п. 26, где клетки CD45+ представляют собой CD3+, CD19+, CD33+, CD34+ или CD45+/B2M+.
28. Способ по п. 26, где клетки CD45+ представляют собой гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), Т-клетки, В-клетки и/или миелоидные клетки.
29. Способ по п.26, где клетки CD45+ представляют собой раковые клетки.
30. Способ по любому из пп. 26-29, где клетки CD45+ подвергают истощению из костного мозга пациента и/или из периферической крови пациента.
31. Способ по любому из пп. 26-30, где пациент нуждается в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
32. Способ по любому из пп. 26-31, дополнительно включающий введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.
33. Способ по п. 31 или 32, где трансплантат является аллогенным.
34. Способ по п. 31 или 32, где трансплантат является аутологичным.
35. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело против CD45 или его антигенсвязывающую часть, конъюгированное с цитотоксином через линкер, причем указанное антитело против CD45 или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-19.
36. ADC по п. 35, где антитело конъюгировано с цитотоксином посредством остатка цистеина в константном домене антитела.
37. ADC по п. 36, где остаток цистеина вводят путем аминокислотной замены в константной области антитела.

38. ADC по п. 37, где аминокислотная замена представляет собой D265C и/или V205C (нумерация EU).

39. ADC по любому из пп. 35-38, где указанный ADC имеет отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

40. ADC по любому из пп. 35-39, где цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы, интеркалирующий ДНК агент, алкилирующий ДНК агент, сшивающий ДНК агент, агент, нарушающий синтез белка, агент, нарушающий динамику микротрубочек или агент, нарушающий митотическое веретено.

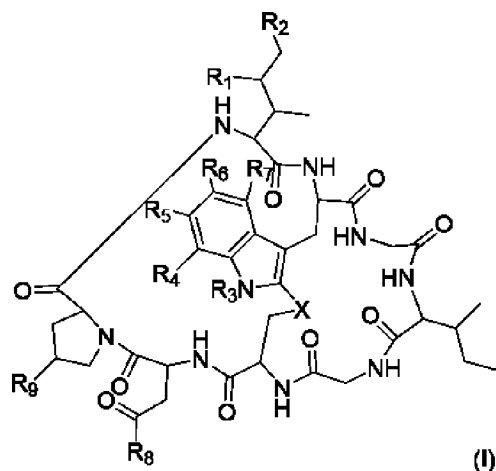
41. ADC по любому из пп. 35-40, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из аматоксина, антрациклина, ауристатина, калихимицина, дебуганина, дифтерийного токсина, дуокармицина, индолинобензодиазепина (IGN), димера индолинобензодиазепина, иринотекана, майтансина, майтансиноида, экзотоксина А псевдомонад, пирролобензодиазепина (PBD), димера пирролобензодиазепина, сапорина и SN-38.

42. ADC по п. 40, где цитотоксин представляет собой ингибитор РНК-полимеразы.

43. ADC по п. 42, где ингибитор РНК-полимеразы представляет собой аматоксин.

44. ADC по п. 43, где указанный ADC представлен формулой Ab-Z-L-Am, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-19, L представляет собой линкер, Z представляет собой химический фрагмент, и Am представляет собой аматоксин.

45. ADC по п. 44, где конъюгат аматоксин-линкер представлен формулой (I):



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

R_2 представляет собой H, OH, OR_B или OR_C ;

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

R_3 представляет собой H, R_C или R_D ;

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

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

R_9 представляет собой H, OH, OR_C или OR_D ;

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

R_C представляет собой -L-Z;

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

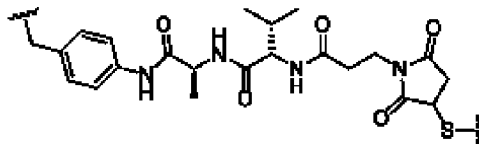
L представляет собой необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилен, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкилен, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенилен, необязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкенилен, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинилен, необязательно замещенный C_2 -

C₆ гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, пептид, дипептид, -(C=O)-, дисульфид, гидразон или их комбинацию;

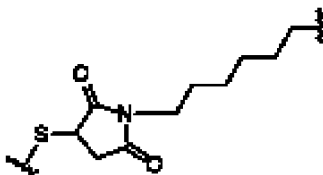
и

Z представляет собой химический фрагмент, образованный в результате реакции сочетания между реакционноспособным заместителем, присутствующим в L, и реакционноспособным заместителем, присутствующим в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, где Am содержит ровно один заместитель R_C.

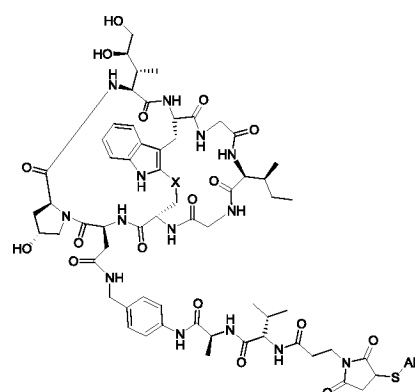
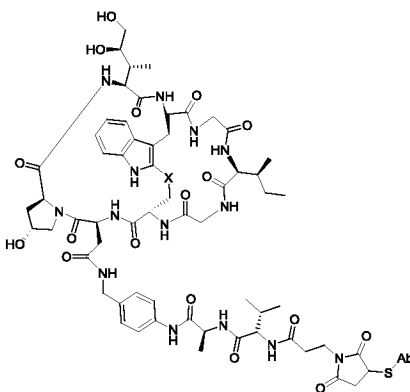
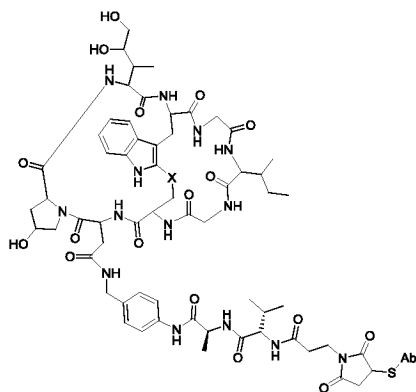
46. ADC по п. 45, где L-Z представляет собой



или



47. ADC по п. 43 или 44, где ADC представлен одним из следующего:



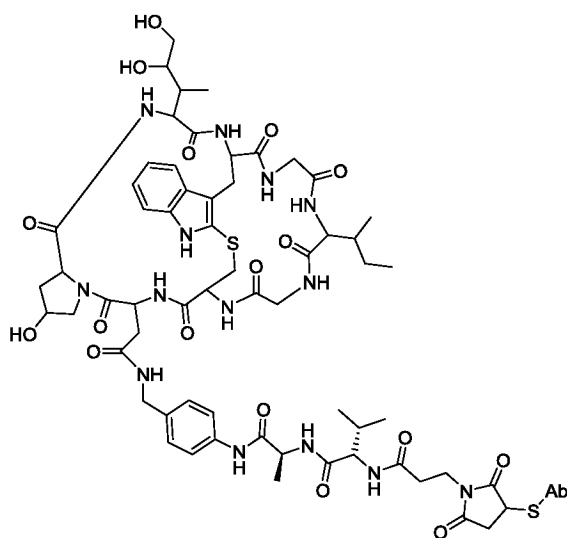
(III)

(IIIA)

(IIIB)

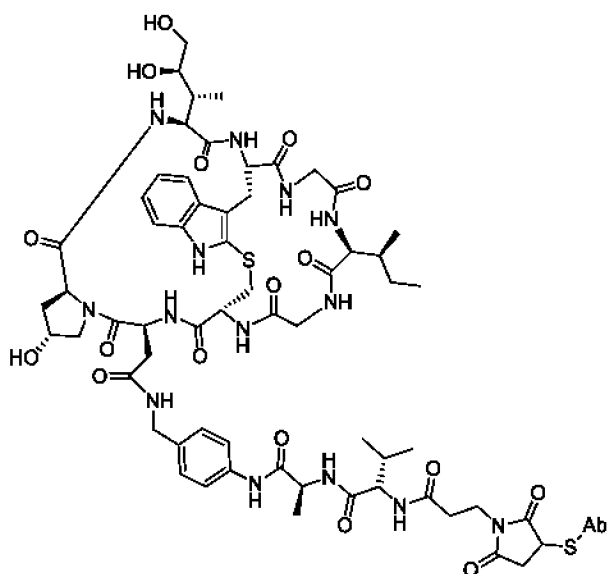
где x представляет собой -S-, -S(O)- или -SO₂-.

48. ADC по п. 43 или 44, где ADC имеет формулу



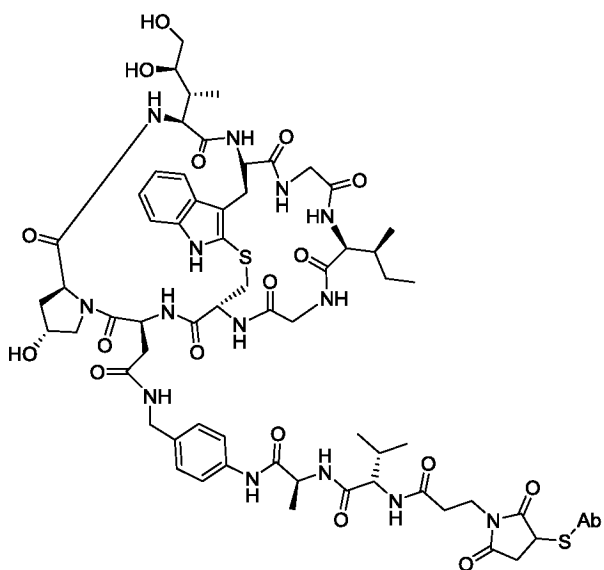
где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

49. ADC по п. 43 или 44, где ADC имеет формулу



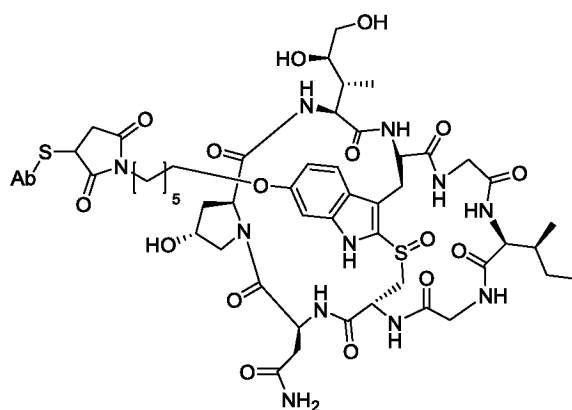
где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

50. ADC по п. 43 или 44, где ADC имеет формулу



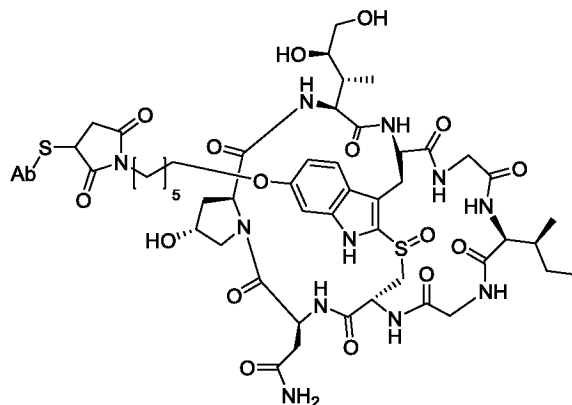
при этом Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

51. ADC по п. 43 или 44, где ADC имеет формулу



где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

52. ADC по п. 43 или 44, где ADC имеет формулу

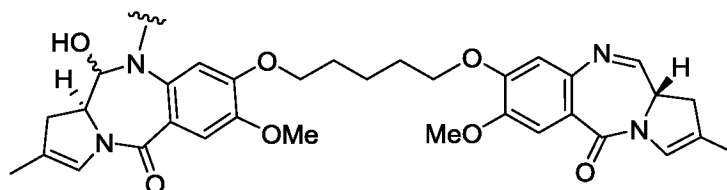


где Ab представляет собой точку присоединения антитела против CD45.

53. ADC по п. 41, где цитотоксин представляет собой пирролобензодиазепин (PBD).

54. ADC по п. 53, где цитотоксин представляет собой димер PBD.

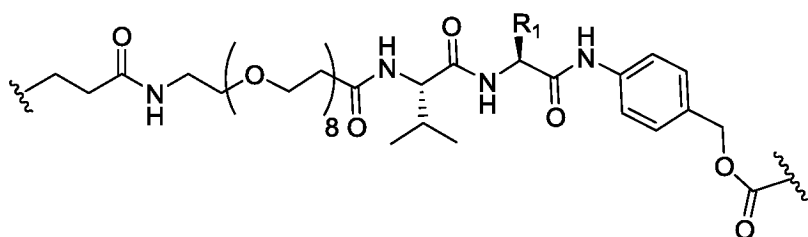
55. ADC по п. 54, где димер PBD представлен:



где волнистая линия обозначает точку присоединения к линкеру ADC.

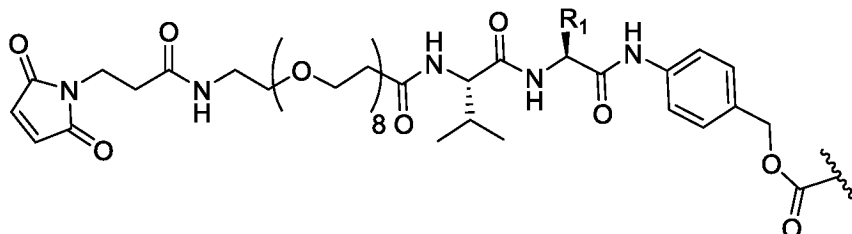
56. ADC по любому из пп. 53-55, где линкер содержит один или более из пептида, олигосахарида, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_q-$, $-(C=O)(CH_2)_r-$, $-(C=O)(CH_2CH_2O)_t-$, $-(NHCH_2CH_2)_u-$, -PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB или Ala-PAB, где каждый из p , q , r , t и u представляет собой целое число от 1 до 12, независимо выбранное для каждого случая.

57. ADC по любому из пп. 53-55, где линкер имеет структуру



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

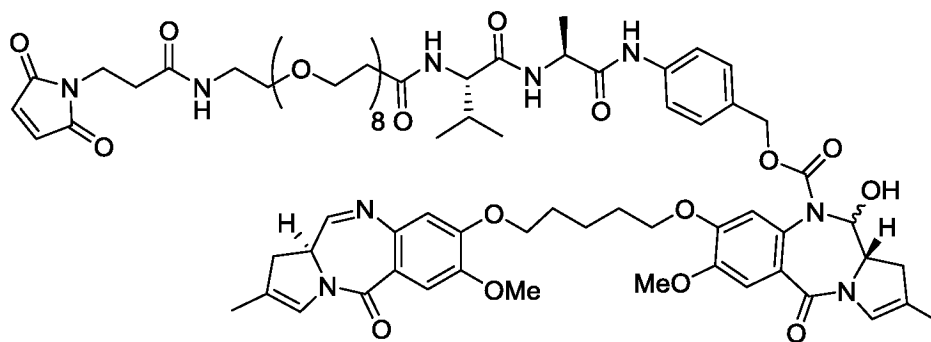
58. ADC по любому из пп. 53-57, где линкер до конъюгации с антителом и включающий реакционноспособный заместитель Z' , взятые вместе как $L-Z'$, имеет структуру



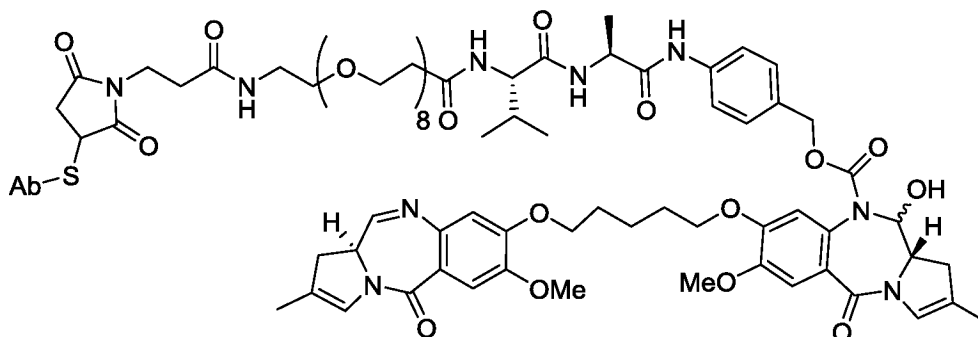
где R_1 представляет собой CH_3 (Ala) или $(CH_2)_3NH(CO)NH_2$ (Cit).

59. ADC по п. 58, где R_1 представляет собой CH_3 .

60. ADC по любому из пп. 53-59, где конъюгат цитотоксин-линкер до конъюгации с антителом и включающий реакционноспособный заместитель Z' , вместе взятые как $Cy-L-Z'$, представляет собой тезирин, имеющий структуру:



61. ADC по любому из пп. 53-60, имеющий структуру

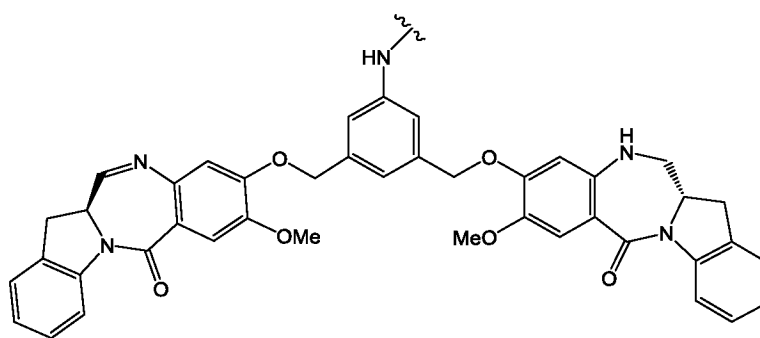


где Ab представляет собой антитело против CD45 или его антигенсвязывающую часть, а S представляет собой атом серы, присутствующий или введенный в антитело или его антигенсвязывающую часть.

62. ADC по п. 41, где цитотоксин представляет собой индолинобензодиазепин (IGN).

63. ADC по п. 62, где цитотоксин представляет собой димер IGN или псевдодимер IGN.

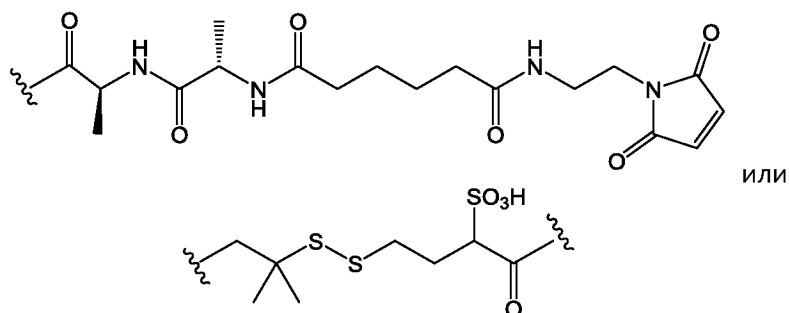
64. ADC по п. 62 или 63, где цитотоксин представляет собой псевдодимер IGN, представленный:



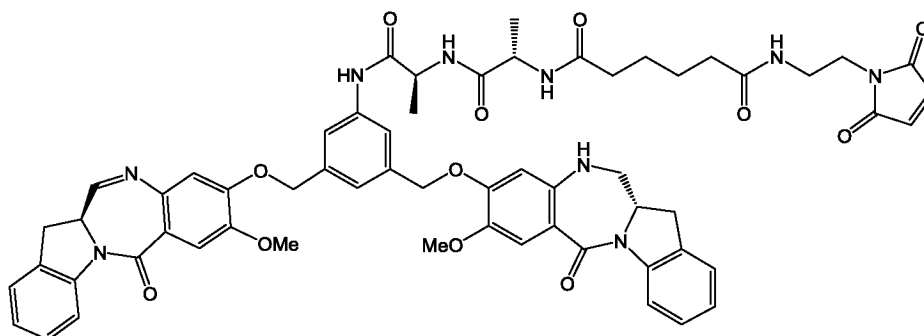
где волнистая линия обозначает точку ковалентного присоединения к линкеру ADC.

65. ADC по любому из пп. 62-64, где линкер содержит дипептид, дисульфид, C1-C12 алкил, C=O или их комбинации.

66. ADC по любому из пп. 62-65, где линкер содержит



67. ADC по любому из пп. 62-66, где конъюгат цитотоксин-линкер до конъюгации с антителом или его антигенсвязывающей частью и включающий реакционноспособный заместитель Z', взятые вместе как Cy-L-Z', имеет структуру:



68. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC по любому из пп. 35-67 и фармацевтически приемлемый носитель.
69. Способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, включающий введение указанному пациенту эффективного количества ADC по любому из пп. 35-67.
70. Способ по п. 69, где клетки CD45+ представляют собой CD3+, CD19+, CD33+, CD34+ или CD45+/B2M+.
71. Способ по п. 69, где клетки CD45+ представляют собой гемопоэтические стволовые клетки (ГСК).
72. Способ по п. 69, где клетки CD45+ представляют собой ГСК, Т-клетки, В-клетки и/или миелоидные клетки.
73. Способ по любому из пп. 69-72, где клетки CD45+ подвергают истощению из костного мозга пациента и/или из периферической крови пациента.
74. Способ по любому из пп. 69-73, где пациент нуждается в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
75. Способ по любому из пп. 69-74, дополнительно включающий введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.
76. Способ истощения популяции клеток CD45+ у пациента-человека, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), включающий введение указанному пациенту ADC по любому из пп. 35-67 до того, как пациент получит трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки.
77. Способ, включающий

(a) введение пациенту-человеку ADC по любому из пп. 35-67, в количестве, достаточном для истощения популяции клеток CD45+ у пациента; и

(b) последующее введение пациенту трансплантата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки.

78. Способ по любому из пп. 74-77, где трансплантат является аллогенным.

79. Способ по любому из пп. 74-77, где трансплантат является аутологичным.

80. Способ по любому из пп. 74-79, где трансплантат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, вводят пациенту после того, как концентрация ADC по существу выведется из крови пациента.

81. Способ по любому из пп. 74-80, где гемопоэтические стволовые клетки или их потомство способны локализоваться в гемопоэтической ткани и/или восстанавливать гемопоэз после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

82. Способ по любому из пп. 74-81, где при трансплантации пациенту гемопоэтические стволовые клетки вызывают восстановление популяции клеток, выбранных из группы, состоящей из мегакариоцитов, тромбоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, тучных клеток, миелобластов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, микроглии, гранулоцитов, моноцитов, остеокластов, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

83. Способ по любому из пп. 69-82, где у пациента имеется заболевание крови, нарушение обмена веществ, рак или аутоиммунное расстройство, или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID).

84. Способ по п. 83, где у пациента имеется рак.

85. Способ по п. 84, где рак представляет собой гематологический рак.

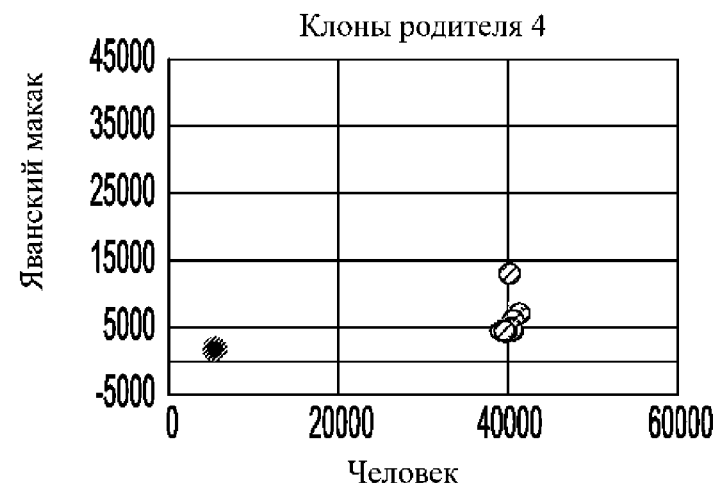
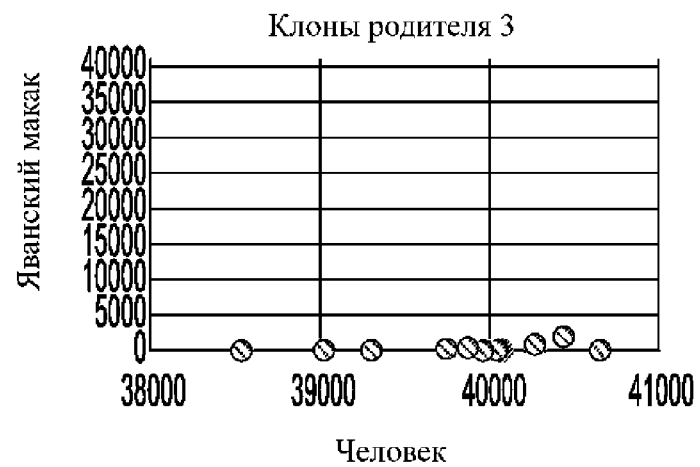
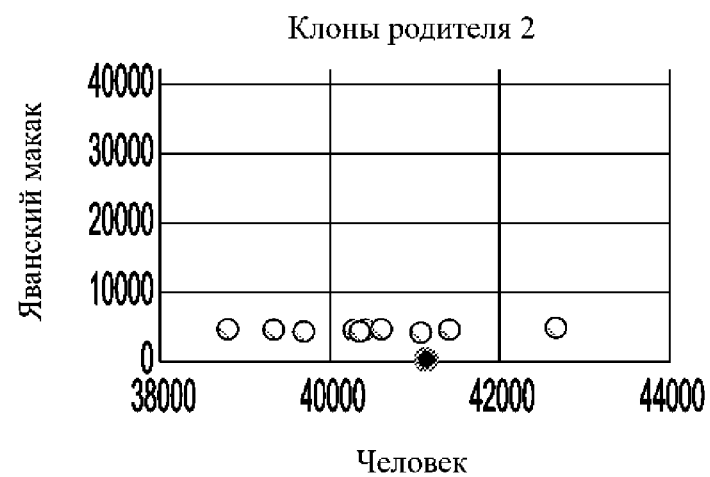
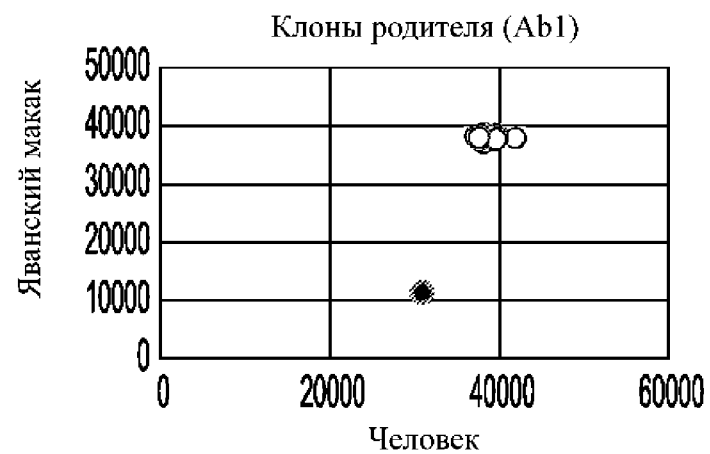
86. Способ по п. 85, где гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз или множественную миелому.

87. Способ по п. 83, где у пациента имеется аутоиммунное расстройство.

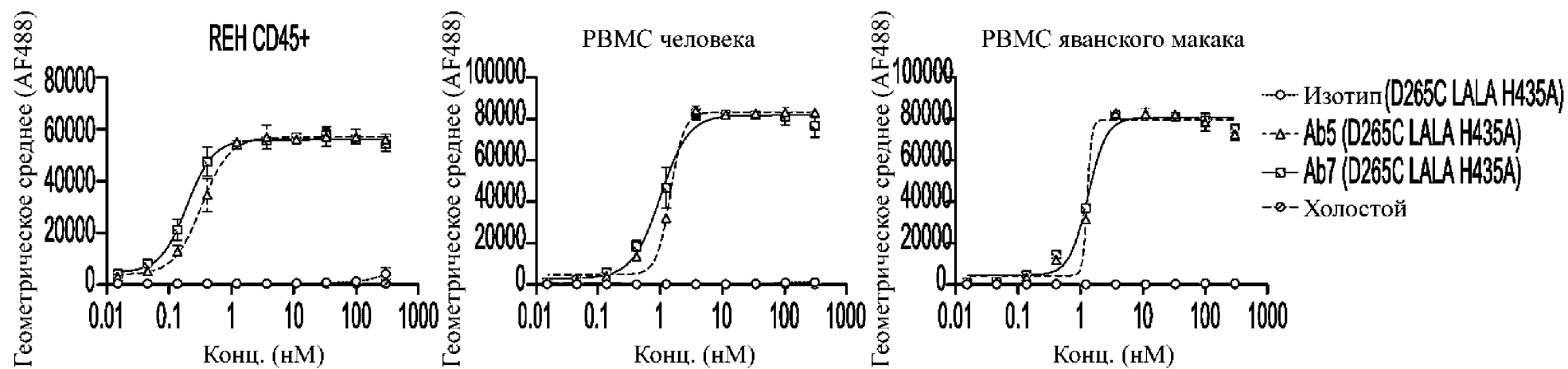
88. Способ по п. 87, где аутоиммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа или склеродермию.

89. Способ по п. 87, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза, системной волчанки человека, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, сахарного диабета 1 типа, острого диссеминированного энцефаломиелита, болезни Аддисона, универсальной алопеции, анкилозирующего спондилита, синдрома антифосфолипидных антител, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, аутоиммунного оофорита, болезни Бало, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Шагаса, синдрома хронической усталости с иммунной дисфункцией, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, болезни Крона, рубцового пемфигоида, глютенowego герпетиформного дерматита, болезни холодových агглютининов, CREST-синдрома, болезни Дегоса, дискоидной волчанки, вегето-сосудистой дистонии, эндометриоза, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гнойного гидраденита, идиопатической и/или острой тромбоцитопенической пурпурой, идиопатического легочного фиброза, нейропатии IgA, интерстициального цистита, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, красного плоского лишая, болезни Лайма, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, миастении гравис, нейромииотонии, синдрома опсоклонус-миоклонус, неврита зрительного нерва, тиреоидита Орда, вульгарной пузырчатки, пернициозной анемии, полихондрита, полимиозита и дерматомиозита, первичного билиарного

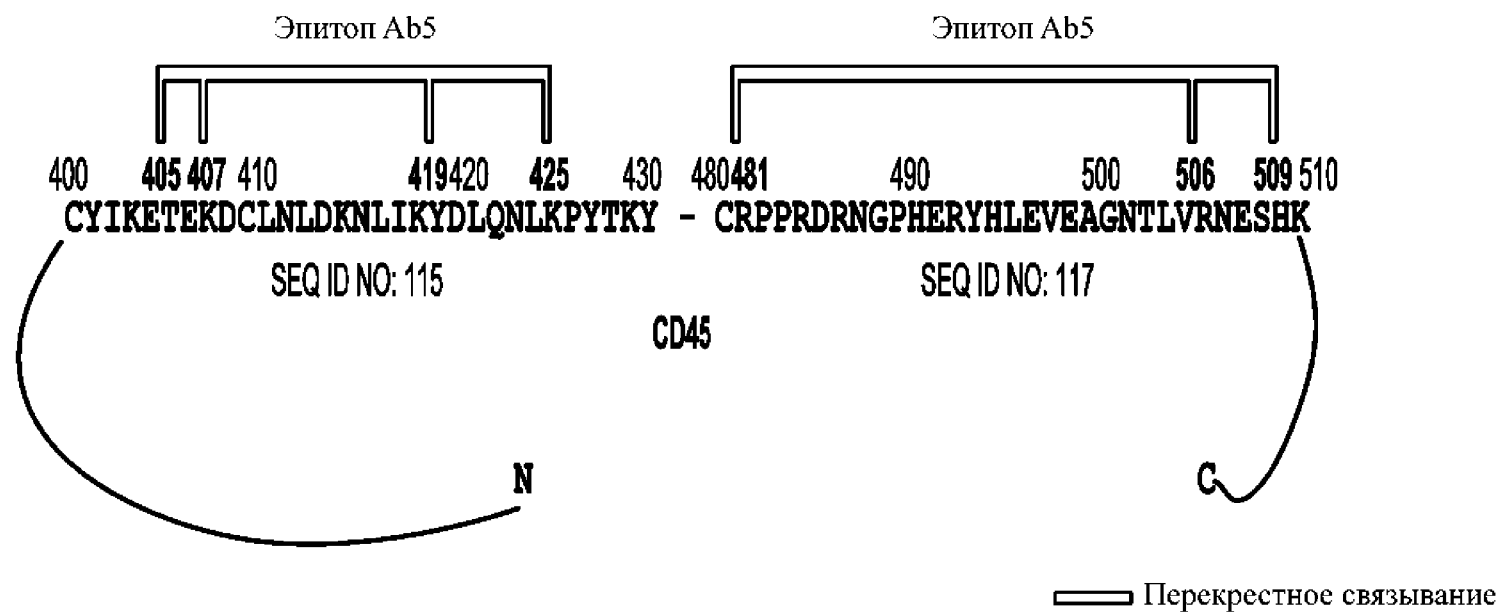
цирроза, узелкового полиартериита, полиглангулярных синдромов, ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, артериита Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, васкулита, витилиго, вульводинии и гранулематоза Вегенера.



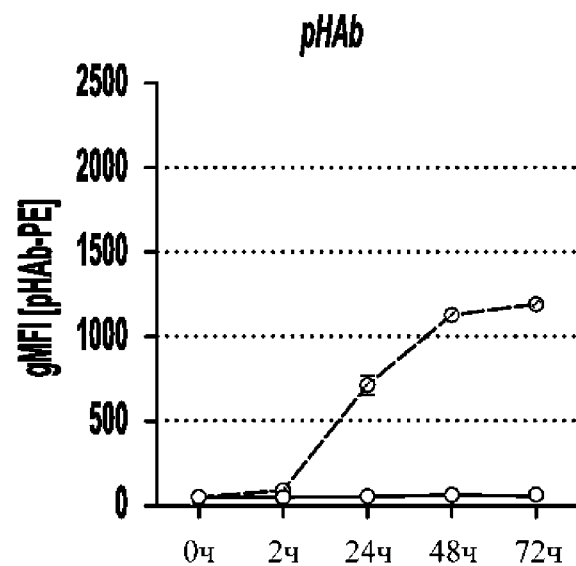
ФИГ. 1



ФИГ. 2

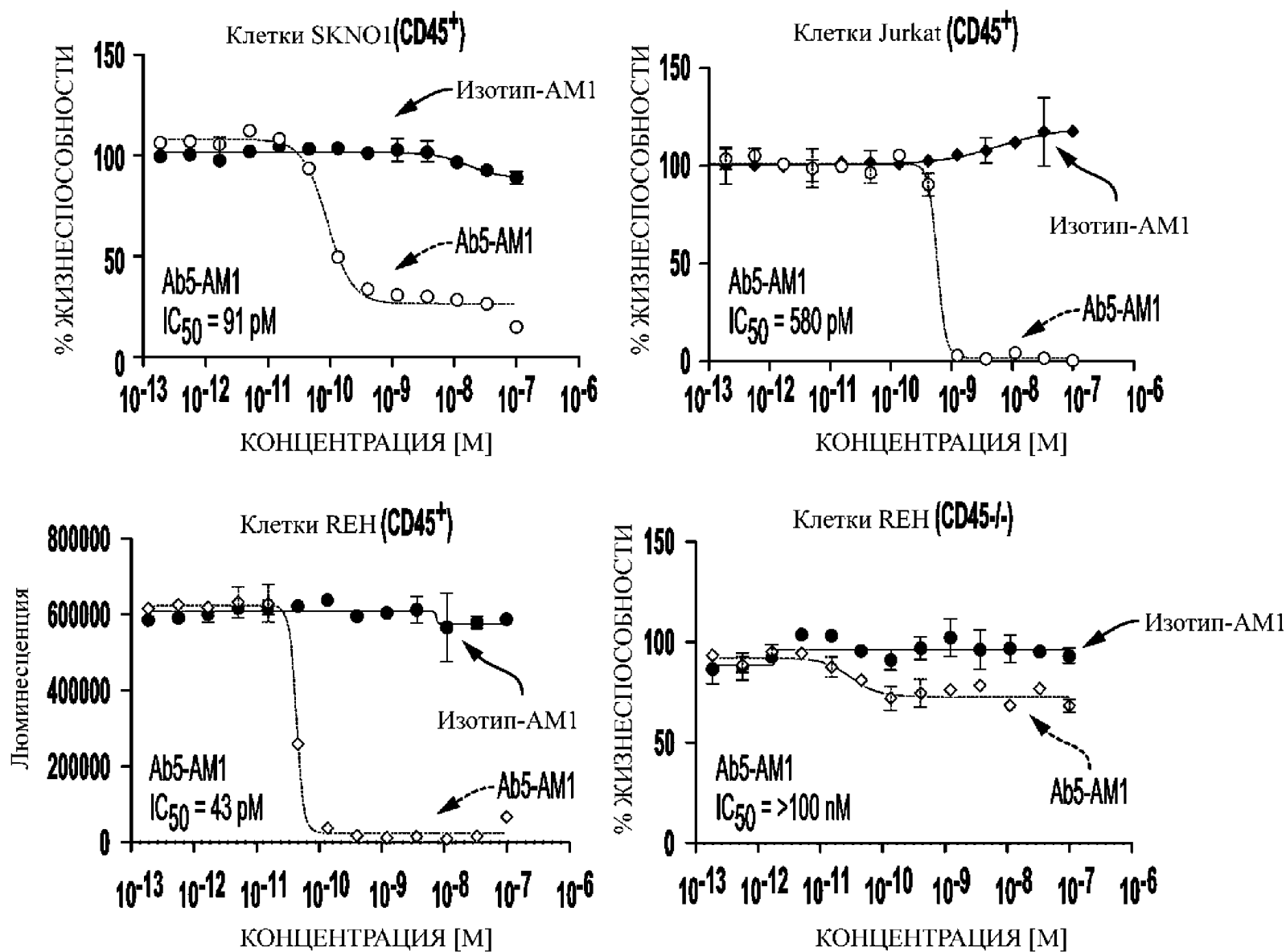


ФИГ. 3

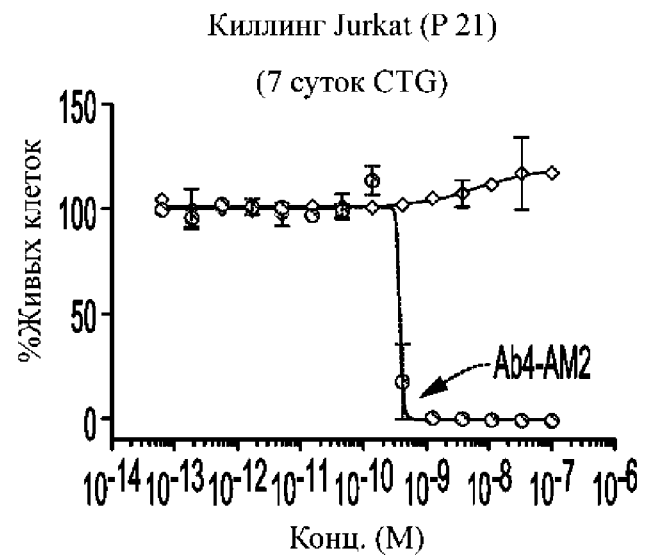


—○— Изотип-AM1
 D265C.LALA.H435A
 -○- Ab5-AM1
 D265C.LALA.H435A

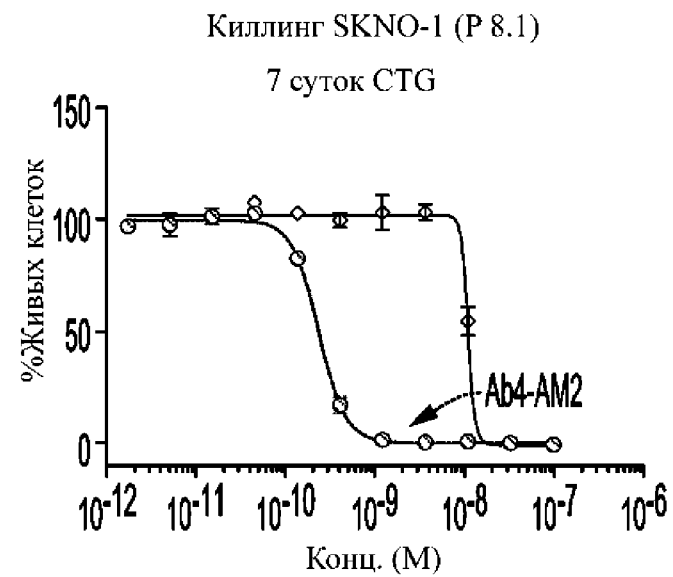
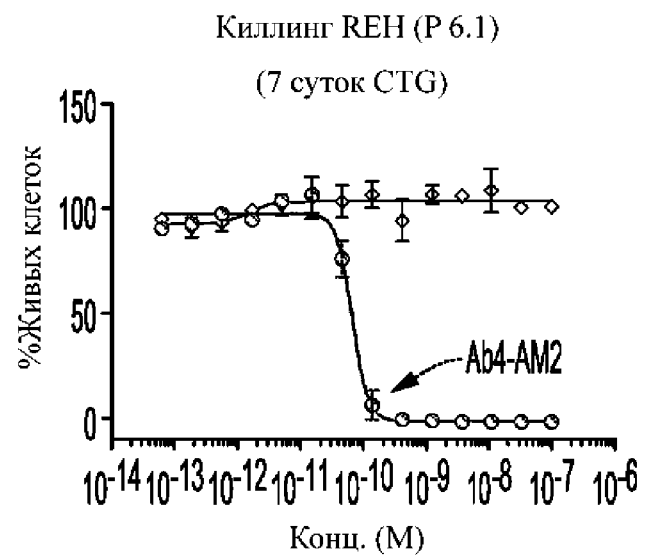
ФИГ. 4



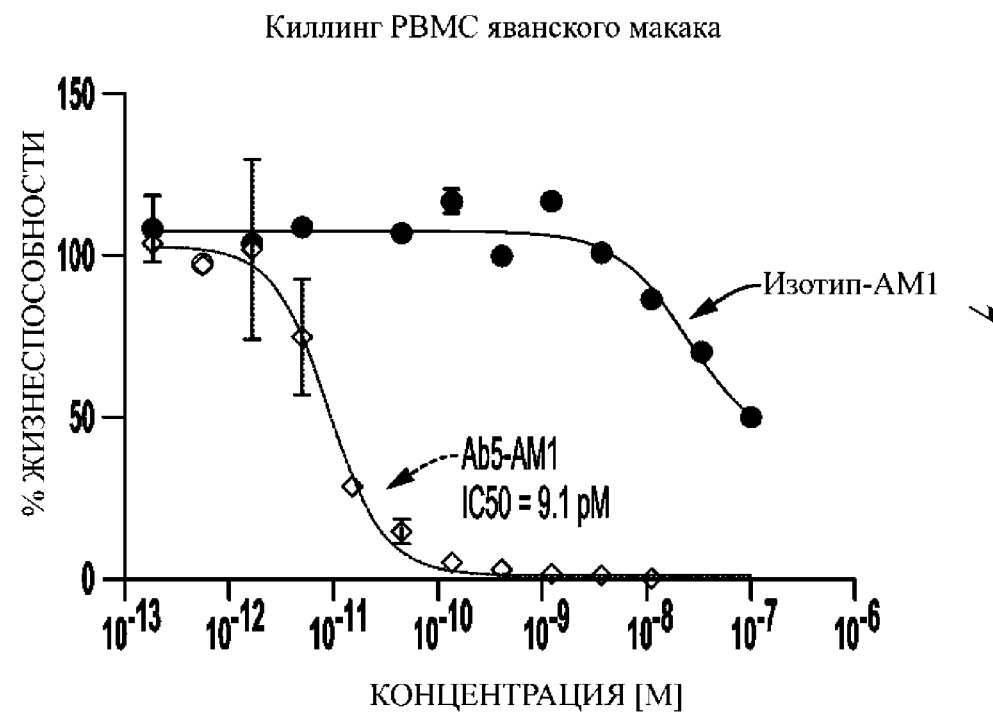
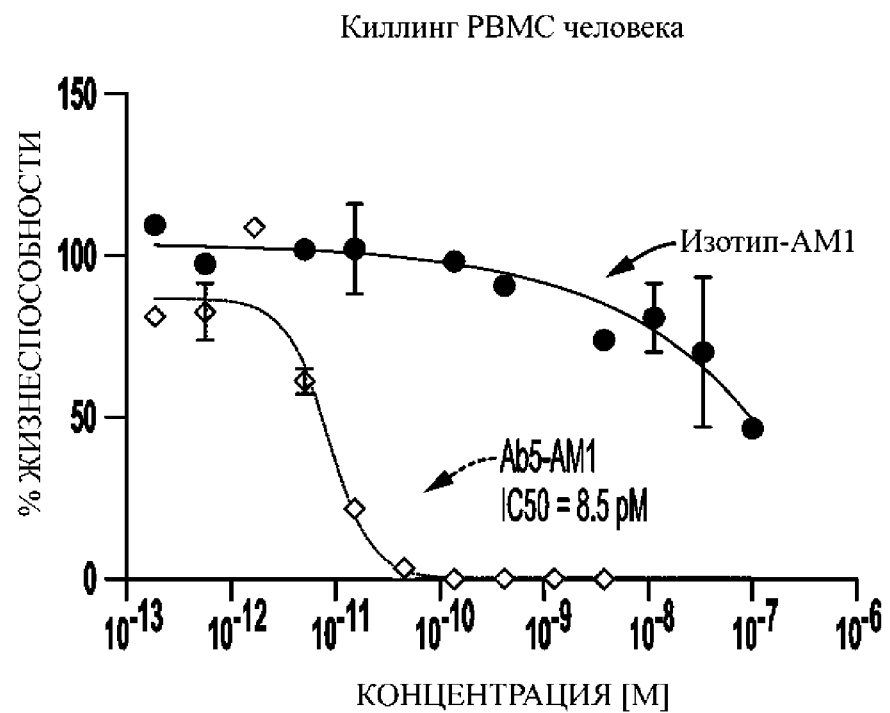
ФИГ. 5А



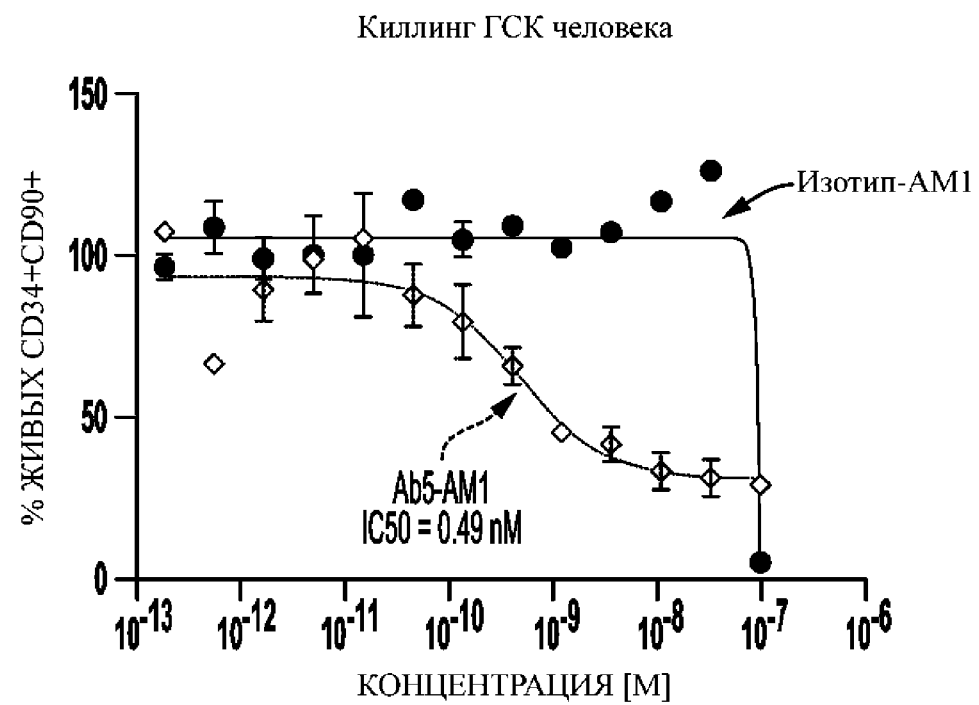
—○— Ab4-AM2 (D265C.LALA.H435A)
—◇— Изотип-AM2



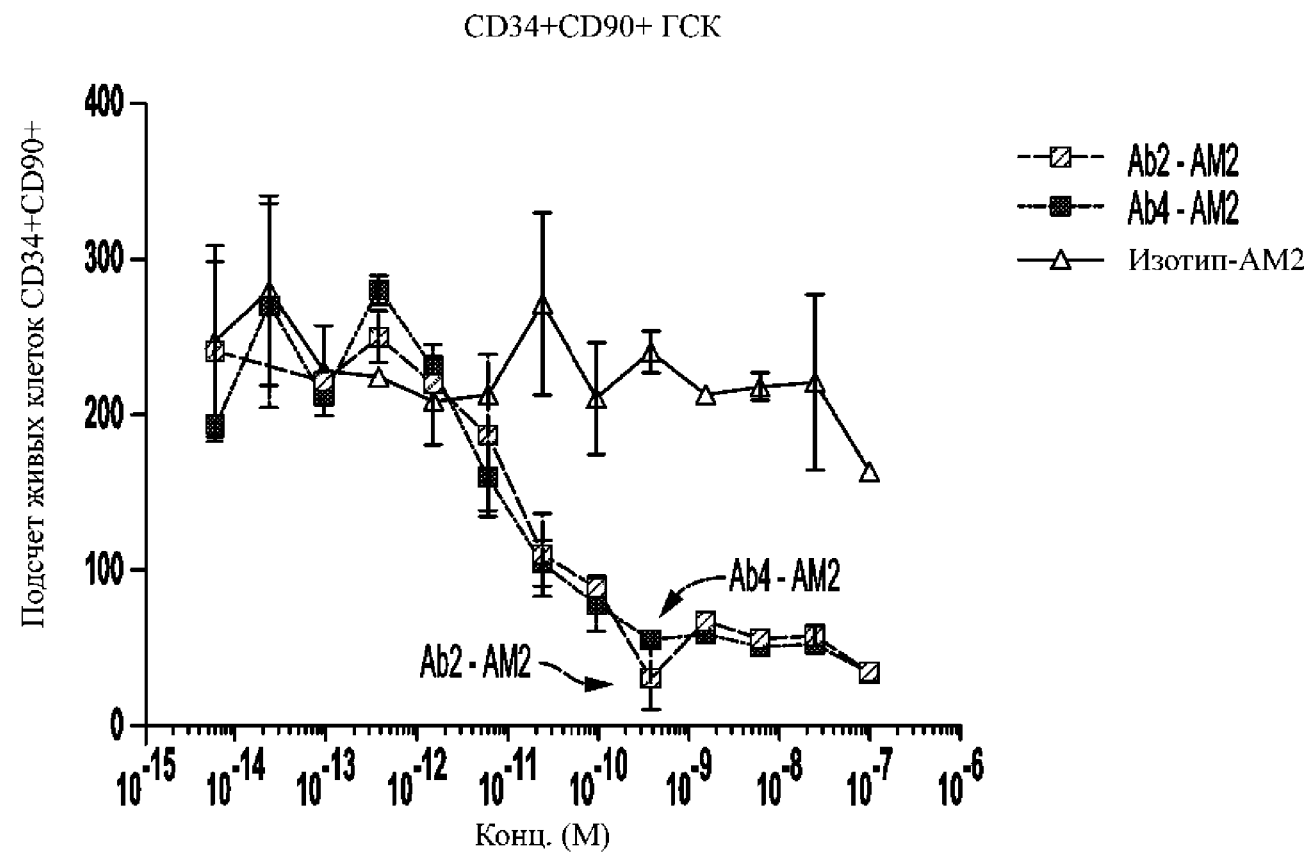
ФИГ. 5В



ФИГ. 6А

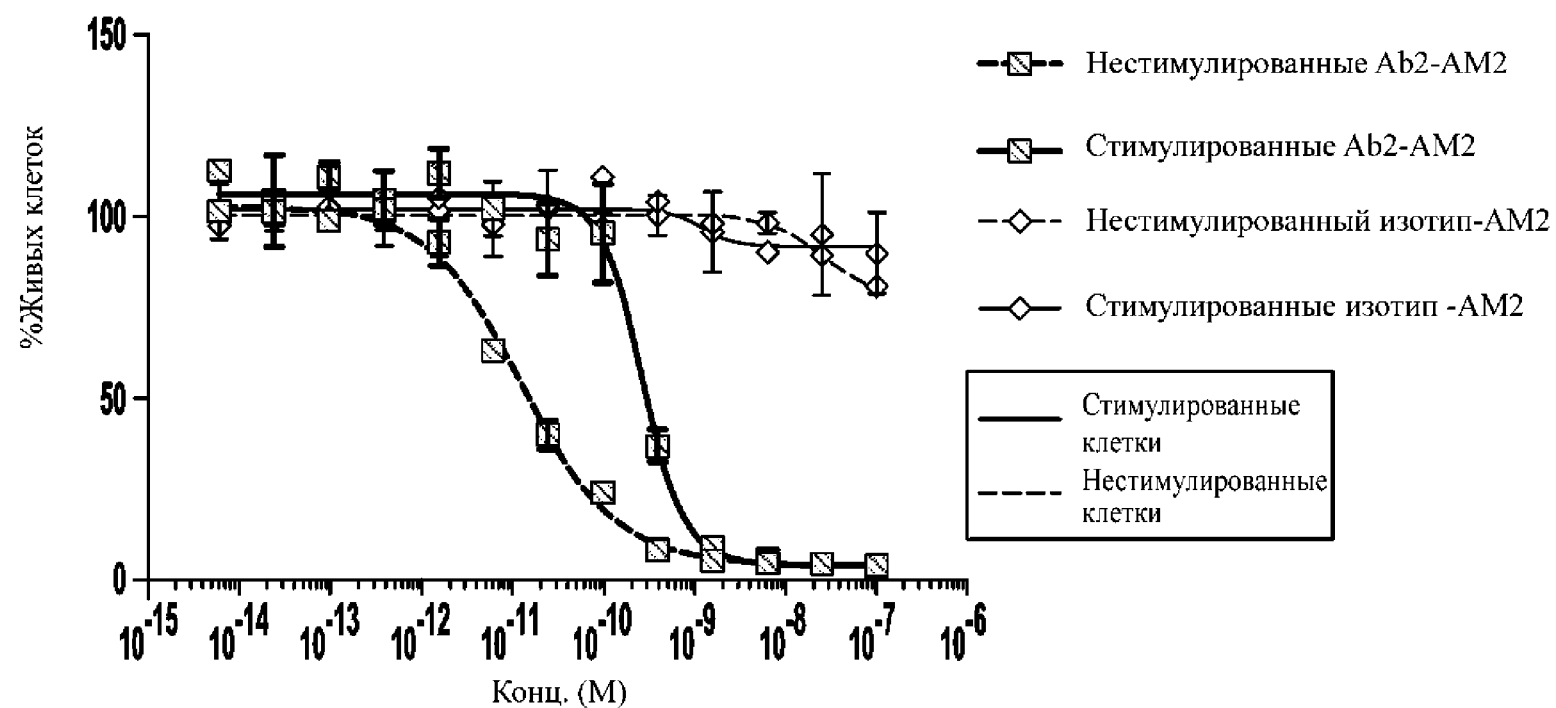


ФИГ. 6В

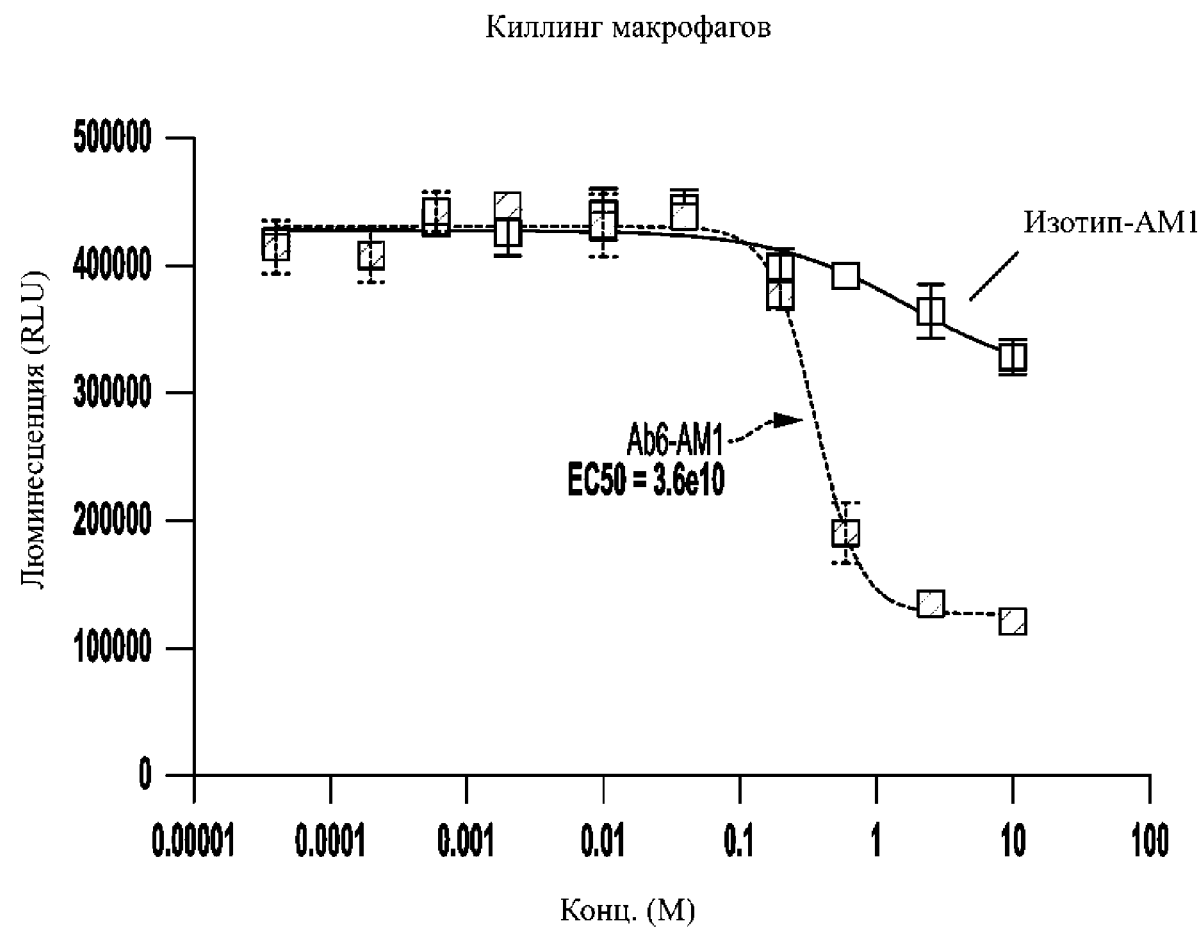


ФИГ. 6С

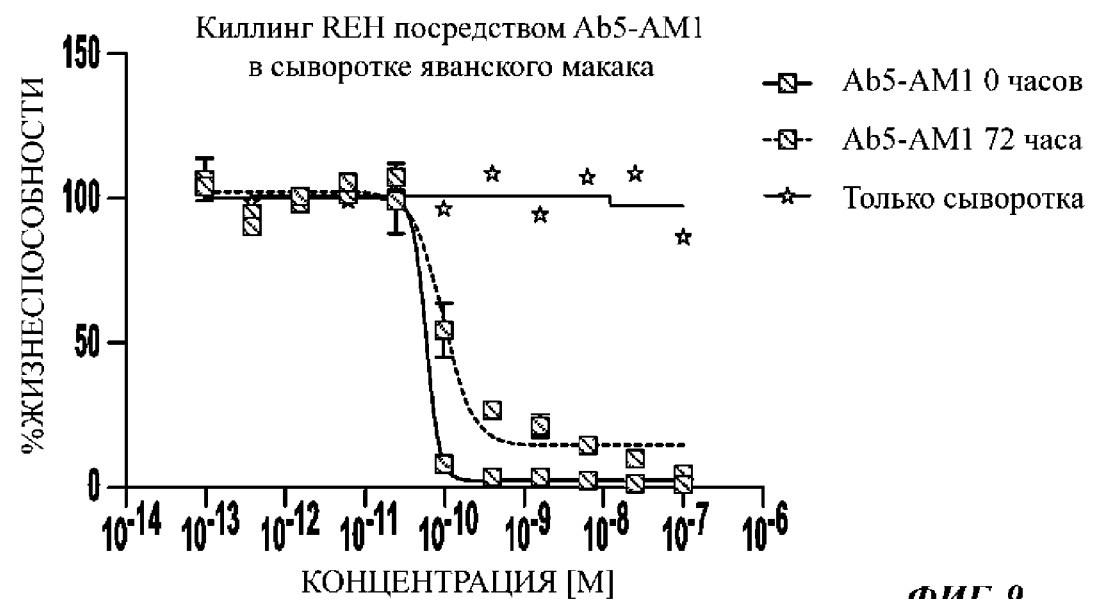
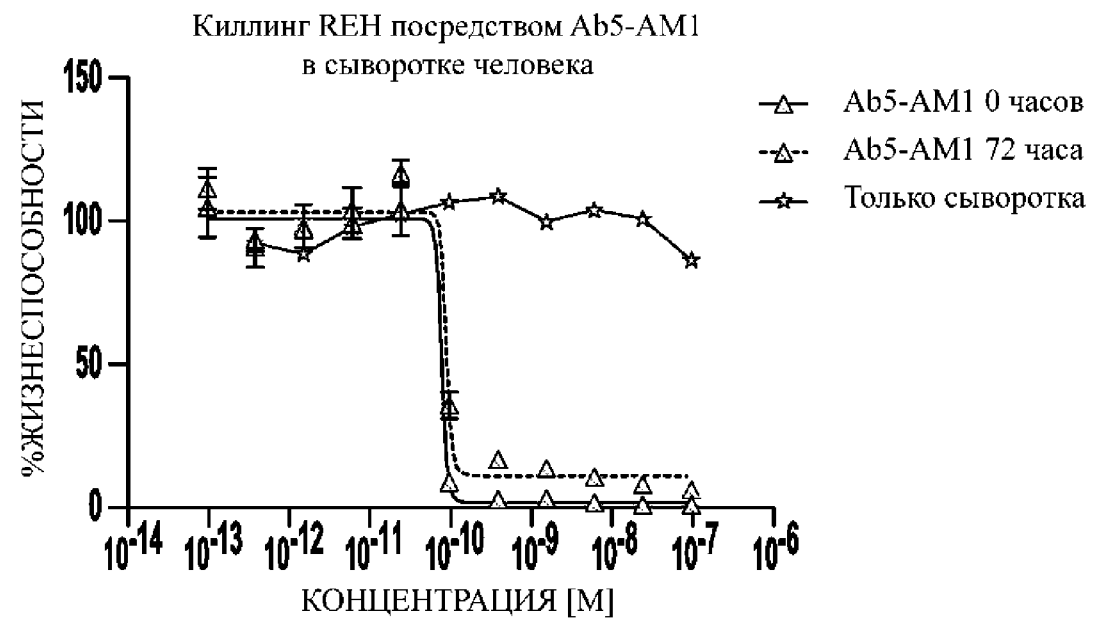
Нормализованные данные киллинга PBMC,
4 дня CTG



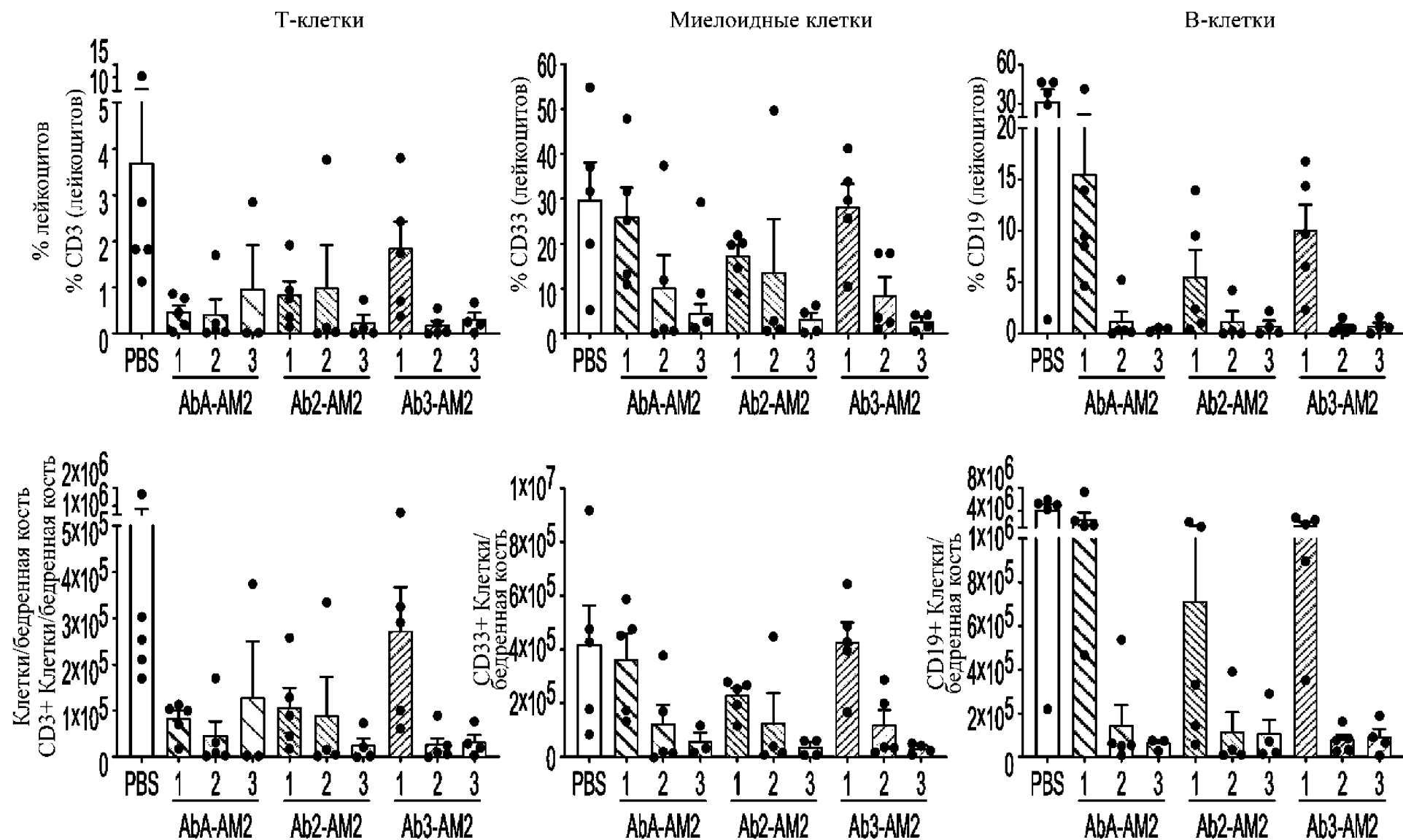
ФИГ. 7



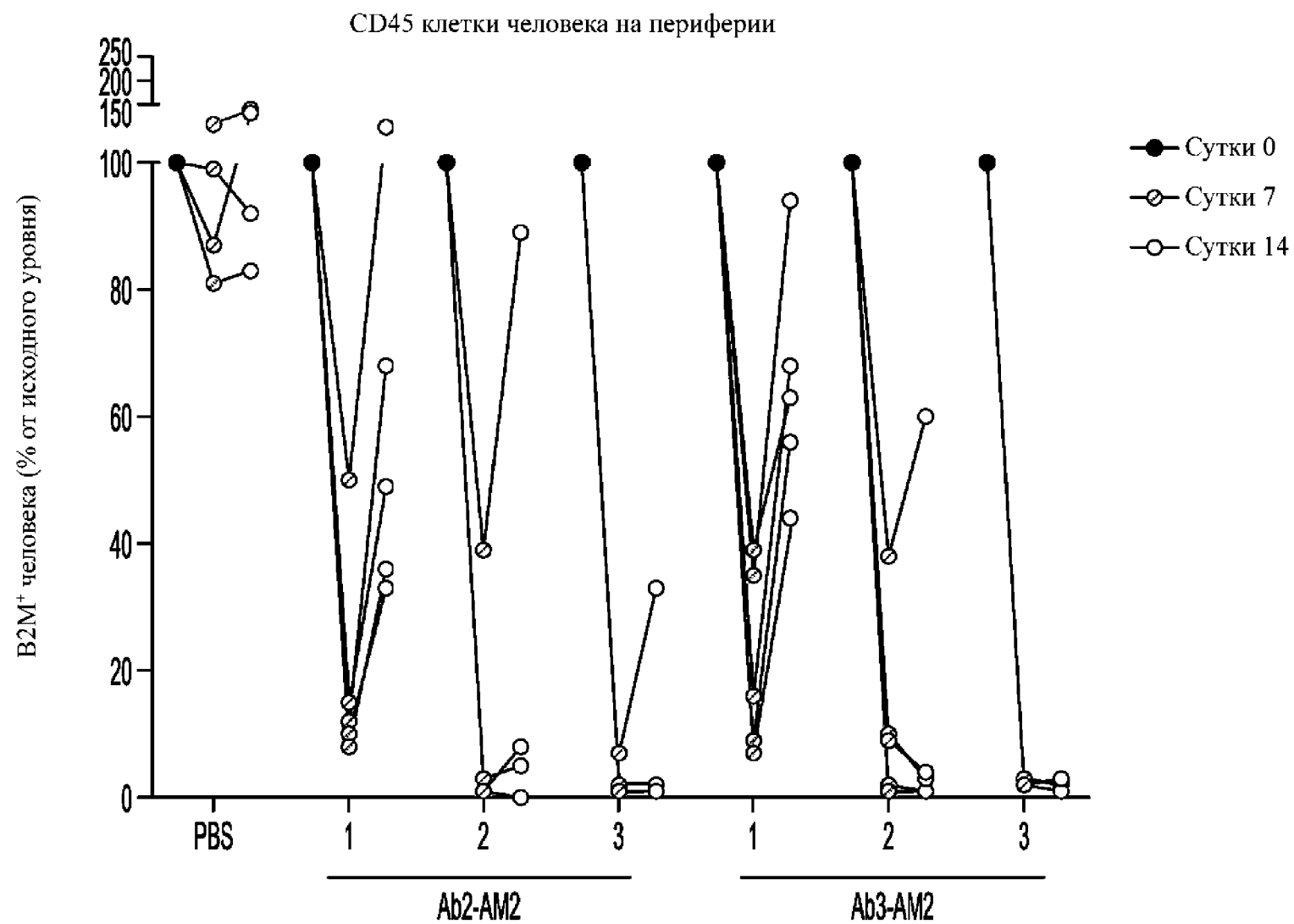
ФИГ. 8



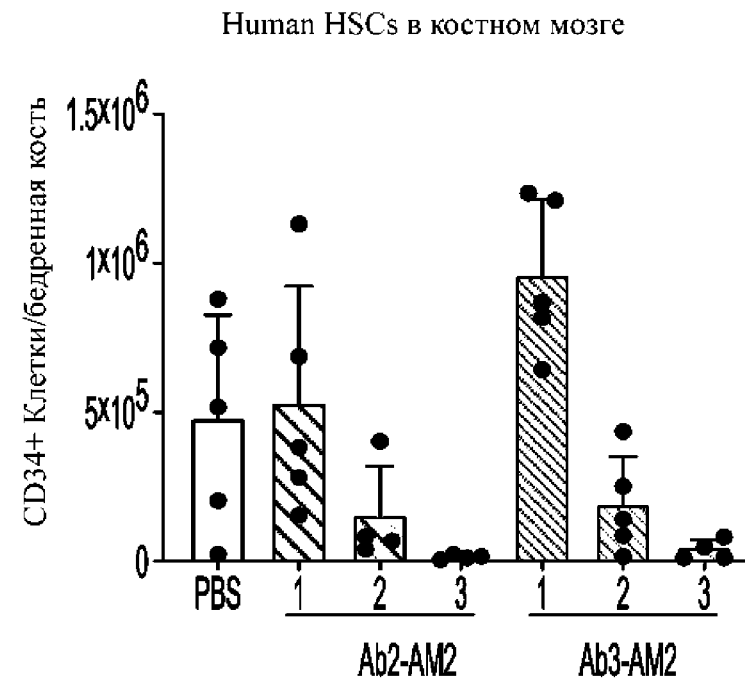
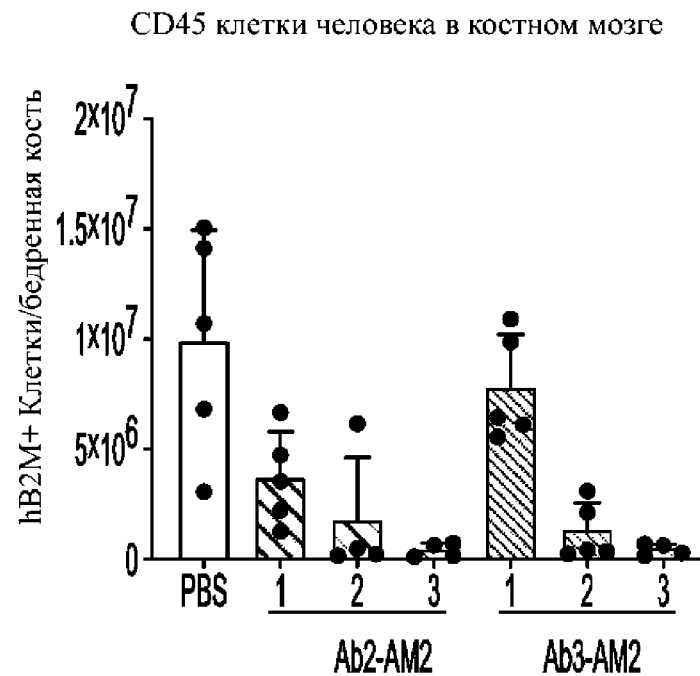
ФИГ. 9



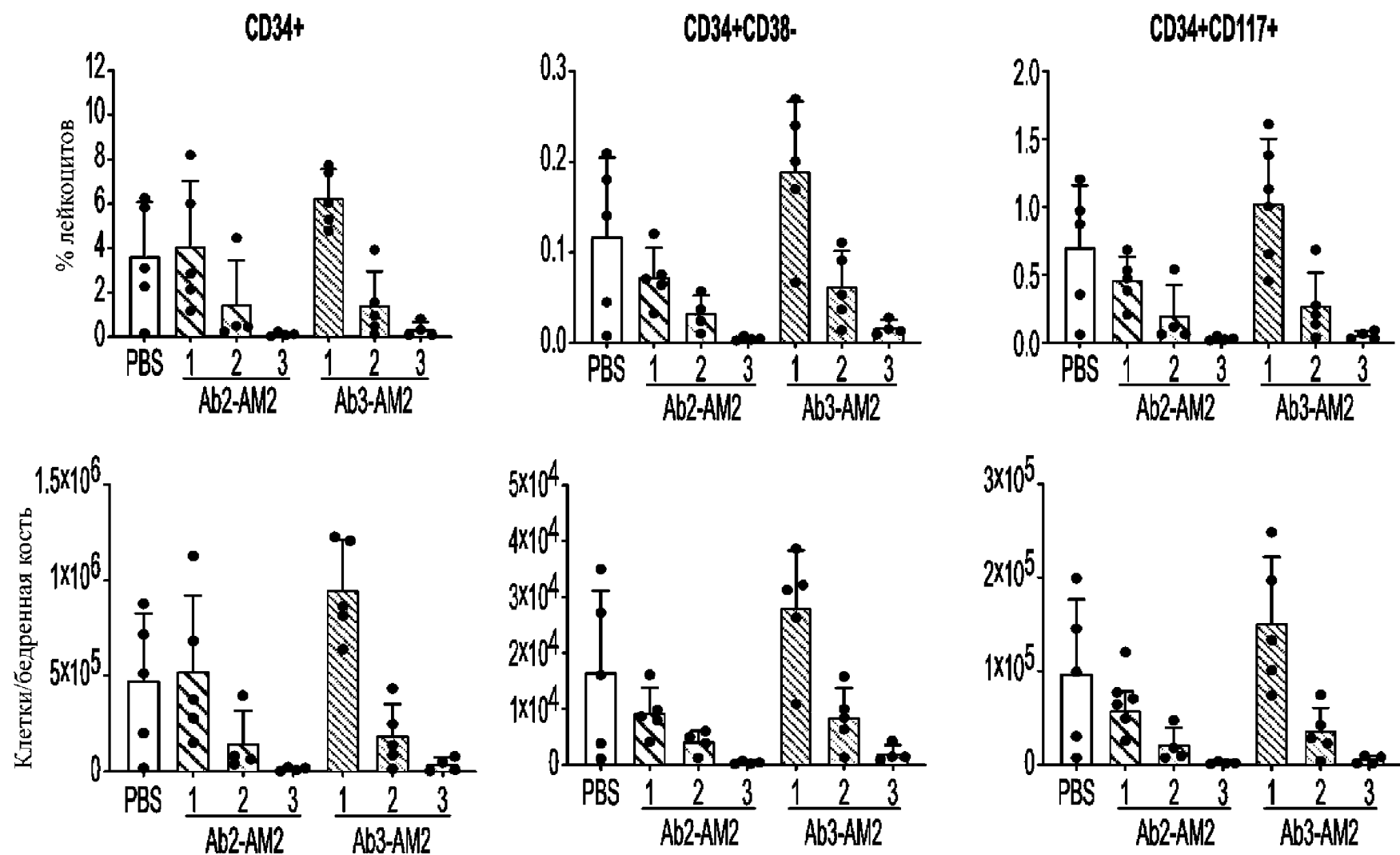
ФИГ. 10А



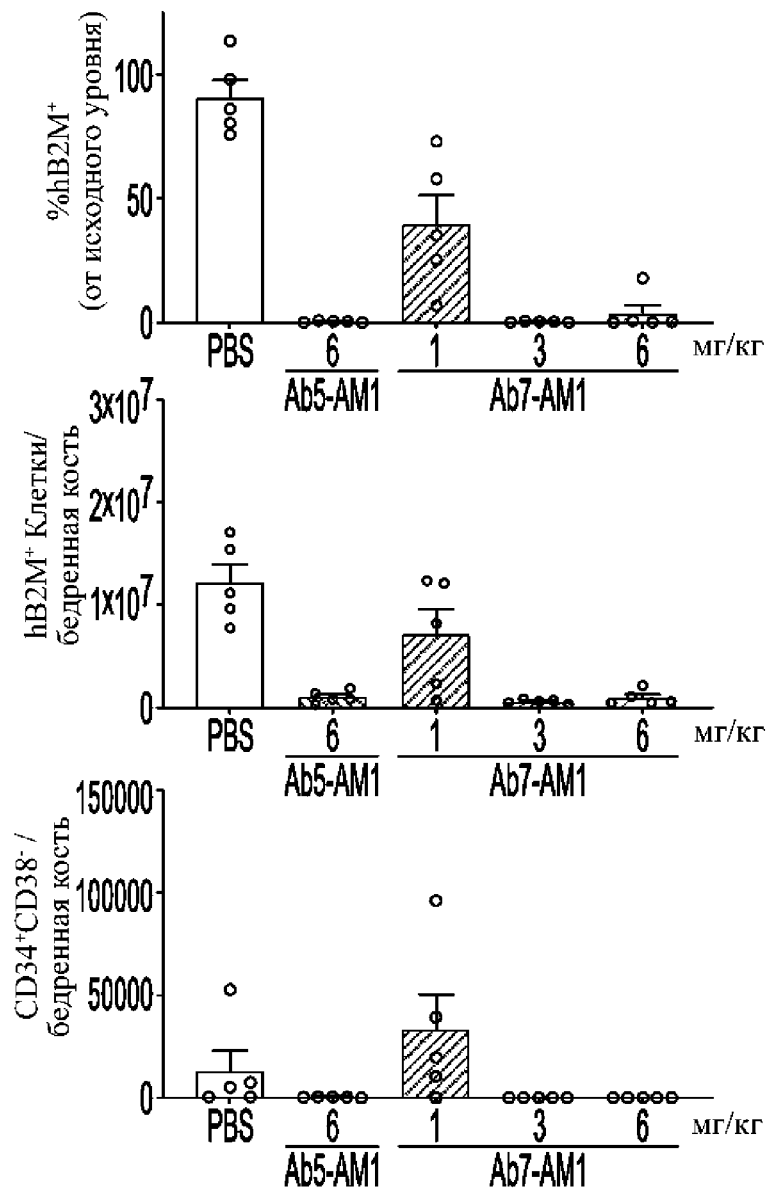
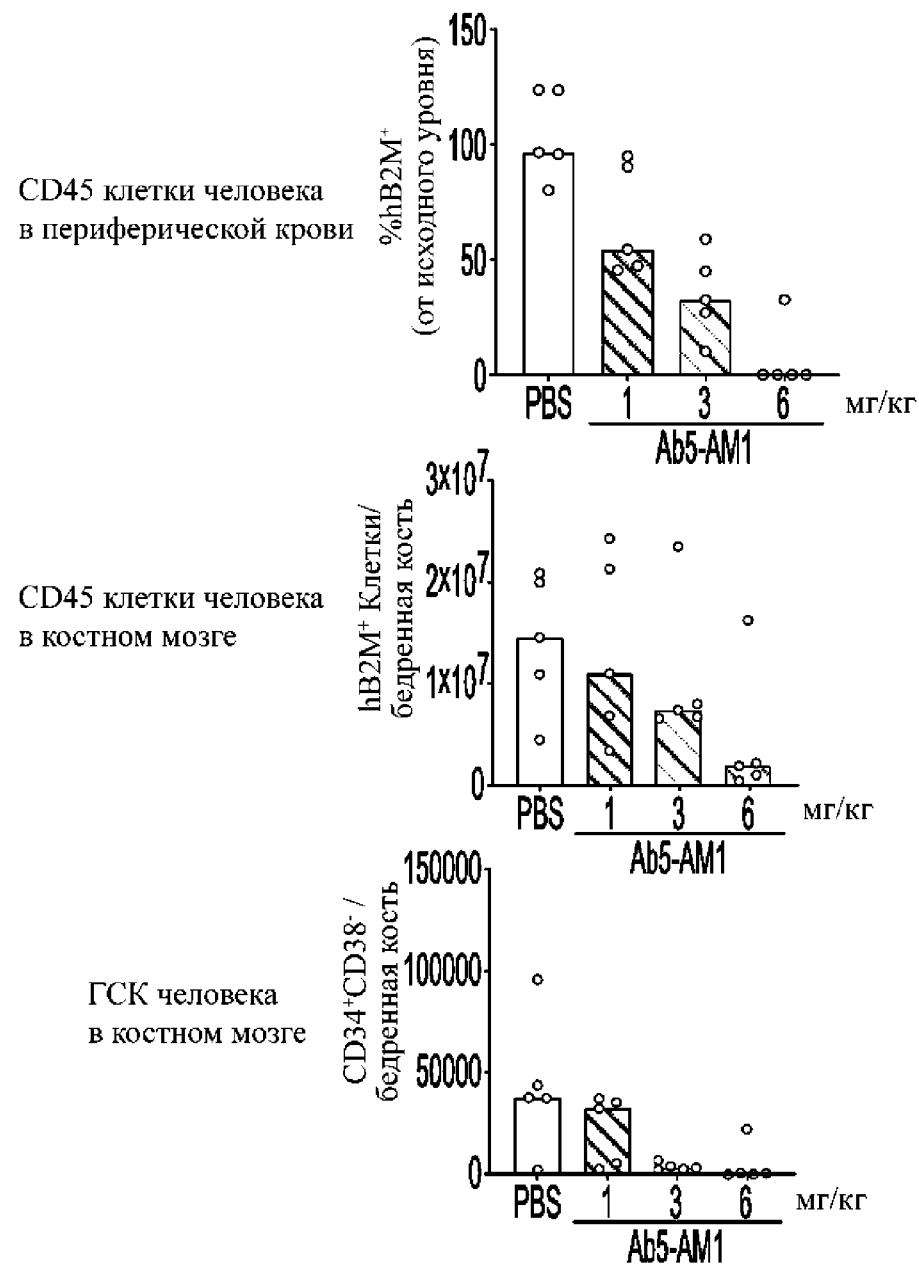
ФИГ. 10В



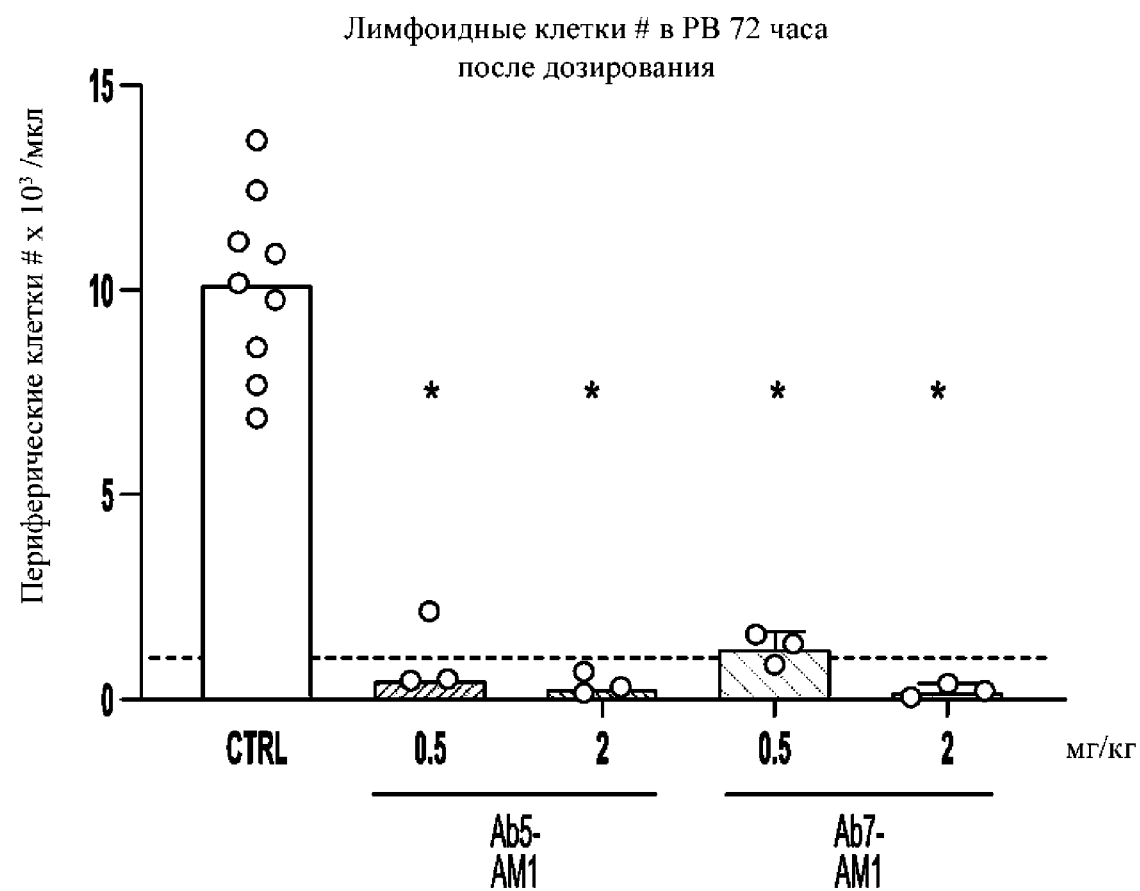
ФИГ. 10С



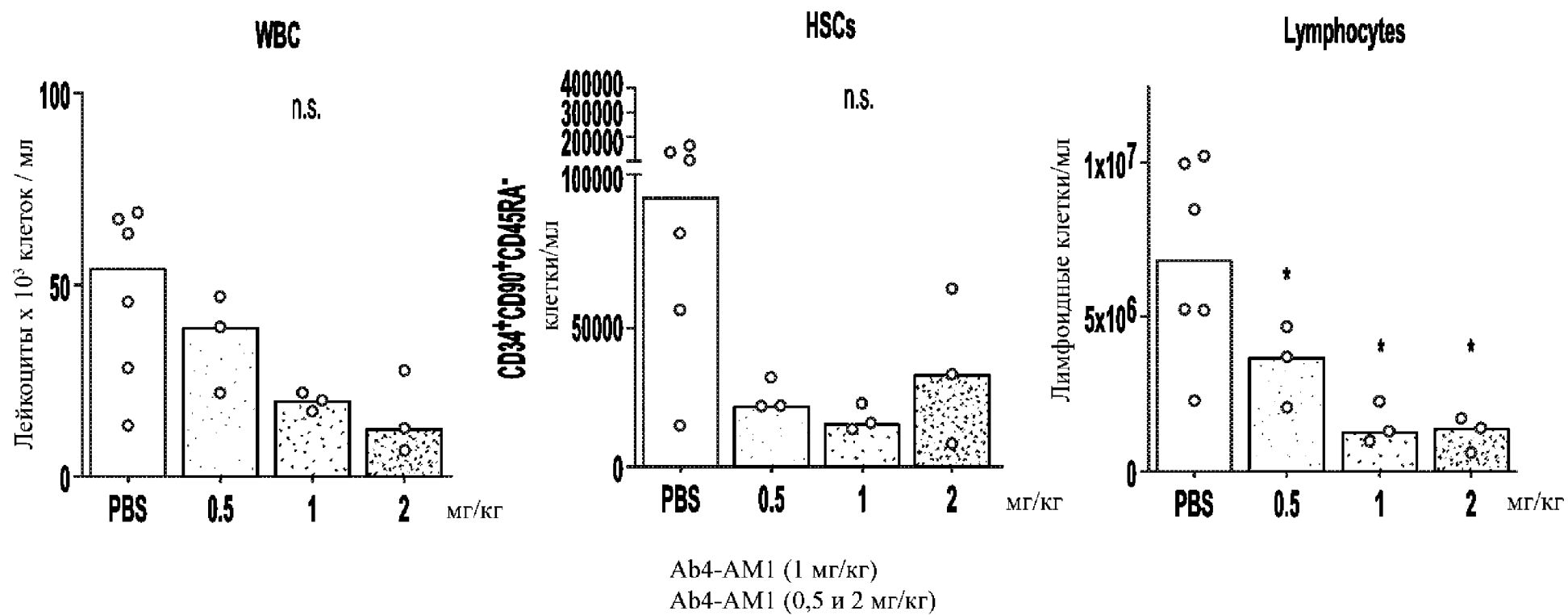
ФИГ. 10D



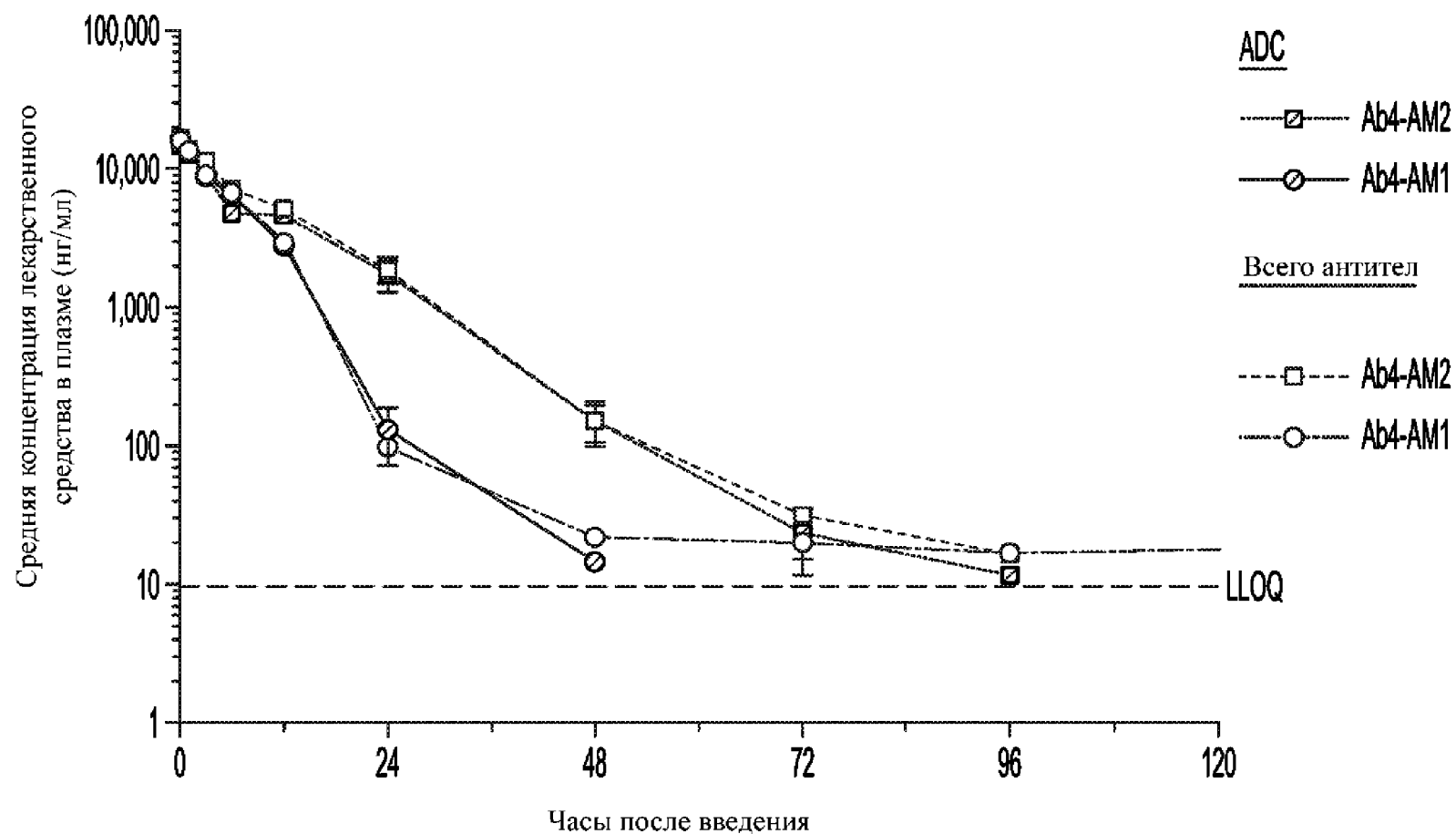
ФИГ. 10Е



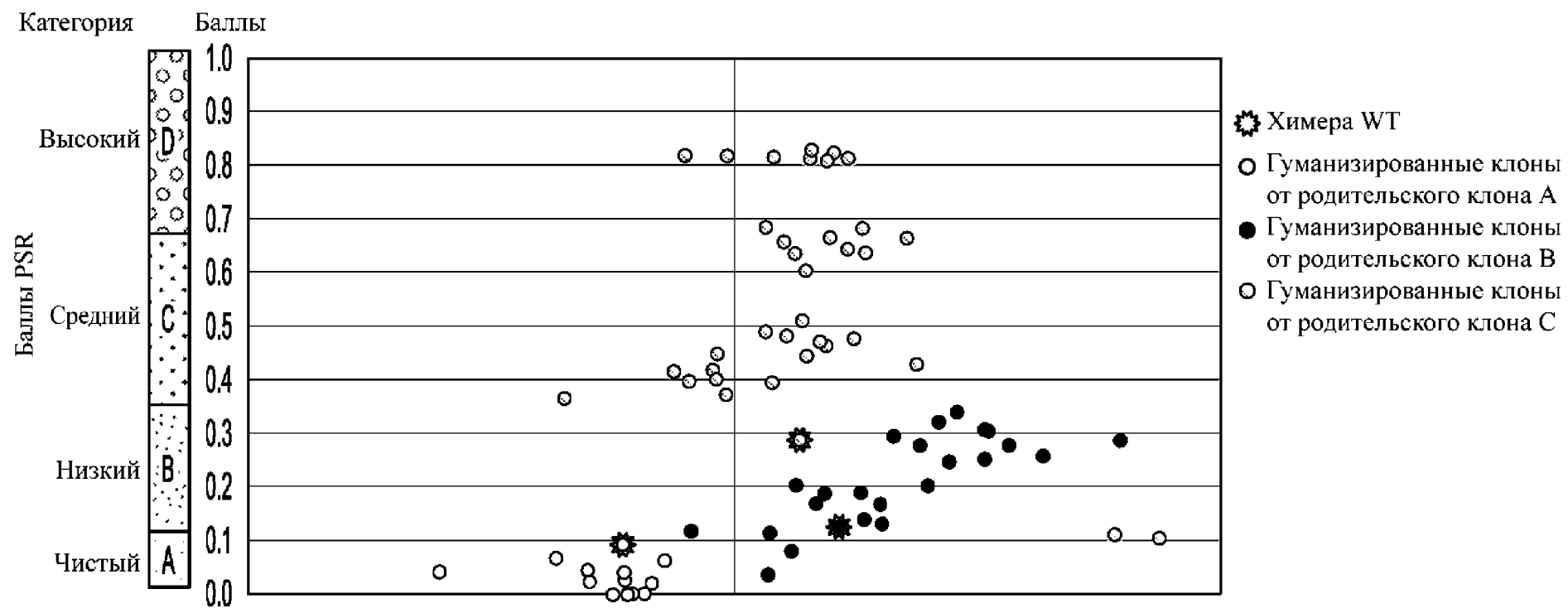
ФИГ. 11А



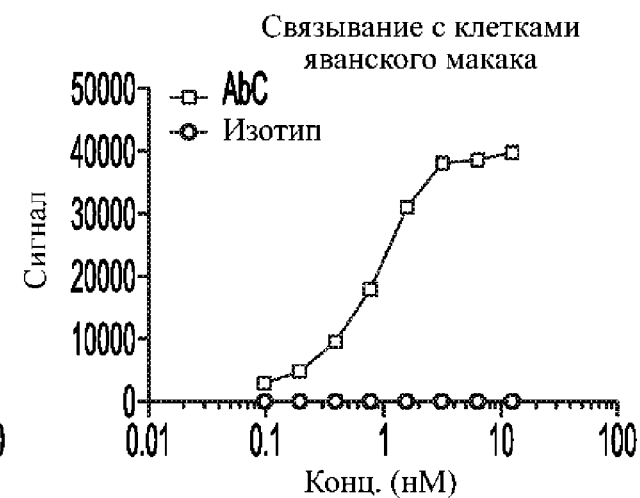
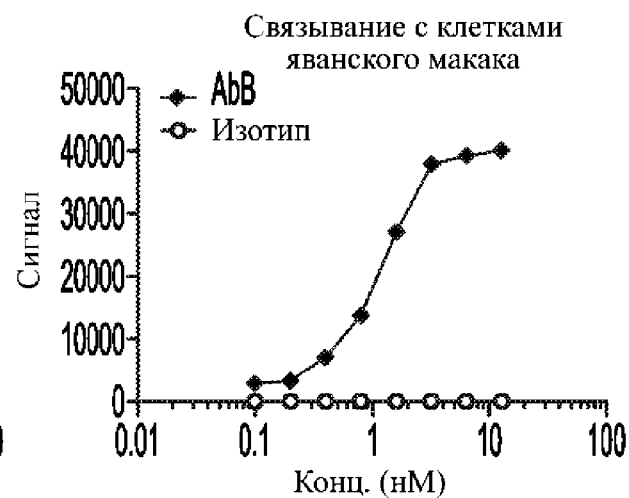
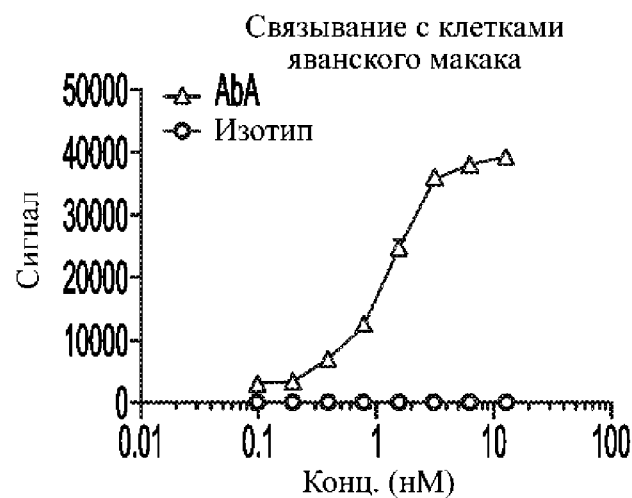
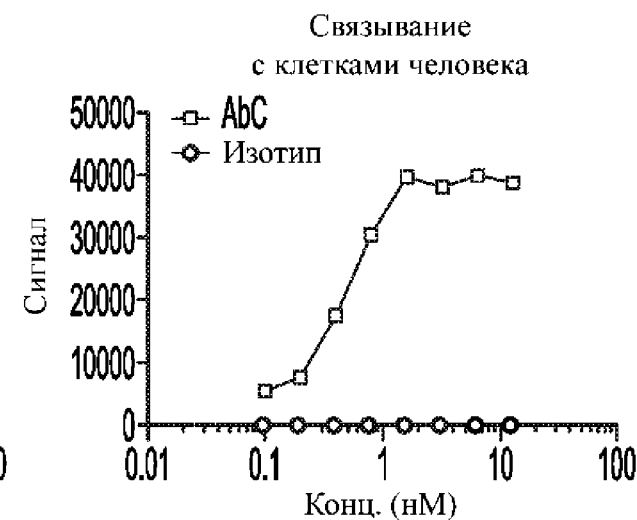
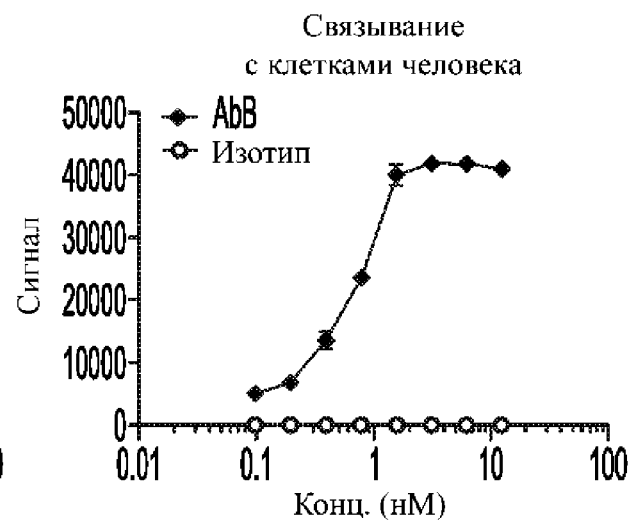
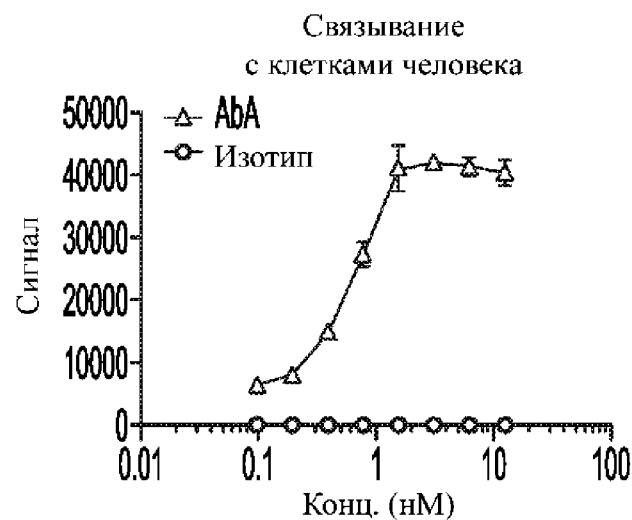
ФИГ. 11В



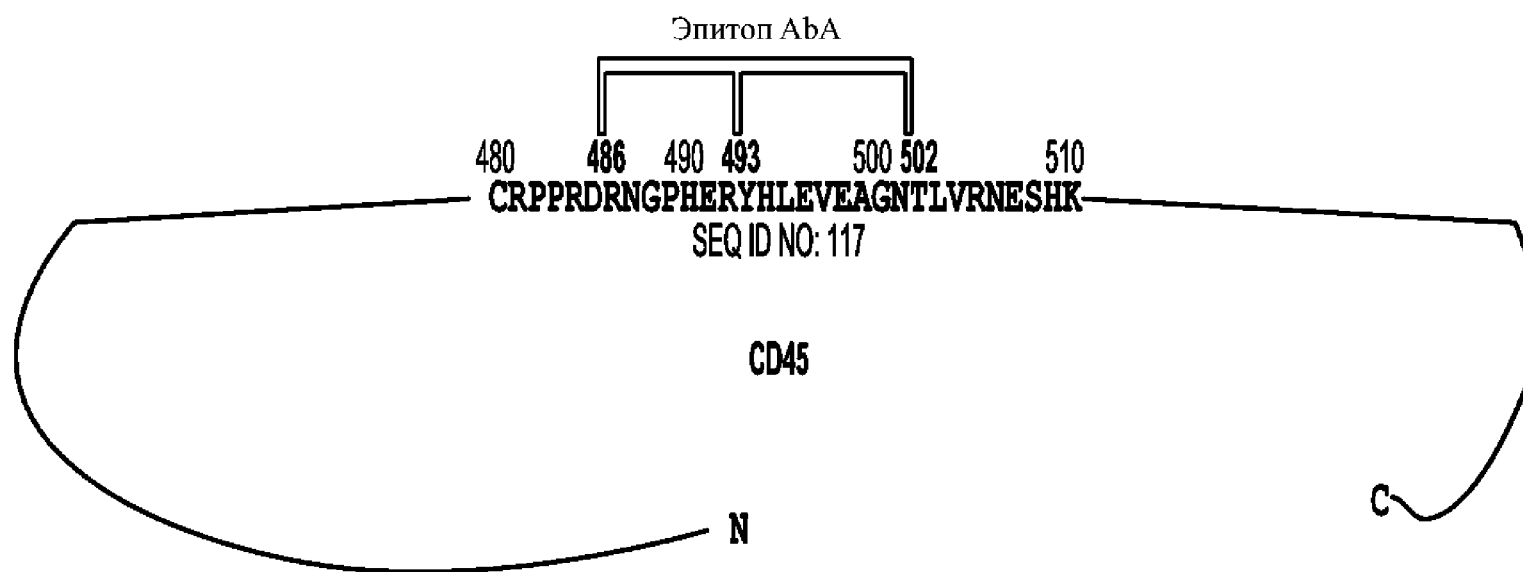
ФИГ. 12



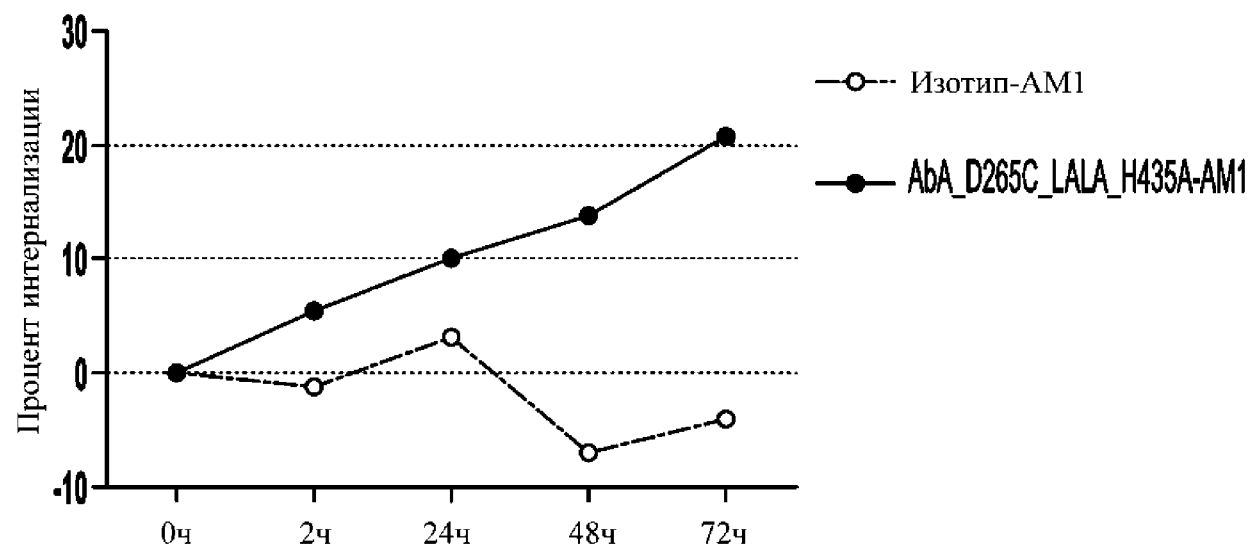
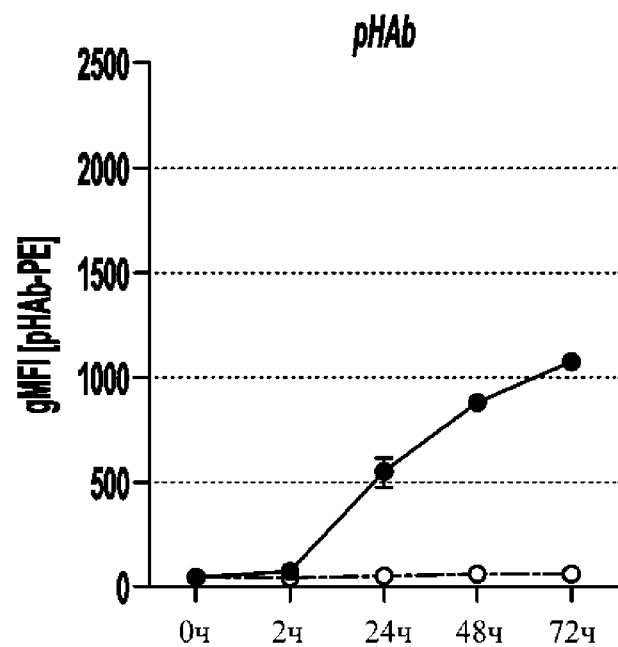
ФИГ. 13



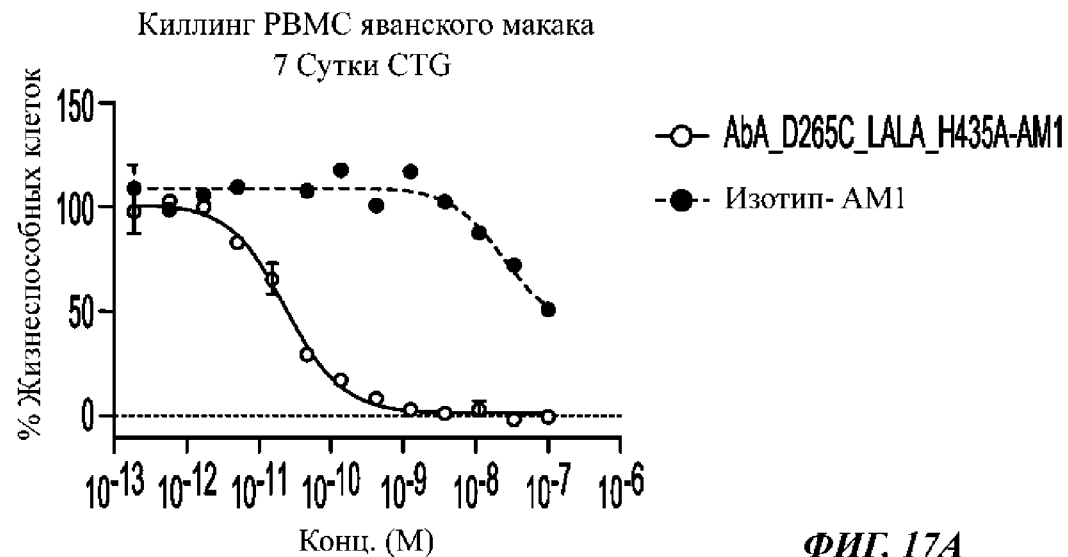
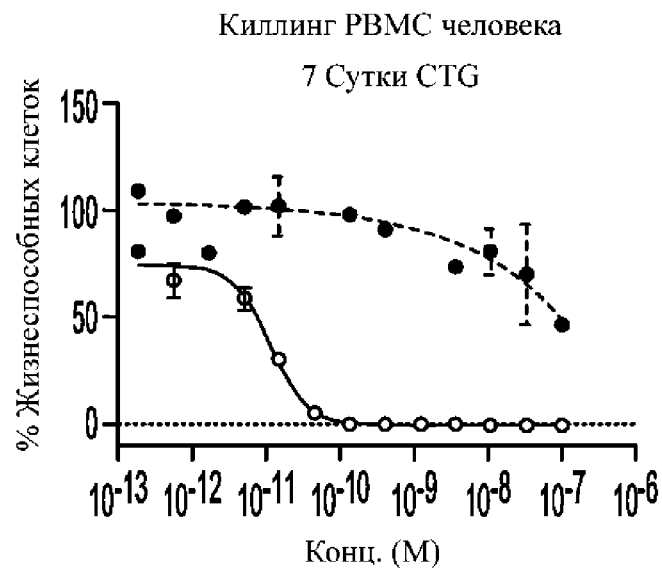
ФИГ. 14



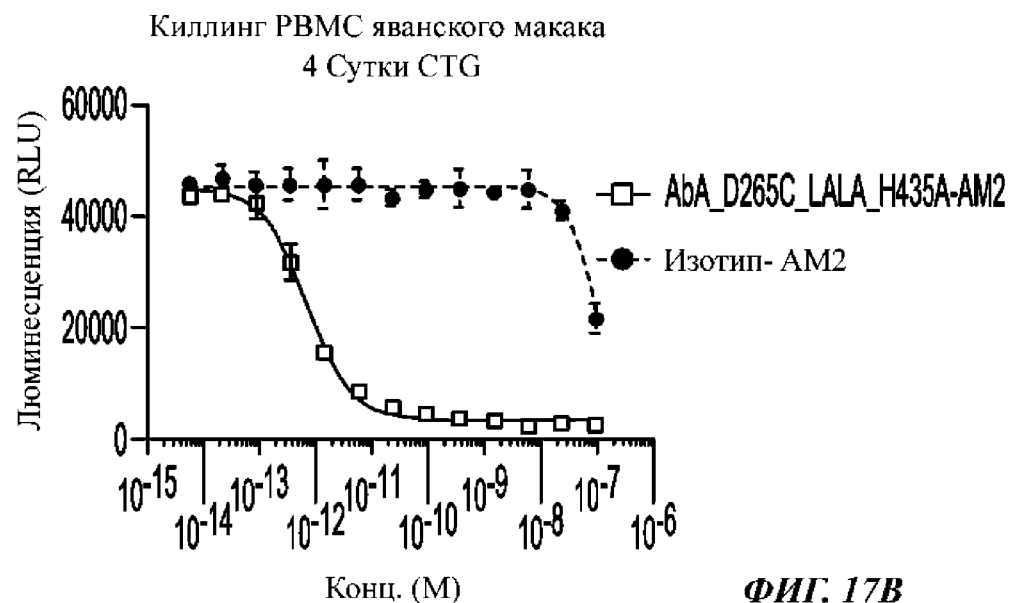
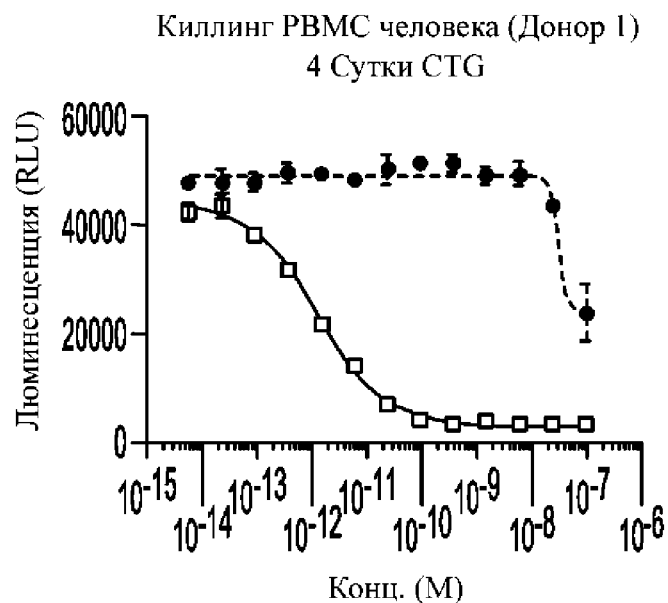
ФИГ. 15



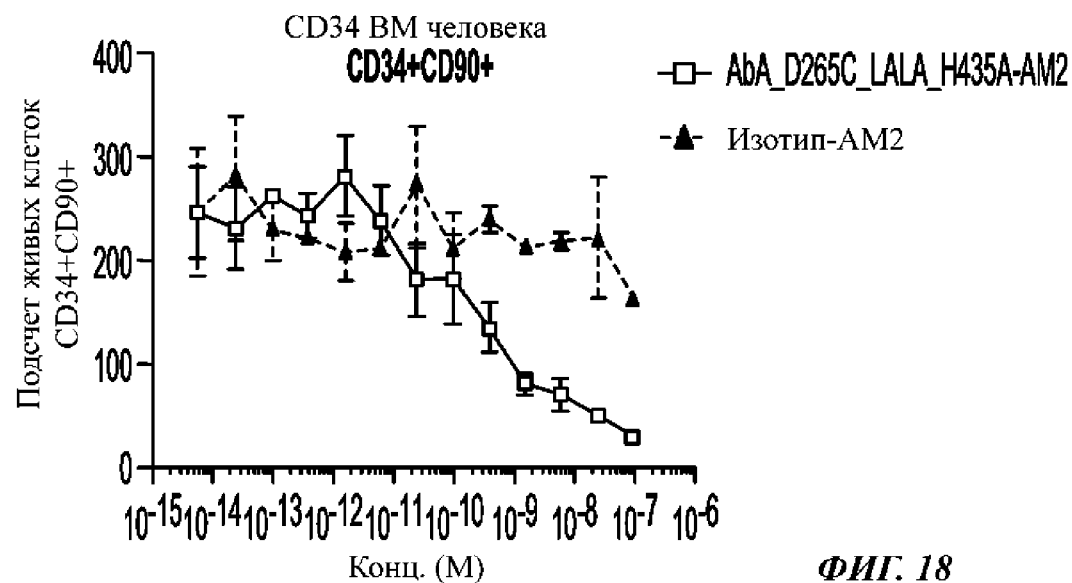
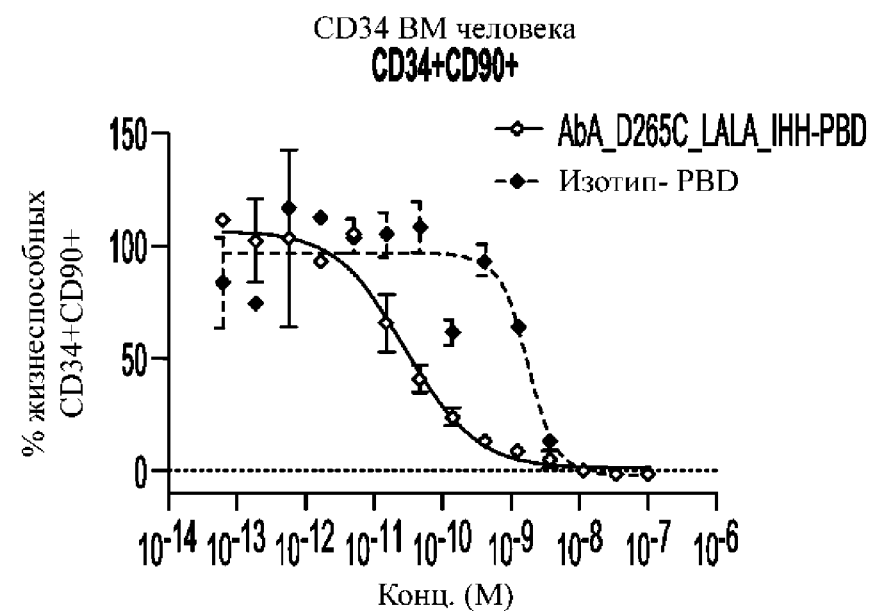
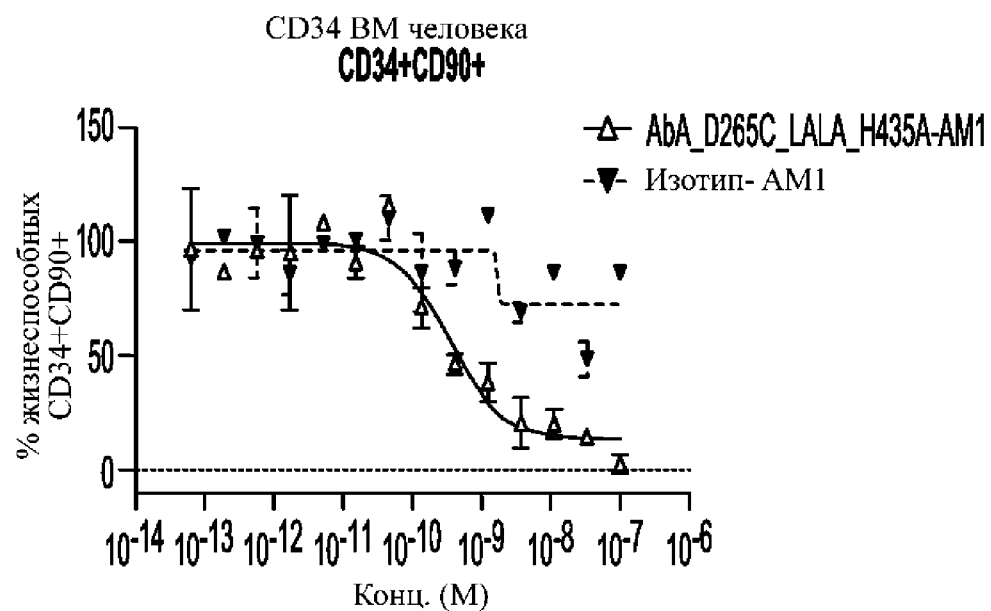
ФИГ. 16



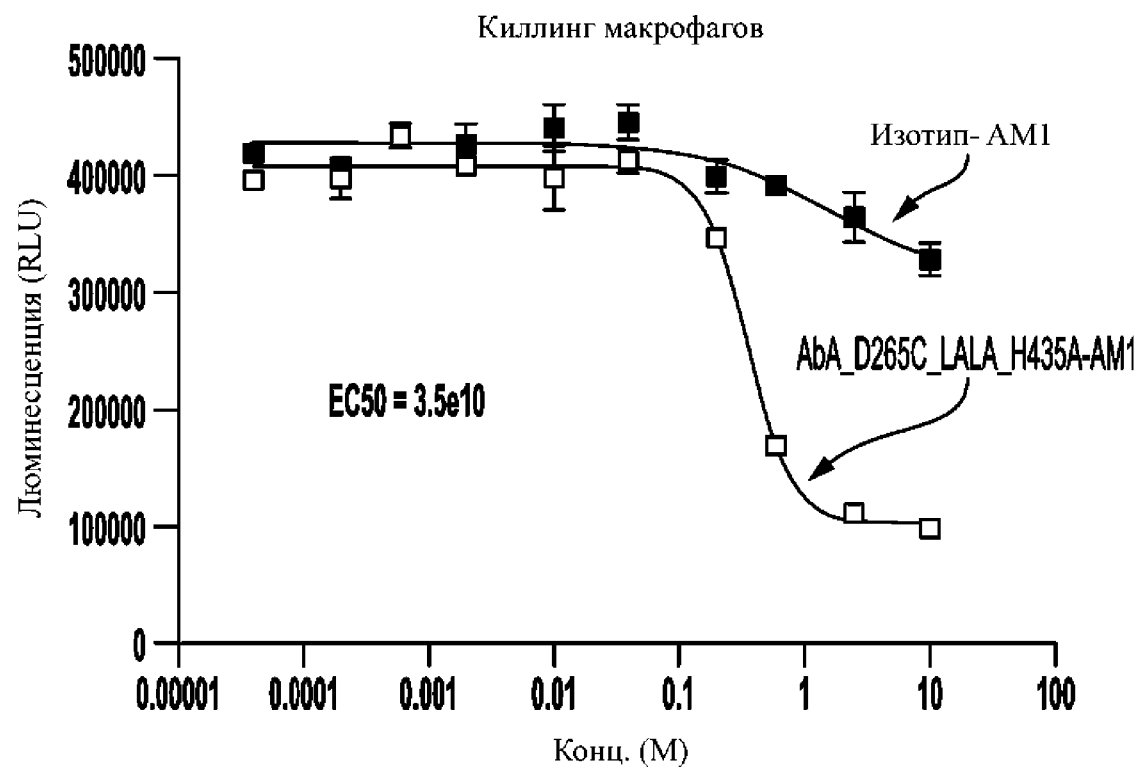
ФИГ. 17А



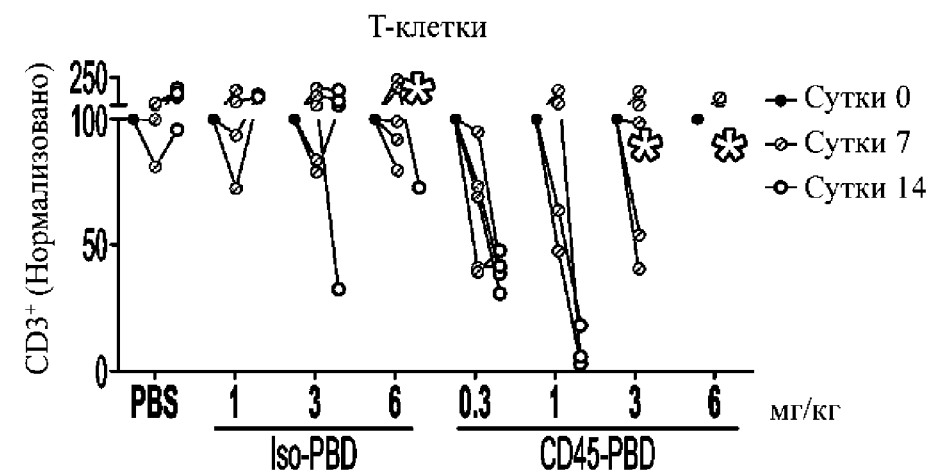
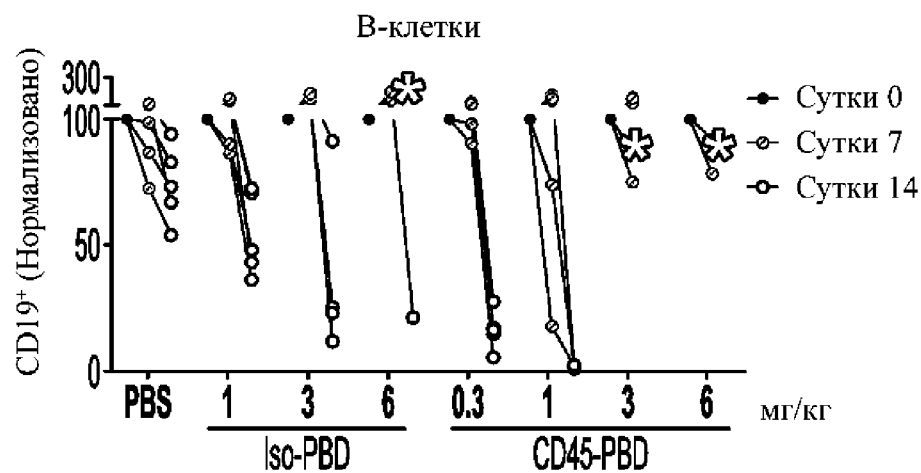
ФИГ. 17В



ФИГ. 18

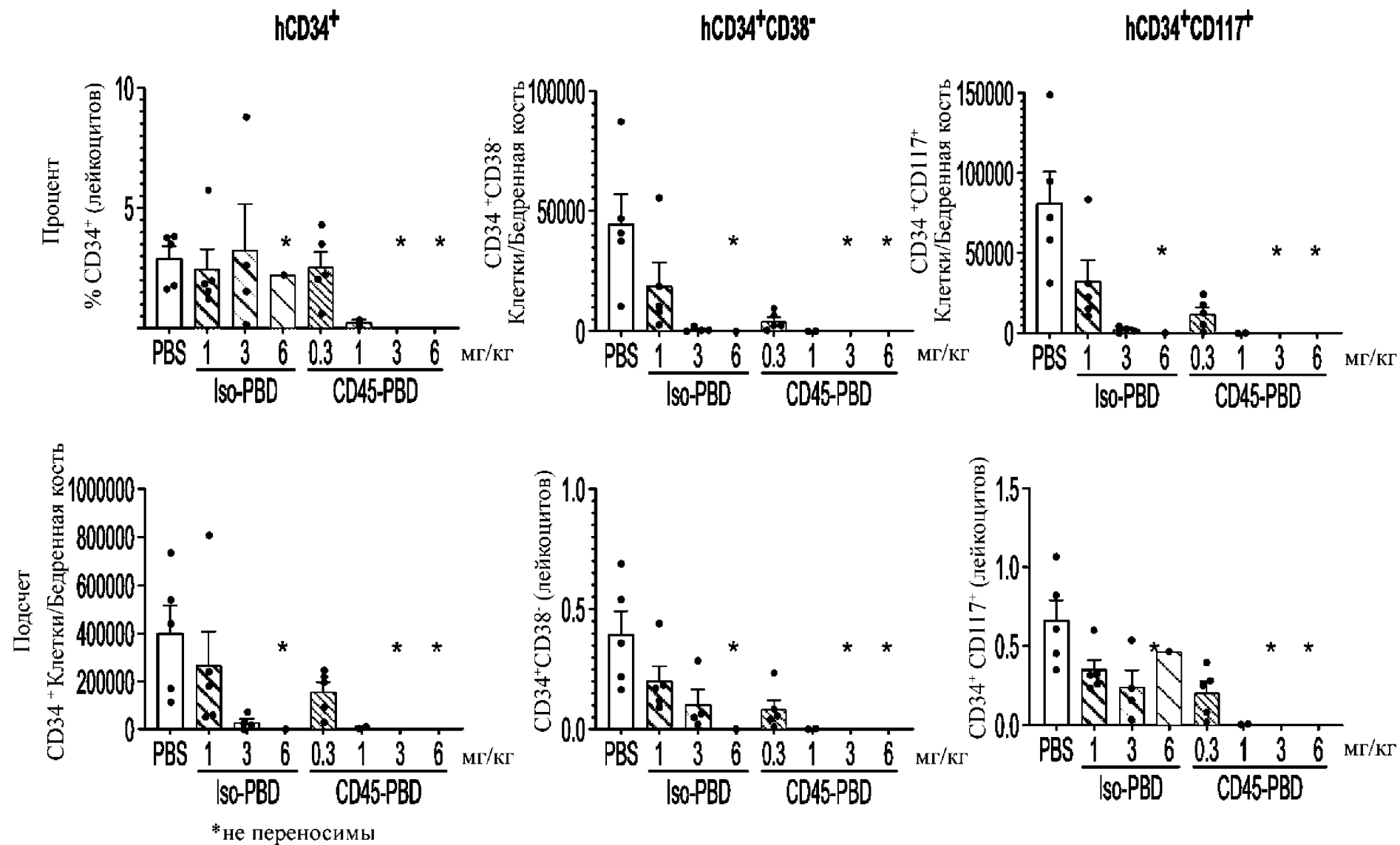


ФИГ. 19

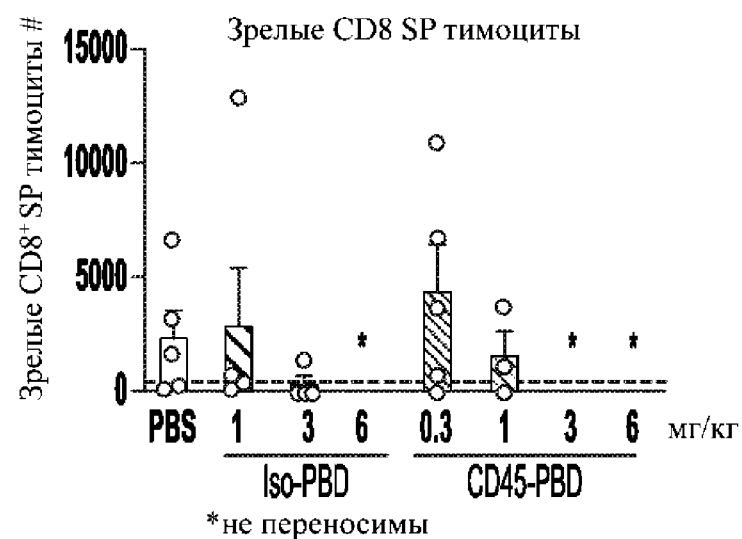
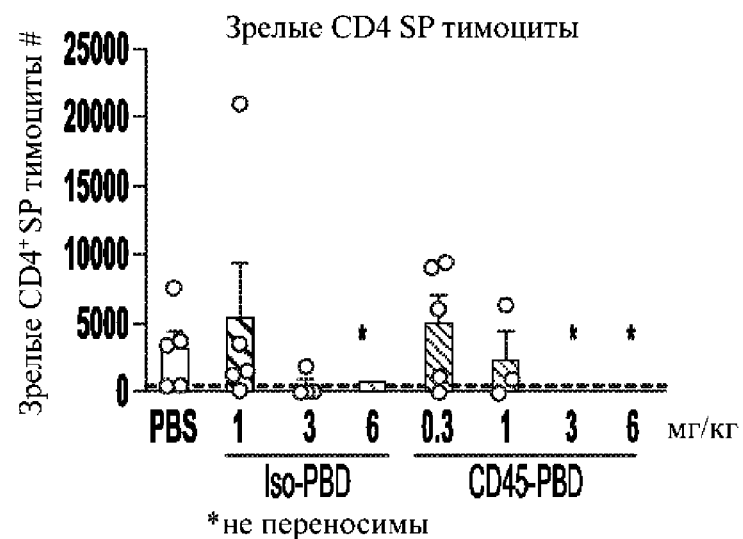
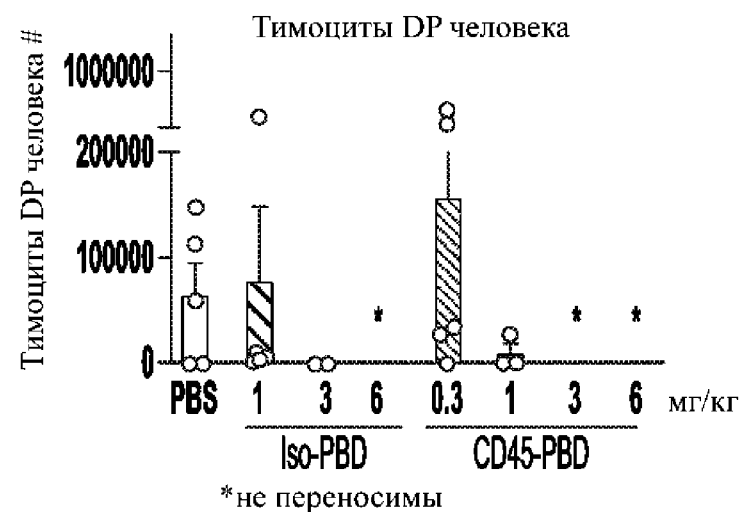
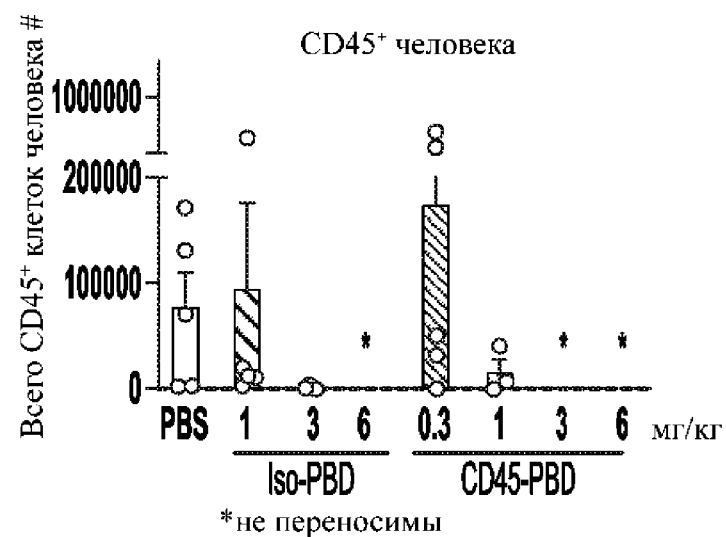


* Не переносимы; >4/5 умерщвлены к дню 14

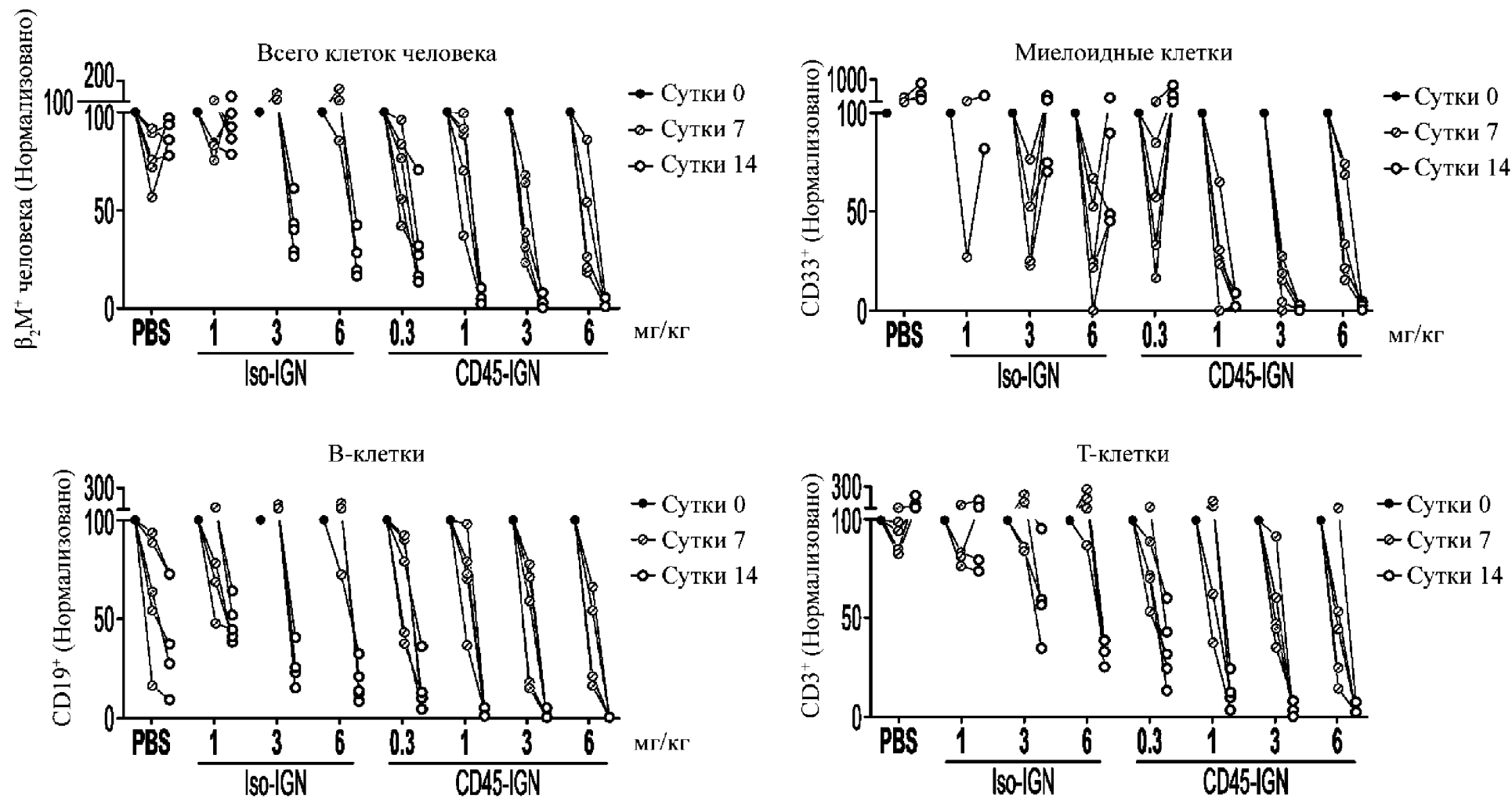
ФИГ. 20



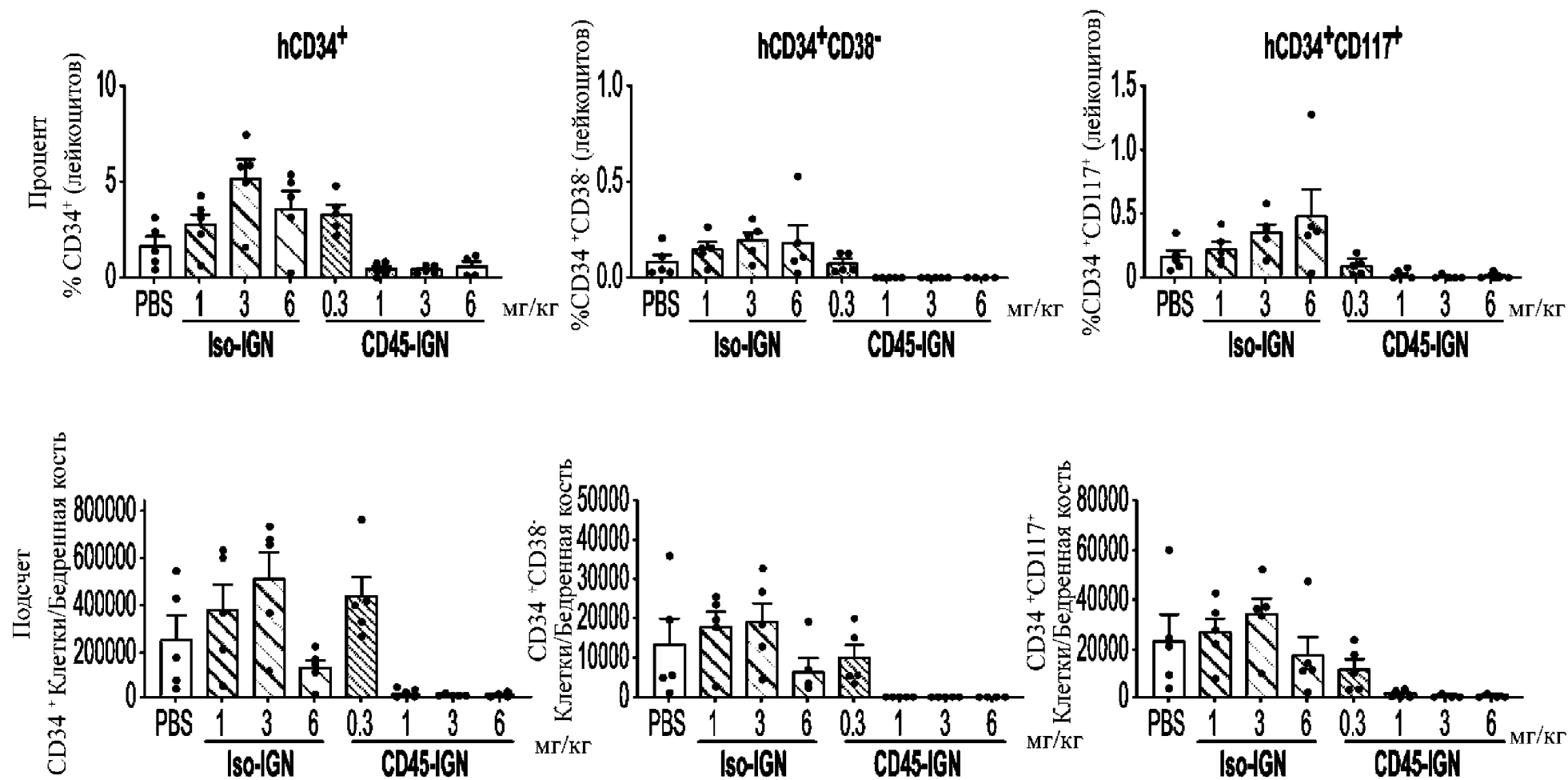
ФИГ. 21



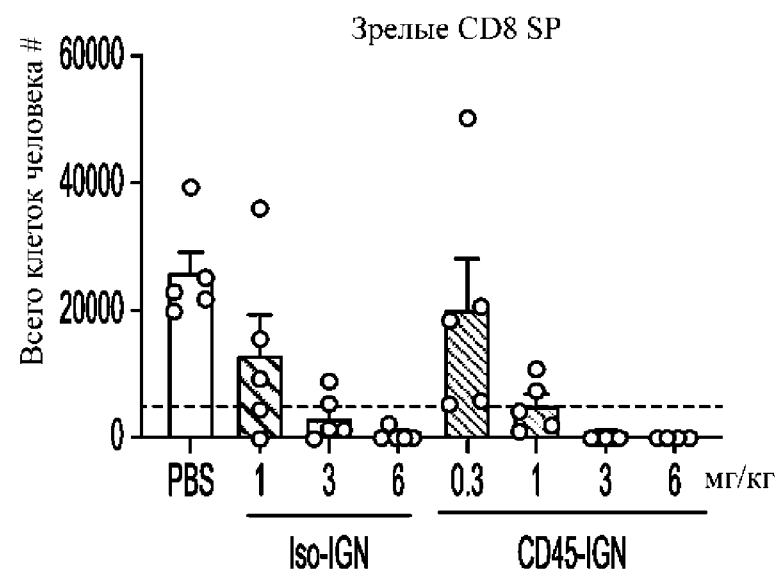
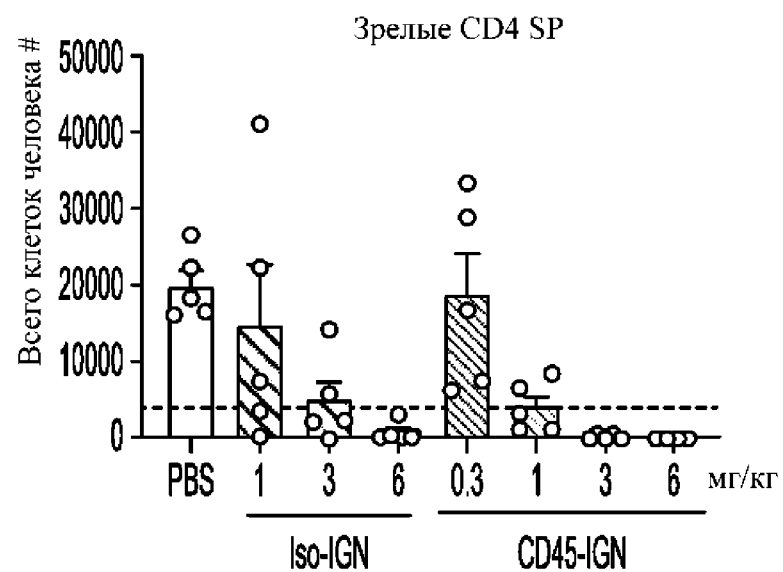
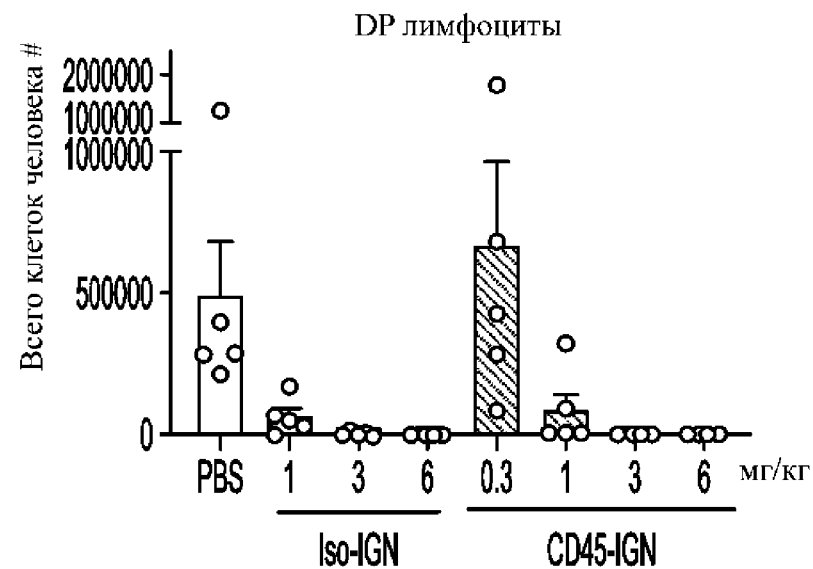
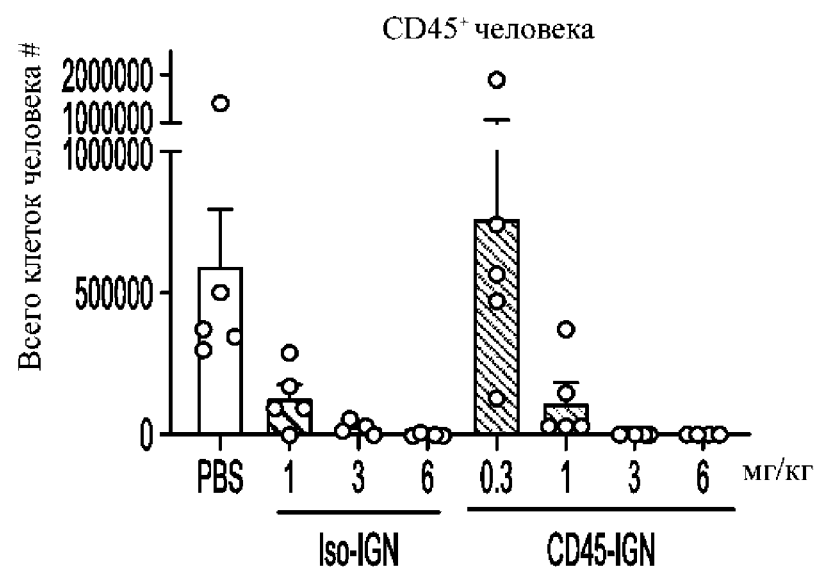
ФИГ. 22



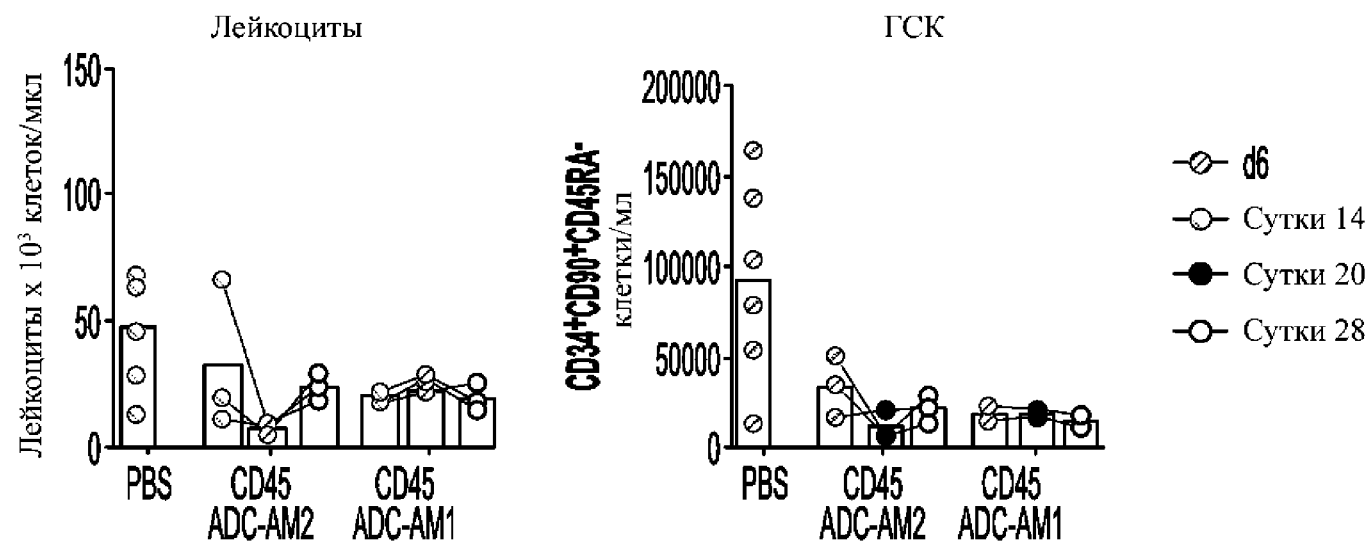
ФИГ. 23



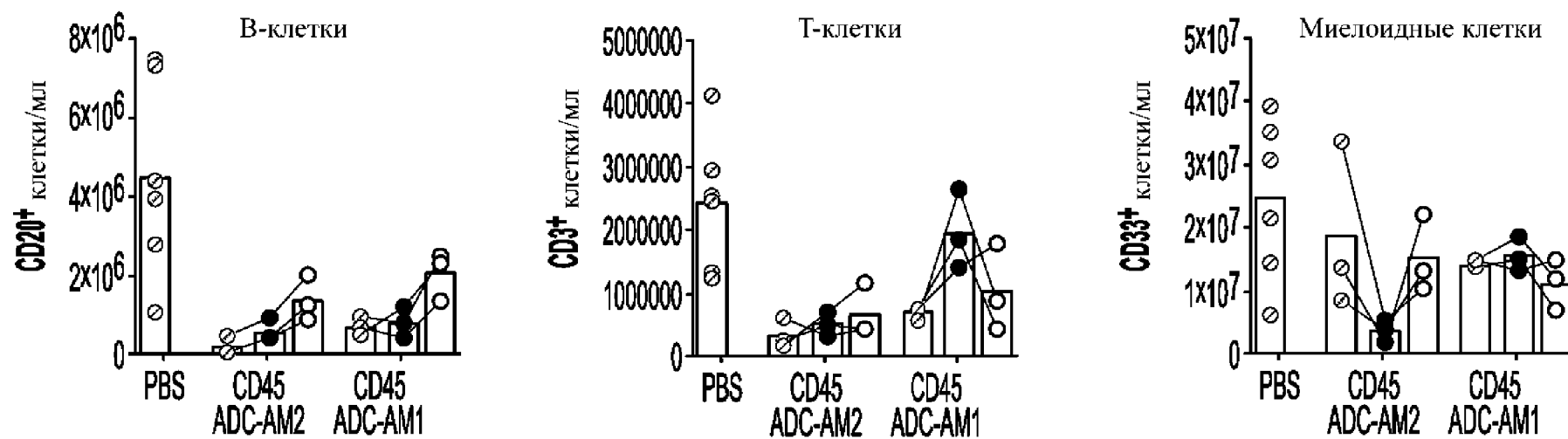
ФИГ. 24



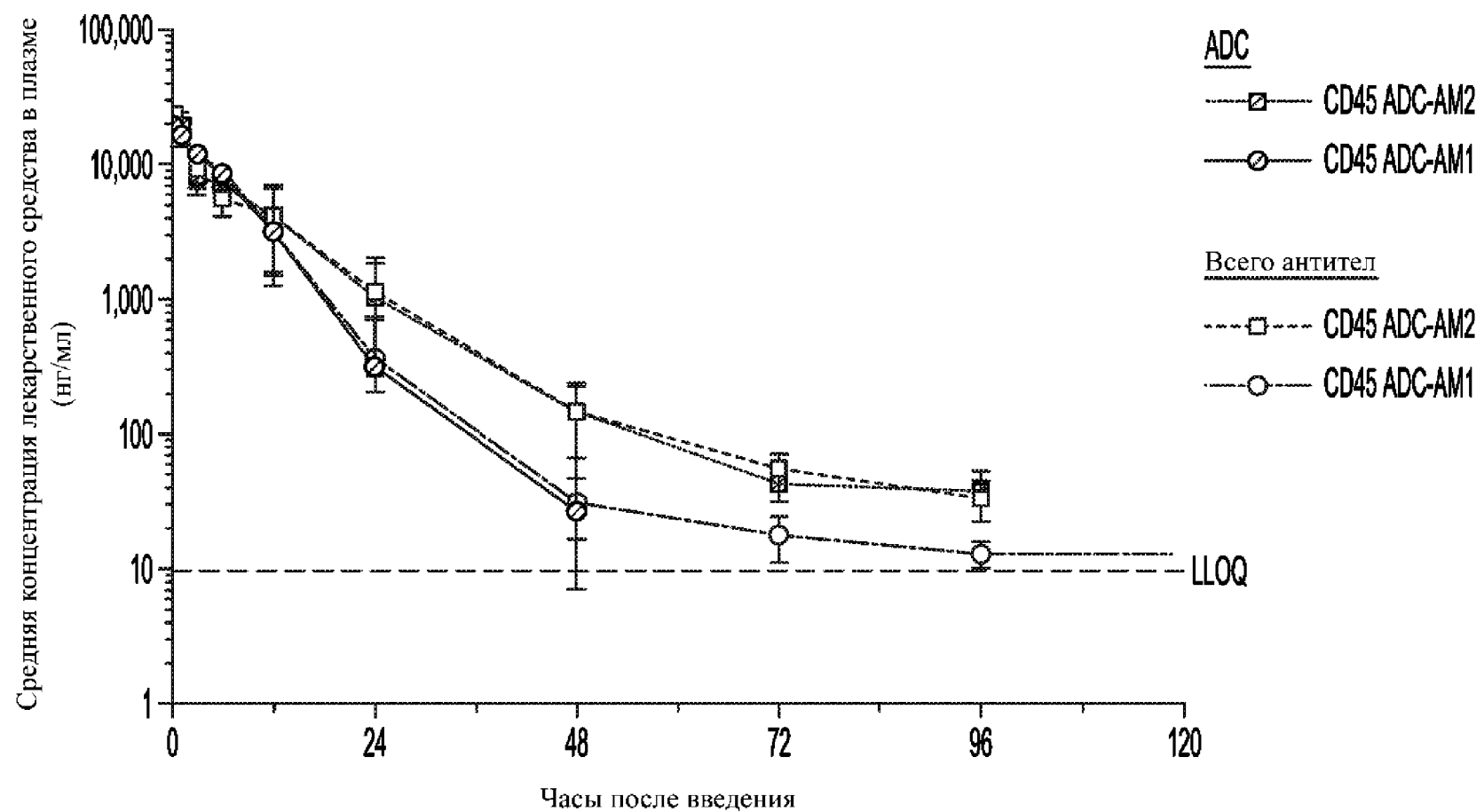
ФИГ. 25



Иммунные клетки



ФИГ. 26



ФИГ. 27

Модель PDX AML

Тип

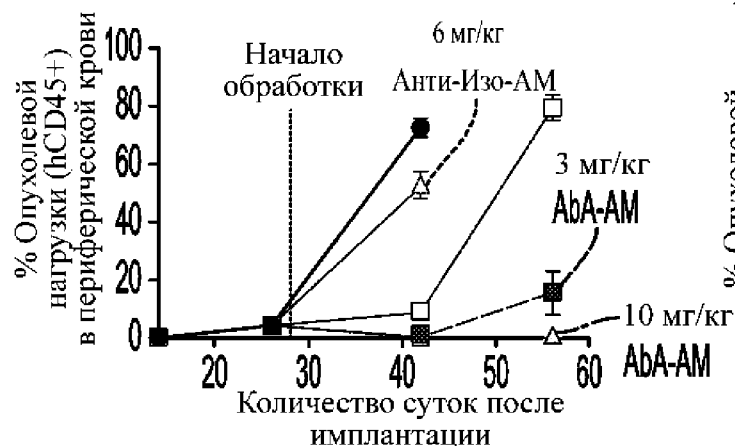
Предшествующее лечение

Кариотип; Мутация

AML #1

AML, M4

О предыдущем лечении не сообщалось
Кариотип 46, XY, FLT3+, NPM1+



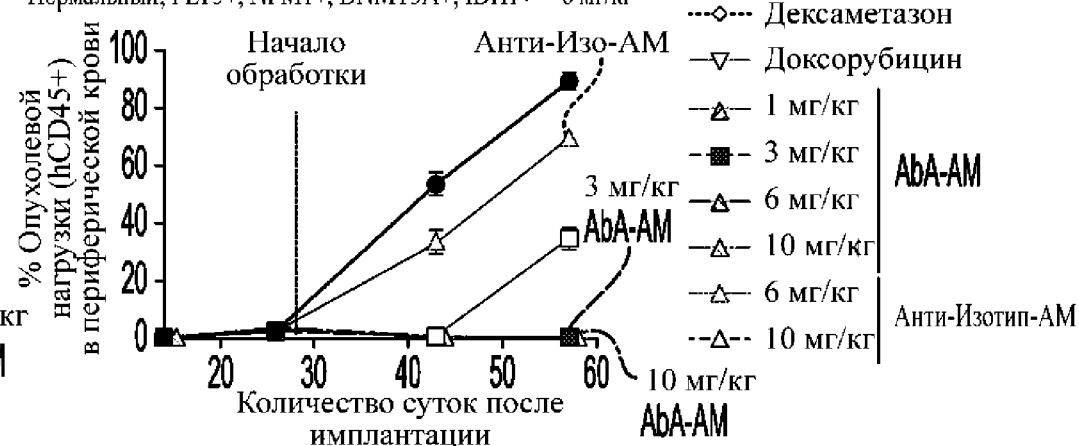
AML #2

Рецидив AML/Устойчивый

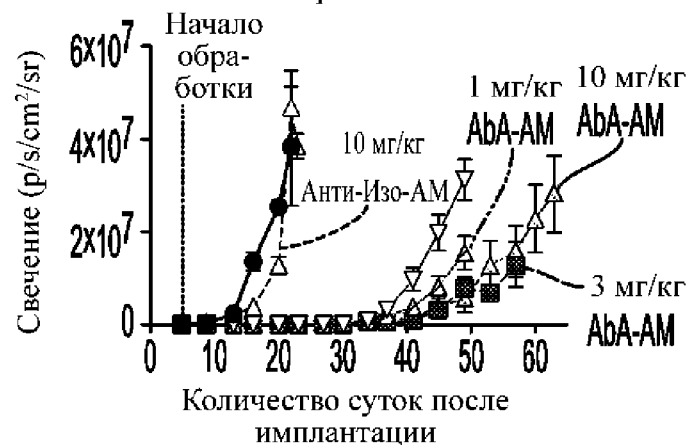
Аллогенный HSCT, Сорафениб,

Гидроксимочевина, Децитабин

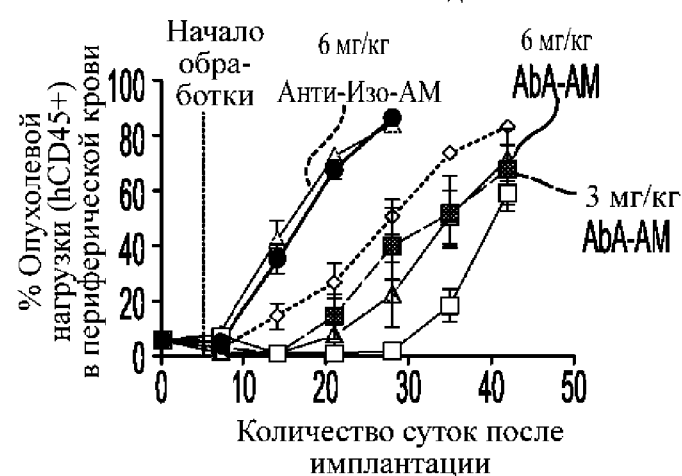
Нормальный; FLT3+, NPM1+, DNMT3A+, IDH1+ 6 мг/кг



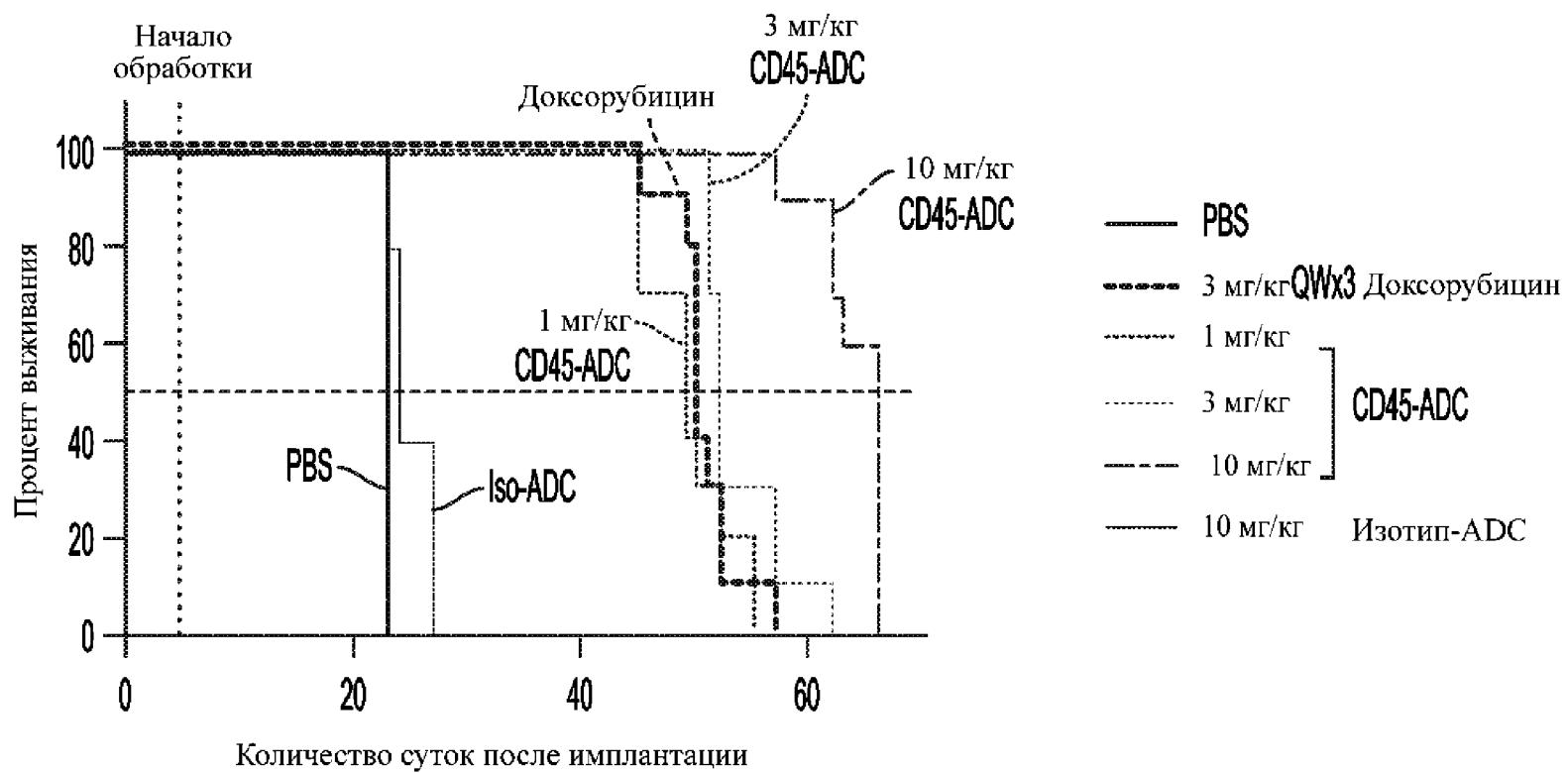
REN-Luc ALL модель
ксенотрансплантата



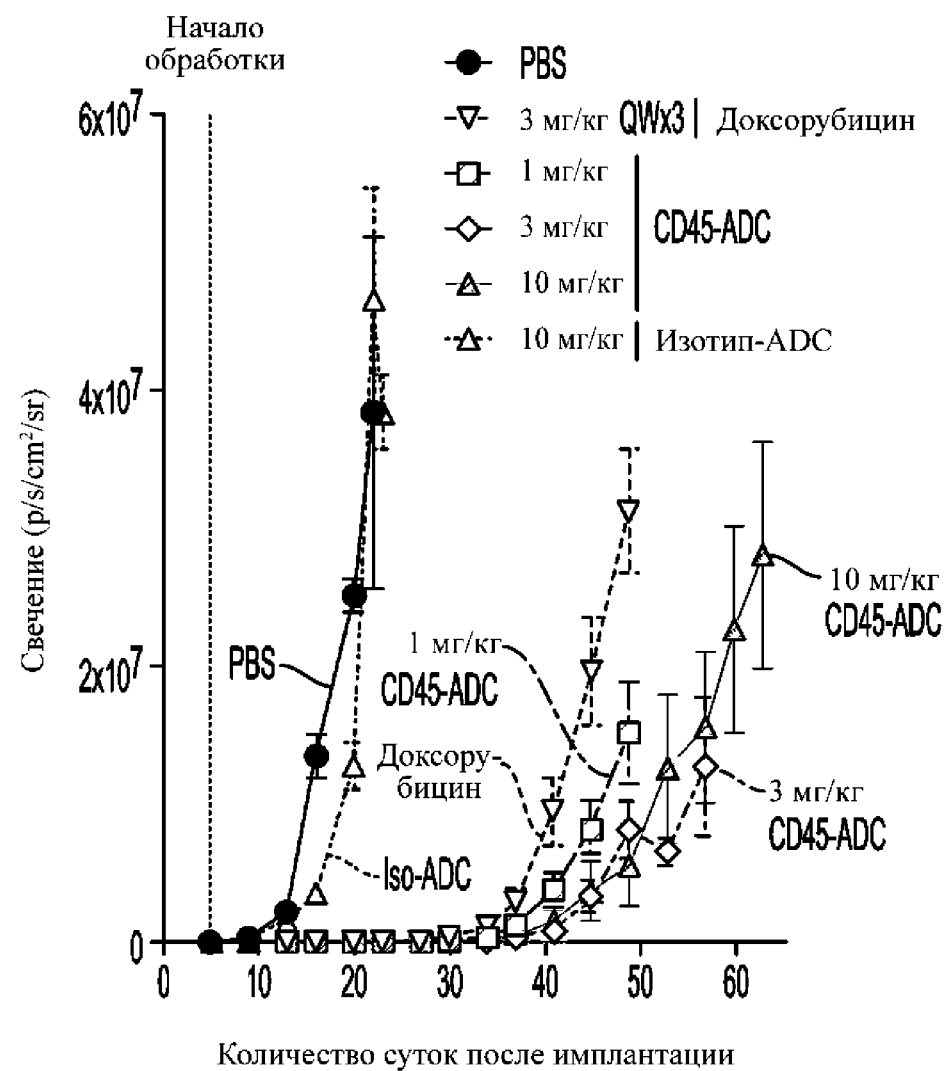
T-ALL PDX Модель



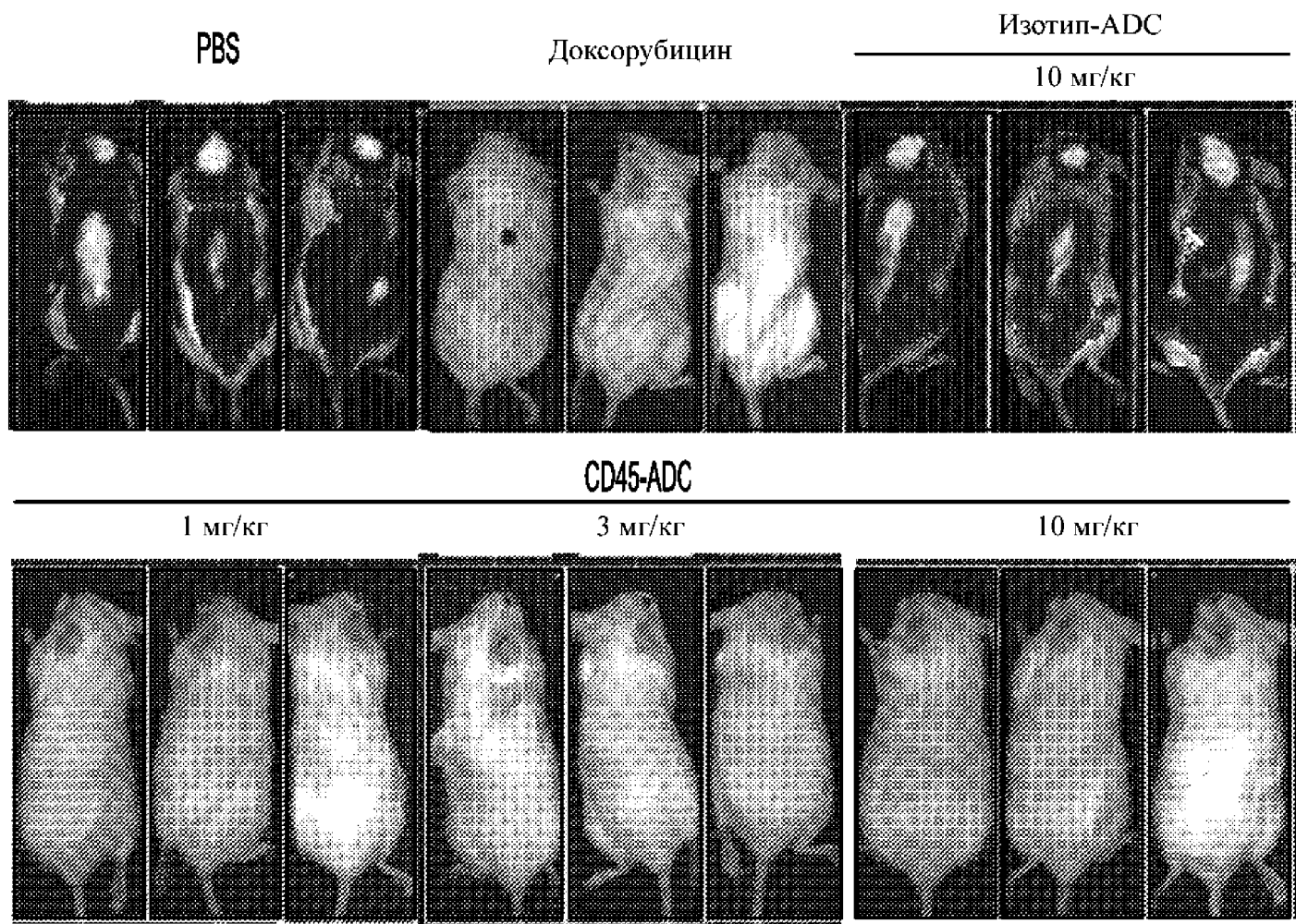
ФИГ. 28



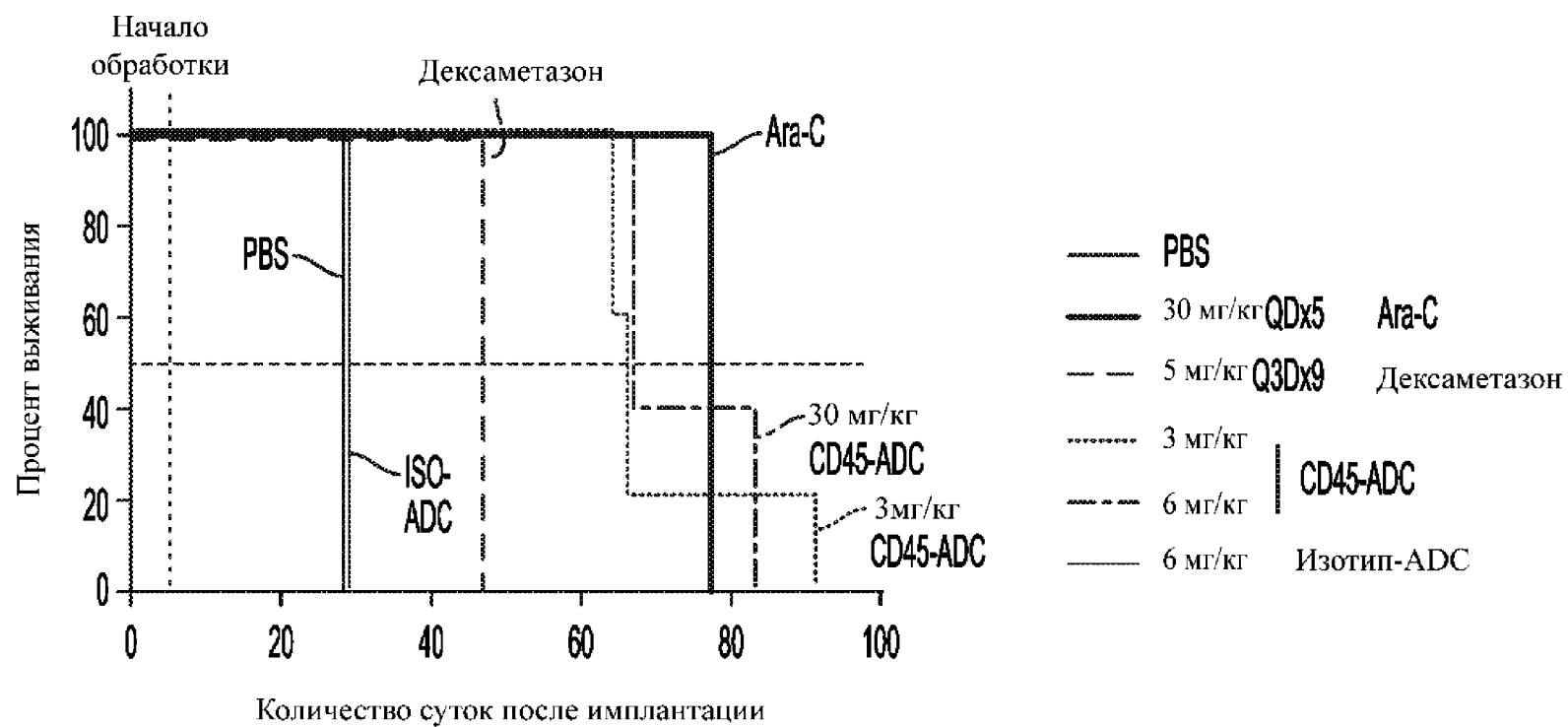
ФИГ. 29А



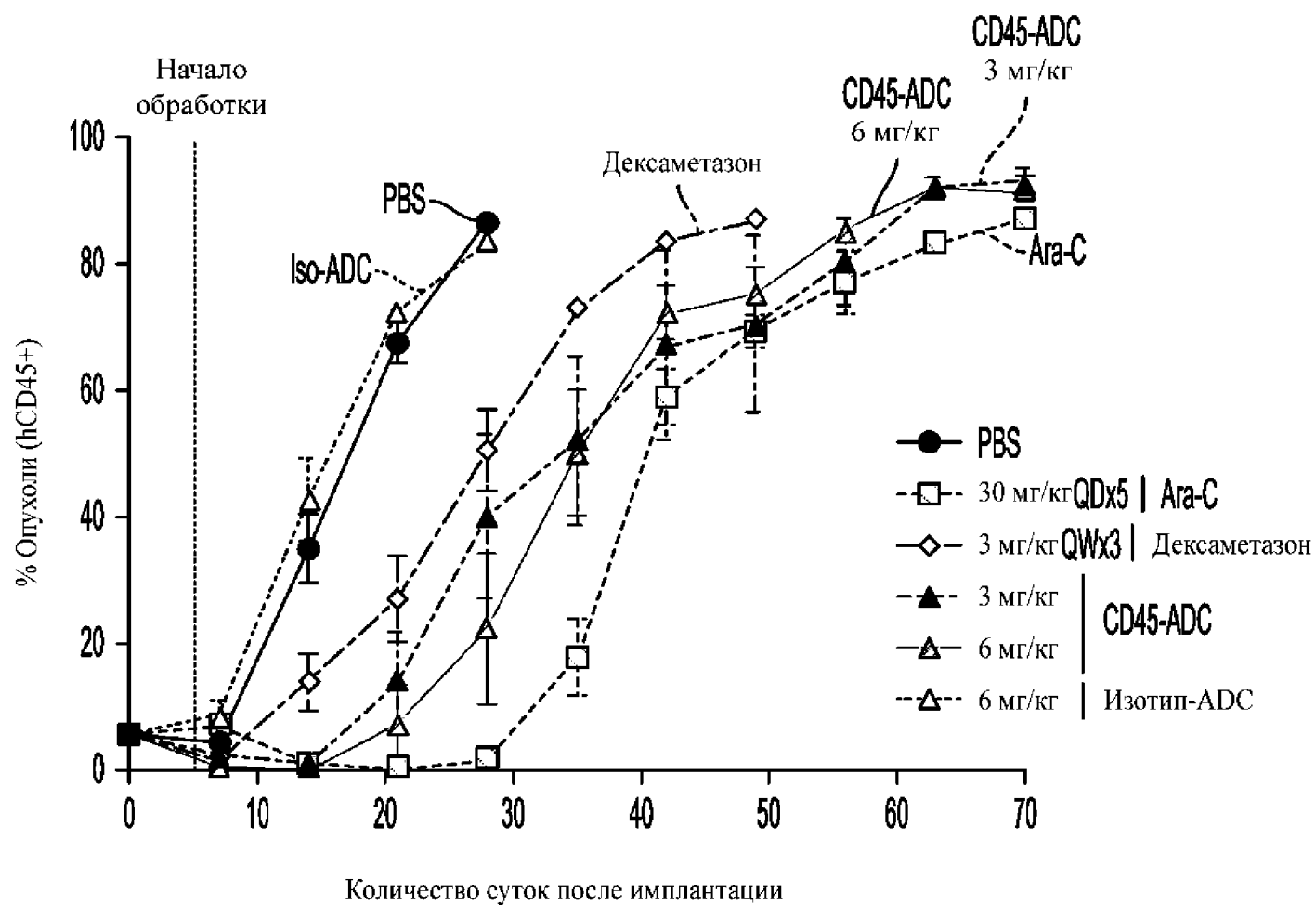
ФИГ. 29В



ФИГ. 29С

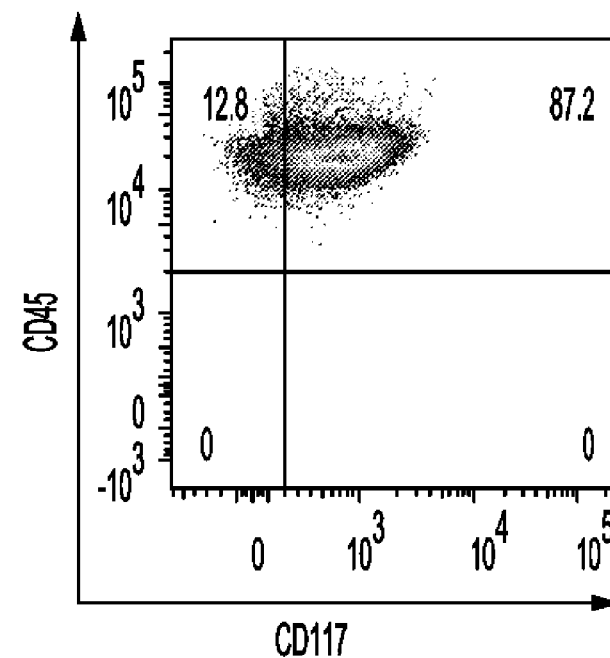
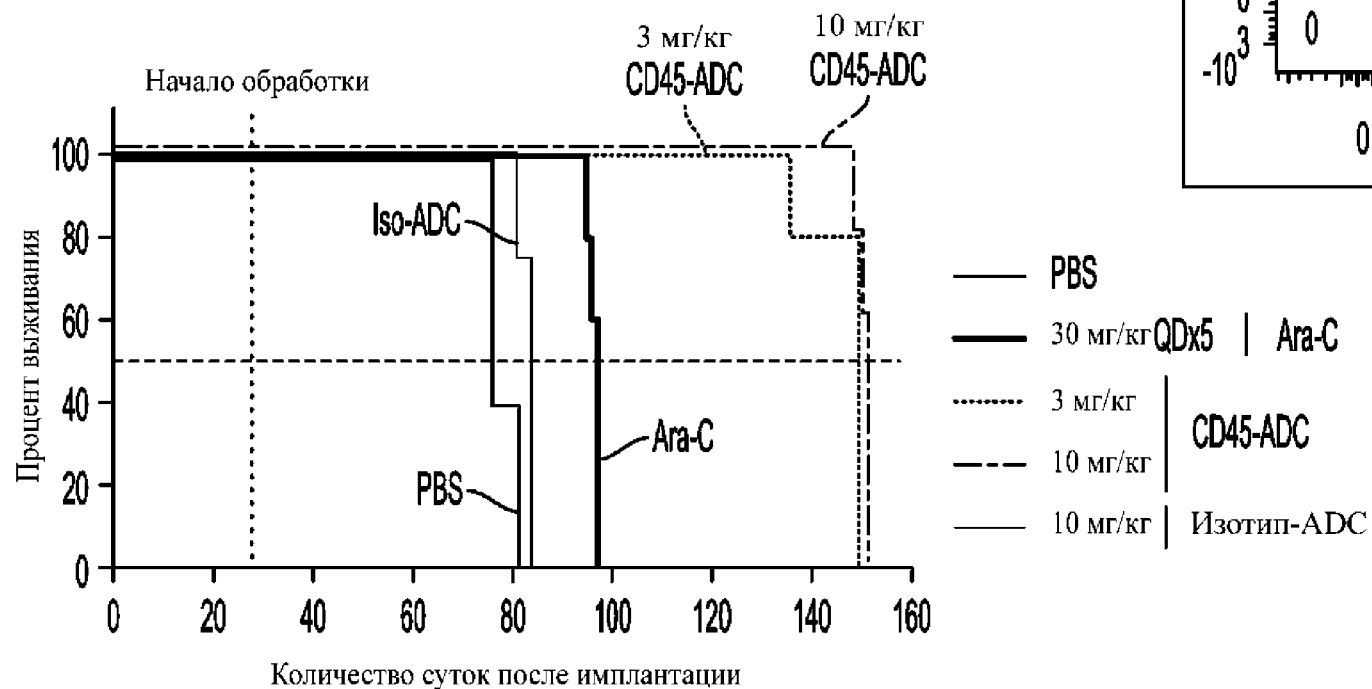


ФИГ. 30А



ФИГ. 30В

Модель PDX	AML #1
Тип	AML, M4
Предшествующее лечение	Предшествующее лечение отсутствует
Кариотип; Мутация	Количество суток после имплантации



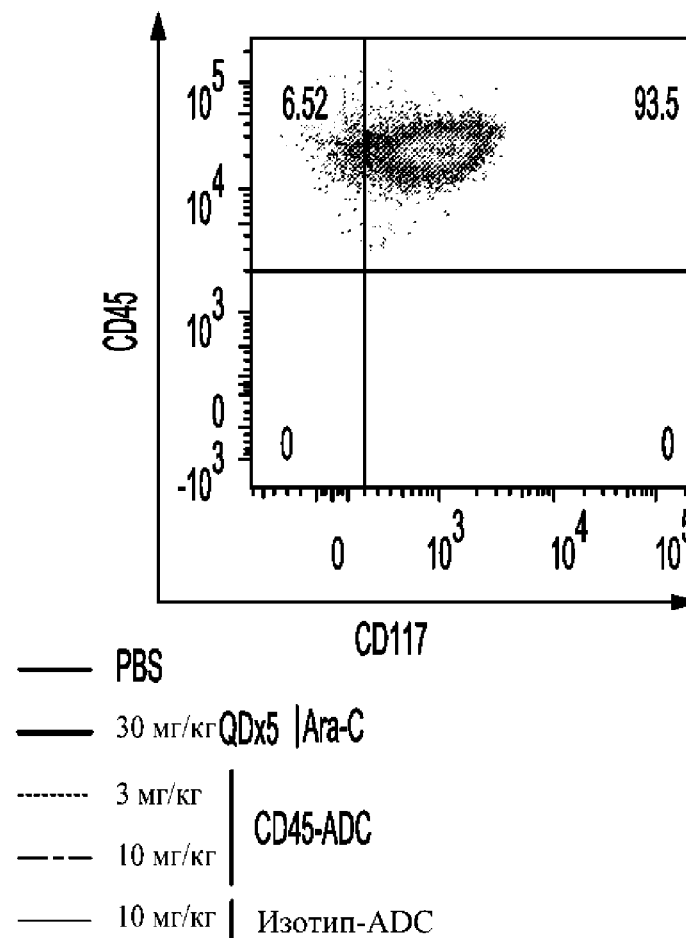
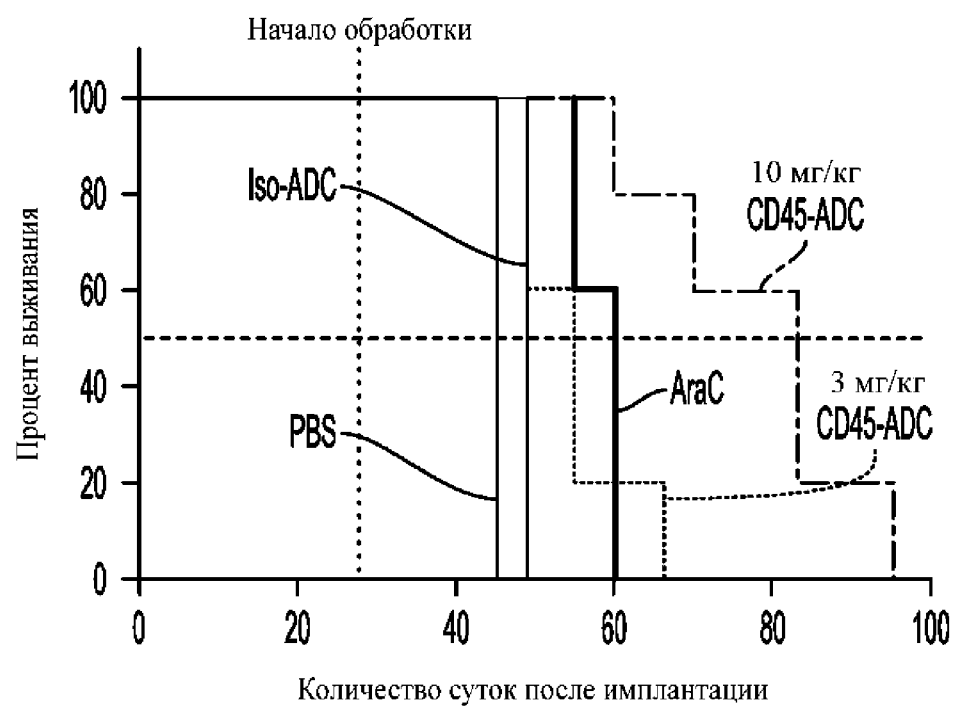
ФИГ. 31A

AML #2

Рецидив AML/Устойчивый

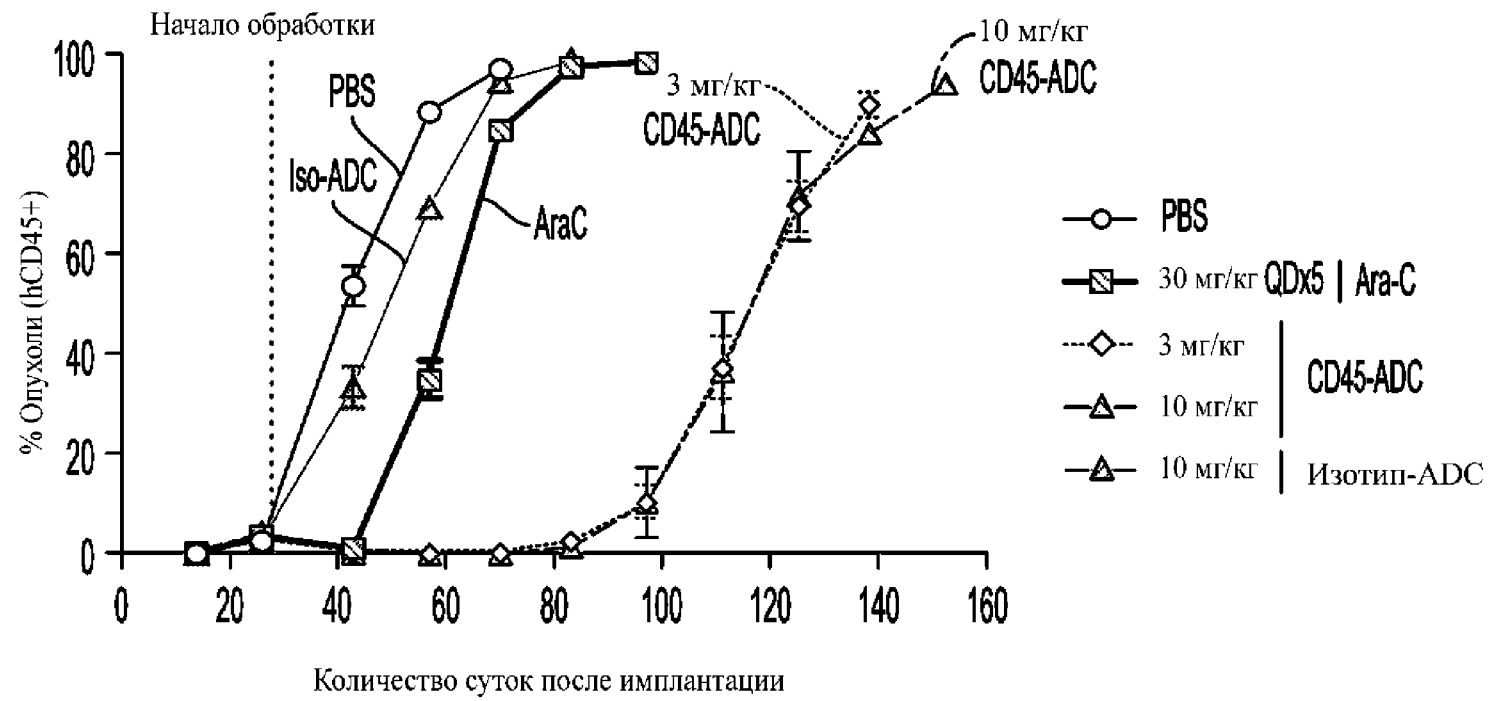
Аллогенный HSCT, Сорафениб, Гидроксимочевина, Децитабин

Нормальный; FLT3+, NPM1+, DNMT3A+, IDH1+



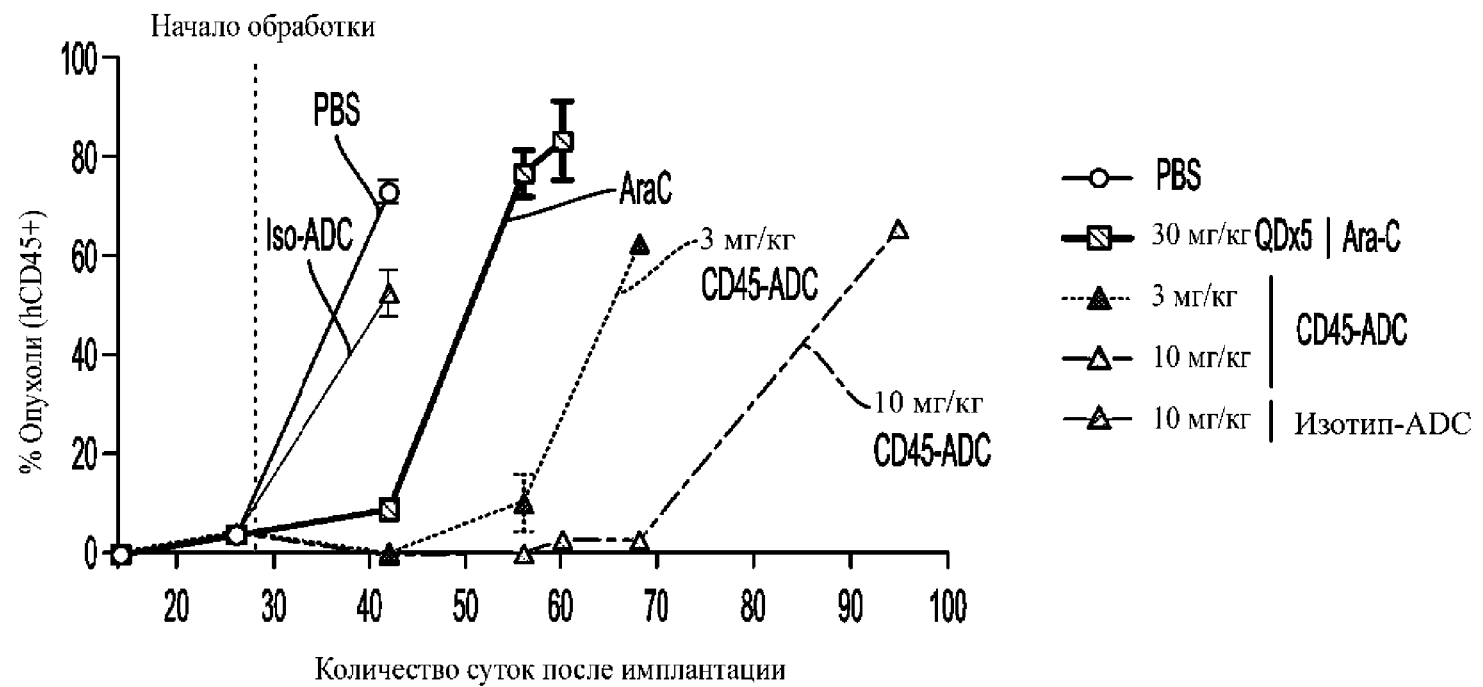
ФИГ. 31В

AML #1



ФИГ. 31С

AML #2



ФИГ. 31D

Консенсусная последовательность тяжелой цепи

Ab1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVROAPGKLEWVSYYISSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYDSSRYGEVAFDINGQGMVTVSS
Ab2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATIHADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYDSSDYGEVAFDINGQGMVTVSS
Ab3	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATITADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYDSSDYGEVAFDINGQGMVTVSS
Ab4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATIHADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYTSSDYGEVAFDINGQGMVTVSS
Ab5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATIHADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYTSSDYGEVAFDINGQGMVTVSS
Ab6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEAYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATIHADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYTSSDYGEVAFDINGQGLVTVSS
Ab7	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGYSMNWVROAPGKLEWVSYYISLGGATITADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQYYDSSDYGEVAFDINGQGMVTVSS

Консенсусная последовательность легкой цепи

Ab1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLESNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTPPFTFGGCTKVEIK
Ab2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTFWSFGGCTKVEIK
Ab3	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTPPFTFGGCTKVEIK
Ab4	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTFWSFGGCTKVEIK
Ab5	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SSGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTFWSFGGCTKVEIK
Ab6	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SSGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTFWSFGGCTKVEIK
Ab7	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLV-SSGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYFGSSRASGVPDFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQRRRTPPFTFGGCTKVEIK

ФИГ. 32