



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111867621 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(21) 申请号 201980020094.X

(22) 申请日 2019.01.18

(30) 优先权数据

62/619,106 2018.01.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/050446 2019.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/142147 EN 2019.07.25

(71) 申请人 美真达治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 梅根·D·霍本

安东尼·博伊坦诺 迈克尔·库克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

权利要求书15页 说明书91页

序列表3页 附图10页

(54) 发明名称

用于耗尽CD134+细胞的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了通过使用与CD134或CD278特异性结合的抗体-药物缀合物(ADC)选择性耗尽造血细胞来预防和治疗移植物抗宿主病和自身免疫性疾病的方法,所述移植物抗宿主病和自身免疫性疾病诸如由移植疗法引起的那些。本文描述的组合物和方法可以用于治疗多种病症,包括自身免疫性疾病、干细胞紊乱和其他血液状况。

1. 一种治疗或预防有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病 (GVHD) 的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

2. 一种耗尽患有移植物抗宿主病 (GVHD) 或处于移植物抗宿主病 (GVHD) 风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

3. 一种治疗或预防有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中所述同种异体移植物排斥是宿主抗移植物病 (HvGD)。

5. 一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于同种异体移植物排斥风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

6. 如权利要求5所述的方法, 其中所述同种异体移植物排斥是HvGD。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

8. 如权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述抗体具有选自由IgG、IgA、IgM、IgD和IgE组成的组的同种型。

9. 如权利要求8所述的方法, 其中所述抗体是IgG并且含有人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型Fc结构域。

10. 如权利要求1-6所述的方法, 其中所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述微管结合剂是美登素或美登木素生物碱。

12. 如权利要求11所述的方法, 其中所述美登木素生物碱选自由以下组成的组: DM1、DM3和DM4, 以及美登醇。

13. 如权利要求10所述的方法, 其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

14. 如权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之前向所述患者施用所述抗体或其抗原结合片段。

15. 如权利要求14所述的方法, 所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之前约三天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

16. 如权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

17. 如权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之后向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

18. 如权利要求17所述的方法, 所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至10天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

19. 如权利要求18所述的方法, 所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

20. 如权利要求14-19中任一项所述的方法, 其中所述移植物是骨髓移植物、外周血移

植物或脐带血移植物。

21. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述人类患者接受包含造血干细胞的同种异体移植物。

22. 如权利要求2或5所述的方法,其中所述CD134阳性细胞是活化的T细胞。

23. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述抗体、其抗原结合片段在接触后被T细胞内化。

24. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述抗体、其抗原结合片段促进T细胞的死亡或抑制T细胞的增殖。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述患者患有干细胞紊乱。

26. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述患者患有血红蛋白病紊乱、免疫缺陷性紊乱、代谢紊乱或癌症。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述血红蛋白病紊乱选自自由以下组成的组:镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血和威斯科特-奥尔德里奇综合征。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述免疫缺陷性紊乱是先天性免疫缺陷或获得性免疫缺陷。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述获得性免疫缺陷是人类免疫缺陷病毒或获得性免疫缺陷综合征。

30. 如权利要求26所述的方法,其中所述代谢紊乱选自自由以下组成的组:糖原贮积症、黏多糖贮积症、戈谢氏病、赫尔勒病、鞘脂贮积症和异染性脑白质营养不良。

31. 如权利要求26所述的方法,其中所述癌症选自自由以下组成的组:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常性综合征以及神经母细胞瘤。

32. 一种治疗有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD134抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

33. 一种耗尽患有GVHD或处于发展GVHD风险的人类受试者中的CD134阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD134 ADC使得所述CD134细胞的群体被耗尽,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

34. 一种治疗有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD134抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

35. 一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于发展同种异体移植物排斥风险的人类受试者中的CD134阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD134 ADC使得所述CD134细胞的群体被耗尽,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

36. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之前向所述患者施用所述ADC。

37. 如权利要求36所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之前约三天向所述患者施用所述ADC。

38. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向所述患者施用所述ADC。

39. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植体之后向所述患者施用所述ADC。

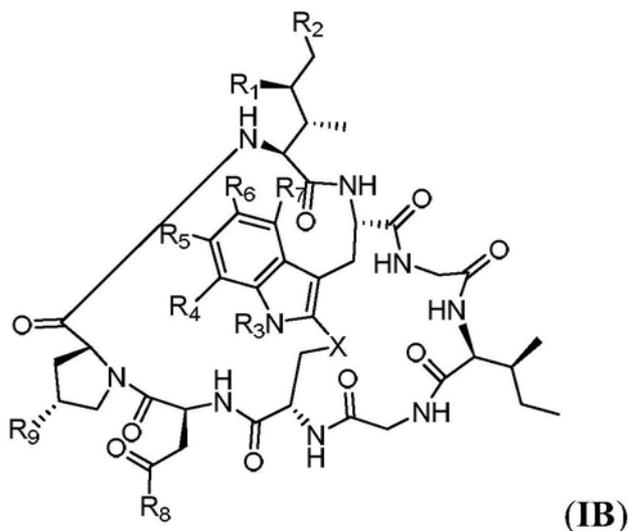
40. 如权利要求39所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植体之后约1小时至10天向所述患者施用所述ADC。

41. 如权利要求40所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植体之后约3天至4天向所述患者施用所述ADC。

42. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述微管结合剂是美登木素生物碱。

43. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD134结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,其中Am-L-Z由式(1B)表示



其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R₃是H、R_C或R_D;

R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

R_C是-L-Z;

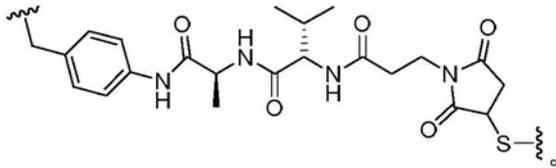
R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;

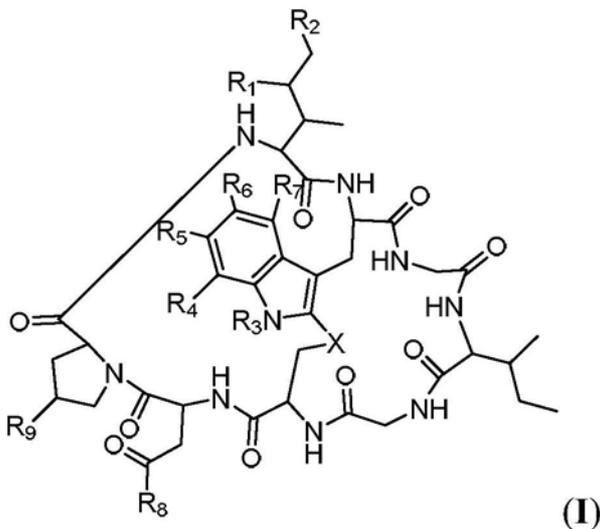
Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分;并且

其中Am包含正好一个R_C取代基。

45. 如权利要求44所述的方法,其中L-Z是



46. 如权利要求43所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD134结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,其中Am-L-Z由式(I)表示



其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R₃是H、R_C或R_D;

R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

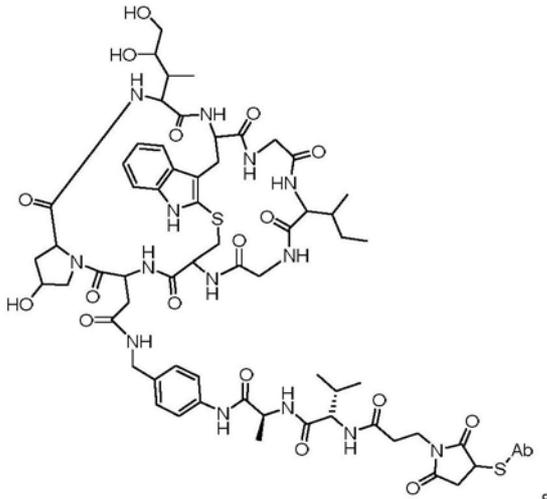
- R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；
 R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；
 R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D；
 R₉是H、OH、OR_C或OR_D；
 X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；
 R_C是-L-Z；

R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；并且

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；并且

Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134结合的所述抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

47. 如权利要求44所述的方法,其中Am-L-Z-Ab由以下表示:



48. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈碱。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组: α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

50. 一种耗尽接受同种异体移植物的人类患者中的同种异体反应性T细胞的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD134 ADC使得同种异体反应性T细胞被耗尽,其中所述ADC包含与细胞毒素缀合的抗CD134抗体。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述移植物是骨髓移植物、外周血移植物或脐带血移植物。

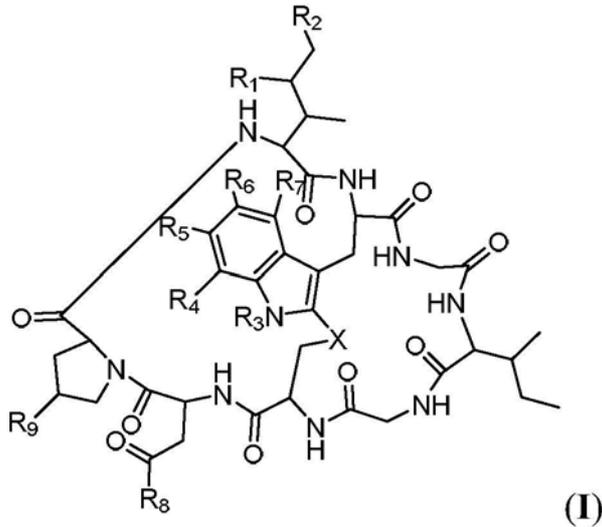
52. 如权利要求50所述的方法,其中所述移植物包含造血细胞。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述造血干细胞或其后代在所述造血干细胞移植到所述患者中之后两天或更多天后维持造血干细胞功能潜能。

54. 如权利要求50至53中任一项所述的方法,其中所述细胞毒素是RNA聚合酶抑制剂。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是抗CD134抗体,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z由式(I)表示



其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R₃是H、R_C或R_D;

R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

R_C是-L-Z;

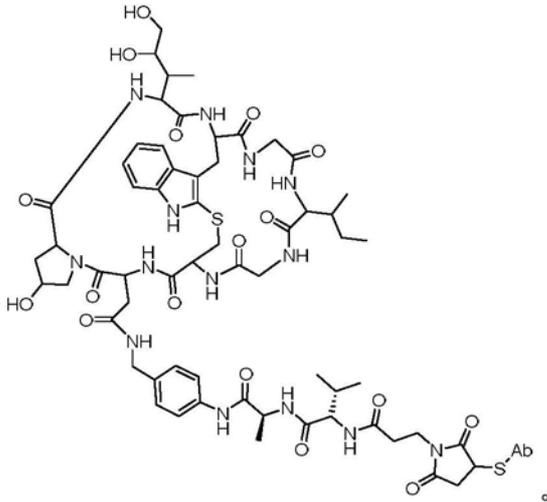
R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;并且

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基

(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;并且

Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134结合的所述抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

57. 如权利要求55所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是所述抗CD134抗体,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z-Ab由以下表示



58. 如权利要求54所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈碱。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组:α-鹅膏蕈碱、β-鹅膏蕈碱、γ-鹅膏蕈碱、ε-鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

60. 一种抗体药物缀合物(ADC),所述抗体药物缀合物(ADC)包含经由肽接头与细胞毒素缀合的抗CD134抗体,其中所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

61. 如权利要求60所述的ADC,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

62. 如权利要求61所述的抗CD134 ADC,其中所述鹅膏蕈毒素是鹅膏蕈碱。

63. 如权利要求62所述的抗CD134 ADC,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组:α-鹅膏蕈碱、β-鹅膏蕈碱、γ-鹅膏蕈碱、ε-鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

64. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求60至63中任一项所述的ADC、以及药学上有活性的载体。

65. 一种治疗有相应需要的人类患者的移植失败或GVHD的方法,所述方法包括向所述人类患者施用有效量的如权利要求60至63中任一项所述的ADC,其中所述人类患者先前接受了移植植物。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述人类患者在施用所述ADC之前不多于4天接受了所述移植植物。

67. 一种治疗处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者的方法,所述方法包括向所述处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者施用有效量的如权利要求60至63中任一项所述的ADC,并且随后向所述人类受试者施用移植植物。

68. 如权利要求60至67中任一项所述的方法,其中所述ADC作为单个剂量被施用至所述人类患者。

69. 一种治疗或预防有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病 (GVHD) 的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

70. 一种耗尽患有移植物抗宿主病 (GVHD) 或处于移植物抗宿主病 (GVHD) 风险的人类患者中的CD278阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

71. 一种治疗或预防有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述同种异体移植物排斥是宿主抗移植物病 (HvGD)。

73. 一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于同种异体移植物排斥风险的人类患者中的CD278阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段经由接头与细胞毒素缀合。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述同种异体移植物排斥是HvGD。

75. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

76. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述抗体具有选自由IgG、IgA、IgM、IgD和IgE组成的组的同种型。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述抗体是IgG并且含有人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型Fc结构域。

78. 如权利要求69-74所述的方法,其中所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

79. 如权利要求78所述的方法,其中所述微管结合剂是美登素或美登木素生物碱。

80. 如权利要求79所述的方法,其中所述美登木素生物碱选自由DM1、DM3和DM4以及美登醇组成的组。

81. 如权利要求78所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

82. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之前向所述患者施用所述抗体或其抗原结合片段。

83. 如权利要求82所述的方法,所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之前约三天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

84. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

85. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之后向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

86. 如权利要求85所述的方法,所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的

移植物之后约1小时至10天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

87. 如权利要求86所述的方法,所述方法包括在所述人类患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向所述患者施用所述抗体、其抗原结合片段。

88. 如权利要求71-74中任一项所述的方法,其中所述移植物是骨髓移植物、外周血移植物或脐带血移植物。

89. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述人类患者接受包含造血干细胞的同种异体移植物。

90. 如权利要求70或73所述的方法,其中所述CD278阳性细胞是活化的T细胞。

91. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述抗体、其抗原结合片段在接触后被T细胞内化。

92. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述抗体、其抗原结合片段促进T细胞的死亡或抑制T细胞的增殖。

93. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述患者患有干细胞紊乱。

94. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述患者患有血红蛋白病紊乱、免疫缺陷性紊乱、代谢紊乱或癌症。

95. 如权利要求94所述的方法,其中所述血红蛋白病紊乱选自以下组成的组:镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血和威斯科特-奥尔德里奇综合征。

96. 如权利要求94所述的方法,其中所述免疫缺陷性紊乱是先天性免疫缺陷或获得性免疫缺陷。

97. 如权利要求96所述的方法,其中所述获得性免疫缺陷是人类免疫缺陷病毒或获得性免疫缺陷综合征。

98. 如权利要求94所述的方法,其中所述代谢紊乱选自以下组成的组:糖原贮积症、黏多糖贮积症、戈谢氏病、赫尔勒病、鞘脂贮积症和异染性脑白质营养不良。

99. 如权利要求94所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常性综合征以及神经母细胞瘤。

100. 一种治疗有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD278抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

101. 一种耗尽患有GVHD或处于发展GVHD风险的人类受试者中的CD278阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD278 ADC使得所述CD278细胞的群体被耗尽,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

102. 一种治疗有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD278抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

103. 一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于发展同种异体移植物排斥风险的人类受试者中的CD278阳性细胞的群体的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD278 ADC使得所述CD278细胞的群体被耗尽,其中所述ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

104. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之前向所述患者施用所述ADC。

105. 如权利要求104所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之前约三天向所述患者施用所述ADC。

106. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向所述患者施用所述ADC。

107. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之后向所述患者施用所述ADC。

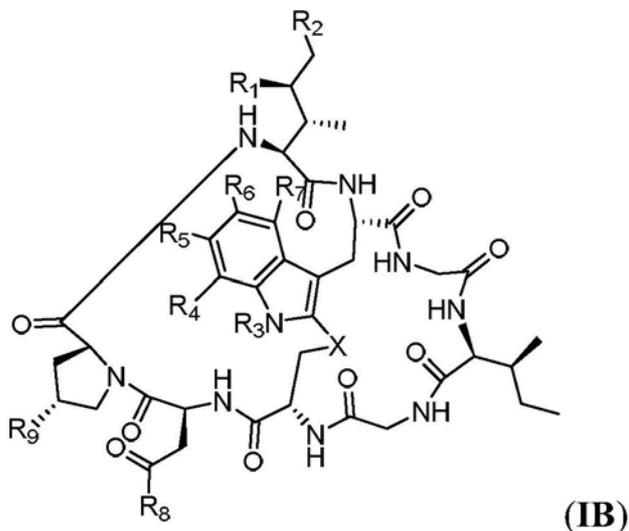
108. 如权利要求107所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至10天向所述患者施用所述ADC。

109. 如权利要求107所述的方法,所述方法包括在所述患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向所述患者施用所述ADC。

110. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述微管结合剂是美登木素生物碱。

111. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

112. 如权利要求111所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD134结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,其中Am-L-Z由式(1B)表示



其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R₃是H、R_C或R_D;

R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

R_C是-L-Z;

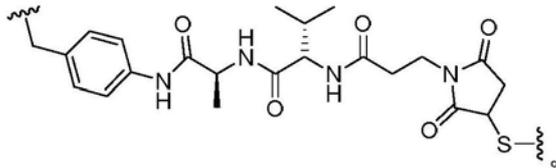
R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;

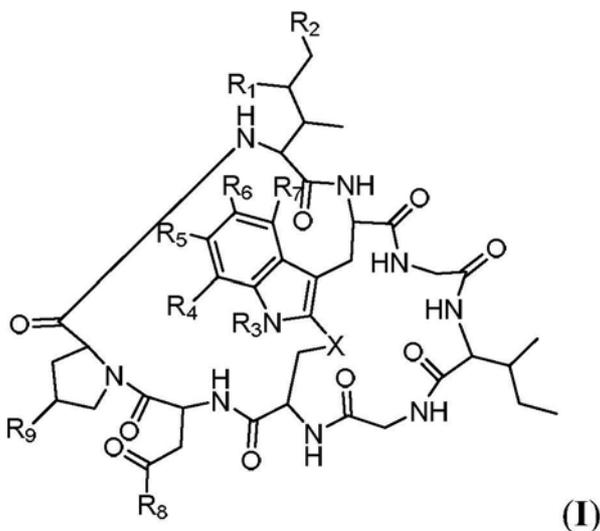
Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分;并且

其中Am包含正好一个R_C取代基。

113. 如权利要求112所述的方法,其中L-Z是



114. 如权利要求111所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z由式(I)表示



其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R₃是H、R_C或R_D;

R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

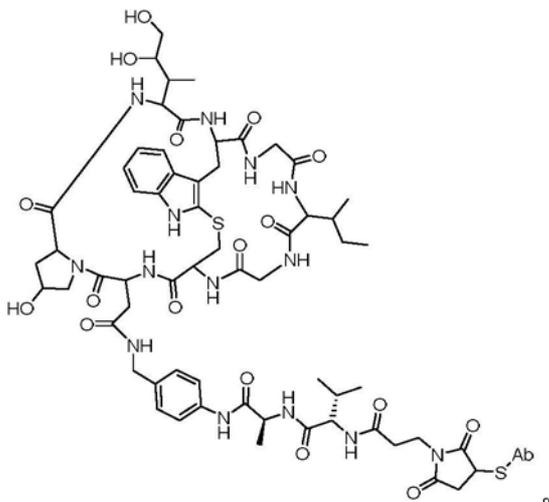
R_C是-L-Z;

R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;并且

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;并且

Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD278结合的所述抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

115. 如权利要求111所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是与CD278结合的抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z-Ab由以下表示



116. 如权利要求100至103中任一项所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈

碱。

117. 如权利要求116所述的方法,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组: α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

118. 一种耗尽接受同种异体移植的人类患者中的同种异体反应性T细胞的方法,所述方法包括向所述人类患者施用抗CD278 ADC使得同种异体反应性T细胞被耗尽,其中所述ADC包含与细胞毒素缀合的抗CD278抗体。

119. 如权利要求118所述的方法,其中所述移植物是骨髓移植物、外周血移植物或脐带血移植物。

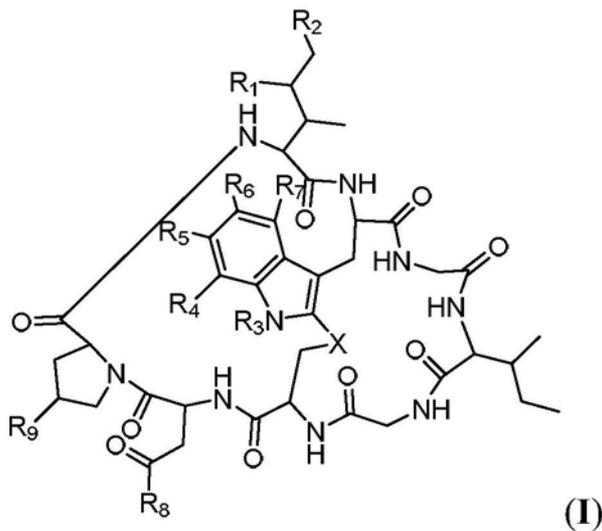
120. 如权利要求118所述的方法,其中所述移植物包含造血细胞。

121. 如权利要求120所述的方法,其中所述造血干细胞或其后代在所述造血干细胞移植到所述患者中之后两天或更多天后维持造血干细胞功能潜能。

122. 如权利要求118至121中任一项所述的方法,其中所述细胞毒素是RNA聚合酶抑制剂。

123. 如权利要求122所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

124. 如权利要求118所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是抗CD278抗体,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z由式(I)表示



其中 R_1 是H、OH、 OR_A 或 OR_C ;

R_2 是H、OH、 OR_B 或 OR_C ;

R_A 和 R_B 在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

R_3 是H、 R_C 或 R_D ;

R_4 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

R_5 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

R_6 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

R_7 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 、 OR_D 、 NHR_C 或 $NR_C R_D$;

R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

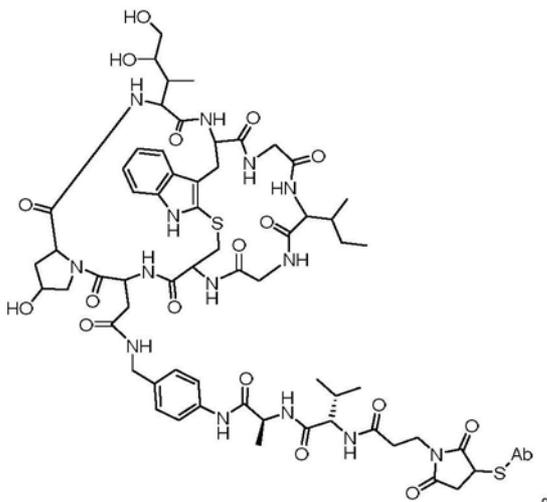
R_C是-L-Z;

R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;并且

L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;并且

Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD278结合的所述抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

125. 如权利要求118所述的方法,其中所述ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是抗CD278抗体,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z-Ab由以下表示



126. 如权利要求122所述的方法,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈碱。

127. 如权利要求126所述的方法,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组:α-鹅膏蕈碱、β-鹅膏蕈碱、γ-鹅膏蕈碱、ε-鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

128. 一种抗体药物缀合物(ADC),所述抗体药物缀合物(ADC)包含经由肽接头与细胞毒素缀合的抗CD278抗体,其中所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

129. 如权利要求128所述的ADC,其中所述RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

130. 如权利要求129所述的抗CD278 ADC,其中所述鹅膏蕈毒素是鹅膏蕈碱。

131. 如权利要求130所述的抗CD278 ADC,其中所述鹅膏蕈碱选自由以下组成的组:α-鹅膏蕈碱、β-鹅膏蕈碱、γ-鹅膏蕈碱、ε-鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

132. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求128至131中任一项所述的ADC、以及药学上有活性的载体。

133. 一种治疗有相应需要的人类患者的移植失败或GVHD的方法,所述方法包括向所述人类患者施用有效量的如权利要求128至131中任一项所述的ADC,其中所述人类患者先前接受了移植物。

134. 如权利要求133所述的方法,其中所述人类患者在施用所述ADC之前不多于4天接受了所述移植物。

135. 一种治疗处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者的方法,所述方法包括向所述处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者施用有效量的如权利要求128至131中任一项所述的ADC,并且随后向所述人类受试者施用移植物。

136. 如权利要求133至135中任一项所述的方法,其中所述ADC作为单个剂量被施用至所述人类患者。

用于耗尽CD134+细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2018年1月18日提交的美国临时申请第62/619,106号的优先权。上文提及的申请的内容通过引用以其整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及移植疗法的领域,并且提供了通过施用能够与由造血细胞表达的抗原结合的抗体、抗体-药物缀合物和配体-药物缀合物来治疗自身免疫性疾病或移植物抗宿主病(GVHD)的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 虽然造血干细胞具有显著的治疗潜力,但已阻碍其在临床上使用的一个限制因素是在细胞移植之后几天或几周的移植物抗宿主病(GVHD)的发展。虽然关于移植后GVHD的治疗已经取得了显著进展,但对改善的方法,特别是关于降低GVHD的死亡率,本领域中仍存在需求。GVHD的常规治疗要求使用有效药物诸如皮质类固醇和环孢菌素的全身性免疫抑制疗法。诸如霉酚酸酯、雷帕霉素(rapamycin)(西罗莫司(sirolimus))、伊马替尼(imatinib)和利妥昔单抗(rituximab)的剂被用于具有类固醇难治性GVHD的患者。然而,这些治疗具有有限的效力,并且经常引起严重的不良作用。仅50%的患有GVHD的患者能够在诊断之后5年内终止免疫抑制治疗,并且10%的患者需要超过5年的持续治疗。剩余的40%在GVHD消退之前死亡或发展复发性恶性肿瘤。具有高风险GVHD的患者(血小板计数<100,000/微升或GVHD进行性发作)的五年存活率仅为40%-50%。因此,预防和治疗GVHD的创新性策略的开发代表着重要的未满足的临床需求。

[0006] 如同GVHD,自身免疫性疾病诸如多发性硬化、类风湿性关节炎、肠道疾病、银屑病、狼疮和1型糖尿病的特征在于针对正常自身组织的异常免疫应答。自身免疫性疾病的特征在于产生自身反应性T细胞和与宿主组织反应的抗体(自身抗体)。用于自身免疫性疾病的传统疗法包括全局抑制免疫应答的免疫抑制剂。这样的剂的益处通常由于易受机会性感染、长期恶性肿瘤的风险、毒性和其他不利副作用而减弱。因此,对开发更特异性地靶向GVHD和自身免疫性疾病两者的细胞介质(cell mediator)的策略存在需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了用于预防和/或治疗接受造血干细胞移植疗法的患者诸如人类患者的急性和慢性形式的移植物抗宿主病(GVHD)或自身免疫性疾病,以便降低与GVHD和自身免疫性疾病相关的发病率和死亡率的方法。此外,本发明的特征在于治疗多种造血状况,诸如镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血(Fanconi anemia)、威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)、腺苷脱氨酶缺乏-重症联合免疫缺陷、异染性脑白质营养不良、Diamond-Blackfan贫血和Schwachman-Diamond综合征、人类免疫缺陷病毒感染和获得性免疫缺陷综合征等的方法。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开的方法和组合物用于治疗或预防接受(或将接受)同种异体骨髓移植的人类患者的同种异体移植物排斥。

[0010] 本发明的特征在于用能够与由造血细胞表达的蛋白质诸如CD134或CD278结合的抗体、抗体-药物缀合物(ADC)、配体和配体-药物缀合物治疗患者,以便耗尽患者中的造血细胞(诸如T细胞)的群体的方法。T细胞的这种选择性耗尽继而改善了总患者存活率和无复发患者存活率,同时显著减少了GVHD和自身免疫性疾病。

[0011] 在第一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗或预防有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法。

[0012] 在第二方面,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法。

[0013] 在第三方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗有相应需要的人类患者的自身免疫性疾病的方法。

[0014] 在第四方面,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来耗尽患有自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法。

[0015] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗或预防有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法。在某些实施方案中,同种异体移植物排斥是宿主抗移植物病(HvGD)。

[0016] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来耗尽患有同种异体移植物排斥或处于同种异体移植物排斥风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法。在某些实施方案中,同种异体移植物排斥是宿主抗移植物病(HvGD)。

[0017] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗或预防有相应需要的人类患者的GVHD的方法。

[0018] 在另一方面,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD278阳性细胞的群体的方法。

[0019] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗有相应需要的人类患者的自身免疫性疾病的方法。

[0020] 在另一方面,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来耗尽患有自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病风险的人类患者中的CD278+细胞的群体的方法。

[0021] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物(ADC)来治疗或预防有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法。在某些实施方案中,同种异体移植物排斥是宿主抗移植物

病 (HvGD)。

[0022] 在另一方面,本发明的特征在于一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合的抗体、或其抗原结合片段、或抗体药物缀合物 (ADC) 来耗尽患有同种异体移植物排斥或处于同种异体移植物排斥风险的人类患者中的CD278阳性细胞的群体的方法。在某些实施方案中,同种异体移植物排斥是宿主抗移植物病 (HvGD)。

[0023] 在一些实施方案中,抗体、其抗原结合片段或抗体-药物缀合物与人类CD134结合,下文提供了人类CD134的氨基酸序列 (NCBI参考序列:NP_003318.1) :

MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR

[0024] AGTQPLDSYKPGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD
PPATQPQETQGPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP
LAILLALYLLRRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI: (SEQ ID NO: 1)

[0025] 在一些实施方案中,抗体、其抗原结合片段或抗体-药物缀合物与人类CD278结合,下文提供了人类CD278的氨基酸序列 (NCBI参考序列:NP_036224.1) :

[0026] MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQL
LKGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNL DSHSHANYFYFC
NLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCILGCILICWLT
KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 2)

[0027] 在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体或其抗原结合片段选自自由以下组成的组:单克隆抗体或其抗原结合片段、多克隆抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、双重可变免疫球蛋白结构域、单链Fv分子 (scFv)、双抗体 (diabody)、三抗体 (triabody)、纳米抗体 (nanobody)、抗体样蛋白支架、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子和串联二-scFv。在另一种实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体或其抗原结合片段是IgG,并且含有人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型Fc结构域。

[0028] 在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体具有选自自由IgG、IgA、IgM、IgD和IgE组成的组的同种型。

[0029] 在一些实施方案中,Fc结构域是人类IgG1同种型Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是人类IgG2同种型Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是人类IgG3同种型Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是人类IgG4同种型Fc结构域。

[0030] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的GVHD的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD134 ADC。

[0031] 在另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD134 ADC或可溶性CD134配体。

[0032] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的自身免疫性疾病的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD134 ADC或可溶性CD134配体。

[0033] 在另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD134 ADC或可溶性CD134配体。

[0034] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的GVHD的方法,

该方法包括向患者施用有效量的抗CD278 ADC。

[0035] 在另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD278 ADC。

[0036] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的自身免疫性疾病的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD278 ADC。

[0037] 在另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病风险的人类患者中的CD278阳性细胞的群体的方法,该方法包括向患者施用有效量的抗CD278 ADC。

[0038] 在另一方面,本发明的特征在于一种耗尽接受同种异体移植物的人类患者中的同种异体反应性T细胞的方法,该方法包括向人类患者施用抗CD134 ADC (或抗CD278 ADC) 使得同种异体反应性T细胞被耗尽,其中该ADC包含与细胞毒素缀合的抗CD134 (或抗CD278) 抗体。在一些实施方案中,移植物是骨髓移植物、外周血移植物或脐带血移植物。在一些实施方案中,移植物包含造血细胞。在一些实施方案中,造血干细胞或其后代在造血干细胞移植到患者中之后两天或更多天后维持造血干细胞功能潜能。在一些实施方案中,细胞毒素是RNA聚合酶抑制剂。在其他实施方案中,RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

[0039] 在一些实施方案中,抗体 (例如,抗CD134抗体或抗CD278抗体) 或其抗原结合片段与细胞毒素缀合,所述细胞毒素诸如微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体或其抗原结合片段或可溶性CD134配体或CD278配体通过接头与微管结合剂缀合。在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体或其抗原结合片段或可溶性CD134配体或CD278配体通过接头与RNA聚合酶抑制剂缀合。

[0040] 在一些实施方案中,微管结合剂是美登素或美登木素生物碱。

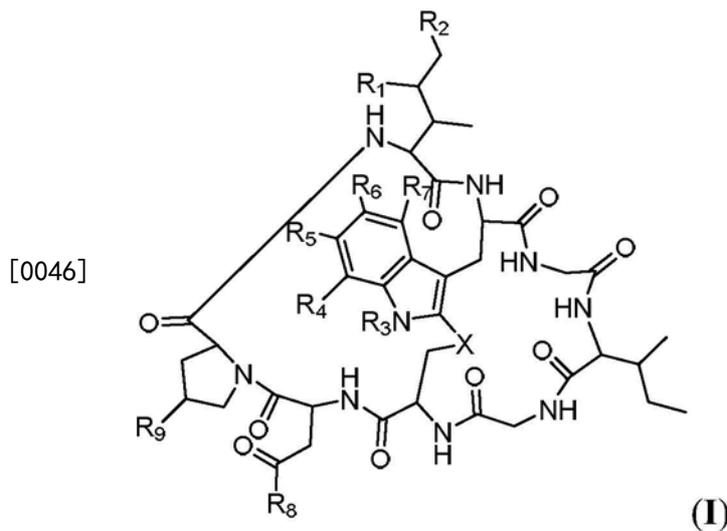
[0041] 在一些实施方案中,美登木素生物碱选自自由以下组成的组:DM1、DM3和DM4以及美登醇 (maytansinol)。

[0042] 在一些实施方案中,美登木素生物碱是美登醇类似物。

[0043] 在一些实施方案中,RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。

[0044] 在以上方面的任一项的一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈毒素或其衍生物,诸如 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素 (amanin)、鹅膏素酰胺 (amaninamide)、鹅膏蕈无毒环肽 (amanullin)、鹅膏蕈无毒环肽酸 (amanullinic acid) 或鹅膏蕈无毒环肽原 (proamanullin)。在一种实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈碱。在以上方面的任一项的一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈毒素,并且抗体或其抗原结合片段通过接头和化学部分与鹅膏蕈毒素缀合以形成由式Ab-Z-L-Am表示的ADC,其中Ab是抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素。

[0045] 在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素与接头缀合。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素-接头缀合物Am-L-Z由式 (I) 表示



[0047] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C；

[0048] R₂是H、OH、OR_B或OR_C；

[0049] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0050] R₃是H、R_C或R_D；

[0051] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0052] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0053] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0054] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0055] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D；

[0056] R₉是H、OH、OR_C或OR_D；

[0057] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；

[0058] R_C是-L-Z；

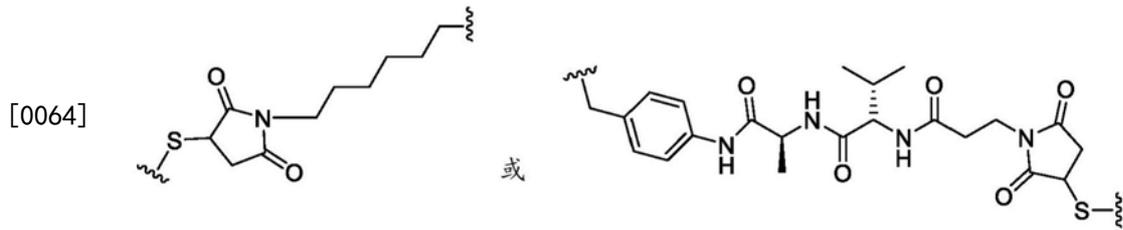
[0059] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0060] L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；并且

[0061] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

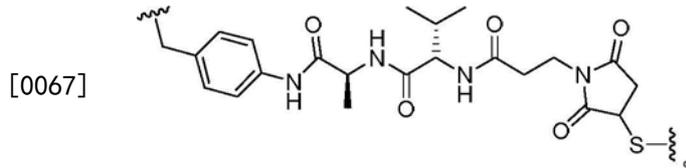
[0062] 在一些实施方案中,Am包含正好一个R_C取代基。

[0063] 在一些实施方案中,接头L和化学部分Z(合在一起称为L-Z)是

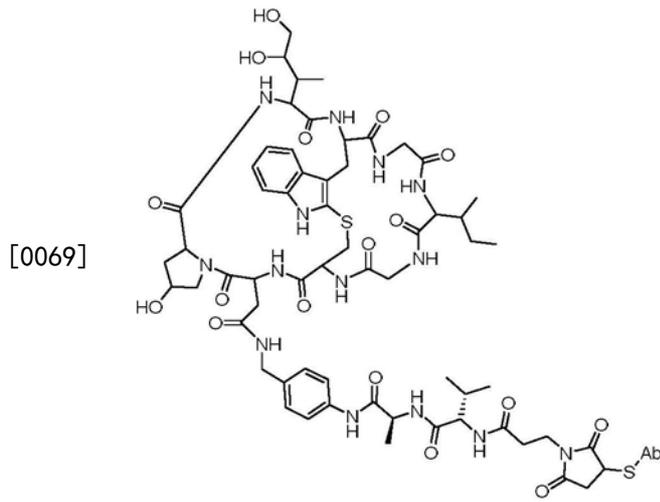


[0065] 其中S是硫原子,表示存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基(例如,来自半胱氨酸残基的-SH基团)。

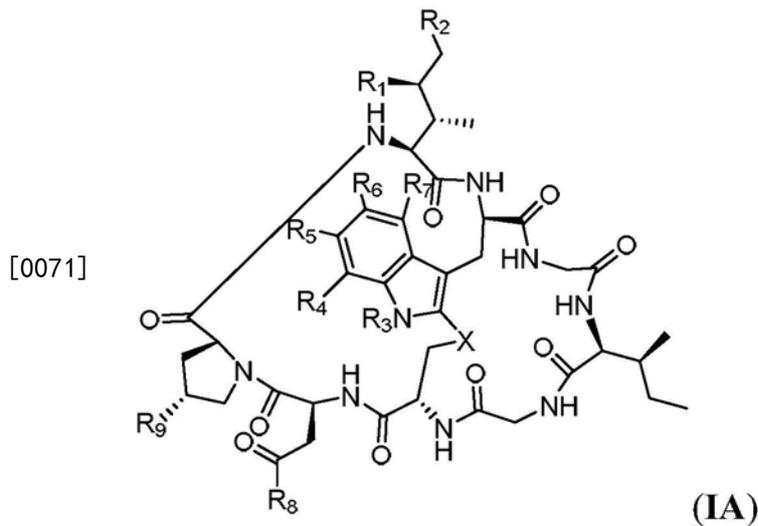
[0066] 在一些实施方案中,L-Z是



[0068] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是:



[0070] 在一些实施方案中,Am-L-Z由式(IA)表示



[0072] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

[0073] R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

[0074] R_A 和 R_B 在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0075] R_3 是H、 R_C 或 R_D ；

[0076] R_4 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0077] R_5 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0078] R_6 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0079] R_7 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0080] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 、 OR_D 、 NHR_C 或 $NR_C R_D$ ；

[0081] R_9 是H、OH、 OR_C 或 OR_D ；

[0082] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；

[0083] R_C 是-L-Z；

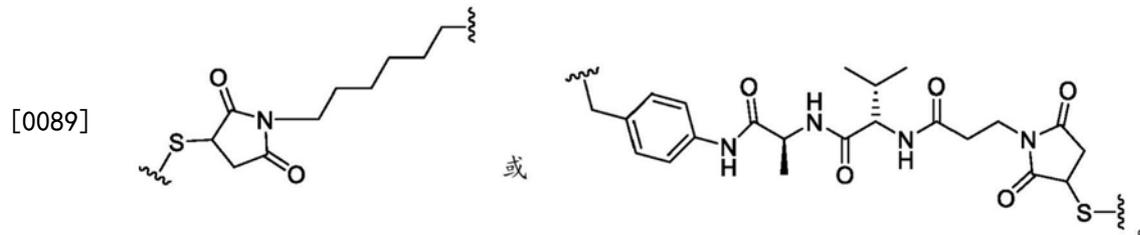
[0084] R_D 是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0085] L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；

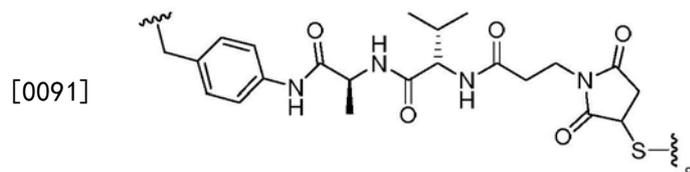
[0086] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分,并且

[0087] 其中Am包含正好一个 R_C 取代基。

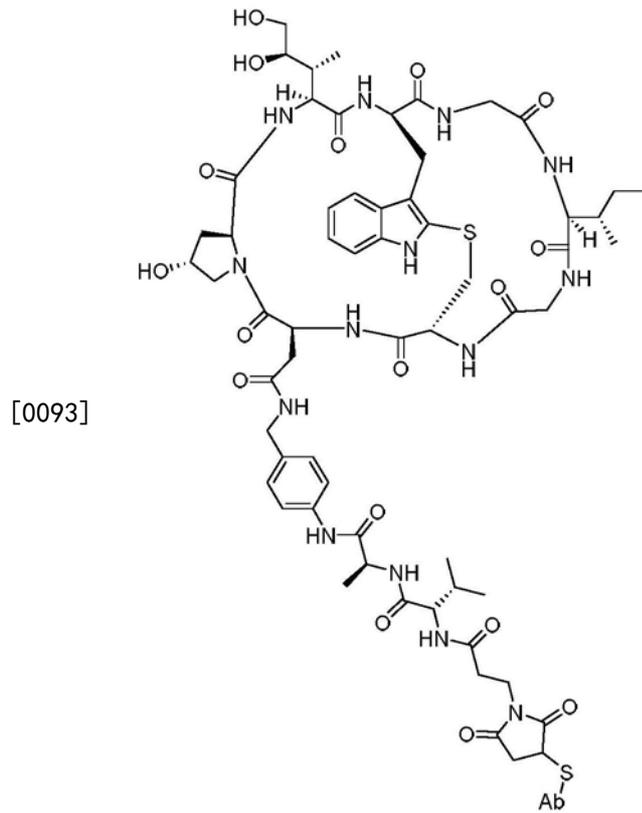
[0088] 在一些实施方案中,接头L和化学部分Z(合在一起称为L-Z)是



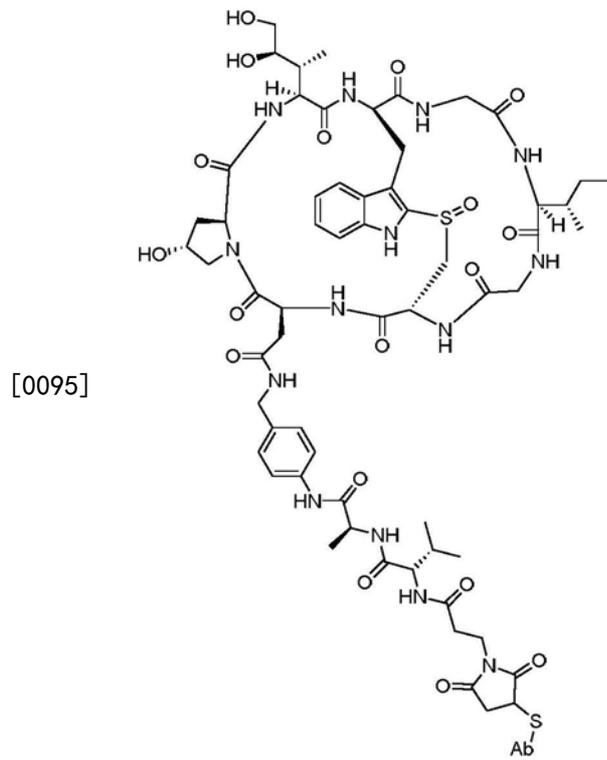
[0090] 在一些实施方案中,L-Z是



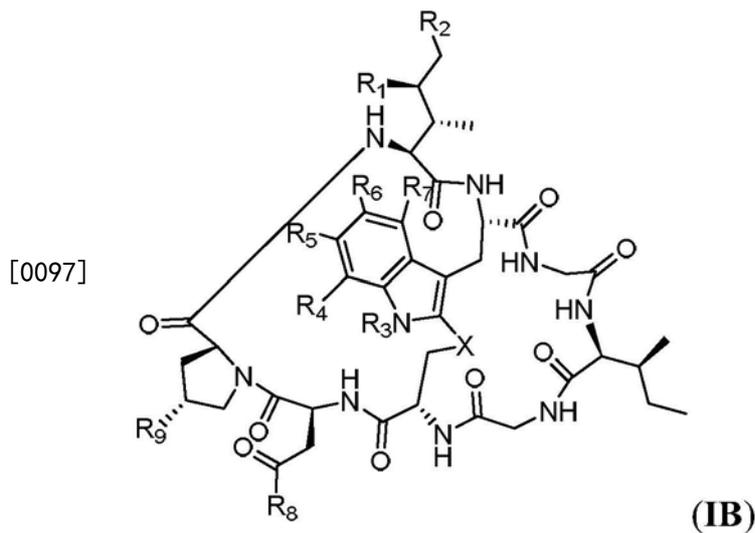
[0092] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是



[0094] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是



[0096] 在一些实施方案中,Am-L-Z由式 (IB) 表示



[0098] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C；

[0099] R₂是H、OH、OR_B或OR_C；

[0100] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0101] R₃是H、R_C或R_D；

[0102] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0103] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0104] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0105] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0106] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D；

[0107] R₉是H、OH、OR_C或OR_D；

[0108] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；

[0109] R_C是-L-Z；

[0110] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0111] L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；

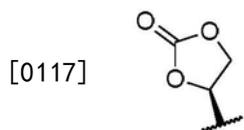
[0112] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分；并且

[0113] 其中Am包含正好一个R_C取代基。

[0114] 在一些实施方案中,Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C；

[0115] R_2 是H、OH、 OR_B 或 OR_C ;

[0116] R_A 和 R_B 在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成:



[0118] R_3 是H或 R_C ;

[0119] R_4 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

[0120] R_5 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

[0121] R_6 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

[0122] R_7 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ;

[0123] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 或 NHR_C ;

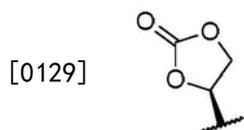
[0124] R_9 是H或OH; 并且

[0125] 其中X、 R_C 和 R_D 各自如上文所定义。

[0126] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示, 其中 R_1 是H、OH、 OR_A 或 OR_C ;

[0127] R_2 是H、OH、 OR_B 或 OR_C ;

[0128] R_A 和 R_B 与它们所结合的氧原子一起组合形成:



[0130] R_3 是H或 R_C ;

[0131] R_4 和 R_5 各自独立地是H、OH、 OR_C 、 R_C 或 OR_D ;

[0132] R_6 和 R_7 各自是H;

[0133] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 或 NHR_C ;

[0134] R_9 是H或OH; 并且

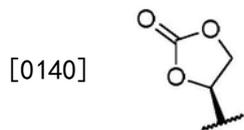
[0135] 其中X和 R_C 如上文所定义。

[0136] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,

[0137] 其中 R_1 是H、OH或 OR_A ;

[0138] R_2 是H、OH或 OR_B ;

[0139] R_A 和 R_B 与它们所结合的氧原子一起组合形成:



[0141] R_3 、 R_4 、 R_6 和 R_7 各自是H;

[0142] R_5 是 OR_C ;

[0143] R_8 是OH或 NH_2 ;

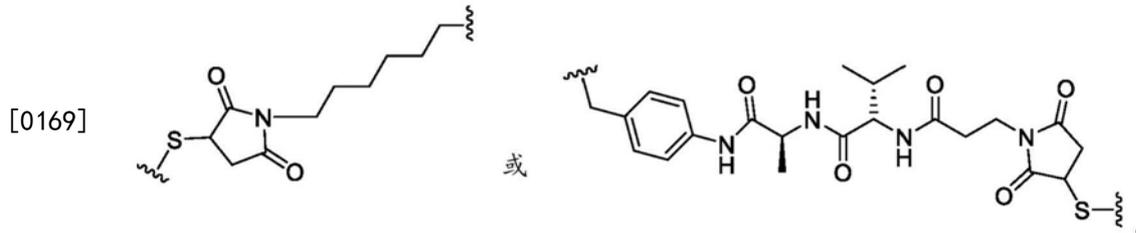
[0144] R_9 是H或OH; 并且

[0145] 其中X和 R_C 如上文所定义。

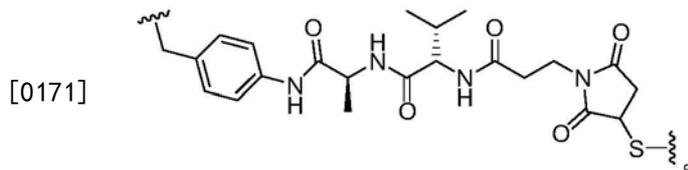
[0146] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,

[0147] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是H或OH;

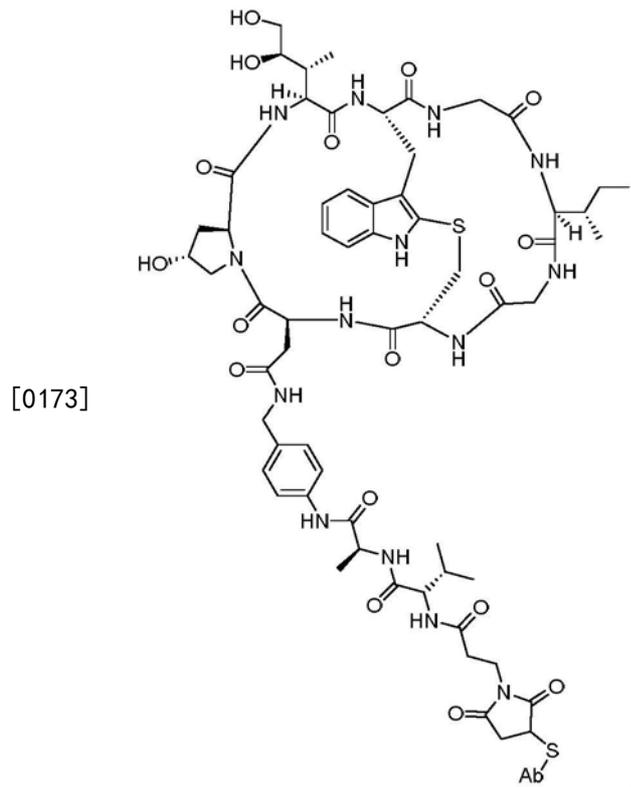
- [0148] R₃是R_C;
- [0149] R₄、R₆和R₇各自是H;
- [0150] R₅是H、OH或OC₁-C₆烷基;
- [0151] R₈是OH或NH₂;
- [0152] R₉是H或OH; 并且
- [0153] 其中X和R_C如上文所定义。
- [0154] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,
- [0155] 其中R₁和R₂各自独立地是H或OH;
- [0156] R₃、R₆和R₇各自是H;
- [0157] R₄和R₅各自独立地是H、OH、OR_C或R_C;
- [0158] R₈是OH或NH₂;
- [0159] R₉是H或OH; 并且
- [0160] 其中X和R_C如上文所定义。
- [0161] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,
- [0162] 其中R₁和R₂各自独立地是H或OH;
- [0163] R₃、R₆和R₇各自是H;
- [0164] R₄和R₅各自独立地是H或OH;
- [0165] R₈是OH、NH₂、OR_C或NHR_C;
- [0166] R₉是H或OH; 并且
- [0167] 其中X和R_C如上文所定义。
- [0168] 在一些实施方案中, 接头L和化学部分Z(合在一起称为L-Z)是



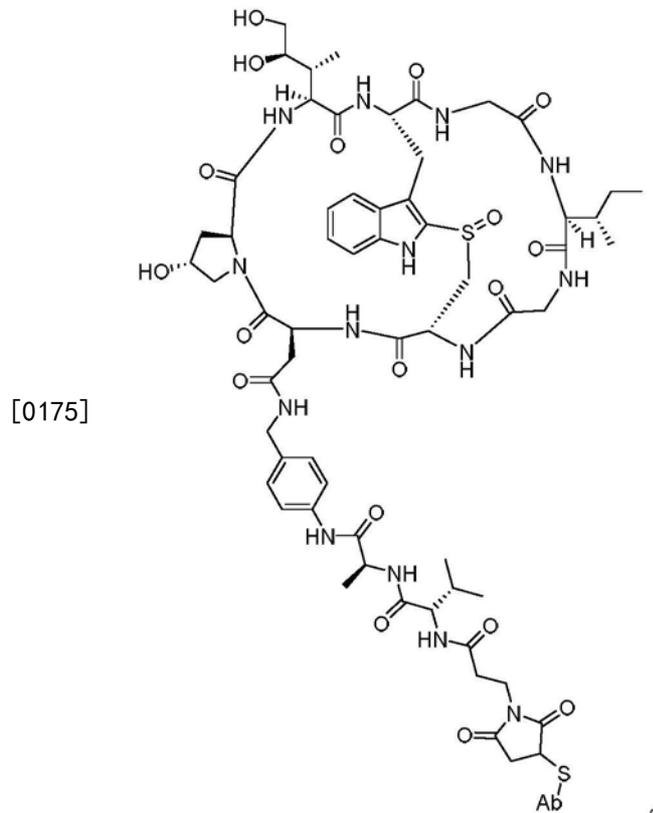
- [0170] 在一些实施方案中, L-Z是



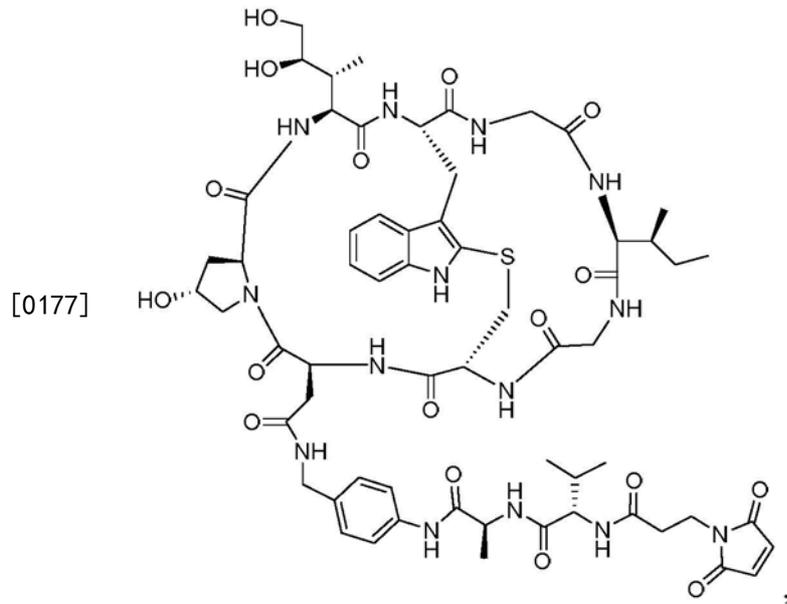
- [0172] 在一些实施方案中, Am-L-Z-Ab是



[0174] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是

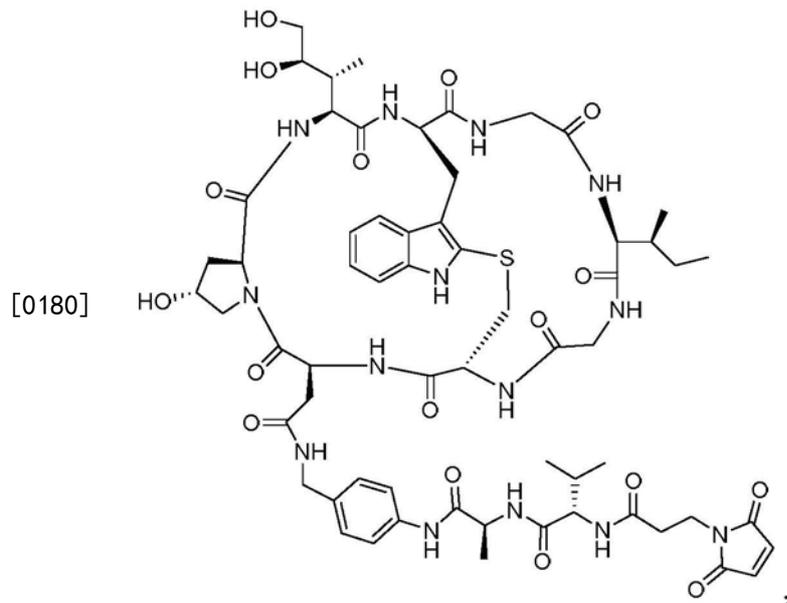


[0176] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab前体是



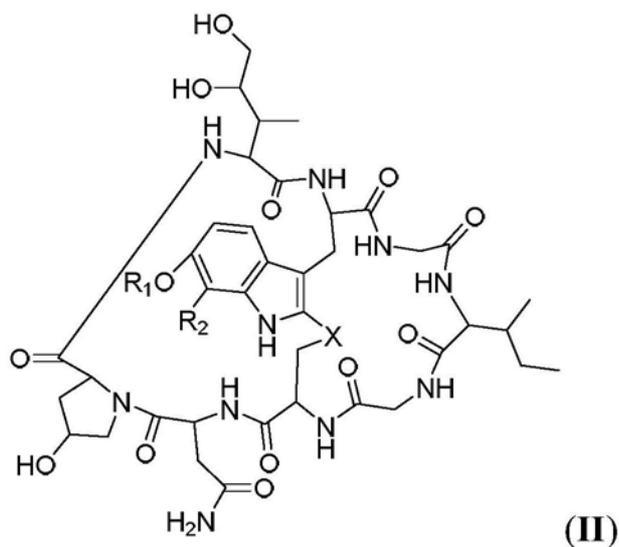
[0178] 其中马来酰亚胺与见于抗体中的半胱氨酸上的硫醇基团反应。

[0179] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab前体是

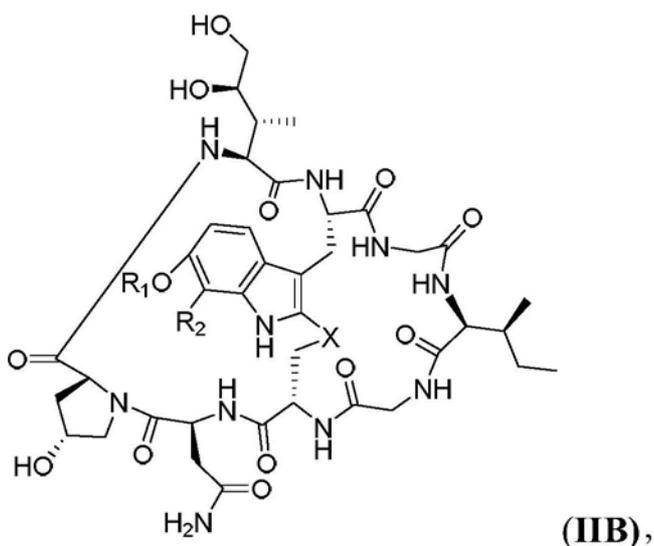
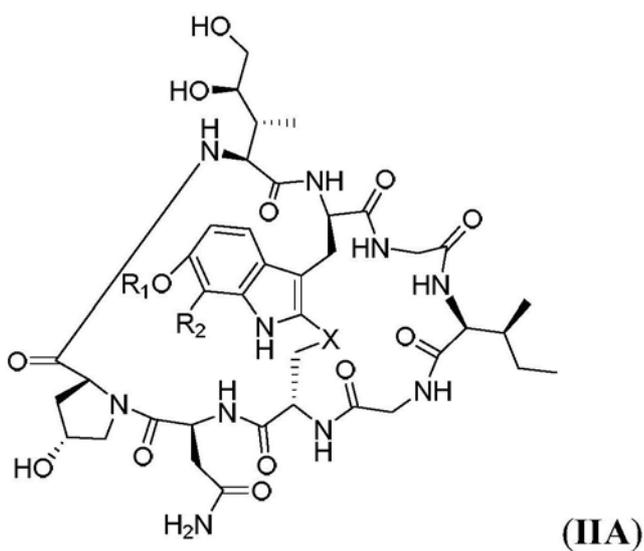


[0181] 其中马来酰亚胺与见于抗体中的半胱氨酸上的硫醇基团反应。

[0182] 在一些实施方案中,Am-L-Z由式(II)、式(IIA)或式(IIB)表示,



[0183]

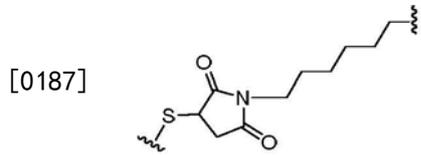


[0184] 其中X是S、S₀或S₀₂；R₁是H或通过化学部分Z与抗体或其抗原结合片段共价结合的接头，所述化学部分Z由存在于接头上的反应性取代基和存在于抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成；并且R₂是H或通过化学部分Z与抗体或其抗原结合片

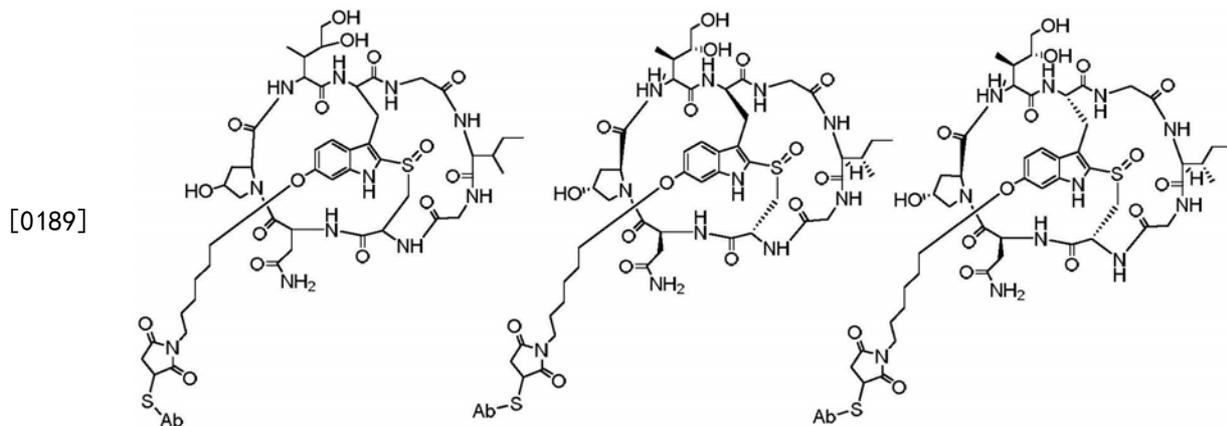
段共价结合的接头,所述化学部分Z由存在于接头上的反应性取代基和存在于抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成;其中当R₁是H时,R₂是接头,并且当R₂是H时,R₁是接头。

[0185] 在一些实施方案中,接头包含-(CH)_{2n}-单元,其中n是从2-6的整数。

[0186] 在一些实施方案中,R₁是接头并且R₂是H,并且接头和化学部分(一起为L-Z)是



[0188] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是以下中的一种:



[0190] 在一些实施方案中,在患者接受包含造血干细胞的移植物之前,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体被递送至患者中。

[0191] 在一些实施方案中,在将造血干细胞施用到患者中之前约3天(例如,从约1小时至约7天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天)),与细胞毒素(诸如微管结合剂)缀合的抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体被递送至患者中。

[0192] 在一些实施方案中,在患者接受包含造血干细胞的移植物的同时,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体被递送至患者中。

[0193] 在一些实施方案中,在患者接受包含造血干细胞的移植物之后,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体被递送至患者中。

[0194] 在一些实施方案中,在施用外源性造血干细胞移植物之后例如约1小时至10天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天)或更长时间,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体(例如与细胞毒素诸如微管结合剂缀合的)被递送至患者中。例如,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、抗体-药物缀合物可以在移植后约3天至4天施用。

- [0195] 在一些实施方案中,移植物是同种异体的。在一些实施方案中,移植物是自体的。
- [0196] 在一些实施方案中,移植物是骨髓移植物、外周血移植物或脐带血移植物。
- [0197] 在一些实施方案中,移植物包含造血细胞(例如,造血干细胞)。
- [0198] 在一些实施方案中,造血干细胞或其后代在造血干细胞移植到患者中之后两天或更多天后维持造血干细胞功能潜能。
- [0199] 在一些实施方案中,造血干细胞或其后代在造血干细胞移植到患者中之后两天或更多天(例如,从约2天至约5天、从约2天至约7天、从约2天至约20天、从约2天至约30天、诸如2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天或更多天)后维持造血干细胞功能潜力。
- [0200] 在一些实施方案中,造血干细胞或其后代能够在造血干细胞移植到患者中之后定位于造血组织(诸如骨髓)和/或重建造血作用。
- [0201] 在一些实施方案中,造血干细胞在移植到患者中后引起选自以下组成的组的细胞的群体的恢复:巨核细胞、凝血细胞(thrombocyte)、血小板(platelet)、红细胞、肥大细胞、原粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、小胶质细胞、粒细胞、单核细胞、破骨细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、T细胞和B细胞。
- [0202] 在一些实施方案中,移植物包含白细胞。
- [0203] 在一些实施方案中,在移植到患者中后,造血细胞选自以下组成的组:T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。
- [0204] 在一些实施方案中,在移植到患者中后,白细胞选自以下组成的组:T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。
- [0205] 在一些实施方案中,CD134阳性细胞选自以下组成的组:活化的T细胞、B细胞、树突细胞、NK细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,细胞展示出针对患者的抗原的反应性。在一些实施方案中,CD278阳性细胞选自以下组成的组:活化的T细胞、B细胞、树突细胞、NK细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体在接触后被T细胞内化。在其他实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体促进T细胞的死亡或抑制T细胞增殖。
- [0206] 在一些实施方案中,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD134结合并与细胞毒素(诸如微管结合剂)缀合的抗体、或抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体来耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD134+细胞的群体的方法,其中包括CD134+细胞的造血细胞选自以下组成的组:T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。
- [0207] 在一些实施方案中,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的能够与CD278结合并与细胞毒素(诸如微管结合剂)缀合的抗体、或抗原结合片段、ADC或可溶性CD278配体来耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD278+细胞的群体的方法,其中包括

CD278+细胞的造血细胞选自由以下组成的组：T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0208] 在一些实施方案中，选自由T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞组成的组的CD134+细胞展示出针对患者的抗原的反应性。

[0209] 在一些实施方案中，选自由T细胞、B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、癌细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞组成的组的CD278+细胞展示出针对患者的抗原的反应性。

[0210] 在一些实施方案中，抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体在施用至患者后被CD134+细胞内化。例如，抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体可以通过受体介导的胞吞作用(例如，在与细胞表面CD134结合后)被CD134+T细胞内化。在一些实施方案中，与抗CD134抗体、其抗原结合片段或ADC共价结合的细胞毒素可以通过化学裂解(例如，通过本文描述的接头的酶促裂解或非特异性裂解)在细胞内释放。然后细胞毒素可以进入其细胞内靶(诸如有丝分裂纺锤体、核DNA、核糖体RNA或拓扑异构酶等)，以促进CD134+T细胞的死亡。

[0211] 在一些实施方案中，抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD278配体在施用至患者后被CD278+细胞内化。例如，抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD278配体可以通过受体介导的胞吞作用(例如，在与细胞表面CD278结合后)被CD278+T细胞内化。在一些实施方案中，与抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC共价结合的细胞毒素可以通过化学裂解(例如，通过本文描述的接头的酶促裂解或非特异性裂解)在细胞内释放。然后细胞毒素可以进入其细胞内靶(诸如有丝分裂纺锤体、核DNA、核糖体RNA或拓扑异构酶等)，以促进CD278+T细胞的死亡。

[0212] 在一些实施方案中，抗CD134抗体、其抗原结合片段、或ADC、或可溶性CD134配体能够促进有丝分裂停滞并抑制CD134+T细胞的增殖(例如，通过抑制微管动态不稳定性)。在其他实施方案中，抗CD278抗体、其抗原结合片段、或ADC或可溶性CD278配体能够促进有丝分裂停滞并抑制CD278+T细胞的增殖(例如，通过抑制微管动态不稳定性)。

[0213] 在一些实施方案中，抗CD134抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体可以通过在施用至患者后募集一种或更多种补体蛋白、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或嗜酸性粒细胞来促进细胞的死亡。在一些实施方案中，募集到T细胞。在一些实施方案中，抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD278配体可以通过在施用至患者后募集一种或更多种补体蛋白、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或嗜酸性粒细胞来促进细胞的死亡。在一些实施方案中，募集到T细胞。

[0214] 在一些实施方案中，抗CD134抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD134配体可以通过在施用至患者后募集一种或更多种补体蛋白、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或嗜酸性粒细胞来促进CD134+T细胞的死亡。在一些实施方案中，抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性CD278配体可以通过在施用至患者后募集一种或更多种补体蛋白、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或嗜酸性粒细胞来促进CD278+T细胞的死亡。

[0215] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段、抗体-药物缀合物或可溶性CD134配

体用于治疗T细胞或B细胞驱动的自身免疫性疾病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化、类风湿性关节炎、肠道疾病、银屑病、狼疮或1型糖尿病。

[0216] 在一些实施方案中,本发明提供了一种通过向患者施用有效量的与细胞毒素(诸如微管结合剂)缀合的抗体或其抗原结合片段来耗尽患有GVHD或处于GVHD风险的人类患者中的CD278+细胞的群体的方法。在某些实施方案中,造血细胞包括T细胞。

[0217] 在一些实施方案中,抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC在施用至患者之后被CD278+细胞内化。例如,抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC可以通过受体介导的胞吞作用(例如,在与细胞表面CD278结合后)被CD278+T细胞内化。在一些实施方案中,与抗体、其抗原结合片段或ADC共价结合的细胞毒素可以通过化学裂解(例如,通过本文描述的接头的酶促裂解或非特异性裂解)在细胞内释放。然后细胞毒素可以进入其细胞内靶(诸如有丝分裂纺锤体、核DNA、核糖体RNA或拓扑异构酶等),以促进CD278+T细胞的死亡。

[0218] 在一些实施方案中,抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC能够促进有丝分裂停滞并抑制CD278+T细胞的增殖(例如,通过抑制微管动态不稳定性)。

[0219] 在一些实施方案中,抗CD278抗体或其抗原结合片段、其抗体-药物缀合物或ADC用于治疗T细胞或B细胞驱动的自身免疫性疾病。

[0220] 在一些实施方案中,方法用于治疗患者的一种或更多种紊乱或癌症,该患者诸如已经接受了包含造血干细胞的移植物的患者。例如,患者可以是患有干细胞紊乱的患者。在一些实施方案中,患者患有血红蛋白病紊乱,诸如镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血和威斯科特-奥尔德里奇综合征。患者可能患有免疫缺陷紊乱,诸如先天性免疫缺陷紊乱或获得性免疫缺陷紊乱(例如,人类免疫缺陷病毒或获得性免疫缺陷综合征)。在一些实施方案中,患者患有代谢紊乱,诸如糖原贮积症、黏多糖贮积症、戈谢氏病(Gaucher's Disease)、赫尔勒病(Hurlers Disease)、鞘脂贮积症和异染性脑白质营养不良。在一些实施方案中,患者患有癌症,诸如白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常性综合征以及神经母细胞瘤。在一些实施方案中,患者患有选自以下组成的组的紊乱:腺苷脱氨酶缺乏和重症联合免疫缺陷、高免疫球蛋白M综合征、切东病(Chediak-Higashi disease)、遗传性淋巴组织细胞增多症、骨硬化症、成骨不全症、贮积症、重型地中海贫血、系统性硬化、系统性红斑狼疮、多发性硬化和幼年型类风湿性关节炎。在一些实施方案中,患者已经接受包含造血干细胞的群体的移植。在其他实施方案中,该方法治疗癌症紊乱。

[0221] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗、预防或减轻有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,该方法包括向人类患者施用抗CD134抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被预防,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体。在一种实施方案中,细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。在一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前约3天向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后向患者施用ADC。在又另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至约10天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、

约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天)向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向患者施用ADC。在其他实施方案中,移植物是同种异体的。

[0222] 在又另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有GVHD或处于发展GVHD风险的人类受试者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法包括向人类患者施用抗CD134 ADC使得CD134细胞的群体被耗尽,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体。在一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前约3天向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后向患者施用ADC。在又另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至10天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天)向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向患者施用ADC。在其他实施方案中,移植物是同种异体的。

[0223] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗、预防或减轻有相应需要的人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,该方法包括向人类患者施用抗CD278抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被预防,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体。在一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前约3天向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后向患者施用ADC。在又另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至10天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天)向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向患者施用ADC。在其他实施方案中,移植物是同种异体的。

[0224] 在又另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有GVHD或处于发展GVHD风险的人类受试者中的CD278阳性细胞的群体的方法,该方法包括向人类患者施用抗CD278 ADC使得CD278细胞的群体被耗尽,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体。在一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之前约3天向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物的同时向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后向患者施用ADC。在又另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约1小时至10天(例如,

约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天)向患者施用ADC。在另一种实施方案中,方法包括在患者接受包含造血干细胞的移植物之后约3天至4天向患者施用ADC。在其他实施方案中,移植物是同种异体的。

[0225] 在又另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法,该方法通过向人类患者施用抗CD134抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

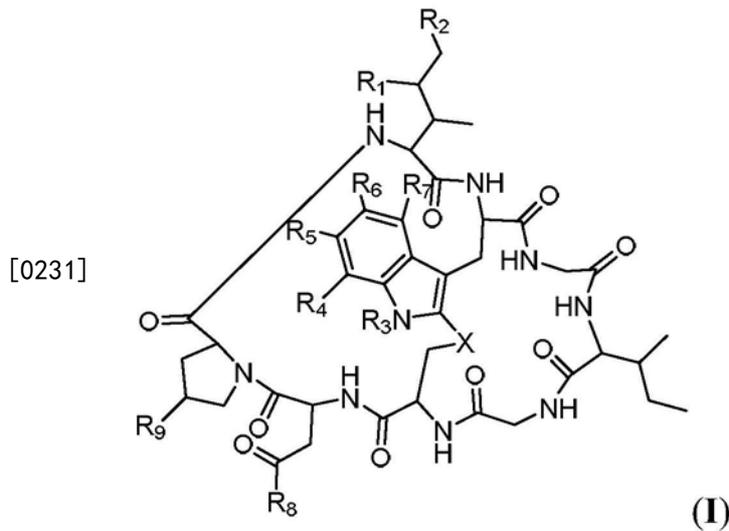
[0226] 在又另一方面,本发明的特征在于一种治疗有相应需要的人类患者的同种异体移植物排斥的方法,该方法通过向人类患者施用抗CD278抗体药物缀合物(ADC)使得GVHD被治疗,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

[0227] 在又另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于发展同种异体移植物排斥风险的人类受试者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法通过向人类患者施用抗CD134 ADC使得CD134细胞的群体被耗尽,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD134抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

[0228] 在又另一方面,本发明的特征在于一种耗尽患有同种异体移植物排斥或处于发展同种异体移植物排斥风险的人类受试者中的CD134阳性细胞的群体的方法,该方法通过向人类患者施用抗CD278 ADC使得CD278细胞的群体被耗尽,其中该ADC包含连接至细胞毒素的抗CD278抗体,所述细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

[0229] 在又另一方面,本发明的特征在于一种抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物(ADC)包含经由肽接头与细胞毒素缀合的抗CD134抗体(或抗CD278抗体),其中细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。在一些实施方案中,RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素。在其他实施方案中,鹅膏蕈毒素是鹅膏蕈碱。在又其他实施方案中,鹅膏蕈碱选自自由以下组成的组: α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原。

[0230] 在某些实施方案中,本发明的ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是抗CD278抗体(或抗CD278抗体),L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z由式(I)表示



[0232] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C；

[0233] R₂是H、OH、OR_B或OR_C；

[0234] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0235] R₃是H、R_C或R_D；

[0236] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0237] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0238] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0239] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0240] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D；

[0241] R₉是H、OH、OR_C或OR_D；

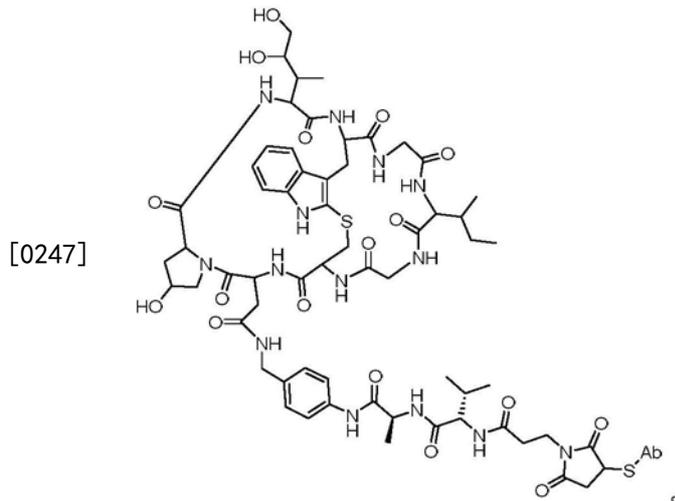
[0242] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；

[0243] R_C是-L-Z；

[0244] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；并且

[0245] L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基或任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；并且

[0246] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。在其他实施方案中,ADC具有式Ab-Z-L-Am,其中Ab是抗CD278抗体(或抗CD278抗体),L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素,并且其中Am-L-Z-Ab由以下表示



[0248] 在某些实施方案中,抗CD134抗体是如本文描述的抗体BER-ACT35、抗体443318或抗体7D6。在某些实施方案中,抗CD278抗体是如本文描述的抗体DX29或抗体669238。

[0249] 在又另一方面,本发明的特征在于一种药物组合物,该药物组合物包含抗体药物缀合物(ADC)和药学上有活性的载体,所述抗体药物缀合物(ADC)包含经由肽接头与细胞毒素缀合的抗CD134抗体(或抗CD278抗体),其中细胞毒素是微管结合剂或RNA聚合酶抑制剂。

[0250] 在又另一方面,本发明的特征在于一种通过向人类患者施用有效量的如本文描述的ADC治疗有相应需要的人类患者的移植失败或GVHD的方法,其中人类患者先前接受了移植。在一些实施方案中,人类患者在施用ADC之前不多于4天接受了移植。

[0251] 在又另一方面,本发明的特征在于一种治疗处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者的方法,该方法通过向处于患有移植失败或GVHD风险的人类患者施用有效量的如本文描述的ADC并且随后向人类受试者施用移植进行。在一些实施方案中,ADC作为单个剂量施用至人类患者。

[0252] 附图简述

[0253] 图1图解描绘了测量CD134在活化的和静息的调节性T细胞(Treg)两者上的表达的流式细胞术测定的结果。结果显示出与对照(活化0小时)相比,56.9%的T细胞在活化后24小时为CD134阳性。

[0254] 图2图解描绘了来自三个个体健康供体对照的新鲜全血的Treg流式分析的结果,结果显示出CD134在活化的T细胞上表达,但没有在静息的T细胞上显著表达。

[0255] 图3图解描绘了体外细胞结合测定的结果,显示出抗CD134抗体与活化的T细胞结合。

[0256] 图4A-4D图解描绘了体外细胞结合测定的结果,显示出抗CD278抗体(图4A)和抗CD134抗体(图4C)与活化的T细胞结合。图4B和图4D分别示出了与抗CD45阳性对照相比的相同结果。

[0257] 图5图解描绘了包括抗CD134-鹅膏蕈碱ADC(即,“CD134-鹅膏蕈碱”)和抗CD278-鹅膏蕈碱ADC(即,“CD278-鹅膏蕈碱”)与阴性对照(即,“hIgG-鹅膏蕈碱”)相比的体外T细胞杀伤测定的结果。结果示出了作为抗体浓度(x轴)的函数的有活力的活化的T细胞的数目(y轴)。

[0258] 图6A图解描绘了包括抗CD134-鹅膏蕈碱ADC(即,“CD134-ACT35-mIgG1-鹅膏蕈

碱”)和抗CD278-鹅膏蕈碱ADC(即,“CD278-DX29-mIgG1-鹅膏蕈碱”和“CD278-669238-mIgG1-鹅膏蕈碱”)与阴性对照(即,“hIgG-鹅膏蕈碱”)相比的体外T细胞杀伤测定的结果。结果示出了作为抗体浓度(x轴)的函数的有活力的活化的T细胞的数目(y轴)。

[0259] 图6B图解描绘了包括抗CD134-MMAF ADC(即,“CD134-ACT35-mIgG1-MMAF”)和抗CD278-MMAF ADC(即,“CD278-DX29-mIgG1-MMAF”)和“CD278-669238-mIgG1-MMAF”)与阴性对照(即,“hIgG-MMAF”)相比的体外T细胞杀伤测定的结果。结果示出了作为抗体浓度(x轴)的函数的有活力的活化的T细胞的数目(y轴)。

[0260] 图7A-7B图解描绘了包括某些阳性对照抗体和阴性对照抗体(图7A)以及抗CD134 ADC和某些抗CD278 ADC(图7B)与Fab-SAP(皂草素(saporin))组合的体外T细胞杀伤测定的结果。结果示出了作为抗体浓度(x轴)的函数的有活力的活化的(不成熟的(blasting))T细胞的数目(y轴)。

[0261] 定义

[0262] 如本文使用的,术语“约”是指高于或低于所描述的值的10%以内的值。例如,术语“约5nM”表示从4.5nM至5.5nM的范围。

[0263] 如本文使用的,术语“同种异体”是指来自属于相同的物种但遗传上不同的个体的细胞或组织,并且因此是免疫上不相容的。因此,术语“同种异体细胞”是指遗传上不同但属于相同物种的细胞类型。通常,术语“同种异体”用于定义从供体移植到相同物种的接受者的细胞,诸如干细胞。

[0264] 如本文使用的,术语“鹅膏蕈毒素”是指由鬼笔鹅膏(*Amanita phalloides*)菌产生的鹅膏蕈毒素肽家族的成员或其变体或其衍生物,诸如其能够抑制RNA聚合酶II活性的变体或其衍生物。还包括了合成鹅膏蕈毒素(参见,例如,通过引用并入本文的美国专利第9676702号)。可与本文描述的组合物和方法联合使用的鹅膏蕈毒素包括 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸和鹅膏蕈无毒环肽原,以及其衍生物,诸如由如本文描述的式(III)、(IIIA)或(IIIB)描述的。如本文描述的,鹅膏蕈毒素可以例如通过接头部分(L)与抗体或其抗原结合片段缀合(因此形成缀合物(也称为抗体药物缀合物(ADC)),所述抗体或其抗原结合片段与CD134或CD278结合。这样的ADC由式Ab-Z-L-Am表示,其中Ab是抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素与接头缀合。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素-接头缀合物Am-L-Z由式(I)、(IA)、(IB)、(II)、(IIA)或(IIB)表示。下文描述了鹅膏蕈毒素缀合的示例性方法和可用于这样的方法的接头。本文还描述了可用于与根据组合物和方法的抗体或抗原结合片段缀合的示例性的含接头的鹅膏蕈毒素。

[0265] 如本文使用的,术语“拮抗剂”描述了抑制或降低靶分子例如CD134或CD278的生物活性的任何分子。

[0266] 如本文使用的,术语“抗体”是指与特定抗原特异性结合或发生免疫学反应的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆抗体、单克隆抗体、遗传工程化抗体和以其他方式修饰的形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、杂缀合抗体(例如,双特异性抗体、三特异性抗体和四特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体),以及抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段。除非另外指示,否则术语“单克隆抗体”(mAb)意在包括能够与靶蛋白质特异性结合的完整分子以及其抗体片段(包括例如Fab片段和F(ab')₂

片段)两者。如本文使用的,Fab和F(ab')₂片段是指缺乏完整抗体的Fc片段的抗体片段。本文描述了这些抗体片段的实例。

[0267] 根据抗体的重链的恒定结构域的氨基酸序列,抗体可以被指定为不同的类别。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的若干种可以被进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的,并且在例如Abbas等Cellular and Mol. Immunology,第4版(2000)中被一般地描述。抗体可以是通过抗体与一个或多个其他蛋白质或肽的共价缔合或非共价缔合形成的更大融合分子的一部分。

[0268] 如本文使用的,术语“抗原结合片段”是指保留与靶抗原特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体片段可以是例如Fab、F(ab')₂、scFv、双抗体、三抗体、亲和体(affibody)、纳米抗体、适配体或结构域抗体。术语抗体的“抗原结合片段”所包括的结合片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,Fab片段是由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,F(ab')₂片段是包含由铰链区处的二硫化物桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由V_H和C_{H1}结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v) 包括V_H和V_L结构域的dAb;(vi) 由V_H结构域组成的dAb片段(参见,例如,Ward等,Nature 341:544-546,1989);(vii) 由V_H或V_L结构域组成的dAb;(viii) 分离的互补决定区(CDR);和(ix) 可以任选地通过合成接头连接两种或更多种(例如,两种、三种、四种、五种或六种)分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域,V_L和V_H,由单独的基因编码,但是它们可以使用重组方法通过接头连接,使它们能够作为单条蛋白质链被制造,其中V_L区和V_H区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与完整抗体相同的方式筛选有用的片段。抗原结合片段可以通过重组DNA技术、完整免疫球蛋白的酶裂解或化学裂解,或者在某些情况下,通过本领域已知的化学肽合成程序产生。

[0269] 如本文使用的,术语“抗CD134抗体”或“抗CD134 ADC”是指与CD134(也称为,例如,OX40、OX40L受体、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)、ACT-4、ACT35或TXGP1L)特异性结合的抗体、抗体片段或ADC。在一种实施方案中,抗体与人类CD134(hCD134)特异性结合。CD134表达于T细胞上。将会与抗CD134抗体(或抗CD134缀合物)结合的人类CD134的氨基酸序列在下文描述于SEQ ID NO:1中。

[0270] 如本文使用的,术语“抗CD278抗体”或“抗CD278 ADC”是指与CD278(也称为ICOS)特异性结合的抗体、抗体片段或ADC。在一种实施方案中,抗体与人类CD278(hCD278)特异性结合。CD278见于T细胞上。将会与抗CD278抗体(或抗CD278缀合物)结合的人类CD278的氨基酸序列在下文描述于SEQ ID NO:2中。

[0271] 如本文使用的,术语“双特异性抗体”是指例如能够与至少两种不同抗原结合的单克隆抗体,通常是人类抗体或人源化抗体。例如,一种结合特异性可以针对T细胞表面抗原(诸如CD134或CD278),另一种结合特异性可以针对不同的T细胞表面抗原或另一种细胞表面蛋白(诸如参与抑制或限制细胞生长的信号转导途径的受体或受体亚基等)。

[0272] 如本文使用的,术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而链的其余部

分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这样的抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要它们表现出期望的生物活性(参见,例如,美国专利第4,816,567号和Morrison等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。在一种实施方案中,嵌合抗体包含鼠重链可变区和轻链可变区以及人类轻链恒定区和重链恒定区。

[0273] 如本文使用的,术语“互补决定区”和“CDR”是指见于抗体的轻链可变结构域和重链可变结构域两者中的高变区。可变结构域的更加高度保守部分称为框架区(FR)。根据环境和本领域已知的多种定义,描绘抗体的高变区的氨基酸位置可以变化。可变结构域内的一些位置可以被视为混合高变位置,因为在一组标准下这些位置可以被视为在高变区内,而在一组不同的标准下这些位置被视为在高变区外。这些位置中的一个或更多个还可以见于扩展的高变区。本文描述的抗体可以在这些混合高变位置中包含修饰。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个主要采用 β -折叠构型的框架区,四个框架区由三个CDR连接,其形成连接 β -折叠结构的环,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过框架区以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序以紧密邻近度结合在一起,并且与来自其他抗体链的CDR一起,对抗体的靶结合位点的形成做出贡献(例如,参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institute of Health,Bethesda,MD.,1987或<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>)。免疫球蛋白氨基酸残基的编号可以根据Kabat等的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统进行。

[0274] 如本文使用的,术语“缀合物”是指通过一个分子(诸如抗体或其抗原结合片段)的反应性官能基团与另一个分子(诸如本文描述的细胞毒素)的适当反应性官能基团的化学键合形成的化合物。缀合物可以包括彼此结合的两个分子(例如,抗CD134抗体和细胞毒素,或抗CD278抗体和细胞毒素)之间,例如抗体和细胞毒素之间的接头。可以用于形成缀合物的接头的实例包括含肽接头,诸如含有天然存在或非天然存在的氨基酸诸如D-氨基酸的那些接头。接头可以使用本文描述的和本领域已知的多种策略制备。取决于其中的反应性组分,接头可以被裂解,例如通过酶水解、光解、酸性条件下的水解、碱性条件下的水解、氧化、二硫化物还原、亲核裂解或有机金属裂解(参见,例如Leriche等,Bioorg.Med.Chem.,20:571-582,2012)。值得注意的是,术语“缀合物”(当指化合物时)在本文中也可互换地被称为“药物抗体缀合物”或“抗体药物缀合物(ADC)”。

[0275] 如本文使用的,术语“偶联反应”是指其中两个或更多个适于彼此反应的取代基进行反应以便形成化学部分的化学反应,所述化学部分将与每个取代基结合的分子片段连接在一起(例如,共价地)。偶联反应包括其中与为细胞毒素(诸如本领域已知或本文描述的细胞毒素)的片段结合的反应性取代基和与本领域已知或本文描述的针对CD134或CD278的片段结合的合适反应性取代基反应的那些偶联反应。合适反应性取代基的实例包括亲核体/亲电体对(例如硫醇/卤代烷基对、胺/羰基对、或硫醇/ α , β -不饱和羰基对等)、二烯/亲二烯体对(例如叠氮化物/炔烃对等)等。偶联反应包括但不限于硫醇烷基化、羟基烷基化、胺烷基化、胺缩合、酰胺化、酯化、二硫化物形成、环加成(例如,[4+2]狄尔斯-阿尔德环加成(Diels-Alder cycloaddition)、[3+2]Huisgen环加成等)、亲核芳族取代、亲电芳族取代和本领域已知或本文描述的其他反应范式。

[0276] 如本文使用的,术语“供体”是指从中分离出一种或更多种细胞然后将所述细胞或

其后代施用至接受者中的人类或动物。一个或多个细胞可以是例如造血干细胞的群体。

[0277] 如本文使用的,术语“双抗体”是指包含两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包括由过短以至于不允许在同一肽链上进行V_H和V_L结构域的分子内缔合的接头(例如,由五个氨基酸组成的接头)连接的V_H和V_L结构域。这种构型迫使每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对以便形成同二聚结构。因此,术语“三抗体”是指包含三条肽链的三价抗体,每条肽链包含由非常短以至于不允许在同一肽链内进行V_H和V_L结构域的分子内缔合的接头(例如,由1-2个氨基酸组成的接头)连接的一个V_H结构域和一个V_L结构域。为了折叠成其天然结构,以这种方式配置的肽通常三聚化以便将相邻肽链的V_H和V_L结构域定位为空间上彼此邻近(参见,例如,Holliger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-48,1993)。

[0278] 如本文使用的,“药物-抗体比”或“DAR”是指附接至ADC的抗体的药物的数量例如鹅膏蕈毒素的数量。尽管根据抗体上的连接位点的数量,更高的负载例如10也是可能的,但是ADC的DAR范围可以从1至8。术语DAR可以用于指负载到单个抗体上的药物的数量,或者可选地,可以用于指一组ADC的DAR平均值或平均DAR(即“平均DAR”)。

[0279] 如本文使用的,“双重可变结构域免疫球蛋白”(“DVD-Ig”)是指经由接头将两个单克隆抗体的靶结合可变结构域组合以产生四价、双靶向单一剂的抗体(参见,例如,Gu等,Meth.Enzymol.,502:25-41,2012)。

[0280] 如本文使用的,术语“内源性”描述了天然地见于特定生物体诸如人类患者的物质,诸如分子、细胞、组织或器官(例如造血干细胞或造血谱系细胞,诸如巨核细胞、凝血细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、原粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、小胶质细胞、粒细胞、单核细胞、破骨细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞)。

[0281] 如本文使用的,术语“外源性”描述了未天然地见于特定生物体诸如人类患者的物质,诸如分子、细胞、组织或器官(例如造血干细胞或造血谱系细胞,诸如巨核细胞、凝血细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、原粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、小胶质细胞、粒细胞、单核细胞、破骨细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞)。外源性物质包括从外部来源提供给生物体或提供给经培养的从生物体中提取的物质(cultured matter extracted therefrom)的那些外源性物质。

[0282] 如本文使用的,术语“框架区”、“FR”或“FW区”包括与抗体或其抗原结合片段的可变区内的CDR相邻的氨基酸残基。FW区残基可以存在于例如人类抗体、人源化抗体、单克隆抗体、抗体片段、Fab片段、单链抗体片段、scFv片段、抗体结构域和双特异性抗体等中。

[0283] 如本文使用的,术语“半衰期”是指身体内的抗体药物的血浆浓度降低一半或50%所需的时间。血清浓度的该50%降低反映了循环并且不被抗体清除的自然方法去除的药物的量。

[0284] 如本文使用的,术语“造血干细胞”(“HSC”)是指具有自我更新和分化为成熟血细胞的能力的未成熟血细胞,所述成熟血细胞包括多种谱系,包括但不限于粒细胞(例如,早幼粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、红细胞(例如,网织红细胞、红细胞)、凝血细胞(例如,巨核细胞、产生血小板的巨核细胞、血小板)、单核细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞)、树突细胞、小胶质细胞、破骨细胞和淋巴细胞(例如NK细胞、B细胞和T细胞)。这样的细胞可以包括CD34+细胞。CD34+细胞是表达CD34细胞表面标志物的未成熟细胞。在

人类中,CD34⁺细胞被认为包括具有上文定义的干细胞性质的细胞亚群,而在小鼠中,HSC是CD34⁻。此外,HSC还指长期重新填充HSC(LT-HSC)和短期重新填充HSC(ST-HSC)。LT-HSC和ST-HSC基于功能潜能和细胞表面标志物表达区分。例如,人类HSC是CD34⁺、CD38⁻、CD45RA⁻、CD90⁺、CD49F⁺和lin⁻(成熟谱系标志物阴性,成熟谱系标志物包括CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11B、CD19、CD20、CD56、CD235A)。在小鼠中,骨髓LT-HSC是CD34⁻、SCA-1⁺、C-kit⁺、CD135⁻、Slamf1/CD150⁺、CD48⁻和lin⁻(成熟谱系标志物阴性,成熟谱系标志物包括Ter119、CD11b、Gr1、CD3、CD4、CD8、B220、IL7ra),而ST-HSC是CD34⁺、SCA-1⁺、C-kit⁺、CD135⁻、Slamf1/CD150⁺和lin⁻(成熟谱系标志物阴性,成熟谱系标志物包括Ter119、CD11b、Gr1、CD3、CD4、CD8、B220、IL7ra)。此外,在稳态条件下,ST-HSC比LT-HSC更少处于静息和更有增殖性。然而,LT-HSC具有更大的自我更新潜能(即,它们在整个成体期生存,并且可以在连续接受者中连续移植),而ST-HSC具有有限的自我更新(即,它们仅生存有限的时间段并且不具有连续移植潜能)。这些HSC中的任一种都可以用于本文描述的方法。ST-HSC特别有用,因为它们有高度增殖性并且因此可以更快地产生分化的后代。

[0285] 如本文使用的,术语“造血干细胞功能潜能”是指造血干细胞的功能性质,其包括1)多潜能(指分化成包括但不限于以下的多种不同血液谱系的能力:粒细胞(例如,早幼粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、红细胞(例如,网织红细胞、红细胞)、凝血细胞(例如,巨核细胞、产生血小板的巨核细胞、血小板)、单核细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞)、树突细胞、小胶质细胞、破骨细胞和淋巴细胞(例如,NK细胞、T细胞和B细胞)),2)自我更新(指造血干细胞产生具有与母细胞等同的潜能的子细胞的能力,并且此外,这种能力可以在个体的一生中反复出现而不衰竭),以及3)造血干细胞或其后代被再引入移植接受者中的能力,在移植接受者中它们归巢至造血干细胞小生境(niche)并且重建有效且持续的造血作用。

[0286] 如本文使用的,术语“人类抗体”是指其中蛋白质的基本上每一部分(例如,所有的CDR、框架区、C_L、C_H结构域(例如,C_H1、C_H2、C_H3)、铰链以及V_L和V_H结构域)在人类中基本上无免疫原性、仅具有微小的序列变化或变异的抗体。人类抗体可以于人类细胞中体外产生(例如,通过重组表达)或者由能够表达功能性重排的人类免疫球蛋白(诸如重链和/或轻链)基因的非人类动物或原核或真核细胞产生。当人类抗体是单链抗体时,它可以包括未见于天然人类抗体中的接头肽。例如,F_v可以包含连接重链的可变区和轻链的可变区的接头肽,诸如2个至约8个甘氨酸或其他氨基酸残基。这样的接头肽被认为是人类来源的。人类抗体可以通过本领域已知的多种方法制备,包括使用源自于人类免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。人类抗体还可以使用不能够表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生(参见,例如,PCT公布第W01998/24893号;第W01992/01047号;第W01996/34096号;第W01996/33735号;美国专利第5,413,923号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,569,825号;第5,661,016号;第5,545,806号;第5,814,318号;第5,885,793号;第5,916,771号;和第5,939,598号)。在一种实施方案中,人类抗体使用重组方法制备,使得抗体的糖基化模式与具有相同序列的抗体(如果其在自然界中存在的话)有差异。

[0287] 非人类(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列。在一种实施方案中,人源化抗体是其中来自接受者的CDR的残基被来自非人

类物种(供体抗体)的CDR的残基替换的具有期望的特异性、亲和力和/或能力的人类抗体(接受者抗体),所述非人类物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物。在一些情况下,人类抗体的框架区(FR)残基被对应的非人类残基替换。此外,人源化抗体可以包含未见于接受者抗体或供体抗体的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上至少一个并且通常是两个可变结构域的全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人类抗体的那些高变环,并且全部或基本上全部FR是人类免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选地还将包含至少一部分抗体恒定区(Fc),通常是人类免疫球蛋白的恒定区。对于进一步的细节,参见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见以下综述文章和其中引用的参考文献:Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994)。

[0288] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地使用以指呈其基本上完整形式的抗体,而不是如本文定义的抗体片段。因此,对于IgG抗体,完整抗体包含两条重链和两条轻链,每条重链包含可变区、恒定区和Fc区,并且每条轻链包含可变区和恒定区。更具体地,完整IgG包含两条轻链和包含两条重链,每条轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL),并且每条重链包含重链可变区(VH)和三个重链恒定区(CH1、CH2和CH3)。CH2和CH3代表重链的Fc区。

[0289] “分离的”,当在本文中使用时,是指已经从表达它的细胞或细胞培养物鉴定及分离和/或回收的多肽,例如抗体。通常,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。因此,“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。

[0290] 如本文使用的,术语“微管结合剂”是指通过破坏对有丝分裂和间期细胞功能所必需的微管网络而起作用的化合物。微管结合剂的实例包括,但不限于,美登素、美登木素生物碱及其衍生物,诸如本文描述的或本领域已知的那些,长春花生物碱,诸如长春花碱、硫酸长春花碱、长春新碱、硫酸长春新碱、长春地辛和长春瑞滨,紫杉烷,诸如多西他赛(docetaxel)和紫杉醇,大环内酯类,诸如圆皮海绵内酯(discodermolides)、秋水仙碱(cochicine)和埃博霉素(epothilone),及其衍生物,诸如埃博霉素B或其衍生物。紫杉醇作为**TAXOL®**;多西他赛作为**TAXOTERE®**;硫酸长春花碱作为**VINBLASTIN R.P®**;并且硫酸长春新碱作为**FARMISTIN®**销售。还包括紫杉醇的一般形式以及紫杉醇的多种剂型。紫杉醇的一般形式包括但不限于盐酸倍他洛尔(betaxolol hydrochloride)。紫杉醇的多种剂型包括但不限于作为**ABRAXANE®**销售的白蛋白纳米颗粒紫杉醇;**ONXOL®**,**CYTOTAX®**。可以获得圆皮海绵内酯,例如,如美国专利第5,010,099号中公开的。还包括美国专利第6,194,181号、W09810121、W09825929、W09808849、W09943653、W09822461和W00031247中公开的埃博霉素衍生物,这些专利中的每一篇的公开内容通过引用并入本文。

[0291] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是指源自单个克隆的抗体,包括任何真核、原核或噬菌体克隆,而不是藉以产生它的方法。

[0292] 如本文使用的,术语“处于GVHD风险的患者”是指具有一个或更多个发展GVHD的风险因素的患者。风险因素包括但不限于:同种异体供体移植物(例如,来自骨髓移植物的造

血干细胞的移植),包括错配的人类白细胞抗原(HLA)供体和性别错配的供体,充满T细胞的干细胞移植(T cell replete stem cell transplant)、供体和接受者年龄、移植物供体或宿主中巨细胞病毒(CMV)或CMV抗体的存在、全身辐照(total-body irradiation)(TBI)剂量的增加、调节方案强度、急性GVHD预防、缺乏保护性环境、脾切除术、免疫球蛋白使用、潜在疾病、ABO相容性、先前暴露于疱疹病毒、供体血液输注、表现评分、抗生素肠道净化去污以及同种异体移植后血液输注。

[0293] 如本文使用的,术语“处于自身免疫性疾病风险的患者”是指具有一个或多个发展自身免疫性疾病的风险因素的患者。风险因素包括但不限于:年龄(青年至中年)、性别(女性)、种族(非裔美国人、美国印第安人或拉丁美洲人)、自身免疫性疾病的家族史、暴露于环境因素、既往感染、慢性炎症和供体移植(例如,来自骨髓移植物的造血干细胞的移植)。

[0294] 如本文使用的,术语“接受者”是指接受移植物(诸如包含造血干细胞的群体的移植物)的患者。施用至接受者的移植的细胞可以是例如自体细胞、同系细胞或同种异体细胞。

[0295] 如本文使用的,术语“样品”是指从受试者获取的样本(例如,血液、血液组分(例如,血清或血浆)、尿液、唾液、羊水、脑脊液、组织(例如,胎盘或真皮)、胰液、绒毛膜绒毛样品和细胞)。

[0296] 如本文使用的,术语“scFv”是指其中来自抗体的重链和轻链的可变结构域已经连接形成一条链的单链Fv抗体。scFv片段包含单条多肽链,该多肽链包括由接头分开的抗体轻链的可变区(V_L)(例如,CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3)和抗体重链的可变区(V_H)(例如,CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3)。连接scFv片段的V_L和V_H区的接头可以是由蛋白氨基酸(proteinogenic amino acid)组成的肽接头。可以使用替代的接头以便增加scFv片段对蛋白水解降解的耐受性(例如,含有D-氨基酸的接头),以增强scFv片段的溶解性(例如,亲水性接头,诸如含有聚乙二醇的接头或含有重复甘氨酸和丝氨酸残基的多肽),以改善分子的生物物理稳定性(例如,含有形成分子内或分子间二硫键的半胱氨酸残基的接头),或以减弱scFv片段的免疫原性(例如,含有糖基化位点的接头)。本领域普通技术人员还将理解,本文描述的scFv分子的可变区可以被修饰,使得它们在氨基酸序列方面与它们所源自的抗体分子不同。例如,可以进行引起氨基酸残基处的保守取代或改变的核苷酸取代或氨基酸取代(例如,在CDR和/或框架残基中),以便保持或增强scFv与由相应抗体识别的抗原结合的能力。

[0297] 如本文使用的,术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指抗体(或ADC)识别和结合至特定蛋白质结构(表位)而不是一般地蛋白质的能力。如果抗体或ADC对表位“A”有特异性,则在含有标记的“A”和抗体的反应中,含有表位A的分子(或游离的、未标记的A)的存在将降低与抗体或ADC结合的标记的A的量。举例而言,如果抗体在被标记时可以被对应的未标记的抗体竞争远离其靶,则抗体与靶“特异性地结合”。在一种实施方案中,如果抗体具有至少约 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更小(更小的意思是小于 10^{-12} 的数字,例如 10^{-13})的针对靶的K_D,则抗体与靶(例如CD134或CD278)特异性结合。在一种实施方案中,如本文使用的,术语“与CD134特异性结合”或“与CD134特异性地结合”,是指抗体或ADC与CD134结合并且具有如由表面等离子体共振确定的 1.0×10^{-7} M或更小的解离

常数 (K_D)。在另一种实施方案中,如本文使用的,术语“与CD278特异性结合”或“与CD278特异性地结合”,是指抗体或ADC与CD278结合并且具有如由表面等离子体共振确定的 $1.0 \times 10^{-7}M$ 或更小的解离常数 (K_D)。在一种实施方案中, K_D 根据标准生物层干涉法 (BLI) 确定。然而,应理解,抗体或ADC可能能够与两种或更多种序列相关的抗原特异性结合。例如,在一种实施方案中,抗体可以与CD134的人类和非人类(例如,小鼠或非人类灵长类动物)种间同源物两者特异性结合。作为另一个实例,在一种实施方案中,抗体可以与CD278的人类和非人类(例如,小鼠或非人类灵长类动物)种间同源物两者特异性结合。

[0298] 如本文使用的,术语“受试者”和“患者”是指接受用于如本文描述的特定疾病或状况的治疗的生物体,诸如人类。例如,患者,诸如人类患者,可以在造血干细胞移植疗法之前接受治疗,以便通过施用如本文描述的能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或配体来治疗或预防GVHD。

[0299] 如本文使用的,短语“基本上从血液清除”是指施用治疗剂(诸如抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体)至患者之后的时间点,在该时间点从患者分离的血液样品中的治疗剂的浓度使得治疗剂通过常规手段不可检测到(例如,使得治疗剂在用于检测治疗剂的设备或测定的噪声阈值之上不可检测到)。本领域已知的多种技术可以用于检测抗体、抗体片段和蛋白质配体,诸如本领域已知的或本文描述的基于ELISA的检测测定。可以用于检测抗体、抗体片段和蛋白质配体的另外的测定包括本领域已知的免疫沉淀技术和免疫印迹测定等。

[0300] 如本文使用的,短语“干细胞紊乱”广义地指可以通过调节受试者的靶组织和/或通过消融靶组织中的内源性干细胞群体(例如,消融来自受试者的骨髓组织的内源性造血干细胞或祖细胞群体)和/或通过受试者的靶组织中植入或移植干细胞来治疗或治愈的任何疾病、紊乱或状况。例如,已经表明1型糖尿病通过造血干细胞移植治愈,并且可以受益于根据本文描述的组合物和方法的调节。可以使用本文描述的组合物和方法治疗的另外的紊乱包括但不限于镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血、威斯科特-奥尔德里奇综合征、ADA SCID、HIV/AIDS、异染性脑白质营养不良、Diamond-Blackfan贫血和Schwachman-Diamond综合征。受试者可能患有遗传性血液紊乱(例如镰状细胞性贫血)或自身免疫性紊乱或受它们影响。另外地或可选地,受试者可能患有恶性肿瘤或受恶性肿瘤影响,恶性肿瘤诸如选自以下组成的组的恶性肿瘤:血液学癌症(例如白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常性综合征)和神经母细胞瘤。在一些实施方案中,受试者患有代谢紊乱或以其他方式受代谢紊乱影响。例如,受试者可能患有代谢紊乱或者任何其他疾病或紊乱,或以其他方式受它们影响,所述代谢紊乱选自糖原贮积症、黏多糖贮积症、戈谢氏病、赫尔勒病、鞘脂贮积症和异染性脑白质营养不良组成的组,所述任何其他疾病或紊乱可以受益于本文公开的治疗和疗法并且包括但不限于以下:重症联合免疫缺陷、威斯科特-奥尔德里奇综合征、高免疫球蛋白M (IgM) 综合征、切东病、遗传性淋巴组织细胞增多症、骨硬化症、成骨不全症、贮积症、重型地中海贫血、镰状细胞性疾病、系统性硬化、系统性红斑狼疮、多发性硬化、幼年型类风湿性关节炎以及在“Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease,”ASH Education Book,1:319-338 (2000)中描述的那些疾病或紊乱,该文献的公开内容在其涉及可以通过施用造血干细胞移植疗法来治疗的病症时通过引用以其整体并入本文。

[0301] 如本文使用的,术语“患有疾病”是指经历GVHD或自身免疫性疾病的受试者(例如,人类)。不意图将本发明限于任何特定迹象或症状,也不限于疾病。因此,意图本发明涵盖正在经历从亚临床疾病到充分发展的疾病的任何疾病范围的受试者,其中受试者表现出与GVHD或自身免疫性疾病相关的象征(例如,迹象和症状)中的至少一些。

[0302] 如本文使用的,术语“转染”是指通常用于将外源性DNA引入原核或真核宿主细胞的许多种技术中的任一种,诸如电穿孔、脂转染、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖酐转染等。

[0303] 如本文使用的,术语“移植物/移植(transplant)”是指已经从其来源部位转移到接受者部位的任何器官、身体组织或细胞,或者这样做的行为。

[0304] 如本文使用的,术语“预防(prevent)”或“预防(preventing)”是指停止、延迟和/或减轻与紊乱诸如GVHD或自身免疫性疾病相关的症状的严重程度。

[0305] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性处理,其中目的是预防或减缓(减轻)不期望的生理变化或紊乱,或者促进针对紊乱进行治疗的患者中的有益表型。有益或期望的临床结果包括但不限于,CD134阳性或CD278阳性细胞的细胞计数或相对浓度的降低、GVHD或自身免疫性疾病的细胞表现和临床表现的减少、和/或促进外源性造血细胞在如本文描述的患者中的植入以及随后的造血干细胞移植疗法。另外的有益结果包括患有GVHD或处于GVHD风险的造血干细胞的细胞计数或相对浓度的增加。本文描述的疗法的有益结果还可以包括在造血干细胞移植疗法之后,造血谱系的一种或更多种细胞的细胞计数或相对浓度的增加,造血谱系的一种或更多种细胞诸如巨核细胞、凝血细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、原粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、小胶质细胞、粒细胞、单核细胞、破骨细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、T细胞或B细胞。

[0306] 如本文使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以达到期望的结果或对GVHD或自身免疫性疾病具有效果的量。用于任何特定的患者的特定的治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的紊乱和紊乱的严重程度;采用的特定组合物;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;施用时间;施用途径;采用的特定化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与采用的特定化合物组合或一致地使用的药物;以及本领域熟知的类似因素。剂量可以变化,并且可以以每日一次或更多次给药施用,持续一天或若干天。

[0307] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可以称为“VH”。轻链的可变结构域可以称为“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变部分,并且含有抗原结合位点(CDR)。

[0308] 如本文使用的,术语“载体”包括核酸载体,诸如质粒、DNA载体、质粒、RNA载体、病毒或其他合适的复制子。本文描述的表达载体可以包含多核苷酸序列以及例如用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞的基因组中的另外的序列元件。可以用于表达本发明的抗体和抗体片段的某些载体包括含有指导基因转录的调控序列(诸如启动子和增强子区域)的质粒。用于表达抗体和抗体片段的其他有用载体包含增强这些基因的翻译速率或改善由基因转录产生的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件可以包括,例如,5'和3'非翻译区和多腺苷酸化信号位点,以便指导表达载体上携带的基因的有效转录。本文描述的表达载体还可以含有编码用于选择含有这样的载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的实例包括编码对抗生素诸如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉

素和诺尔丝菌素(nourseothricin)的耐受性的基因。

[0309] 如本文使用的,术语“烷基(alkyl)”是指在链中具有例如从1个至20个碳原子的直链或支链烷基基团。烷基基团的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基等。

[0310] 如本文使用的,术语“亚烷基”是指直链或支链二价烷基基团。二价位置可以在烷基链内的相同或不同原子上。亚烷基的实例包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基等。

[0311] 如本文使用的,术语“杂烷基”是指在链中具有例如从1个至20个碳原子并且在链中还含有一个或多个杂原子(例如氧、氮或硫等)的直链或支链烷基基团。

[0312] 如本文使用的,术语“亚杂烷基(heteroalkylene)”是指直链或支链二价杂烷基基团。二价位置可以在杂烷基链内的相同或不同原子上。

[0313] 如本文使用的,术语“烯基”是指在链中具有例如从2个至20个碳原子的直链或支链烯基基团。烯基基团的实例包括乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、叔丁烯基、己烯基等。

[0314] 如本文使用的,术语“亚烯基”是指直链或支链二价烯基基团。二价位置可以在亚烯基链内的相同或不同原子上。亚烯基的实例包括亚乙烯基、亚丙烯基、亚异丙烯基、亚丁烯基等。

[0315] 如本文使用的,术语“杂烯基”是指在链中具有例如从2个至20个碳原子并且在链中还含有一个或多个杂原子(例如氧、氮或硫等)的直链或支链烯基基团。

[0316] 如本文使用的,术语“亚杂烯基(heteroalkenylene)”是指直链或支链二价杂烯基基团。二价位置可以在杂烯基链内的相同或不同原子上。

[0317] 如本文使用的,术语“炔基”是指在链中具有例如从2个至20个碳原子的直链或支链炔基基团。炔基基团的实例包括炔丙基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。

[0318] 如本文使用的,术语“亚炔基”是指直链或支链二价炔基基团。二价位置可以在炔基链内的相同或不同原子上。

[0319] 如本文使用的,术语“杂炔基”是指在链中具有例如从2个至20个碳原子并且在链中还含有一个或多个杂原子(例如氧、氮或硫等)的直链或支链炔基基团。

[0320] 如本文使用的,术语“亚杂炔基(heteroalkynylene)”是指直链或支链二价杂炔基基团。二价位置可以在杂炔基链内的相同或不同原子上。

[0321] 如本文使用的,术语“环烷基”是指饱和的并且具有例如从3个至12个碳环原子的单环、或稠合、桥连、或螺多环环结构。环烷基基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[3.1.0]己烷等。

[0322] 如本文使用的,术语“亚环烷基(cycloalkylene)”是指二价环烷基基团。二价位置可以在环结构内的相同或不同原子上。亚环烷基的实例包括环亚丙基、环亚丁基、环亚戊基、环亚己基等。

[0323] 如本文使用的,术语“杂环烷基”是指饱和的并且每个环结构具有例如从3个至12个选自碳原子和杂原子的环原子的单环、或稠合、桥连或螺多环环结构,杂原子选自例如氮、氧和硫等。环结构可以例如在碳、氮或硫环成员上含有一个或多个氧代基团。以举例的方式,杂环烷基的实例包括但不限于二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基(piperidyl))、四氢噻吩基、哌啶基(piperidinyl)、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、四氢咪唑基、四氢吡喃基、双四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、哌嗪基、奎

宁环基和吗啉基。

[0324] 如本文使用的,术语“亚杂环烷基(heterocycloalkylene)”是指二价杂环烷基基团。二价位置可以在环结构内的相同或不同原子上。

[0325] 如本文使用的,术语“芳基”是指含有例如从6个至19个碳原子的单环或多环芳香族环体系。芳基基团包括但不限于苯基、茛基、萘基等。

[0326] 如本文使用的,术语“亚芳基”是指二价芳基基团。二价位置可以在相同或不同的原子上。

[0327] 如本文使用的,术语“杂芳基”是指单环杂芳香族或双环或三环稠环杂芳香族基团,其中一个或多个环原子是杂原子,例如氮、氧或硫。杂芳基基团包括吡啶基、吡咯基、咪唑基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,3,4-三嗪基、1,2,3-三嗪基、苯并咪唑基、[2,3-二氢]苯并咪唑基、异苯并咪唑基、苯并噻吩基、苯并三唑基、异苯并噻吩基、吲哚基、异吲哚基、3H-吲哚基、苯并咪唑基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、喹啉基、酞嗪基、喹啉基、噌啉基、萘啶基、吡啶并[3,4-b]吡啶基、吡啶并[3,2-b]吡啶基、吡啶并[4,3-b]吡啶基、喹啉基、异喹啉基、四唑基、5,6,7,8-四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢异喹啉基、嘌呤基、喋啶基、呋唑基、咕吨基、苯并喹啉基等。

[0328] 如本文使用的,术语“亚杂芳基(heteroarylene)”是指二价杂芳基基团。二价位置可以在相同或不同的原子上。

[0329] 除非另外受单独取代基的定义限制,否则前述化学部分,诸如“烷基”、“亚烷基”、“杂烷基”、“亚杂烷基”、“烯基”、“亚烯基”、“杂烯基”、“亚杂烯基”、“炔基”、“亚炔基”、“杂炔基”、“亚杂炔基”、“环烷基”、“亚环烷基”、“杂环烷基”、“亚杂环烷基”、“芳基”、“亚芳基”、“杂芳基”和“亚杂芳基”基团可以任选地被例如从1个至5个选自由以下组成的组的取代基取代:烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、烷基芳基、烷基杂芳基、烷基环烷基、烷基杂环烷基、氨基、铵基、酰基、酰氧基、酰氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、脲基、氨基甲酸酯、芳基、杂芳基、亚磺酰基、磺酰基、烷氧基、硫烷基、卤素、羧基、三卤甲基、氰基、羟基、巯基、硝基等。典型的取代基包括但不限于, $-X$ 、 $-R$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-SH$ 、 $-SR$ 、 NH_2 、 $-NHR$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-N^+(R)_3$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NC(=O)H$ 、 $-NC(=O)R$ 、 $-C(=O)H$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)N(R)_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NH_2$ 、 $-S(=O)_2N(R)_2$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OH)_2$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)N(R)_2$ 、 $-C(=S)NH_2$ 、 $-C(=S)N(R)_2$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 和 $-C(=NR)N(R)_2$;其中每个X在每次出现时独立地选自F、Cl、Br和I;并且每个R在每次出现时独立地选自烷基、芳基、杂环烷基或杂芳基、保护基团和前药部分。在基团被描述为“任选地被取代的”的任何情况下,该基团可以在每次出现时独立地被上文取代基中的一种或更多种取代。取代可以包括其中邻近取代基已经经历闭环的情况,所述闭环诸如邻位官能取代基的闭环,以形成例如通过闭环形成的内酰胺、内酯、环酞、缩醛、半缩醛、硫代缩醛、缩醛胺和半缩醛胺,例如,以提供保护基团。

[0330] 将理解的是,根据上下文,某些基(radical)命名惯例可以包括一价基(mono-radical)或二价基(di-radical)。例如,在取代基需要两个附接至分子的剩余部分的点时,

应理解该取代基是二价基。例如,需要两个附接点的被确定为烷基的取代基包括二价基,诸如 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 等。其他基命名惯例清楚地指示,基是二价基,诸如“亚烷基”、“亚烯基”、“亚芳基”、“亚杂环烷基”等。

[0331] 在取代基被描绘为二价基(即,具有两个附接至分子的剩余部分的点)的任何情况下,应理解,除非另有指示,否则取代基可以以任何方向构型附接。

[0332] 详述

[0333] 本发明提供了通过施用能够与由造血细胞表达的抗原结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体来预防和/或治疗移植物抗宿主病(GVHD)和自身免疫性疾病的方法。在某些实施方案中,本文公开的方法和组合物可以用于预防或治疗同种异体移植物排斥,包括宿主抗移植物病(HvGD)。在同种异体移植诸如同种异体骨髓移植之后,施用抗CD134抗体或CD278抗体或ADC可以导致选择性耗竭对宿主有反应的外源性T细胞的群体。本发明部分地基于以下发现:能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体可以施用至患者,以便预防和治疗GVHD和自身免疫性疾病,诸如由造血干细胞移植疗法引起的那些,其中抗CD134或CD278的剂靶向并破坏免疫细胞,特别是同种异体反应性T细胞,使得移植物被患者接受。本文描述的方法和组合物是有益的,因为不需要一般的免疫抑制药物,使得患者的免疫系统通常保持完整,同时特异性靶向至少部分地导致排斥的细胞。

[0334] 施用抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体导致的GVHD的预防和治疗可以表现为多种临床症状(参见,例如,McDonald, Blood. 127:1544-1440, 2016和Flowers等, Blood. 125:606-615,其公开内容在其分别涉及但不限于急性和慢性GVHD的可测量临床特征时通过引用并入本文)。施用抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC导致的GVHD和自身免疫性疾病的预防和治疗可以表现为多种经验测量。例如,CD134+或CD278+阳性细胞的耗尽可以通过以下确定:通过本领域已知的荧光激活细胞分选(FACS)分析方法以分别测量移植后时间段期间外周血中的CD134+或CD278+白细胞计数,和/或通过测量骨髓抽吸样品中供体细胞对骨髓细胞的恢复。对接受者的外周血中的产生干扰素- γ (IFN- γ)的T细胞的计数可以评估抗CD134或抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC针对GVHD和自身免疫性疾病的效力。如由FACS确定的免疫细胞群体的改变可以指示GVHD或自身免疫性疾病。最后,取自患者的基因生物标志物和蛋白质组生物标志物也可以指示GVHD或自身免疫性疾病。

[0335] 以下章节提供了对可以施用至患有GVHD或自身免疫性疾病或处于GVHD或自身免疫性疾病风险的患者的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体,以及向患者施用这样的治疗剂的方法的描述。

[0336] 抗CD134抗体和配体

[0337] 本发明部分地基于以下发现:能够与CD134(也被称为OX40、OX40R或肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4))结合的抗体、其抗原结合片段、抗体-药物缀合物(ADC)或可溶性配体可以用作治疗剂,以预防和治疗患有GVHD或自身免疫性疾病或处于GVHD或自身免疫性疾病风险的患者的由造血干细胞引起的GVHD。此外,已经发现与CD134结合的配体,诸如人类CD134L,可以用作治疗剂以预防或治疗患有GVHD或处于GVHD风险的患者。这些配体(诸如可溶性人类CD134)可以与效应结构域(诸如Fc结构域)共价地结合,以便例如促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0338] 已经表明T细胞表达CD134,因为该抗原是共刺激分子的跨膜TNF受体超家族,并且在多种造血细胞上表达,并且促进T细胞活化,并且调控T细胞的增殖和存活(参见,例如Cannons等,J.Immunol.167:1313-1324,2001,该文献的公开内容在其涉及CD134被T细胞表达时通过引用并入本文)。抗体、其抗原结合片段和配体可以使用本领域已知的和本文描述的技术来鉴定,诸如通过免疫、计算建模技术和体外选择方法,诸如下文描述的噬菌体展示和基于细胞的展示平台。

[0339] 在一种实施方案中,可以用于本文描述的方法和组合物(包括ADC)的抗CD134抗体是鼠单克隆抗CD134抗体Ber-ACT35或含有对应于Ber-ACT35抗体的抗原结合区的抗CD134抗体。Ber-ACT35(由Biolegend销售,目录号350004;还参见Santa Cruz Biotechnology, Inc.目录号sc-20073(日期为2019年1月18日))。0x40(BER-Act35)是针对HuT 102T细胞产生的小鼠单克隆抗体。

[0340] 在一种实施方案中,抗CD134抗体包含含有抗CD134抗体ACT35的CDR1、CDR2和CDR3的重链,以及含有抗CD134抗体Ber-ACT35的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在另一种实施方案中,本文公开的组合物和方法中使用的抗CD134抗体是人源化Ber-ACT35抗体。

[0341] 在一种实施方案中,可以用于本文描述的方法和组合物(包括ADC)的抗CD134抗体是鼠单克隆抗CD134抗体7D6或含有对应于7D6抗体的抗原结合区的抗CD134抗体。7D6(由Thermo Fisher Scientific销售,目录号MA5-16548(日期为2019年1月17日);还参见Bio Rad, Inc.目录号MCA2568GA(日期为2019年1月18日))。7D6是针对CHO衍生的猫CD134-Fc融合蛋白产生的小鼠单克隆抗体。

[0342] 在一种实施方案中,抗CD134抗体包含含有抗CD134抗体7D6的CDR1、CDR2和CDR3的重链,以及含有抗CD134抗体7D6的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在另一种实施方案中,本文公开的组合物和方法中使用的抗CD134抗体是人源化7D6抗体。

[0343] 在一种实施方案中,可以用于本文描述的方法和组合物(包括ADC)的抗CD134抗体是大鼠单克隆抗CD134抗体443318或含有对应于443318抗体的抗原结合区的抗CD134抗体。443318(由Novus销售,目录号MAB3388-SP(日期为2019年1月17日);还参见Thermo Fisher Scientific.目录号MA5-23676(日期为2019年1月18日))。44318是针对小鼠骨髓瘤细胞系NS0衍生的重组人类OX40/TNFRSF4 Leu29-Ala216(登录号P43489)产生的大鼠单克隆抗体(IgG2A)。

[0344] 在一种实施方案中,抗CD134抗体包含含有抗CD134抗体443318的CDR1、CDR2和CDR3的重链,以及含有抗CD134抗体443318的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在另一种实施方案中,本文公开的组合物和方法中使用的抗CD134抗体是人源化443318抗体。

[0345] 在其他实施方案中,可以与本文描述的方法和组合物(包括ADC)联合使用的另外的抗CD134抗体及其抗原结合片段包括以下:MEDI6469(AgonOx,Medimmune)、PF-04518600(Pfizer)、vonlerizumab(也称为pogalizumab、MOXR0916、RG7888;Genentech)、KHK4083(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd.,Kirin Pharma)、BMS 986178(Bristol-Myers Squibb、Pfizer)、tavolimab(也称为MEDI0562、MEDI-0562、tavolixizumab;Medimmune)、INCAGN1949(也称为INCAGN01949;Agenus Inc、Incyte)、GBR 830(也称为VH6/VL9;Glenmark)、ATOR-1015(也称为ADC-1015;Alligator Bioscience)、GSK3174998(GlaxoSmithKline/MD Anderson Cancer Center)、MEDI6383(Medimmune)、MEDI1109

(Medimmune)、IBI101 (Innovent Biologics)、UCB取得专利的抗OX40 (patent anti-OX40) (UCB S.A.)、U.Texas取得专利的抗OX40 (也称为Hu222;University of Texas)、Crucell取得专利的抗OX40 (Crucell)、Janssen取得专利的抗OX40 (Bioceros B.V.、Janssen Biotech Inc)、Glaxo取得专利的抗OX40 (GlaxoSmithKline、Merck&Co., Inc.)、Spring Bioscience取得专利的抗OX40 (Roche (F.Hoffmann-La Roche Ltd)、Spring Bioscience Corp.)、Roche取得专利的抗OX40/FAP (Roche (F.Hoffmann-La Roche Ltd))、DingFu Biotarget取得专利的抗OX40 (DingFu Biotarget Co.Ltd.)、Cancer Research Tech取得专利的抗OX40 (Cancer Research Technology)、Agenus取得专利的抗GITR/OX40 (Agenus Inc、Ludwig Institute for Cancer Research、Sloan-Kettering Inst.for Cancer Res.)、Inhibrx取得专利的抗PD-L1/OX40 (Inhibrx LLC)、Alligator取得专利的抗OX40/X (Alligator Bioscience)、IGM Bio取得专利的抗OX40 (IGM Biosciences)、Sorrento取得专利的抗OX40 (Sorrento Therapeutics)、AbbVie取得专利的抗OX40 (AbbVie, Inc.)、Roche取得专利的抗OX40/Tenascin C (Roche (F.Hoffmann-La Roche Ltd))、Roche取得专利的抗OX40/EpCAM (Roche (F.Hoffmann-La Roche Ltd))以及Alligator取得专利的抗OX40/CTLA-4 (Alligator Bioscience)。

[0346] 可以与本文公开的方法和组合物一起使用(包括与本文描述的细胞毒素联合使用)的抗CD134抗体可以使用本领域已知的技术(例如,杂交瘤产生或噬菌体展示)来鉴定。杂交瘤可以使用鼠系统制备。用于免疫和随后分离脾细胞以便融合的方案是本领域已知的。用于杂交瘤产生的融合配偶体和程序也是已知的。人类抗CD134抗体也可以在**HuMAb-Mouse®**或XenoMouse™中产生。在制备抗CD134抗体时,将CD134抗原分离和/或纯化。CD134抗原可以是来自CD134的细胞外结构域的CD134的片段。对动物进行免疫可以通过本领域已知的任何方法进行。参见,例如,Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990。用于对动物诸如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马进行免疫的方法是本领域熟知的。参见,例如,Harlow和Lane, 同上,以及美国专利第5,994,619号。CD134抗原可以与佐剂一起施用以刺激免疫应答。本领域已知的佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。在用CD134抗原对动物进行免疫后,产生抗体的永生化细胞系由从免疫的动物分离的细胞制备。在免疫后,将动物处死,并且通过本领域已知的方法(例如,致癌基因转移、致癌病毒转导、暴露于致癌化合物或突变化合物、与永生化细胞例如骨髓瘤细胞融合、以及使肿瘤抑制基因失活)使淋巴结和/或脾B细胞永生化。参见,例如,Harlow和Lane, 同上。可以选择、克隆和进一步筛选杂交瘤的期望的特性,包括稳健的生长、高抗体产生和期望的抗体特性。

[0347] 抗CD134抗体可以由分离的核酸分子产生,该分离的核酸分子包含编码由本公开内容提供的CD134结合分子的氨基酸序列的核苷酸序列。由核苷酸序列编码的氨基酸序列可以是抗体的任何部分,诸如CDR,包含一个、两个或三个CDR的序列,重链的可变区,轻链的可变区,或者可以是全长重链或全长轻链。本公开内容的核酸可以是例如DNA或RNA,并且可以包含或不包含内含子序列。通常,核酸是cDNA分子。

[0348] 除了抗体和抗原结合片段之外,可溶性CD134配体诸如人类CD134配体可以在造血干细胞移植疗法之前根据本文描述的方法施用至患者以调节患者。例如,CD134配体诸如人类CD134配体可以与细胞毒素(例如,根据下文描述的或本领域已知的方法)或另一种效应

分子诸如Fc结构域缀合。用于与本文描述的方法一起使用的美登素细胞毒素包括,例如,人类CD134配体-IgG1 Fc缀合物、人类CD134配体-IgG2 Fc缀合物、人类CD134配体-IgG3 Fc缀合物、人类CD134配体-IgG4 Fc缀合物、人类CD134配体-IgA Fc缀合物、人类CD134配体-IgE Fc缀合物、人类CD134配体-IgM Fc缀合物和人类CD134配体-IgD Fc缀合物。

[0349] 用于与本文描述的组合物和方法联合使用的抗体和配体包括上文描述的那些抗体的变体,诸如含有或缺乏Fc结构域的抗体片段,以及本文描述的非人类抗体的人源化变体和含有本文描述的抗体、抗体片段或可溶性配体的一个或更多个或所有CDR或其等同区域的抗体样蛋白支架(例如¹⁰Fn3结构域)。前述抗体的示例性抗原结合片段包括双重可变免疫球蛋白结构域、单链Fv分子(scFv)、双抗体、三抗体、纳米抗体、抗体样蛋白支架、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子和串联二-scFv等。

[0350] 本发明的抗体可以通过引入另外的Fc突变工程化,以进一步调节抗体半衰期,所述另外的Fc突变诸如在例如(Dall'Acqua等(2006) J Biol Chem 281:23514-24)、(Zalevsky等(2010) Nat Biotechnol 28:157-9)、(Hinton等(2004) J Biol Chem 279:6213-6)、(Hinton等(2006) J Immunol 176:346-56)、(Shields等(2001) J Biol Chem 276:6591-604)、(Petkova等(2006) Int Immunol 18:1759-69)、(Datta-Mannan等(2007) Drug Metab Dispos 35:86-94)、(Vaccaro等(2005) Nat Biotechnol 23:1283-8)、(Yeung等(2010) Cancer Res 70:3269-77)和(Kim等(1999) Eur J Immunol 29:2819-25)中描述的并且包括位置250、252、253、254、256、257、307、376、380、428、434和435的那些。可以单独或组合进行的示例性突变是T250Q、M252Y、I253A、S254T、T256E、P257I、T307A、D376V、E380A、M428L、H433K、N434S、N434A、N434H、N434F、H435A和H435R突变。

[0351] 前述抗CD134抗体或其抗原结合片段可以用于本文阐述的本发明的多个方面,包括例如用于耗尽人类受试者中的CD134+细胞的方法中。前述抗CD134抗体或其抗原结合片段还可以与如本文描述的剂,例如细胞毒素,例如鹅膏蕈毒素缀合。

[0352] 抗CD278抗体

[0353] 本发明还部分地基于以下发现:能够与CD278(也被称为ICOS、AILIM或活化可诱导淋巴细胞免疫调节分子)结合的抗体、其抗原结合片段、抗体-药物缀合物(ADC)或可溶性配体可以用作治疗剂,以预防和治疗患有GVHD或自身免疫性疾病或处于GVHD或自身免疫性疾病风险的患者的由造血干细胞引起的GVHD。

[0354] CD278或ICOS(Inducible T-cell COstimulator,可诱导T细胞共刺激分子)是表达于活化的T细胞上的CD28超家族共刺激分子。CD278属于CD28和CTLA-4细胞表面受体家族,并且在细胞-细胞信号传导、免疫应答和细胞增殖调控中起重要作用。

[0355] 在一种实施方案中,抗CD278抗体包含含有抗CD278抗体DX29的CDR1、CDR2和CDR3的重链,以及含有抗CD134抗体DX29的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在另一种实施方案中,本文公开的组合物和方法中使用的抗CD278抗体是人源化DX29抗体。

[0356] 在一种实施方案中,可以用于本文描述的方法和组合物(包括ADC)的抗CD278抗体是鼠单克隆抗CD278抗体DX29或含有对应于DX29抗体的抗原结合区的抗CD278抗体。DX29(由BD Biosciences销售,目录号557801(日期为2019年1月17日);还参见Fisher Scientific.目录号BDB557802(日期为2019年1月18日))。DX29是针对活化的人类T细胞产生的小鼠单克隆抗体。

[0357] 在一种实施方案中,抗CD278抗体包含含有抗CD278抗体669238的CDR1、CDR2和CDR3的重链,以及含有抗CD134抗体669238的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在另一种实施方案中,本文公开的组合物和方法中使用的抗CD278抗体是人源化669238抗体。

[0358] 在一种实施方案中,可以用于本文描述的方法和组合物(包括ADC)的抗CD278抗体是鼠单克隆抗CD278抗体DX29或含有对应于669238抗体的抗原结合区的抗CD278抗体。669238(由Novus销售,目录号MAB69751-SP;还参见Fisher Scientific目录号MAB69752(日期为2019年1月18日))。669238是针对部分重组人类ICOS蛋白(氨基酸21-141)[UniProt Q9Y6W8]产生的小鼠单克隆抗体。

[0359] 在其他实施方案中,可以与本文描述的方法和组合物(包括ADC)联合使用的另外的抗CD278抗体及其抗原结合片段包括以下:MEDI-570(也称为JMab-136;Medimmune)、GSK3359609(也称为88-2、53-3、92-17、IgG4PE;GlaxoSmithKline、INSERM)、vopratelimab(也称为JTX-2011;Jounce Therapeutics)、XmAb23104(Xencor Inc.)、KY1044(Kymab Ltd.)、Japan Tobacco取得专利的抗ICOS(Japan Tobacco Inc)、Kymab取得专利的抗ICOS(Kymab Ltd.)以及BMS取得专利的抗ICOS(Bristol-Myers Squibb)。

[0360] 可以与本文描述的细胞毒素联合使用的抗CD278抗体可以使用本领域已知的技术(例如,杂交瘤产生)鉴定。杂交瘤可以使用鼠系统制备。用于免疫和随后分离脾细胞以便融合的方案是本领域已知的。用于杂交瘤产生的融合配偶体和程序也是已知的。人类抗CD278抗体也可以在HuMab-Mouse®或XenoMouse™中产生。在制备抗CD278抗体时,将CD278抗原分离和/或纯化。CD278抗原可以是来自CD278的细胞外结构域的CD278的片段。对动物进行免疫可以通过本领域已知的任何方法进行。参见,例如,Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Press,1990。用于对动物诸如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马进行免疫的方法是本领域熟知的。参见,例如,Harlow和Lane,同上,以及美国专利第5,994,619号。CD278抗原可以与佐剂一起施用以刺激免疫应答。本领域已知的佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。在用CD278抗原对动物进行免疫后,产生抗体的永生化细胞系由从免疫的动物分离的细胞制备。在免疫后,将动物处死,并且通过本领域已知的方法(例如,致癌基因转移、致癌病毒转导、暴露于致癌化合物或突变化合物、与永生化细胞例如骨髓瘤细胞融合、以及使肿瘤抑制基因失活)使淋巴结和/或脾B细胞永生化。参见,例如,Harlow和Lane,同上。可以选择、克隆和进一步筛选杂交瘤的期望的特性,包括稳健的生长、高抗体产生和期望的抗体特性。

[0361] 抗CD278抗体可以由分离的核酸分子产生,该分离的核酸分子包含编码由本公开内容提供的CD278结合分子的氨基酸序列的核苷酸序列。由核苷酸序列编码的氨基酸序列可以是抗体的任何部分,诸如CDR,包含一个、两个或三个CDR的序列,重链的可变区,轻链的可变区,或者可以是全长重链或全长轻链。本公开内容的核酸可以是例如DNA或RNA,并且可以包含或不包含内含子序列。通常,核酸是cDNA分子。

[0362] 除了抗体和抗原结合片段之外,可溶性CD278配体诸如人类CD278配体可以例如在造血干细胞移植疗法之后根据本文描述的方法施用至患者以预防同种异体移植排斥。例如,CD278配体诸如人类CD278配体可以与细胞毒素(例如,根据下文描述的或本领域已知的方法)或另一种效应分子诸如Fc结构域缀合。用于与本文描述的方法一起使用的美登素细胞毒素包括,例如,人类CD278配体-IgG1 Fc缀合物、人类CD278配体-IgG2 Fc缀合物、人类

CD278配体-IgG3 Fc缀合物、人类CD278配体-IgG4Fc缀合物、人类CD278配体-IgA Fc缀合物、人类CD278配体-IgE Fc缀合物、人类CD278配体-IgM Fc缀合物和人类CD278配体-IgD Fc缀合物。

[0363] 用于与本文描述的组合物和方法联合使用的抗体和配体包括上文描述的那些抗体的变体,诸如含有或缺乏Fc结构域的抗体片段,以及本文描述的非人类抗体的人源化变体和含有本文描述的抗体、抗体片段或可溶性配体的一个或更多个或所有CDR或其等同区域的抗体样蛋白支架(例如¹⁰Fn3结构域)。前述抗体的示例性抗原结合片段包括双重可变免疫球蛋白结构域、单链Fv分子(scFv)、双抗体、三抗体、纳米抗体、抗体样蛋白支架、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子和串联二-scFv等。

[0364] 本发明的抗体可以通过引入另外的Fc突变工程化,以进一步调节抗体半衰期,所述另外的Fc突变诸如在例如(Dall'Acqua等(2006) *J Biol Chem* 281:23514-24)、(Zalovsky等(2010) *Nat Biotechnol* 28:157-9)、(Hinton等(2004) *J Biol Chem* 279:6213-6)、(Hinton等(2006) *J Immunol* 176:346-56)、(Shields等(2001) *J Biol Chem* 276:6591-604)、(Petkova等(2006) *Int Immunol* 18:1759-69)、(Datta-Mannan等(2007) *Drug Metab Dispos* 35:86-94)、(Vaccaro等(2005) *Nat Biotechnol* 23:1283-8)、(Yeung等(2010) *Cancer Res* 70:3269-77)和(Kim等(1999) *Eur J Immunol* 29:2819-25)中描述的并且包括位置250、252、253、254、256、257、307、376、380、428、434和435的那些。可以单独或组合进行的示例性突变是T250Q、M252Y、I253A、S254T、T256E、P257I、T307A、D376V、E380A、M428L、H433K、N434S、N434A、N434H、N434F、H435A和H435R突变。

[0365] 前述抗CD278抗体或其抗原结合片段可以用于本文阐述的本发明的多个方面,包括例如用于耗尽人类受试者中的CD278+细胞的方法中。前述抗CD278抗体或其抗原结合片段还可以与如本文描述的剂,例如细胞毒素,例如鹅膏蕈毒素缀合。

[0366] 本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体或结合片段也可以包括改变抗体和/或片段的性质的修饰和/或突变,诸如,如本领域已知的增加半衰期、增加或减少ADCC等的那些修饰和/或突变。

[0367] 在一种实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体或其结合片段包含变体Fc区,其中所述变体Fc区包含相对于野生型Fc区的至少一个氨基酸修饰,使得所述分子具有改变的对Fc γ R的亲和力。通过结晶学研究已知Fc区内的某些氨基酸位置与Fc γ R进行直接接触。特别是氨基酸234-239(铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)和氨基酸327-332(F/G环)。(参见Sondermann等,2000*Nature*,406:267-273)。因此,本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体可以包含变体Fc区,该变体Fc区包含基于结构和晶体学分析与Fc γ R进行直接接触的至少一个残基的修饰。在一种实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体(或其片段)的Fc区在根据如Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD(1991)中的EU索引的氨基酸265处包含氨基酸取代,该文献通过引用明确并入本文。“如Kabat中的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的编号。EU索引或如Kabat中的EU索引或EU编号方案是指EU抗体的编号(Edelman等,1969, *Proc Natl Acad Sci USA* 63:78-85,在此通过引用整体并入本文)。在一种实施方案中,Fc区包含D265A突变。在一种实施方案中,Fc区包含D265C突变。在一些实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体(或其片段)的Fc区在根据如Kabat中的EU索引的氨基酸234处包含氨基酸

取代。在一种实施方案中, Fc区包含L234A突变。在一些实施方案中, 抗CD134抗体或抗CD278抗体(或其片段)的Fc区在根据如Kabat中的EU索引的氨基酸235处包含氨基酸取代。在一种实施方案中, Fc区包含L235A突变。在又另一种实施方案中, Fc区包含L234A和L235A突变。在另一种实施方案中, Fc区包含D265C、L234A和L235A突变。

[0368] 在某些方面, 变体IgG Fc结构域包含一个或更多个氨基酸取代, 导致与不包含一个或更多个氨基酸取代的野生型Fc结构域相比对Fc γ R和/或C1q的结合亲和力减少或消除。Fc结合相互作用对于多种效应物功能和下游信号转导事件至关重要, 包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。因此, 在某些方面, 包含修饰的Fc区(例如, 包含L234A、L235A和D265C突变)的抗体具有显著减少或消除的效应物功能。

[0369] 对Fc区的亲和力可以使用本领域已知的多种技术来确定, 例如但不限于平衡法(例如, 酶联免疫吸附测定 (ELISA); KinExA, Rathanaswami等Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; 或放射免疫测定 (RIA), 或通过表面等离子体共振测定或其他基于动力学的测定的机制(例如BIACORE™分析或Octet™分析 (forteBIO)) 以及其他方法, 诸如间接结合测定、竞争性结合测定、荧光共振能量转移 (FRET)、凝胶电泳和色谱法(例如凝胶过滤)。这些和其他方法可以利用一种或更多种被检查的组分上的标记和/或采用多种检测方法, 包括但不限于显色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可以见于Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), 其集中于抗体-免疫原相互作用。竞争性结合测定的一个实例是放射免疫测定, 包括在递增量的未标记的抗原的存在下, 将标记的抗原与感兴趣的抗体一起孵育, 并且检测与标记的抗原结合的抗体。感兴趣的抗体对特定抗原的亲和力和结合解离速率可以通过scatchard图分析从数据确定。与第二抗体的竞争也可以使用放射免疫测定来确定。在该情况下, 在递增的量的未标记的第二抗体的存在下, 将抗原与缀合至标记的化合物的感兴趣的抗体一起孵育。

[0370] 本文描述的抗体可以通过引入另外的Fc突变进一步工程化, 以进一步调节抗体半衰期, 所述另外的Fc突变诸如在例如 (Dall'Acqua等(2006) J Biol Chem 281:23514-24)、(Zalevsky等(2010) Nat Biotechnol 28:157-9)、(Hinton等(2004) J Biol Chem 279:6213-6)、(Hinton等(2006) J Immunol 176:346-56)、(Shields等(2001) J Biol Chem 276:6591-604)、(Petkova等(2006) Int Immunol 18:1759-69)、(Datta-Mannan等(2007) Drug Metab Dispos 35:86-94)、(Vaccaro等(2005) Nat Biotechnol 23:1283-8)、(Yeung等(2010) Cancer Res 70:3269-77) 和 (Kim等(1999) Eur J Immunol 29:2819-25) 中描述的并且包括位置250、252、253、254、256、257、307、376、380、428、434和435的那些。可以单独或组合进行的示例性突变是T250Q、M252Y、I253A、S254T、T256E、P257I、T307A、D376V、E380A、M428L、H433K、N434S、N434A、N434H、N434F、H435A和H435R突变。

[0371] 因此, 在一种实施方案中, Fc区包含引起半衰期缩短的突变。具有短半衰期的抗体在其中预期该抗体作为短寿命治疗剂起作用的某些情况下可能是有益的。在一种实施方案中, Fc区在位置435处(根据Kabat的EU索引)包含突变。在一种实施方案中, 突变是H435A突变。

[0372] 在一种实施方案中, 本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体具有等于或小于24小

时的半衰期、等于或小于22小时的半衰期、等于或小于20小时的半衰期、等于或小于18小时的半衰期、等于或小于16小时的半衰期、等于或小于14小时、等于或小于13小时、等于或小于12小时,或等于或小于11小时的半衰期。在一种实施方案中,抗体的半衰期为11小时至24小时;12小时至22小时;10小时至20小时;8小时至18小时;或14小时至24小时。

[0373] 在一些方面,Fc区包含两个或更多个突变,所述突变赋予减少的半衰期并极大地减少或完全消除抗体的效应物功能。在一些实施方案中,Fc区包含导致半衰期减少的突变以及可以与Fc γ R进行直接接触(例如,如基于结构和晶体学分析的)的至少一个残基的突变。在一种实施方案中,Fc区包含H435A突变、L234A突变和L235A突变。在一种实施方案中,Fc区包含H435A突变和D265C突变。在一种实施方案中,Fc区包含H435A突变、L234A突变、L235A突变和D265C突变。

[0374] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段通过抗体或其抗原结合片段的Fc结构域中的半胱氨酸残基的方式与细胞毒素(例如,鹅膏蕈毒素)缀合。在一些实施方案中,半胱氨酸残基通过抗体或其抗原结合片段的Fc结构域中的突变的方式引入。例如,半胱氨酸残基可以选自由Cys118、Cys239和Cys265组成的组。在一种实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体(或其片段)的Fc区在根据如Kabat中的EU索引的氨基酸265处包含氨基酸取代。在一种实施方案中,Fc区包含D265C突变。在一种实施方案中,Fc区包含D265C和H435A突变。在一种实施方案中,Fc区包含D265C、L234A和L235A突变。在一种实施方案中,Fc区包含D265C、L234A、L235A和H435A突变。

[0375] 在这些方面的一些实施方案中,半胱氨酸残基天然存在于抗体或其抗原结合片段的Fc结构域中。例如,Fc结构域可以是IgG Fc结构域,诸如人类IgG1 Fc结构域,并且半胱氨酸残基可以选自由以下组成的组:Cys261、Cys321、Cys367和Cys425。

[0376] 本文描述的变体Fc结构域根据组成它们的氨基酸修饰来定义。对于本文讨论的所有与Fc区相关的氨基酸取代,编号总是根据EU索引。因此,例如,D265C是相对于亲本Fc结构域在EU位置265处天冬氨酸(D)被半胱氨酸(C)取代的Fc变体。同样,例如D265C/L234A/L235A定义了相对于亲本Fc结构域在EU位置265(D至C)、234(L至A)和235(L至A)处具有取代的变体Fc。变体也可以根据其在突变的EU氨基酸位置的最终氨基酸组成来指定。例如,L234A/L235A突变体可以称为LALA。应注意,取代的提供顺序是任意的。

[0377] 鉴定抗体的方法

[0378] 用于高通量筛选能够与CD134或CD278结合的分子的抗体、抗体片段和配体的文库的方法可以用于鉴定剂并使剂亲和力成熟,所述剂例如可用于预防和治疗GVHD或自身免疫性疾病。这样的方法包括本领域已知的体外展示技术,诸如噬菌体展示、细菌展示、酵母展示、哺乳动物细胞展示、核糖体展示、mRNA展示和cDNA展示等。使用噬菌体展示来分离与生物相关分子结合的抗体、抗原结合片段或配体已经在例如Felici等,Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183,1995;Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45,1997;和Hoogenboom等, Immunotechnology 4:1-20,1998中进行了综述,其中每一篇文献的公开内容在其涉及体外展示技术时通过引用并入本文。已经构建了随机化组合肽文库以选择与细胞表面抗原结合的多肽,如Kay, Perspect. Drug Discovery Des. 2:251-268,1995和Kay等, Mol. Divers. 1:139-140,1996中描述的,其中每一篇文献的公开内容在其涉及抗原结合分子的发现时通过引用并入本文。蛋白质,诸如多聚蛋白质,已经成功地经噬菌体展示为功能

分子(参见,例如,EP 0349578;EP 4527839;和EP 0589877,以及Chiswell和McCafferty, Trends Biotechnol.10:80-841992,其中每一篇文献的公开内容在其涉及体外展示技术用于抗原结合分子的发现的用途时通过引用并入本文)。此外,功能抗体片段,诸如Fab和scFv片段,已经以体外展示形式表达(参见,例如,McCafferty等,Nature 348:552-554,1990;Barbas等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982,1991;和Clackson等,Nature 352:624-628,1991,其中每一篇文献的公开内容在其涉及用于发现抗原结合分子的体外展示平台时通过引用并入本文)。人类抗CD134抗体或人类抗CD278抗体也可以例如在HuMAb-Mouse®或XenoMouse™中产生。这些技术尤其可以用于鉴定和改善与CD134或CD278结合的抗体、抗体片段和配体的亲和力,所述抗体、抗体片段和配体继而可以用于耗尽患者中的造血细胞。

[0379] 除了体外展示技术之外,计算建模技术可以用于计算机模拟地(in silico)设计和鉴定抗CD134抗体或抗CD278抗体、抗体片段和配体,例如,使用US 2013/0288373中描述的程序,该专利申请的公开内容在其涉及用于鉴定抗CD134抗体或抗CD278抗体的分子建模方法时并入本文。例如,使用计算建模技术,本领域技术人员可以计算机模拟地筛选抗体、抗体片段和配体的文库,而筛选出能够分别与CD134或CD278上的特异性表位诸如CD134或CD278的细胞外表位结合分子。

[0380] 可以使用另外的技术来鉴定与细胞(例如,T细胞)表面上的CD134或CD278结合的并且例如通过受体介导的胞吞作用被细胞内化的抗体、其抗原结合片段及其配体。例如,上文描述的体外展示技术可以被修改以筛选与造血干细胞表面上的CD134或CD278结合并且随后被内化的抗体、其抗原结合片段和配体。噬菌体展示代表可以与这种筛选范式联合使用的一种这样的技术。为了鉴定与CD134或CD278结合并随后被造血干细胞内化的抗CD134抗体或抗CD278抗体、其片段和配体,本领域技术人员可以使用Williams等,Leukemia 19:1432-1438,2005中描述的噬菌体展示技术,该文献的公开内容通过引用以其整体并入本文。例如,使用本领域已知的诱变方法,可以产生重组噬菌体文库,该文库编码抗体、抗体片段诸如scFv片段、Fab片段、双抗体、三抗体和¹⁰Fn3结构域等,或者(例如,在一个或多个或所有CDR或其等同区域中,或者抗体或抗体片段中)含有随机化氨基酸盒的配体。抗体或抗体片段的框架区、铰链区、Fc结构域和其他区域可以被设计成例如藉由具有人类种系抗体序列或相对于人类种系抗体仅表现出微小变化的序列使得它们在人类中无免疫原性。

[0381] 使用本文描述的或本领域已知的噬菌体展示技术,包含与噬菌体颗粒共价结合的随机化抗体、抗体片段或配体的噬菌体文库可以与CD134或CD278抗原一起孵育,例如,通过首先将噬菌体文库与封闭剂(诸如,例如,乳蛋白、牛血清白蛋白和/或IgG)一起孵育以便去除编码表现出非特异性蛋白结合的抗体、其片段或配体的噬菌体以及编码与Fc结构域结合的抗体或其片段的噬菌体,并且然后将噬菌体文库与为CD134+或CD278+的造血干细胞的群体一起孵育。噬菌体文库可以与造血干细胞一起孵育足够的时间(例如,在4°C 30分钟至6小时,诸如在4°C 1小时)以允许CD134特异性抗体、其抗原结合片段或配体与细胞表面CD134或CD278结合并随后被造血干细胞内化。含有未表现出对CD134或CD278的足够亲和力以至于不允许与造血干细胞结合并被造血干细胞内化的抗体、其片段或配体的噬菌体,可以随后通过例如用冷(4°C) 0.1M甘氨酸缓冲液在pH 2.8洗涤细胞去除。与已经被造血干细胞内化的抗体、其片段或配体结合的噬菌体可以通过例如裂解细胞和从细胞培养基中回收内化的

噬菌体来鉴定。然后可以例如,通过使用本领域已知的方法在 $2\times$ YT培养基中将细菌细胞与回收的噬菌体一起孵育,在细菌细胞中扩增噬菌体。然后从该培养基回收的噬菌体可以例如,通过确定插入噬菌体基因组内的编码抗体、其片段或配体的基因(一个或多个)的核酸序列来表征。编码的抗体、其片段或配体可以随后通过化学合成(例如抗体片段,诸如scFv片段,或者CD134配体或CD278配体)或通过重组表达(例如,全长抗体)从头制备。

[0382] 制备的抗体、其片段或配体的内化能力可以例如使用本领域已知的放射性核素内化测定评估。例如,使用本文描述的或本领域已知的体外展示技术鉴定的抗CD134抗体或抗CD278抗体、其片段或配体可以通过掺入放射性同位素来官能化,所述放射性同位素诸如 ^{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 或 ^{225}Ac 。例如,放射性卤素,诸如 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{77}Br 、 ^{122}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I 、 ^{211}At ,可以使用含有亲电卤素试剂的珠,诸如聚苯乙烯珠(例如碘化珠,Thermo Fisher Scientific, Inc., Cambridge, MA),掺入抗体、其片段或配体中。放射性标记的抗体、其片段、ADC或配体可以与造血干细胞一起孵育足够的时间(例如,在 4°C 30分钟至6小时,诸如在 4°C 1小时)以允许内化。然后可以洗涤细胞以去除未内化的抗体或其片段(例如,使用冷(4°C) 0.1M甘氨酸缓冲液在pH 2.8)。内化的抗体、其片段或配体可以通过检测所得造血干细胞的发出的辐射(例如 γ 辐射)、与回收的洗涤缓冲液的发出的辐射(例如 γ 辐射)进行比较来鉴定。前述内化测定也可以用于表征ADC。

[0383] 抗体可以使用重组方法和组合物来产生,例如,如在美国专利第4,816,567号中描述的。在一种实施方案中,提供了编码本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体的分离的核酸。这样的核酸可以编码含有抗体的VL的氨基酸序列和/或含有抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在另一种实施方案中,提供了包含这样的核酸的一种或更多种载体(例如,表达载体)。在另一种实施方案中,提供了包含这样的核酸的宿主细胞。在一种这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用以下转化):(1)包含编码含有抗体的VL的氨基酸序列和含有抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码含有抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码含有抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一种实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一种实施方案中,提供了制备抗CD134抗体或抗CD278抗体的方法,其中该方法包括在适于表达抗体的条件下培养包含编码如上文提供的抗体的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0384] 为了重组产生抗CD134抗体或抗CD278抗体,将编码例如如上文描述的抗体的核酸分离,并且插入一个或多个载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。这样的核酸可以容易地使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)分离和测序。

[0385] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适的宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应物功能时。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利第5,648,237号、第5,789,199号和第5,840,523号。(还参见Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, 该文献描述了抗体片段在大肠杆菌(E.coli.)中的表达)。在表达后,抗体可以从细菌细胞浆(paste)以可溶性级分(fraction)

分离,并且可以被进一步纯化。

[0386] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人类胚胎肾系(293或293细胞,如例如在Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977)中描述的);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(mouse sertoli cell)(TM4细胞,如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中描述的);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人类宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;布法罗(buffalo)大鼠肝细胞(BRL 3A);人类肺细胞(W138);人类肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如在Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中描述的;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于某些适用于抗体产生的哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,N.J.),pp.255-268(2003)。

[0387] 用于与本文描述的组合物和方法一起使用的抗CD134抗体或抗CD278抗体的体外演化的示例性方法是噬菌体展示。噬菌体展示文库可以通过在抗体的CDR或抗体样支架的类似区域(例如,¹⁰Fn3结构域的BC、CD和DE环)的编码序列内进行经设计的系列突变或变异来产生。其中引入这些突变的编码抗体的模板序列可以是,例如,天然人类种系序列。这些突变可以使用本领域已知的标准诱变技术进行。因此,除了一个或更多个氨基酸变异之外,每个突变体序列编码对应于模板的抗体。逆转录病毒和噬菌体展示载体可以使用本领域已知的标准载体构建技术来工程化。P3噬菌体展示载体连同相容的蛋白质表达载体可以用于产生用于抗体多样化的噬菌体展示载体。

[0388] 经诱变的DNA提供了序列多样性,并且每个转化体噬菌体展示了由该DNA编码的初始模板氨基酸序列的一个变体,导致噬菌体群体(文库)展示了大量不同但结构上相关的氨基酸序列。由于良好定义的抗体高变区结构,预期在噬菌体展示筛选中引入的氨基酸变异会改变结合肽或结构域的结合性质,而不会显著改变其总体分子结构。

[0389] 在典型的筛选中,噬菌体文库可以与CD134或CD278或其表位接触并允许与CD134或CD278或其表位结合。为了促进结合物(binder)和非结合物的分离,将靶固定在固体支持物上是方便的。具有CD134结合部分或CD278结合部分的噬菌体可以与固体支持物上的靶形成复合物,而非结合噬菌体保留在溶液中并可以用过量的缓冲液洗涤掉。然后,结合的噬菌体可以通过将缓冲液改变至极端pH(pH 2或pH 10)、改变缓冲液的离子强度、添加变性剂或其他已知方法从靶释放。

[0390] 然后,回收的噬菌体可以通过细菌细胞的感染扩增,并且筛选过程可以用现在耗尽了非结合抗体并且富集了与CD134或CD278结合的抗体的新的池(pool)来重复。即使回收少量结合噬菌体也足以扩增噬菌体用于随后的迭代筛选。经过几轮选择后,从结合池中的选择的噬菌体克隆获得的编码抗体或其抗原结合片段的基因序列通过常规方法确定,从而揭示赋予噬菌体与靶的结合亲和力的肽序列。在淘选(panning)过程期间,群体的序列多样性随着每一轮的选择减少,直到期望的肽结合抗体保留下来。序列可以汇合(converge)于少数相关的抗体或其抗原结合片段。在每一轮的选择中回收的噬菌体的数量的增加指示了

文库在筛选中已经发生汇合。

[0391] 与CD134或CD278结合的非人类抗体可以例如根据以下程序被人源化。共有人类抗体重链序列和轻链序列是本领域已知的(参见例如“VBASE”人类种系序列数据库;Kabat等 Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH PublicationNo.91-3242,1991;Tomlinson等, J.Mol.Biol.227:776-798,1992;和Cox等,Eur.J.Immunol.24:827-836,1994,其中每一篇文献的公开内容在其涉及共有人类抗体重链序列和轻链序列时通过引用并入本文)。使用已建立的程序,本领域技术人员可以鉴定共有抗体序列的可变结构域框架残基和CDR(例如,通过序列比对)。人们可以用与CD134或CD278结合的非人类抗体的一个或更多个相应CDR取代共有人类抗体的重链和/或轻链可变结构域的一个或更多个CDR,以便产生人源化抗体。

[0392] 为了产生人源化抗体,人们可以重组地表达编码上文的共有序列的多核苷酸,其中一个或更多个可变区CDR已经被与CD134或CD278结合的非人类抗体的一个或更多个可变区CDR序列替换。因为抗体对CD134或CD278的亲和力主要由CDR序列决定,预期所得的人源化抗体对CD134或CD278表现出的亲和力与人源化抗体所源自的非人类抗体的亲和力大致相同。确定抗体对靶抗原的亲和力的方法包括,例如,本文描述的和在本领域已知的基于ELISA的技术,以及表面等离子体共振、荧光各向异性和等温滴定量热法等。

[0393] 抗体-药物缀合物(ADC)

[0394] 细胞毒素

[0395] 本文描述的抗体、其抗原结合片段和配体(例如,识别和结合CD134或CD278的抗体、其抗原结合片段和可溶性配体)可以与细胞毒素缀合(或连接),所述细胞毒素诸如微管结合剂(例如,美登素或美登木素生物碱)、鹅膏蕈毒素、假单胞菌外毒素A、deBouganin、或白喉毒素、诸如 α -鹅膏蕈碱、皂草素、奥瑞他汀(auristatin)、葱环霉素、加利车霉素(calicheamicin)、伊立替康(irinotecan)、SN-38、倍癌霉素(duocarmycin)、吡咯并苯二氮卓类、吡咯并苯二氮卓类二聚体、吲哚并苯二氮卓类和吲哚并苯二氮卓类二聚体,或其变体,或本文描述的或本领域已知的另一种细胞毒性化合物,以便在施用至患者后促进造血细胞诸如宿主反应性T细胞的耗尽。在一些实施方案中,细胞毒性分子与内化抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段或可溶性配体缀合,使得在细胞摄取抗体、其片段或可溶性配体后,细胞毒素可以接近其胞内靶并且介导造血细胞死亡。适于与本文描述的组合物和方法一起使用的另外的细胞毒素包括DNA嵌入剂(例如葱环霉素)、能够破坏有丝分裂纺锤体装置的剂(例如长春花生物碱、美登素、美登木素生物碱及其衍生物)、RNA聚合酶抑制剂(例如鹅膏蕈毒素诸如 α -鹅膏蕈碱及其衍生物)、能够破坏蛋白质生物合成的剂(例如表现出rRNAN-糖苷酶活性的剂,诸如皂草素和蓖麻毒蛋白A链),以及本领域已知的其他细胞毒素。

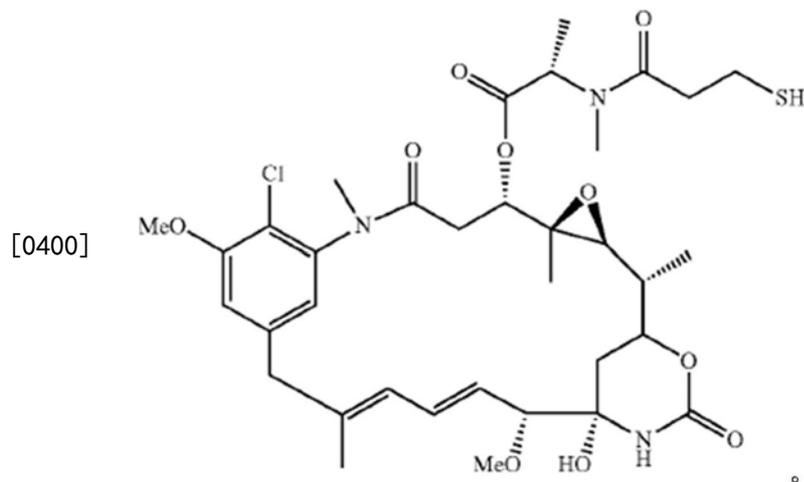
[0396] 美登木素生物碱

[0397] 抗CD134抗体或抗CD278抗体可以与为微管结合剂的细胞毒素缀合。在一些实施方案中,细胞毒素是美登素、美登木素生物碱或美登木素生物碱类似物。美登木素生物碱是抑制微管蛋白聚合的微管结合剂。合适的美登木素生物碱的实例包括美登醇的酯、合成美登醇以及美登醇类似物和衍生物。包括抑制微管形成并且对哺乳动物细胞是高度毒性的任何

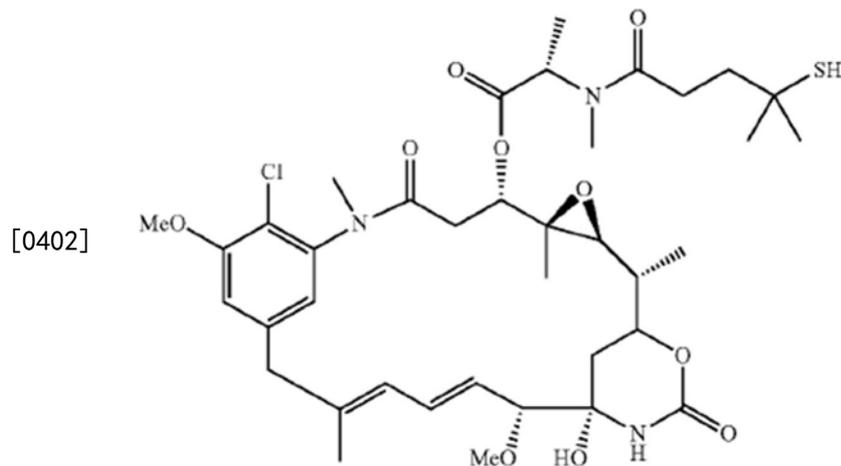
药物,如美登木素生物碱、美登醇以及美登醇类似物和衍生物。

[0398] 合适的美登醇的酯的实例包括具有修饰的芳香族环的那些和在其他位置具有修饰的那些。这样的合适的美登木素生物碱在美国专利第4,137,230号;第4,151,042号;第4,248,870号;第4,256,746号;第4,260,608号;第4,265,814号;第4,294,757号;第4,307,016号;第4,308,268号;第4,308,269号;第4,309,428号;第4,313,946号;第4,315,929号;第4,317,821号;第4,322,348号;第4,331,598号;第4,361,650号;第4,362,663号;第4,364,866号;第4,424,219号;第4,450,254号;第4,322,348号;第4,362,663号;第4,371,533号;第5,208,020号;第5,416,064号;第5,475,092号;第5,585,499号;第5,846,545号;第6,333,410号;第7,276,497号和第7,473,796号,所述美国专利中的每一篇的公开内容在其涉及美登木素生物碱及其衍生物时通过引用并入本文。

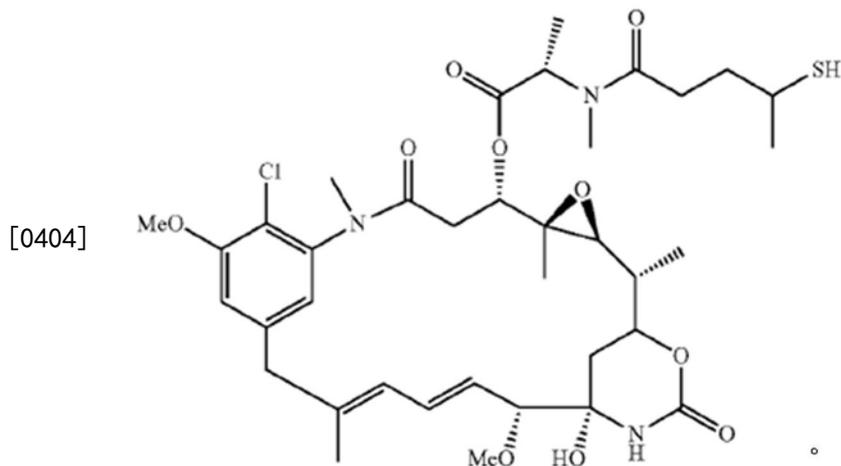
[0399] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物利用被正式称为 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧丙基)-美登素的含硫醇的美登素生物碱(DM1)作为细胞毒性剂。DM1由以下结构式表示:



[0401] 在另一种实施方案中,本发明的缀合物利用含硫醇的美登木素生物碱 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(例如,DM4)作为细胞毒性剂。DM4由以下结构式表示:



[0403] 另一种包含含有空间位阻的硫醇键的侧链的美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(被称为DM3),由以下结构式表示:



[0405] 在美国专利第5,208,020号和第7,276,497号中教导的美登木素生物碱中的每一种也可以用于本发明的缀合物。在这方面,5,208,020和7,276,697的全部公开内容通过引用并入本文。

[0406] 美登木素生物碱上的许多位置可以用作与连接部分化学连接的位置。例如,具有羟基基团的C-3位、用羟甲基修饰的C-14位、用羟基修饰的C-15位和具有羟基基团的C-20位都预期是有用的。在一些实施方案中,C-3位用作与连接部分化学连接的位置,并且在一些特定的实施方案中,美登醇的C-3位用作与连接部分化学连接的位置。

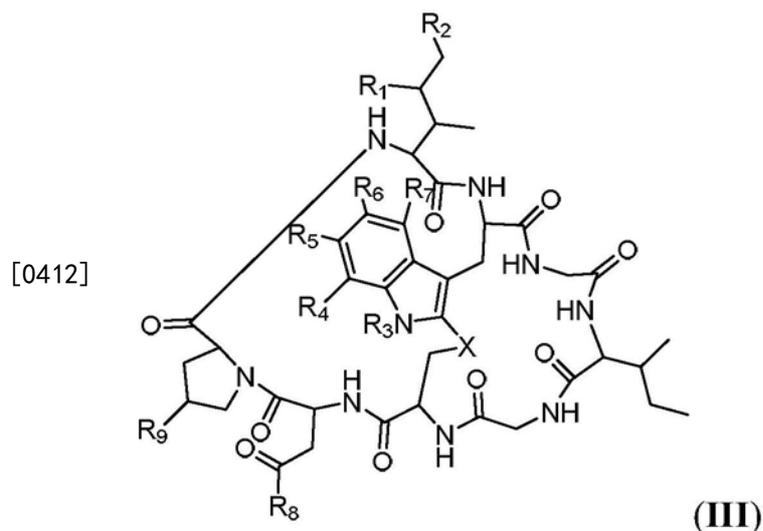
[0407] 本发明还包括美登木素生物碱和缀合物的多种异构体和混合物。本发明的某些化合物和缀合物可以以多种立体异构形式、对映体形式和非对映体形式存在。美国专利第5,208,020号、第5,416,064号、第6,333,410号、第6,441,163号、第6,716,821号和第7,368,565号中提供了关于产生这样的抗体-美登木素缀合物的若干描述,所述美国专利中的每一篇通过引用以其整体并入本文。

[0408] 可以通过分光光度法测量252nm和280nm处的吸光度的比率确定每个抗体分子结合的美登木素生物碱分子的治疗有效数目。每个抗体分子缀合的平均3个至4个美登木素生物碱分子可以增强靶细胞的细胞毒性,而不会不利地影响抗体的功能或溶解度,尽管毒素/抗体的一个分子相比于单独的抗体可以增强细胞毒性。美登木素生物碱分子/抗体或其抗原结合片段或可溶性配体的平均数目可以是例如1-10或2-5。

[0409] 鹅膏蕈毒素

[0410] 在一些实施方案中,抗体-药物缀合物的细胞毒素是RNA聚合酶抑制剂。在一些实施方案中,RNA聚合酶抑制剂是鹅膏蕈毒素或其衍生物。在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈毒素或其衍生物,诸如 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸或鹅膏蕈无毒环肽原。多种天然存在的鹅膏蕈毒素的结构由式(III)、(IIIA)和(IIIB)表示,并且在例如Zanotti等,Int.J.Peptide ProteinRes.30,1987,450-459中公开。

[0411] 在某些实施方案中,可与本文描述的组合物和方法联合使用的鹅膏蕈毒素包括根据式(III)、(IIIA)和(IIIB)的化合物(例如, α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素、鹅膏素酰胺、鹅膏蕈无毒环肽、鹅膏蕈无毒环肽酸、鹅膏蕈无毒环肽原或其衍生物)。式(III)如下:



[0413] 其中R₁是H、OH或OR_A；

[0414] R₂是H、OH或OR_B；

[0415] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0416] R₃是H或R_D；

[0417] R₄是H、OH、OR_D或R_D；

[0418] R₅是H、OH、OR_D或R_D；

[0419] R₆是H、OH、OR_D或R_D；

[0420] R₇是H、OH、OR_D或R_D；

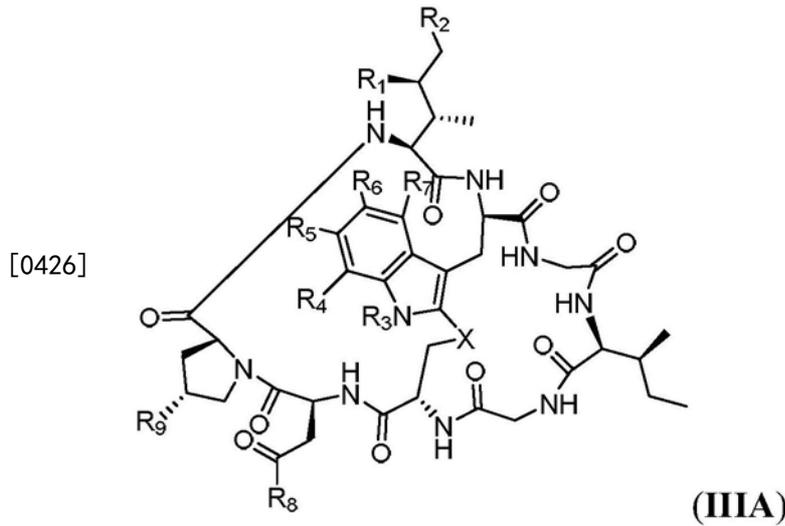
[0421] R₈是OH、NH₂或OR_D；

[0422] R₉是H、OH或OR_D；

[0423] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；并且

[0424] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基。

[0425] 例如,在一种实施方案中,可与本文描述的组合物和方法联合使用的鹅膏蕈毒素包括下文根据式(IIIA)的化合物:



[0427] 其中R₁是H、OH或OR_A；

[0428] R₂是H、OH或OR_B；

[0429] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0430] R₃是H或R_D；

[0431] R₄是H、OH、OR_D或R_D；

[0432] R₅是H、OH、OR_D或R_D；

[0433] R₆是H、OH、OR_D或R_D；

[0434] R₇是H、OH、OR_D或R_D；

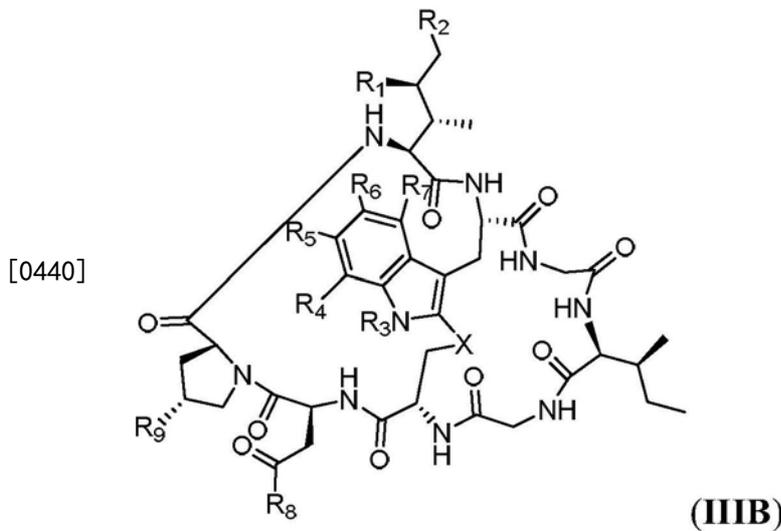
[0435] R₈是OH、NH₂或OR_D；

[0436] R₉是H、OH或OR_D；

[0437] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；并且

[0438] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基。

[0439] 在一种实施方案中,可与本文描述的组合物和方法联合使用的鹅膏蕈毒素还包括下文根据式(IIIB)的化合物:



[0441] 其中R₁是H、OH或OR_A；

[0442] R₂是H、OH或OR_B；

[0443] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0444] R₃是H或R_D；

[0445] R₄是H、OH、OR_D或R_D；

[0446] R₅是H、OH、OR_D或R_D；

[0447] R₆是H、OH、OR_D或R_D；

[0448] R₇是H、OH、OR_D或R_D；

[0449] R₈是OH、NH₂或OR_D；

[0450] R₉是H、OH或OR_D；

[0451] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；并且

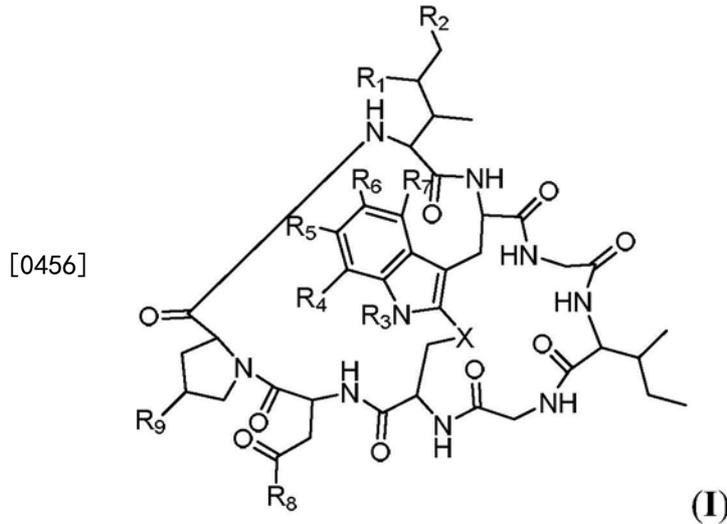
[0452] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基。

[0453] 在一种实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈碱。

[0454] 如本文描述的,鹅膏蕈毒素可以例如通过接头部分与抗体或其抗原结合片段缀合。在下文标题为“用于化学缀合的接头”的章节中以及在表1中描述了鹅膏蕈毒素缀合的示例性方法和可用于这样的方法的接头。可用于与根据本文描述的组合物和方法的抗CD134抗体或抗CD278抗体或抗原结合片段缀合的示例性含接头的鹅膏蕈毒素以本文列举的结构式(I)、(IA)、(IB)、(II)、(IIA)和(IIB)示出。

[0455] 例如,本文描述的抗体或抗原结合片段可以与鹅膏蕈毒素结合,以便形成由式Ab-Z-L-Am表示的缀合物,其中Ab是抗体或其抗原结合片段,L是接头,Z是化学部分,并且Am是鹅膏蕈毒素。鹅膏蕈毒素或其衍生物上的许多位置可以用作与连接部分L共价键合并因此与抗体或其抗原结合片段共价键合的位置。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素-接头缀合物

Am-L-Z由式(I)表示



[0457] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

[0458] R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

[0459] R_A和R_B与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

[0460] R₃是H、R_C或R_D;

[0461] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0462] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0463] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0464] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0465] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

[0466] R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

[0467] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

[0468] R_C是-L-Z;

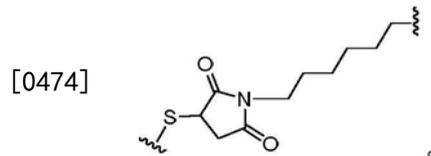
[0469] R_D是任选地被取代的C₁-C₆烷基、任选地被取代的C₁-C₆杂烷基、任选地被取代的C₂-C₆烯基、任选地被取代的C₂-C₆杂烯基、任选地被取代的C₂-C₆炔基、任选地被取代的C₂-C₆杂炔基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

[0470] L是接头,诸如任选地被取代的C₁-C₆亚烷基、任选地被取代的C₁-C₆亚杂烷基、任选地被取代的C₂-C₆亚烯基、任选地被取代的C₂-C₆亚杂烯基、任选地被取代的C₂-C₆亚炔基、任选地被取代的C₂-C₆亚杂炔基、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;并且

[0471] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段或可溶性配体内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分。

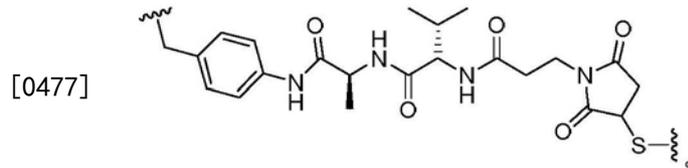
[0472] 在一些实施方案中,细胞毒素包含一个R_C取代基。

[0473] 在一些实施方案中,接头包含-(CH)_{2n}-单元,其中n是从2-6的整数。在一些实施方案中,接头包括-((CH₂)_n),其中n是6。在一些实施方案中,L-Z是

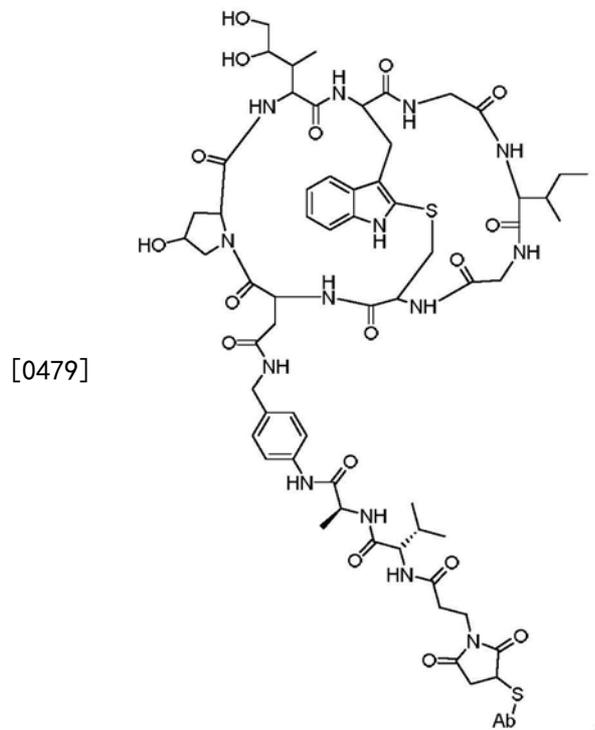


[0475] 其中S是硫原子,表示存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基(例如,来自半胱氨酸残基的-SH基团)。

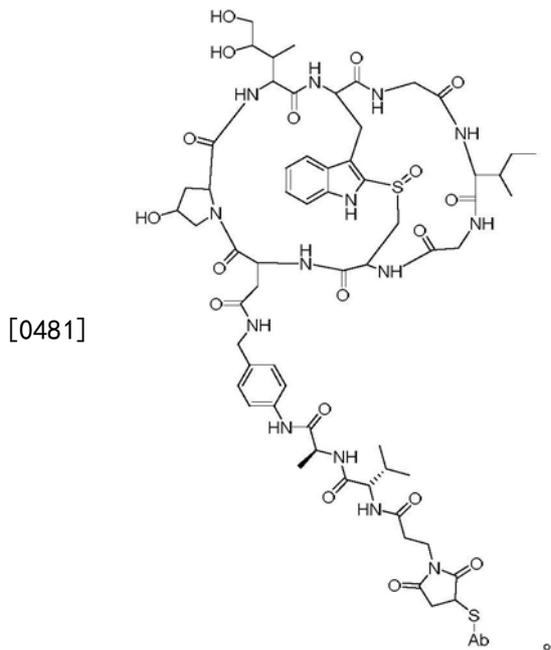
[0476] 在一些实施方案中,L-Z是



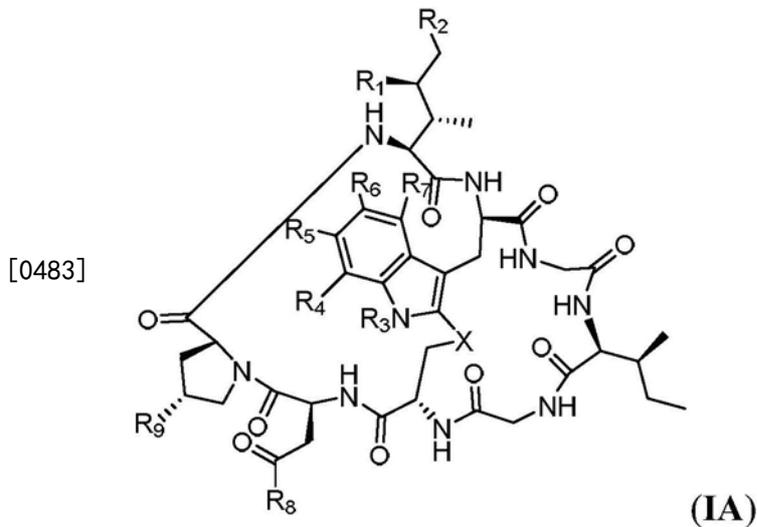
[0478] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是



[0480] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是



[0482] 在一些实施方案中,Am-L-Z由式 (IA) 表示



[0484] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C;

[0485] R₂是H、OH、OR_B或OR_C;

[0486] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团;

[0487] R₃是H、R_C或R_D;

[0488] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0489] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0490] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0491] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D;

[0492] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D;

[0493] R₉是H、OH、OR_C或OR_D;

[0494] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-;

[0495] R_C 是-L-Z;

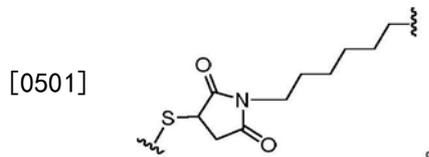
[0496] R_D 是任选地被取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地被取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地被取代的 C_2 - C_6 烯基、任选地被取代的 C_2 - C_6 杂烯基、任选地被取代的 C_2 - C_6 炔基、任选地被取代的 C_2 - C_6 杂炔基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

[0497] L是任选地被取代的 C_1 - C_6 亚烷基、任选地被取代的 C_1 - C_6 亚杂烷基、任选地被取代的 C_2 - C_6 亚烯基、任选地被取代的 C_2 - C_6 亚杂烯基、任选地被取代的 C_2 - C_6 亚炔基、任选地被取代的 C_2 - C_6 亚杂炔基、任选地被取代的环亚烷基、任选地被取代的杂环亚烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合;

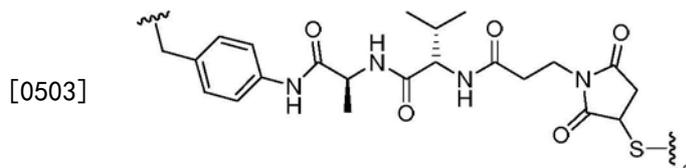
[0498] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段或可溶性配体内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分;并且

[0499] 其中Am包含一个 R_C 取代基。

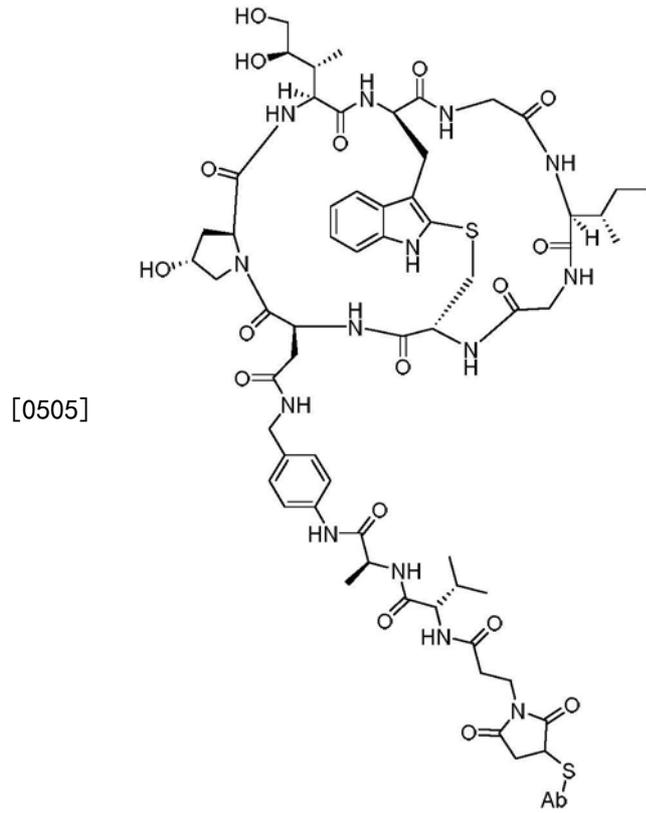
[0500] 在一些实施方案中,接头包括-((CH₂)_n),其中n是6。在一些实施方案中,L-Z是



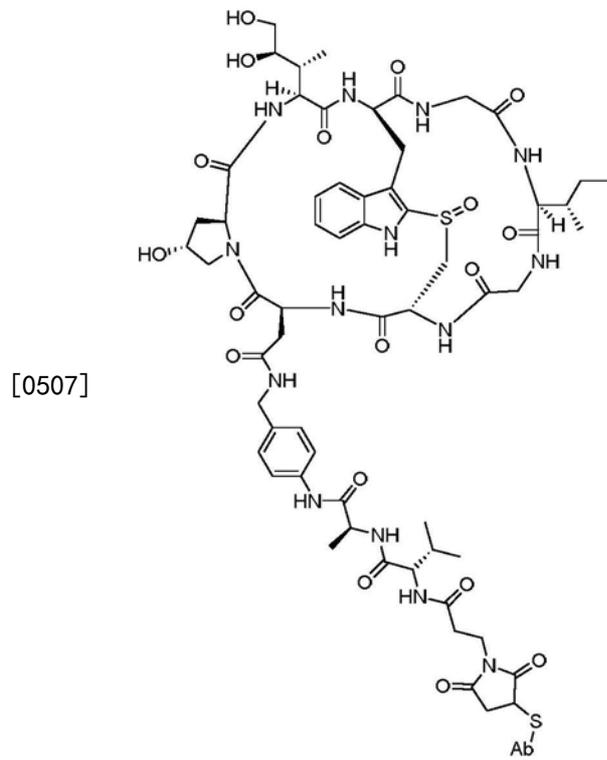
[0502] 在一些实施方案中,L-Z是



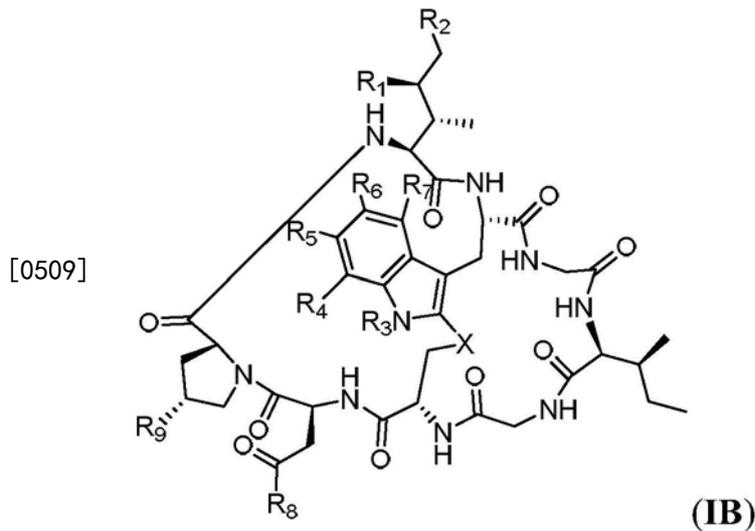
[0504] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是



[0506] 在一些实施方案中, Am-L-Z-Ab是



[0508] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式 (IB) 表示



[0510] 其中R₁是H、OH、OR_A或OR_C；

[0511] R₂是H、OH、OR_B或OR_C；

[0512] R_A和R_B在存在时与它们所结合的氧原子一起组合形成任选地被取代的5元杂环烷基基团；

[0513] R₃是H、R_C或R_D；

[0514] R₄是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0515] R₅是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0516] R₆是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0517] R₇是H、OH、OR_C、OR_D、R_C或R_D；

[0518] R₈是OH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C或NR_CR_D；

[0519] R₉是H、OH、OR_C或OR_D；

[0520] X是-S-、-S(O)-或-SO₂-；

[0521] R_C是-L-Z；

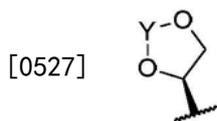
[0522] R_D是任选地被取代的烷基(例如C₁-C₆烷基)、任选地被取代的杂烷基(例如C₁-C₆杂烷基)、任选地被取代的烯基(例如C₂-C₆烯基)、任选地被取代的杂烯基(例如C₂-C₆杂烯基)、任选地被取代的炔基(例如C₂-C₆炔基)、任选地被取代的杂炔基(例如C₂-C₆杂炔基)、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0523] L是接头,诸如任选地被取代的亚烷基(例如C₁-C₆亚烷基)、任选地被取代的亚杂烷基(C₁-C₆亚杂烷基)、任选地被取代的亚烯基(例如C₂-C₆亚烯基)、任选地被取代的亚杂烯基(例如C₂-C₆亚杂烯基)、任选地被取代的亚炔基(例如C₂-C₆亚炔基)、任选地被取代的亚杂炔基(例如C₂-C₆亚杂炔基)、任选地被取代的亚环烷基、任选地被取代的亚杂环烷基、任选地被取代的亚芳基、任选地被取代的亚杂芳基、二肽、-(C=O)-、肽或其组合；

[0524] Z是由存在于L上的反应性取代基和存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成的化学部分；并且

[0525] 其中Am包含正好一个R_C取代基。

[0526] 在一些实施方案中,R_A和R_B与它们所结合的氧原子一起组合形成



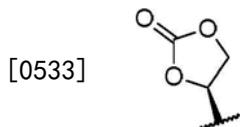
[0528] 其中Y是 $-(C=O)-$ 、 $-(C=S)-$ 、 $-(C=NR_E)-$ 或 $-(CR_E R_{E'})-$ ；并且

[0529] R_E 和 $R_{E'}$ 各自独立地是任选地被取代的 C_1-C_6 亚烷基- R_C 、任选地被取代的 C_1-C_6 亚杂烷基- R_C 、任选地被取代的 C_2-C_6 亚烯基- R_C 、任选地被取代的 C_2-C_6 亚杂烯基- R_C 、任选地被取代的 C_2-C_6 亚炔基- R_C 、任选地被取代的 C_2-C_6 亚杂炔基- R_C 、任选地被取代的亚环烷基- R_C 、任选地被取代的亚杂环烷基- R_C 、任选地被取代的亚芳基- R_C 或任选地被取代的亚杂芳基- R_C 。

[0530] 在一些实施方案中， $Am-L-Z$ 由式(I)、(IA)或(IB)表示，其中 R_1 是H、OH、 OR_A 或 OR_C ；

[0531] R_2 是H、OH、 OR_B 或 OR_C ；

[0532] R_A 和 R_B 与它们所结合的氧原子一起组合形成：



[0534] R_3 是H或 R_C ；

[0535] R_4 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0536] R_5 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0537] R_6 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0538] R_7 是H、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 或 R_D ；

[0539] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 或 NHR_C ；

[0540] R_9 是H或OH；并且

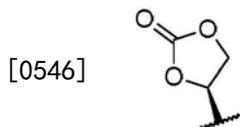
[0541] 其中 R_C 和 R_D 各自如上文所定义。

[0542] 在一些实施方案中， $Am-L-Z$ 由式(I)、(IA)或(IB)表示，

[0543] 其中 R_1 是H、OH、 OR_A 或 OR_C ；

[0544] R_2 是H、OH、 OR_B 或 OR_C ；

[0545] R_A 和 R_B 与它们所结合的氧原子一起组合形成：



[0547] R_3 是H或 R_C ；

[0548] R_4 和 R_5 各自独立地是H、OH、 OR_C 、 R_C 或 OR_D ；

[0549] R_6 和 R_7 各自是H；

[0550] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 或 NHR_C ；

[0551] R_9 是H或OH；并且

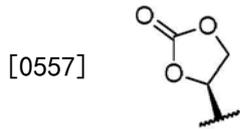
[0552] 其中X和 R_C 如上文所定义。

[0553] 在一些实施方案中， $Am-L-Z$ 由式(I)、(IA)或(IB)表示，

[0554] 其中 R_1 是H、OH或 OR_A ；

[0555] R_2 是H、OH或 OR_B ；

[0556] R_A 和 R_B 与它们所结合的氧原子一起组合形成：



[0558] R_3 、 R_4 、 R_6 和 R_7 各自是H;

[0559] R_5 是 OR_C ;

[0560] R_8 是OH或 NH_2 ;

[0561] R_9 是H或OH; 并且

[0562] 其中 R_C 如上文所定义。这样的鹅膏蕈毒素缀合物例如在美国专利申请公布第2016/0002298号中描述, 该美国专利申请公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0563] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,

[0564] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是H或OH;

[0565] R_3 是 R_C ;

[0566] R_4 、 R_6 和 R_7 各自是H;

[0567] R_5 是H、OH或 OC_1-C_6 烷基;

[0568] R_8 是OH或 NH_2 ;

[0569] R_9 是H或OH; 并且

[0570] 其中 R_C 如上文所定义。这样的鹅膏蕈毒素缀合物例如在美国专利申请公布第2014/0294865号中描述, 该美国专利申请公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0571] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示,

[0572] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是H或OH;

[0573] R_3 、 R_6 和 R_7 各自是H;

[0574] R_4 和 R_5 各自独立地是H、OH、 OR_C 或 R_C ;

[0575] R_8 是OH或 NH_2 ;

[0576] R_9 是H或OH; 并且

[0577] 其中 R_C 如上文所定义。这样的鹅膏蕈毒素缀合物例如在美国专利申请公布第2015/0218220号中描述, 该美国专利申请公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0578] 在一些实施方案中, Am-L-Z由式(I)、(IA)或(IB)表示, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是H或OH;

[0579] R_3 、 R_6 和 R_7 各自是H;

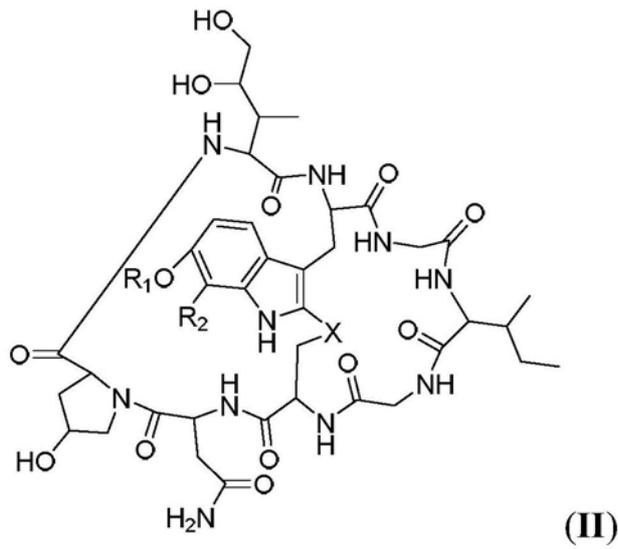
[0580] R_4 和 R_5 各自独立地是H或OH;

[0581] R_8 是OH、 NH_2 、 OR_C 或 NHR_C ;

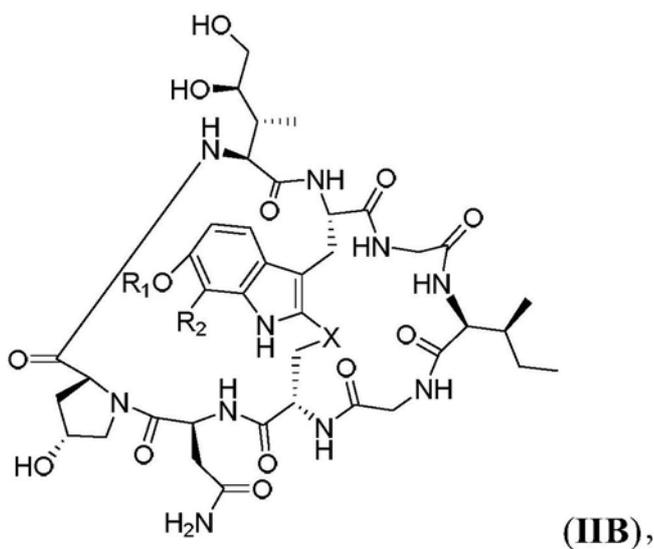
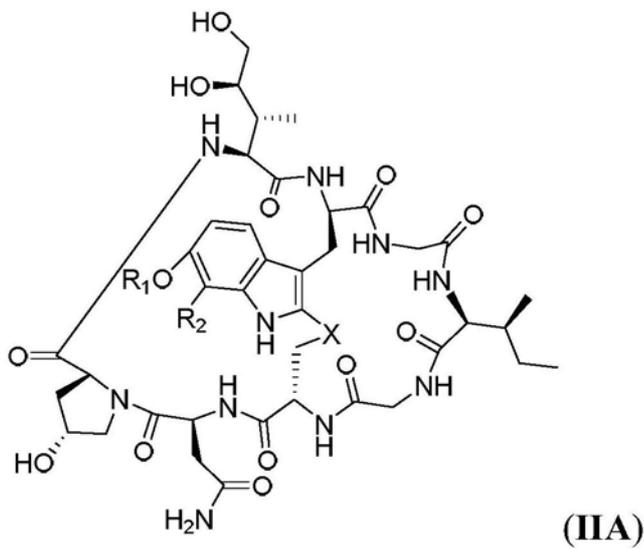
[0582] R_9 是H或OH; 并且

[0583] 其中 R_C 如上文所定义。这样的鹅膏蕈毒素缀合物例如在美国专利第9,233,173号和第9,399,681号中描述, 所述美国专利中的每一个的公开内容通过引用以其整体并入本文。可以用于与根据本文描述的组合物和方法的抗体或其抗原结合片段缀合的另外的鹅膏蕈毒素例如在WO 2016/142049; WO 2016/071856; 和WO 2017/046658中描述, 其中每一个的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0584] 在一些实施方案中, 鹅膏蕈毒素-接头缀合物Am-L-Z由式(II)、式(IIA)或式(IIB)表示,



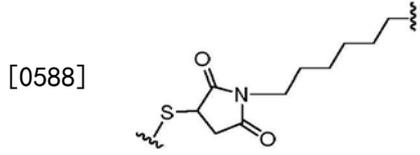
[0585]



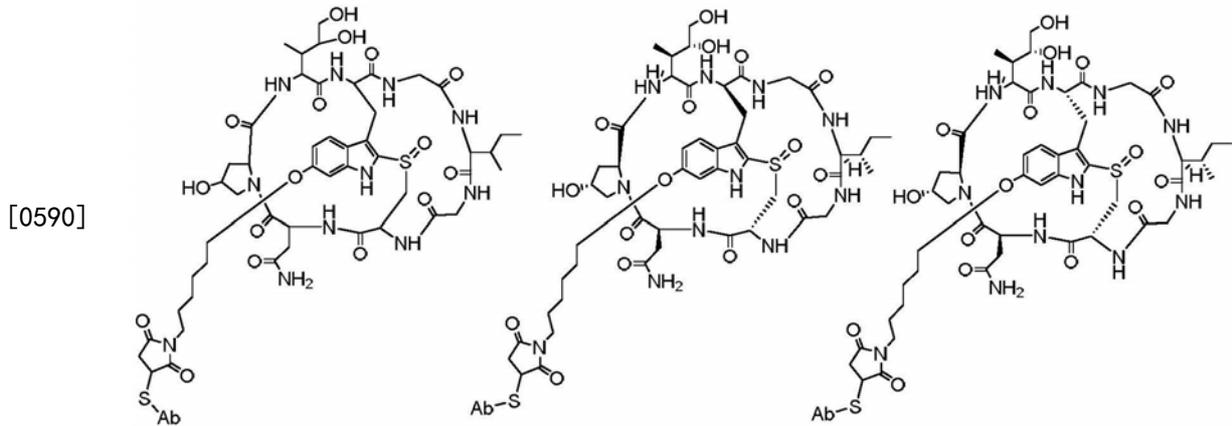
[0586] 其中X是S、S₀或S₀₂;R₁是H或通过化学部分Z与抗体或其抗原结合片段共价结合的接头,所述化学部分Z由存在于接头上的反应性取代基和存在于抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成;并且R₂是H或通过化学部分Z与抗体或其抗原结合片

段共价结合的接头,所述化学部分Z由存在于接头上的反应性取代基和存在于抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基之间的偶联反应形成;其中当R₁是H时,R₂是接头,并且当R₂是H时,R₁是接头。

[0587] 在一些实施方案中,接头包括-(CH₂)_n-单元,其中n是从2-6的整数。在一些实施方案中,R₁是接头并且R₂是H,并且接头和化学部分(一起为L-Z)是

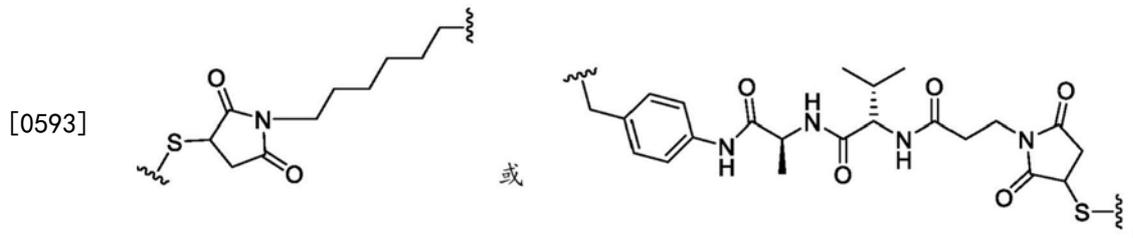


[0589] 在一些实施方案中,Am-L-Z-Ab是以下中的一种:



[0591] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈毒素。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素是式(III)、(IIIA)或(IIIB)的化合物。在一些实施方案中,式(III)、(IIIA)或(IIIB)的鹅膏蕈毒素经由接头L附接至抗CD134抗体或抗CD278抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如,R¹-R⁹中的任何一个)附接至式(III)、(IIIA)或(IIIB)的鹅膏蕈毒素,以提供式(I)、(IA)、(IB)、(II)、(IIA)或(II B)的鹅膏蕈毒素-接头缀合物。在一些实施方案中,接头被附接在位置R¹处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R²处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R³处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁴处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁵处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁶处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁷处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁸处。在一些实施方案中,接头被附接在位置R⁹处。在一些实施方案中,鹅膏蕈毒素是α-鹅膏蕈碱。在一些实施方案中,接头包括肼、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括-(C=O)(CH₂)_n-单元,其中n是从1-6的整数。

[0592] 在一些实施方案中,接头包括-(CH₂)_n-单元,其中n是从2-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH₂)_n-。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH₂)_n-。在一些实施方案中,接头L和化学部分Z(合在一起称为L-Z)是



[0594] 在一些实施方案中,细胞毒素是 β -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中, β -鹅膏蕈碱是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的 β -鹅膏蕈碱经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1 - R^9 中的任何一个)附接至式IV的 β -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0595] 在一些实施方案中,细胞毒素是 γ -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中, γ -鹅膏蕈碱是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的 γ -鹅膏蕈碱经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1 - R^9 中的任何一个)附接至式IV的 γ -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0596] 在一些实施方案中,细胞毒素是 ϵ -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中, ϵ -鹅膏蕈碱是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的 ϵ -鹅膏蕈碱经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1 - R^9 中的任何一个)附接至式IV的 ϵ -鹅膏蕈碱。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化

物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0597] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏素。在一些实施方案中,鹅膏素是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的鹅膏素经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1-R^9 中的任何一个)附接至式IV的鹅膏素。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0598] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏素酰胺。在一些实施方案中,鹅膏素酰胺是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的鹅膏素酰胺经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1-R^9 中的任何一个)附接至式IV的鹅膏素酰胺。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0599] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈无毒环肽。在一些实施方案中,鹅膏蕈无毒环肽是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的鹅膏蕈无毒环肽经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1-R^9 中的任何一个)附接至式IV的鹅膏蕈无毒环肽。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案

中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0600] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈无毒环肽酸。在一些实施方案中,鹅膏蕈无毒环肽酸是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的鹅膏蕈无毒环肽酸经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1-R^9 中的任何一个)附接至式IV的鹅膏蕈无毒环肽酸。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0601] 在一些实施方案中,细胞毒素是鹅膏蕈无毒环肽原。在一些实施方案中,鹅膏蕈无毒环肽原是式IV的化合物。在一些实施方案中,式IV的鹅膏蕈无毒环肽原经由接头L被附接至抗CD134抗体。接头L可以在若干可能位置中的任何一个位置(例如, R^1-R^9 中的任何一个)附接至式IV的鹅膏蕈无毒环肽原。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^1 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^2 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^3 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^4 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^5 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^6 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^7 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^8 处。在一些实施方案中,接头被附接在位置 R^9 处。在一些实施方案中,接头包括胍、二硫化物、硫醚或二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是-PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是-PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

[0602] 用于与本文描述的组合物和方法一起使用的抗体、抗原结合片段和配体可以使用本领域已知的或本文描述的缀合技术与鹅膏蕈毒素诸如 α -鹅膏蕈碱或其变体缀合。例如,识别CD134或CD278并与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段和配体可以与 α -鹅膏蕈碱或其变体缀合,如US 2015/0218220中描述的,US 2015/0218220的公开内容在其涉及例如鹅膏蕈毒素诸如 α -鹅膏蕈碱及其变体以及可以用于共价缀合的共价接头时通过引用并入本文。制备鹅膏蕈毒素的合成方法在例如美国专利第9,676,702号中描述,该美国专利在关于其中公开的合成方法时通过引用并入本文。

[0603] 可与本文描述的方法联合使用的示例性抗体-药物缀合物和配体-药物缀合物可

以通过抗体、其抗原结合片段或配体与缀合至接头的鹅膏蕈毒素反应而形成,所述接头含有适于与抗体、其抗原结合片段或配体上的反应性残基反应的取代基。与接头(含有适于与抗体、其抗原结合片段或配体上的反应性残基反应的取代基)缀合的鹅膏蕈毒素包括但不限于以下:7'C-(4-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷羰基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(3-羧基丙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(2-溴乙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(4-(马来酰亚胺基)丁酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(马来酰亚胺基)乙酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(3-(马来酰亚胺基)丙酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(4-(马来酰亚胺基)丁酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(3-((6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(3-((6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(3-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(3-((6-((4-(马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(4-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)丁酰胺基)乙基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(4-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)丁酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(6-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)己酰胺基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;(R)-7'C-((3-((6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;(S)-7'C-((3-((6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-(2-(6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)-S-甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)-R-甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏

蕈毒素;7'C-((3-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)-S-甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)-R-甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((3-羧基丙酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((6-((6-((马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((马来酰亚胺基)乙酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((3-((马来酰亚胺基)丙酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((4-((马来酰亚胺基)丁酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((2-((马来酰亚胺基)乙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((4-((马来酰亚胺基)丁酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-((马来酰亚胺基)己酰胺基)甲基)氮杂环丁烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((2-((6-((马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)氮杂环丁烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)甲基)氮杂环丁烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((2-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)乙基)氮杂环丁烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((2-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)氮杂环丁烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(((2-((6-((马来酰亚胺基)-N-甲基己酰胺基)乙基)(甲基)氨基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(((4-((6-((马来酰亚胺基)-N-甲基己酰胺基)丁基)(甲基)氨基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((2-((2-((6-((马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)氮杂环丙烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((2-((2-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)乙基)氮杂环丙烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((6-((6-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)己酰胺基)己酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((1-((氨基氧基)-2-氧代-6,9,12,15-四氧杂-3-氮杂十七烷-17-酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)乙酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((3-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)丙酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((4-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)丁酰基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((6-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)己酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((2-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)乙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((4-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)丁酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((20-((氨基氧基)-4,19-二氧代-6,9,12,15-四氧杂-3,18-二氮杂二十烷基(diazaicosyl))哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(((2-((6-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)-N-甲基己酰胺基)乙基)(甲基)氨基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(((4-((6-((2-((氨基氧基)乙酰胺基)-N-甲基己酰胺基)丁基)(甲基)氨基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)甲基)吡咯烷-1-基)-S-甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((3-((6-((4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己酰胺基)-R-甲基)吡咯烷-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((2-((溴乙酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((2-((溴乙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;7'C-((4-((2-((3-((吡啶-2-基二硫烷基)丙酰胺基)乙基)哌啶-1-基)甲基)-鹅膏蕈毒素;6'O-((6-((6-((马来酰亚胺基)己酰胺基)己基)-鹅膏蕈毒素;6'O-((5-((4-((马来酰亚胺基)甲

基)环己烷甲酰胺基)戊基)-鹅膏蕈毒素;6'0-(2-((6-(马来酰亚胺基)己基)氧基)-2-氧代乙基)-鹅膏蕈毒素;6'0-((6-(马来酰亚胺基)己基)氨基甲酰胺基)-鹅膏蕈毒素;6'0-((6-(4-((马来酰亚胺基)甲基)环己烷甲酰胺基)己基)氨基甲酰胺基)-鹅膏蕈毒素;6'0-(6-(2-溴乙酰胺基)己基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(6-(叠氮基)己酰胺基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(己-5-炔酰基氨基)哌啶-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;7'C-(4-(2-(6-(6-(马来酰亚胺基)己酰胺基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-基)-鹅膏蕈毒素;6'0-(6-(6-(11,12-二脱氢-5,6-二氢-二苯并[b,f]氮杂环辛(azocin)-5-基)-6-氧代己酰胺基)己基)-鹅膏蕈毒素;6'0-(6-(己-5-炔酰基氨基)己基)-鹅膏蕈毒素;6'0-(6-(2-(氨基氧基)乙酰基酰胺基)己基)-鹅膏蕈毒素;6'0-((6-氨基氧基)己基)-鹅膏蕈毒素;和6'0-(6-(2-碘乙酰胺基)己基)-鹅膏蕈毒素。前述接头以及可与本文描述的组合物和方法联合使用的其他接头在例如美国专利申请公布第2015/0218220号中描述,该美国专利申请公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0604] 用于在治疗GVHD或自身免疫性疾病中使用的可以缀合至识别并结合CD134或CD278的抗体、其抗原结合片段和配体的另外的细胞毒素包括,但不限于以下:5-乙炔基尿嘧啶、阿比特龙(abiraterone)、酰基富烯(acylfulvene)、阿的培诺(adecypenol)、阿多来新(adozelesin)、阿地白介素、六甲蜜胺、氨莫司汀(ambamustine)、艾美多(amidox)、氨磷汀、氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)、氨柔比星(amrubicin)、安吡啶、阿那格雷(anagrelide)、阿那曲唑(anastrozole)、穿心莲内酯、血管生成抑制剂、安雷利克斯(antarelix)、抗背部化形态发生蛋白-1、抗雄激素、前列腺癌、抗雌激素、抗新普拉通(antineoplaston)、反义寡核苷酸、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolinglycinate)、凋亡基因调节剂、凋亡调节剂、脱嘌呤核酸、奥沙那宁(asulacrine)、阿他美坦(atamestane)、阿莫司汀(atrimustine)、阿新司坦汀1(axinastatin1)、阿新司坦汀2(axinastatin2)、阿新司坦汀3(axinastatin3)、阿扎司琼(azasetron)、阿扎托新(azatoxin)、重氮酪氨酸、巴卡亭III衍生物(baccatin III derivative)、班兰诺(balanol)、巴马司他(batimastat)、BCR/ABL拮抗剂、苯并二氢吡啶类(benzochlorins)、苯甲酰基星形孢菌素(benzoylstaurosporine)、β内酰胺衍生物、β-阿立辛(beta-alethine)、β可来霉素B(betaclamycin B)、桦木酸、bFGF抑制剂、比卡鲁胺(bicalutamide)、比生群(bisantrene)、双氮丙啶基精胺(bisaziridinylspermine)、双奈法德(bisnafide)、bistratene A、比折来新(bizelesin)、比锐来特(breflate)、博来霉素A2、博来霉素B2、溴匹立明(bropirimine)、布多替钛(budotitane)、丁硫氨酸亚砷亚胺、卡泊三醇、钙磷酸蛋白C(calphostin C)、喜树碱衍生物(例如,10-羟基-喜树碱)、卡培他滨(capecitabine)、甲酰胺-氨基-三唑(carboxamide-amino-triazole)、羧酰胺基三唑(carboxyamidotriazole)、卡折来新(carzelesin)、酪蛋白激酶抑制剂、栗树精胺、杀菌肽B(cecropin B)、西曲瑞克(cetorelix)、二氢吡吩、氯喹啉磺胺、西卡前列素(cicaprost)、顺式吡啶、克拉屈滨(cladribine)、氯米芬及其类似物、克霉唑(collismycin A、collismycin B)、考布他汀A4(combretastatin A4)、考布他汀类似物、康纳京尼(conagenin)、卡那贝西汀816(crambescidin 816)、克里斯托(crisnatol)、念珠藻环肽8、念珠藻环肽A衍生物、卡拉新A(curacin A)、环戊噻酮、环普兰姆(cycloplatam)、西匹霉素(cypemycin)、十八烷基磷酸阿糖胞苷(cytarabine ocfosfate)、溶细胞因子、磷酸己烷雌酚(cytostatin)、达昔单抗

(dacliximab)、地西他滨(decitabine)、脱氢膜海鞘素B、2'脱氧柯福霉素(2' deoxycoformycin) (DCF)、地洛瑞林(deslorelin)、右异环磷酰胺(dexifosfamide)、右雷佐生(dexrazoxane)、右维拉帕米(dexverapamil)、地吡醌(diaziquone)、膜海鞘素B、地多西(didox)、二乙基降精胺(diethylnorspermine)、二氢-5-氮杂胞苷(dihydro-5-azacytidine)、二氢紫杉醇(dihydrotaxol)、二恶霉素(dioxamycin)、二苯基螺莫司汀(diphenyl spiromustine)、圆皮海绵内酯、二十二烷醇(docosanol)、多拉司琼(dolasetron)、去氧氟尿苷、屈洛昔芬(droloxidene)、屈大麻酚、倍癌霉素SA(duocarmycin SA)、依布硒啉(ebselen)、依考莫司汀(ecomustine)、依地福新(edelfosine)、依决洛单抗(edrecolomab)、依氟鸟氨酸(eflornithine)、榄香烯、乙嘧替氟、埃博霉素、epithilones、爱普列特(epristeride)、雌莫司汀及其类似物、依托泊苷(etoposide)、依托泊苷4'-磷酸酯(也被称为etopofos)、依西美坦(exemestane)、法倔唑(dadrozole)、法扎拉滨(dazarabine)、维甲酰酚胺(fenretinide)、非格司亭(filgrastim)、非那雄胺(finasteride)、夫拉平度(flavopiridol)、氟卓斯汀(flezelastine)、夫斯特隆(flusterone)、氟达拉滨(fludarabine)、盐酸氟道诺霉素(fluorodaunorunicin hydrochloride)、福酚美克(forfenimex)、福美司坦(formestane)、福司曲星(fostriecin)、福莫司汀(fotemustine)、钆德卟啉(gadolinium texaphyrin)、硝酸镓、加洛他滨(galocitabine)、加尼瑞克(ganirelix)、明胶酶抑制剂、吉西他滨(gemcitabine)、谷胱甘肽抑制剂、和普苏姆(hepsulfam)、高三尖杉酯碱(homoharringtonine) (HHT)、金丝桃素、伊班膦酸、艾多昔芬(idoxifene)、伊决孟酮(idramantone)、伊莫福新(ilmofosine)、伊洛马司他(ilomastat)、咪唑吡啶酮(imidazoacridones)、咪喹莫特(imiquimod)、免疫刺激肽、碘苄胍、碘多柔比星、甘薯醇、伊立替康、伊罗普拉(iroplact)、伊索拉定(irsogladine)、异苯胍唑(isobengazole)、jasplakinolide、kahalalide F、三醋酸层状素N(lamellarin-N triacetate)、兰乐肽(lanreotide)、leinamycin、来格司亭(lenograstim)、硫酸香菇多糖(lentinan sulfate)、雷托他汀(leptolstatin)、来曲唑(letrozole)、亲脂性铂类化合物、立索克林酰胺7(lissoclinamide 7)、洛铂、洛美曲索(lometrexol)、氯尼达明(lonidamine)、洛索蒽醌(losoxantrone)、洛索立宾(loxoribine)、勒托替康(lurtotecan)、镧德卟啉(lutetium texaphyrin)、立索茶碱(lysofylline)、马索罗酚、丝抑蛋白(maspin)、基质金属蛋白酶抑制剂、美诺立尔(menogaril)、rnerbarone、美替瑞林(meterelin)、甲硫氨酸酶、甲氧氯普胺、MIF抑制剂、米非司酮(mifepristone)、米替福新(miltefosine)、米立司亭(mirimostim)、光辉霉素(mithracin)、米托胍脘(mitoguazone)、二溴卫矛醇、丝裂霉素及其类似物、米托萘胺(mitonafide)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫法罗汀(mofarotene)、莫拉司亭(molgramostim)、mycaperoxide B、美瑞泡仁(myriaporone)、N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline)、N-取代苯甲酰胺、那法瑞林(nafarelin)、纳格瑞替(nagrestip)、纳普维(napavin)、萘特非(naphterpin)、那托司亭(nartograstim)、奈达铂(nedaplatin)、奈莫柔比星(nemorubicin)、奈立膦酸、尼鲁米特(nilutamide)、丽沙霉素(nisamycin)、里挫林(nitrullyn)、奥曲肽(octreotide)、奥克恩(okicenone)、奥那司酮(onapristone)、昂丹司琼(ondansetron)、奥拉新(oracin)、奥马铂(ormaplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、厄诺霉素(oxaunomycin)、紫杉醇及其类似物、帕诺明(palauamine)、十六酰基根霉素

(palmitoylrhizoxin)、帕米麟酸、人参炔三醇、帕诺米芬 (panomifene)、帕拉贝新 (parabactin)、帕折普汀 (pazelliptine)、培门冬酶 (pegaspargase)、皮地新 (peldesine)、戊聚糖聚硫酸钠、喷司他丁 (pentostatin)、喷唑 (pentozole)、潘氟隆 (perflubron)、培磷酰胺、苯连氮霉素 (phenazinomycin)、皮西板尼 (picibanil)、吡柔比星 (pirarubicin)、吡曲克辛 (piritrexim)、鬼臼毒素 (podophyllotoxin)、泊非霉素 (porfiromycin)、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、雷替曲塞 (raltitrexed)、根霉素、罗谷亚胺 (rogletimide)、罗希吐碱、鲁滨吉隆B1 (rubiginone B1)、鲁泊塞 (ruboxyl)、沙芬戈 (safingol)、圣特平 (saintopin)、沙卡弗托A (sarcophytol A)、沙格司亭 (sargramostim)、索布佐生 (sobuzoxane)、索纳明 (sonermin)、斯帕磷酸、斯皮卡霉素D (spicamycin D)、螺莫司汀 (spiromustine)、斯替皮米德 (stipiamide)、sulfinosine、他莫司汀 (tallimustine)、替加氟 (tegafur)、替莫唑胺、替尼泊昔、噻立拉斯汀 (thaliblastine)、噻考瑞林 (thiocoraline)、替拉扎明 (tirapazamine)、拓扑替康 (topotecan)、托普升替 (topsentin)、曲西立滨 (triciribine)、三甲曲沙 (trimetrexate)、凡拉明、长春瑞滨 (vinorelbine)、维萨汀 (vinoxaltine)、伏罗唑 (vorozole)、折尼铂 (zeniplatin) 和亚苾维C (zilascorb) 等。

[0605] 用于化学缀合的接头

[0606] 多种接头可以用于使本文描述的抗体、抗原结合片段和配体 (例如识别CD134或CD278并与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段和可溶性配体) 与细胞毒性分子缀合。如本文使用的, 术语“接头”意指包含共价键的二价化学部分或将抗体或其片段 (Ab) 共价附接至药物部分 (D) 以形成本公开内容的抗体-药物缀合物 (ADC; Ab-Z-L-D, 其中D是细胞毒素) 的原子链。合适的接头具有两个反应性末端, 一个反应性末端用于与抗体缀合并且另一个反应性末端用于与细胞毒素缀合。接头的抗体缀合反应性末端 (反应性部分, Z) 通常是能够通过抗体上的半胱氨酸硫醇或赖氨酸胺基团与抗体缀合的位点, 并且因此通常是硫醇反应性基团, 诸如双键 (如马来酰亚胺中的) 或离去基团诸如氯、溴、碘或R-磺酰基基团, 或胺反应性基团诸如羧基基团; 而接头的抗体缀合反应性末端通常是能够通过与细胞毒素上的碱性胺或羧基基团形成酰胺键而与细胞毒素缀合的位点, 并且因此通常是羧基或碱性胺基团。当术语“接头”用于描述缀合形式的接头时, 由于接头和/或细胞毒素之间以及接头和/或抗体或其抗原结合片段之间的键的形成, 一个或两个反应性末端将不存在 (诸如反应性部分Z, 已经转化为化学部分Z) 或不完整 (诸如仅仅是羧酸的羰基)。这样的缀合反应在下文中进一步描述。

[0607] 在一些实施方案中, 接头在细胞内条件下是可裂解的, 使得接头的裂解使药物单元在细胞内环境中从抗体释放。在又其他实施方案中, 接头单元是不可裂解的, 并且药物通过例如抗体降解而释放。可用于本发明的ADC的接头优选在细胞外稳定, 防止ADC分子聚集, 并保持ADC在水性介质中和在单体状态下可自由溶解。在转运或递送到细胞中之前, 优选地ADC是稳定的并保持完整, 即抗体保持与药物部分连接。接头在靶细胞外是稳定的, 并且可以在细胞内以某种有效的速率被裂解。有效的接头将会: (i) 维持抗体的特异性结合性质; (ii) 允许缀合物或药物部分的细胞内递送; (iii) 直到缀合物已经被递送或转运至其靶向的位点之前保持稳定和完整, 即, 不裂解; 并且 (iv) 维持细胞毒性部分的细胞毒性、细胞杀伤作用或细胞抑制作用。ADC的稳定性可以通过标准分析技术诸如质谱、HPLC和分离/分析技术LC/MS进行测量。抗体和药物部分的共价附接要求接头具有两个反应性官能基团, 即反

应意义上的二价性。可用于附接两个或更多个功能或生物活性部分(诸如肽、核酸、药物、毒素、抗体、半抗原和报告物基团)的二价接头试剂是已知的,并且已经描述了它们产生缀合物的方法(Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p. 234-242)。

[0608] 接头包括可以例如通过酶水解、光解、酸性条件下的水解、碱性条件下的水解、氧化、二硫化物还原、亲核裂解或有机金属裂解来裂解的那些接头(参见,例如Leriche等, *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012, 该文献的公开内容在其涉及适于共价缀合的接头时通过引用并入本文)。

[0609] 酸性条件下可水解的接头包括例如脘、缩氨基脒、缩氨硫脒、顺式乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等。(参见,例如,美国专利第5,122,368号;第5,824,805号;第5,622,929号;Dubowchik和Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123;Neville等, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661, 其中每一篇文献的公开内容在其涉及适于共价缀合的接头时通过引用以其整体并入本文)。这样的接头在中性pH条件下诸如在血液中的那些中性pH条件下相对稳定,但在pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)以下时不稳定。

[0610] 还原条件下可裂解的接头包括例如二硫化物。多种二硫化物接头是本领域已知的,包括,例如,可以使用以下形成的那些二硫化物接头:SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB和SMPT(参见,例如,Thorpe等, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931;Wawrzynczak等, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987))。还参见美国专利第4,880,935号,其中每一篇文献的公开内容在其涉及适于共价缀合的接头时通过引用以其整体并入本文。

[0611] 另外的接头包括不可裂解的马来酰亚胺基己酰基接头,该接头特别可用于微管破坏剂(诸如奥瑞他汀)的缀合,由Doronina等, *Bioconjugate Chem.* 17:14-24, 2006描述,该文献的公开内容在其涉及用于化学缀合的接头时通过引用并入本文。适于合成如本文描述的药物-抗体和药物-配体缀合物的另外的接头包括能够通过1,6-消除过程释放细胞毒素的那些接头(“自降解(self-immolative)”基团),诸如对氨基苄醇(PABC)、6-马来酰亚胺基己酸、pH敏感性碳酸酯和在Jain等, *Pharm. Res.* 32:3526-3540, 2015中描述的其他试剂,该文献的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0612] 在一些实施方案中,接头包括自降解基团,诸如上文提及的PAB或PABC(对氨基苄氧羰基),其在例如Carl等, *J. Med. Chem.* (1981) 24:479-480;Chakravarty等(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中公开。其他的能够进行该过程的这样的化学部分(“自降解接头”)包括亚甲基氨基甲酸酯和杂芳基基团诸如氨基噻唑、氨基咪唑、氨基嘧啶等。含有这样的杂环自降解基团的接头在例如美国专利公布第20160303254号和第20150079114号以及美国专利第7,754,681号;Hay等(1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237;US 2005/0256030;de Groot等(2001) *J. Org. Chem.* 66:

8815-8830;和US 7223837中公开。

[0613] 对酶水解易感的接头可以是,例如,被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶)裂解的含肽接头。使用细胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点是,剂在缀合时通常被削弱,并且缀合物的血清稳定性通常高。在一些实施方案中,肽基接头是至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。示例性氨基酸接头包括二肽、三肽、四肽或五肽。合适的肽的实例包括含有氨基酸的那些肽,所述氨基酸诸如缬氨酸、丙氨酸、瓜氨酸(Cit)、苯丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸和甘氨酸。构成氨基酸接头组分的氨基酸残基包括天然存在的那些氨基酸残基、以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物诸如瓜氨酸。示例性二肽包括缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)和丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。示例性三肽包括甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。在一些实施方案中,接头包括二肽,诸如Val-Cit、Ala-Val或Phe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg或Trp-Cit。含二肽诸如Val-Cit或Phe-Lys的接头在例如美国专利第6,214,345号中公开,该美国专利的公开内容在其涉及适于共价缀合的接头时通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,二肽与自降解接头组合使用。

[0614] 适于本文中使用的接头还可以包括选自以下的一个或多个基团: C_1-C_6 亚烷基、 C_1-C_6 亚杂烷基、 C_2-C_6 亚烯基、 C_2-C_6 亚杂烯基、 C_2-C_6 亚炔基、 C_2-C_6 亚杂炔基、 C_3-C_6 亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基、亚杂芳基及其组合,其中的每一个可以任选地被取代。这样的基团的非限制性实例包括 $(CH_2)_n$ 、 $(CH_2CH_2O)_n$ 和 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是每次出现时独立地选择的从1-6的整数。

[0615] 在一些实施方案中,接头可以包括以下中的一种或更多种:胍、二硫化物、硫醚、二肽、对氨基苄基(PAB)基团、杂环自降解基团、任选地被取代的 C_1-C_6 烷基、任选地被取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地被取代的 C_2-C_6 烯基、任选地被取代的 C_2-C_6 杂烯基、任选地被取代的 C_2-C_6 炔基、任选地被取代的 C_2-C_6 杂炔基、任选地被取代的 C_3-C_6 环烷基、任选地被取代的杂环烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的杂芳基、酰基、 $-(C=O)-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 基团,其中n是从1-6的整数。本领域技术人员将认识到,所列出的一个或多个基团可以以二价(二价基)物类的形式存在,例如 C_1-C_6 亚烷基等。

[0616] 在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一种实施方案中,对氨基苄基基团布置于细胞毒性药物和接头中的蛋白酶裂解位点之间。在一种实施方案中,对氨基苄基基团是对氨基苄基氧羰基单元的一部分。在一种实施方案中,对氨基苄基基团是对氨基苄基酰氨基单元的一部分。

[0617] 在一些实施方案中,接头包括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或Ala-PAB。

[0618] 在一些实施方案中,接头包括以下中的一种或更多种的组合:肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB或Ala-PAB。

[0619] 在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。

[0620] 在一些实施方案中,接头包括 $-(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从2至6的整数。

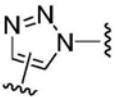
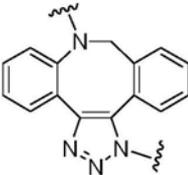
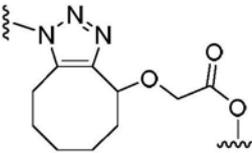
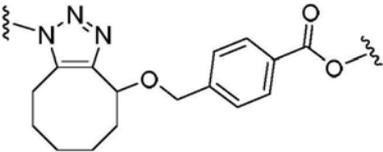
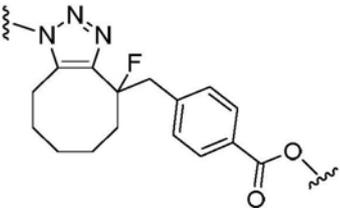
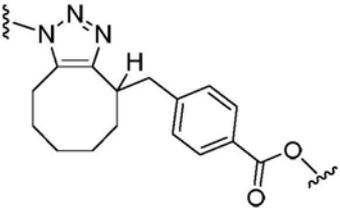
[0621] 在某些实施方案中,ADC的接头是N-β-马来酰亚胺丙基-Val-Ala-对氨基苄基(BMP-Val-Ala-PAB)。

[0622] 可以用于将抗体、其抗原结合片段或配体与细胞毒性剂缀合的接头包括以下那些接头:其在接头的一个末端与细胞毒性剂共价结合,并且在接头的另一个末端含有化学部分,所述化学部分由存在于接头上的反应性取代基与存在于与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段或配体内的反应性取代基之间的偶联反应形成。可以存在于与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段或配体内的反应性取代基包括但不限于,丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的羟基部分;赖氨酸残基的氨基部分;天冬氨酸和谷氨酸残基的羧基部分;和半胱氨酸残基的硫醇部分,以及非天然存在的氨基酸的炔丙基、叠氮基、卤代芳基(例如,氟芳基)、卤代杂芳基(例如,氟杂芳基)、卤代烷基和卤代杂烷基部分。可用于合成药物-抗体缀合物的接头的实例包括,含有适于与存在于抗体或抗原结合片段内的亲核取代基(诸如胺和硫醇部分)反应的亲电体的那些接头,所述亲电体诸如迈克尔受体(例如,马来酰亚胺)、活化酯、缺电子羰基化合物和醛等。例如,适于合成药物-抗体缀合物的接头包括但不限于:琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-L-羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、磺基-SMCC、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、磺基-MBS和琥珀酰亚胺基碘乙酸酯等,它们在例如Liu等,18:690-697,1979中描述,该文献的公开内容在其涉及用于化学缀合的接头时通过引用并入本文。

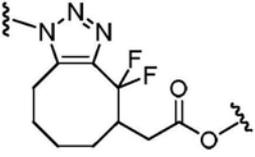
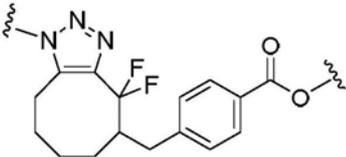
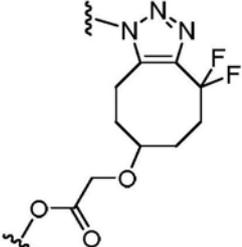
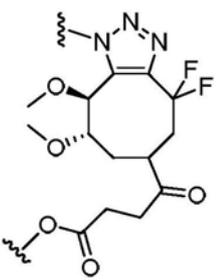
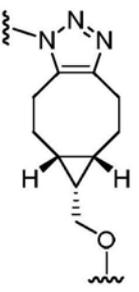
[0623] 本领域技术人员将认识到,本文公开的任何一种或更多种化学基团、部分和特征可以以多种方式组合,以形成可用于如本文公开的抗体和细胞毒素的缀合的接头。可与本文描述的组合物和方法联合使用的其他接头在例如美国专利申请公布第2015/0218220号中描述,该美国专利申请公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0624] 可与本文描述的抗体-药物和配体-缀合物联合使用的接头包括但不限于含有如下文表1中描绘的由偶联反应形成的化学部分的接头。曲线分别表示与抗体、抗原结合片段或配体和细胞毒性分子的附接点。

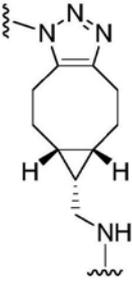
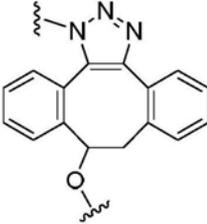
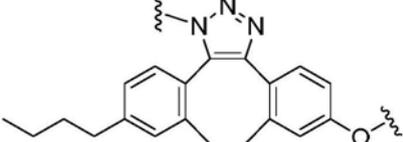
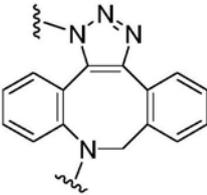
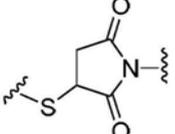
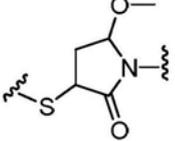
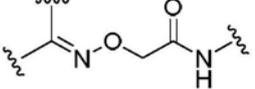
[0625] 表1. 在抗体-药物缀合物的形成中由偶联反应形成的示例性化学部分

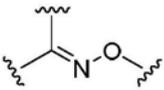
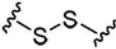
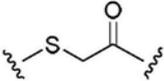
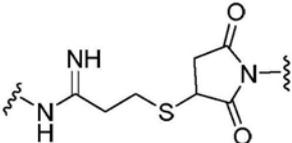
示例性偶联反应	由偶联反应形成的化学部分 Z
[3+2]环加成	
[3+2]环加成	
[3+2]环加成、酯化	
[0626] [3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	

[0627]

[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	

[0628]

[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、酯化	
[3+2]环加成、醚化作用	
[3+2]环加成	
迈克尔加成 (Michael addition)	
迈克尔加成	
亚胺缩合、酰胺化	

[0629]	
	
	
	

[0630] 本领域技术人员将认识到, 附接至接头的反应性取代基Z和抗体或其抗原结合片段上的反应性取代基参与共价偶联反应以产生化学部分Z, 并且将认识到反应性取代基Z。因此, 可与本文描述的方法联合使用的抗体-药物缀合物可以通过抗体或其抗原结合片段与如本文描述的接头或细胞毒素-接头缀合物反应而形成, 接头或细胞毒素-接头缀合物包括反应性取代基Z, 反应性取代基Z适于与抗体或其抗原结合片段上的反应性取代基反应, 以形成化学部分Z。

[0631] 如表1中描绘的, 接头和抗体或其抗原结合片段上的合适反应性取代基的实例包括亲核体/亲电体对 (例如硫醇/卤代烷基对、胺/羰基对或硫醇/ α, β -不饱和羰基对等)、二烯/亲二烯体对 (例如叠氮化物/炔烃对或二烯/ α, β -不饱和羰基对等) 等。反应性取代基之间形成化学部分Z的偶联反应包括但不限于硫醇烷基化、羟基烷基化、胺烷基化、胺或羟胺缩合、肼形成、酰胺化、酯化、二硫化物形成、环加成 (例如, [4+2]狄尔斯-阿尔德环加成、[3+2]Huisgen环加成等)、亲核芳族取代、亲电芳族取代和本领域已知或本文描述的其他反应范式。优选地, 接头包含用于与抗体或其抗原结合片段上的亲核官能基团反应的亲电官能基团。

[0632] 可以存在于如本文公开的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基包括但不限于亲核基团, 诸如 (i) N-末端胺基团, (ii) 侧链胺基团, 例如赖氨酸, (iii) 侧链硫醇基团, 例如半胱氨酸, 和 (iv) 糖羟基或氨基基团, 其中抗体被糖基化。可以存在于如本文公开的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基包括但不限于, 丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的羟基部分; 赖氨酸残基的氨基部分; 天冬氨酸和谷氨酸残基的羧基部分; 和半胱氨酸残基的硫醇部分, 以及非天然存在的氨基酸的炔丙基、叠氮基、卤代芳基 (例如, 氟芳基)、卤代杂芳基 (例如, 氟杂芳基)、卤代烷基和卤代杂烷基部分。在一些实施方案中, 存在于如本文公开的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基包括胺或硫醇部分。某些抗体具有可还原的链间二硫化物, 即半胱氨酸桥。通过用还原剂诸如DTT (二硫苏糖醇) 处理, 可以使抗体对于与接头试剂发生缀合是反应性的。因此, 理论上, 每个半胱氨酸桥将形成两个反应性硫醇亲核体。通过赖氨酸与2-亚氨基硫杂环戊烷 (Traut试剂) 的反应引起胺转化为硫醇, 可以将另外的亲核基团引入抗体中。通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基 (例如, 制备包含一个或更多个非天然半胱氨酸残基的突变体抗体), 可以将反应性硫醇基团引入抗

体(或其片段)中。美国专利第7,521,541号教导了通过引入反应性半胱氨酸氨基酸来工程化抗体。

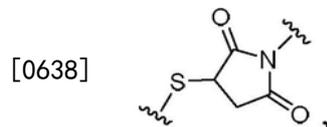
[0633] 在一些实施方案中,衔接至接头的反应性部分Z是与存在于抗体上的亲电基团反应的亲核基团。抗体上有用的亲电基团包括但不限于醛和酮羰基基团。亲核基团的杂原子可以与抗体上的亲电基团反应并与抗体形成共价键。有用的亲核基团包括但不限于酰肼、肟、氨基、羟基、肼、缩氨硫脲、羧酸肼和芳基酰肼。

[0634] 在一些实施方案中,Z是存在于抗体或其抗原结合片段内的反应性亲核取代基(诸如胺和硫醇部分)与反应性亲电取代基Z之间的反应产物。例如,Z可以是迈克尔受体(例如马来酰亚胺)、活化酯、缺电子羰基化合物或醛等。

[0635] 在一些实施方案中,ADC包含抗CD134抗体或抗CD278抗体,所述抗CD134抗体或抗CD278抗体经由接头和化学部分Z与如本文公开的式III、IIIA或IIIB中的任一种的鹅膏蕈毒素缀合,以形成如本文公开的式I、IA、IB、II、IIA或IIB中的任一种的鹅膏蕈毒素-接头缀合物。在一些实施方案中,接头包括二肽。在一些实施方案中,接头包括选自Val-Ala和Val-Cit的二肽。在一些实施方案中,接头包括对氨基苄基基团(PAB)。在一些实施方案中,接头包括PAB-Cit-Val部分。在一些实施方案中,接头包括PAB-Ala-Val部分。在一些实施方案中,接头包括 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从1-6的整数。在一些实施方案中,接头是PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。

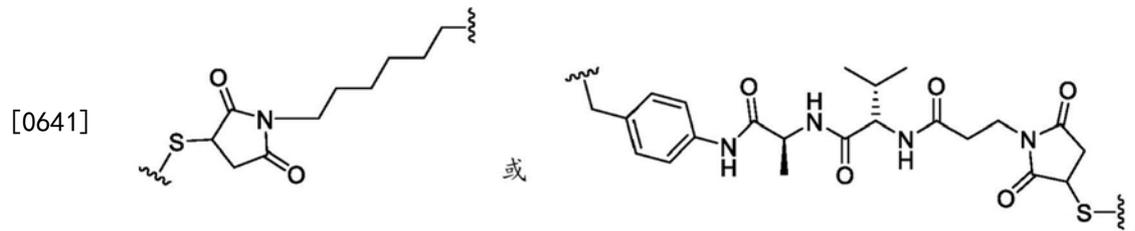
[0636] 在一些实施方案中,接头包括 $-(CH_2)_n-$ 单元,其中n是从2-6的整数。在一些实施方案中,接头是PAB-Cit-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是PAB-Ala-Val- $-(C=O)(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是 $-(CH_2)_n-$ 。在一些实施方案中,接头是 $-(CH_2)_n-$,其中n是6。

[0637] 在一些实施方案中,化学部分Z选自表1。在一些实施方案中,化学部分Z是



[0639] 其中S是硫原子,表示存在于与CD134或CD278结合的抗体或其抗原结合片段内的反应性取代基(例如,来自半胱氨酸残基的-SH基团)。

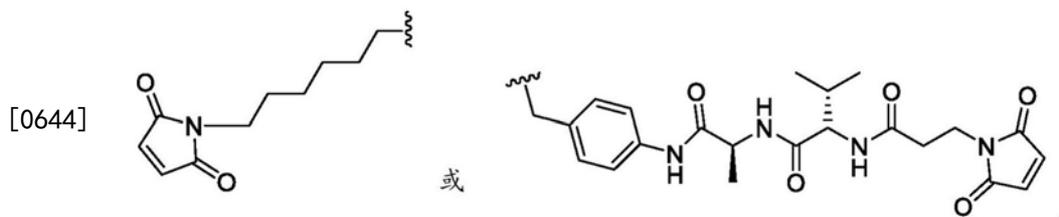
[0640] 在一些实施方案中,接头L和化学部分Z(合在一起称为L-Z)是



[0642] 本领域技术人员将认识到,在与抗体或其抗原结合片段缀合之前,接头-反应性取代基基团结构包括作为基团Z的马来酰亚胺。可与本文描述的组合物和方法联合使用的前述接头部分和鹅膏蕈毒素-接头缀合物等,在例如美国专利申请公布第2015/0218220号和专利申请公布第W02017/149077号中描述,其中每一个的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0643] 在一些实施方案中,在与抗体或其抗原结合片段缀合之前,接头反应性取代基基

团结构是：



[0645] 抗体-药物缀合物的制备

[0646] 在如本文公开的式I、IA、IB、II、IIA和IIB的ADC中,抗体或其抗原结合片段通过如本文公开的接头L和化学部分Z与一个或多个细胞毒性药物部分(D)缀合,例如每个抗体与约1个至约20个药物部分缀合。本公开内容的ADC可以通过若干途径,采用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂来制备,包括:(1)抗体或其抗原结合片段的反应性取代基与二价接头试剂反应以形成如上文描述的Ab-Z-L,随后与药物部分D反应;或(2)药物部分的反应性取代基与二价接头试剂反应以形成D-L-Z,随后与如上文描述的抗体或其抗原结合片段的反应性取代基反应,以形成式D-L-Z-Ab的ADC,诸如Am-Z-L-Ab。本文描述了另外的用于制备ADC的方法。

[0647] 在另一方面,抗体或其抗原结合片段具有可以被化学地修饰以引入一个或多个巯基基团的一个或多个赖氨酸残基。然后,如上文描述的,通过由巯基基团的硫原子缀合而形成ADC。可以用于修饰赖氨酸的试剂包括,但不限于,N-琥珀酰亚胺基S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)和2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐(Traut试剂)。

[0648] 在另一方面,抗体或其抗原结合片段可以具有可以被化学地修饰以具有一个或多个巯基基团的一个或多个碳水化合物基团。然后,如上文描述的,通过由巯基基团的硫原子缀合而形成ADC。

[0649] 在又另一方面,抗体可以具有可以被氧化以提供醛(-CHO)基团的一个或多个碳水化合物基团(参见,例如,Laguzza等,J.Med.Chem.1989,32(3),548-55)。然后,如上文描述的,通过由相应的醛缀合而形成ADC。用于修饰蛋白质以便附接或缔合细胞毒素的其他方案在通过引用并入本文的Coligan等,Current Protocols in Protein Science,vol.2,John Wiley&Sons(2002)中描述。

[0650] 用于将接头-药物部分与细胞靶向的蛋白质(诸如抗体、免疫球蛋白或其片段)缀合的方法见于,例如,美国专利第5,208,020号;美国专利第6,441,163号;W02005037992;W02005081711;和W02006/034488,其全部在此通过引用以其整体明确地并入本文。

[0651] 可选地,可以例如通过重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒性剂的融合蛋白。DNA的长度可以包括编码缀合物的两个部分的相应区域,所述相应区域彼此相邻或者被编码不会破坏缀合物的期望性质的接头肽的区域分开。

[0652] 抗体药代动力学谱

[0653] 在一些实施方案中,抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物具有确定的血清半衰期。可用于本文的方法的抗体、其抗原结合片段和缀合物包括具有例如从1小时-24小时的血清半衰期的那些。在一些实施方案中,当循环抗体的水平为治疗有效水平时,在抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物之前、同时或之后施用移植物。通过测量血清水平的药代动力学分析可以通过本领域已知的测定进行。

[0654] 施用和给药途径

[0655] 本文描述的抗体、其抗原结合片段、ADC和配体可以以多种剂型施用至患者(例如,患有GVHD或自身免疫性疾病或处于GVHD或自身免疫性疾病风险的人类患者)。例如,本文描述的抗体、其抗原结合片段、ADC和配体可以以水性溶液诸如含有一种或更多种药学上可接受的赋形剂的水性溶液的形式施用至患有GVHD或处于GVHD风险的患者。用于与本文描述的组合物和方法一起使用的合适的药学上可接受的赋形剂包括黏度调节剂。水性溶液可以使用本领域已知的技术灭菌。

[0656] 包含如本文描述的抗CD134 ADC或抗CD278 ADC的药物制剂通过将这样的ADC与一种或更多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A.Ed. (1980))混合来制备,呈冻干制剂或水性溶液的形式。药学上可接受的载体通常在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸(phosphate)、柠檬酸(citrate)和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苜醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;盐形成抗衡离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。

[0657] 本文描述的抗体、抗原结合片段、ADC和配体可以通过多种途径施用,所述多种途径诸如口服、透皮、皮下、鼻内、静脉内、肌肉内、眼内或胃肠外。在任何给定情况下,最合适的施途径将取决于所施用的特定抗体、抗原结合片段或ADC、患者、药物配制方法、施用方法(例如,施用时间和施途径)、患者的年龄、体重、性别、所治疗的疾病的严重程度、患者的饮食和患者的排泄速率。

[0658] 本文描述的抗体、其抗原结合片段、ADC或配体的有效剂量的范围可以例如每单次(例如,团注(bolus))施用、多次施用或连续施用从约0.001mg/kg体重至约100mg/kg体重,或者以达到抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体的最佳血清浓度(例如,0.0001 μ g/mL-5000 μ g/mL的血清浓度)。剂量可以每天、每周或每月一次或更多次(例如,2次-10次)施用至患有GVHD或自身免疫性疾病或处于GVHD或自身免疫性疾病风险的受试者(例如,人类)。抗体、其抗原结合片段、ADC或配体可以在造血干细胞移植之前以足以将宿主反应性T细胞的数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的量施用。

[0659] 治疗方法

[0660] 本文描述的组合物和方法可以用于耗尽与移植失败,特别是同种异体移植物排斥,以及自身免疫性疾病相关的活化的T细胞,以便获得移植物耐受性。本文描述的组合物和方法对于预防和治疗GVHD和/或自身免疫性疾病特别有用。本文描述的组合物和方法还可用于预防或治疗宿主抗移植物病(HvGD)。本文公开的方法和组合物还可用于降低接受同种异体移植物的人类患者的移植失败风险。优选的受试者是人类。施用的抗体、抗体-药物缀合物或配体-药物缀合物的量应足以耗尽促进GVHD或自身免疫性疾病的细胞,例如活化的T细胞。治疗有效剂量的确定在本领域从业者的能力内,然而,作为实例,在本文利用抗体

的全身施用来治疗GVHD或自身免疫性疾病所描述的方法的实施方案中,有效的人类剂量将在0.1mg/kg-150mg/kg的范围内(例如,5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、150mg/kg等)。施用途径可以影响推荐剂量。根据所采用的施用模式,考虑重复的全身剂量以便维持有效水平,例如,以减轻或抑制GVHD或自身免疫性疾病。

[0661] 抗体、抗体-药物缀合物或配体-药物缀合物可以在细胞或实体器官移植到患者之前、同时或之后施用至有需要的人类患者。在一种实施方案中,在移植细胞或实体器官之前(例如,之前约3天、之前约2天、之前约12小时),抗CD134 ADC或抗CD278 ADC被施用至有相应需要的人类患者。在一种实施方案中,在移植细胞或实体器官之后(例如,之后约1天、之后约2天、之后约3天或之后约4天),抗CD134 ADC或抗CD278 ADC被施用至有相应需要的人类患者。在某些实施方案中,在移植之前、同时和/或之后,本文描述的ADC被施用至患者。在移植细胞或器官之前、同时或之后,单个剂量的抗CD134 ADC或抗CD278 ADC可以施用至人类患者,其中这样的单个剂量足以治疗或预防GVHD或移植失败。

[0662] 抗CD134 ADC或抗CD278 ADC可以用作用于促进移植物(包括同种异体移植物)的接受性的传统的剂(例如,化疗和/或放射)的替代物。传统的剂通常降低患者的免疫应答,以便促进所移植的细胞或器官的植入和接受。本文描述的方法和组合物提供了更具选择性的疗法,该疗法允许患者的大部分免疫系统保持完整,同时靶向和耗尽表达CD134的活化的T细胞或表达CD278的活化的T细胞。因此,在移植环境中,特别是鉴于同种异体活化的免疫细胞可以被靶向和耗尽以便获得细胞或实体器官的成功移植,本文公开的抗CD134 ADC或抗CD278 ADC选择性地耗尽活化的T细胞的能力提供了比传统疗法有益的疗法。

[0663] 本文公开的方法和组合物可以用于预防或治疗移植失败。移植失败或移植物排斥,包括同种异体造血干细胞移植后的失败,通常可以表现为供体细胞初始植入的缺乏,或初始植入后供体细胞的损失(关于综述,参见Mattsson等(2008) *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(增刊1):165-170)。本文公开的组合物和方法可以用于在移植失败是令人担忧的移植物或移植环境下耗尽表达CD134或CD278的活化的T细胞,所述环境例如,当人类患者在移植实体器官或细胞后处于发展移植失败的风险时,特别是当移植的细胞或器官是同种异体的时。在一种实施方案中,抗CD134抗体或抗CD278抗体、抗体-药物缀合物或配体-药物缀合物用于通过在将细胞、移植物或器官移植到人类患者之前使细胞、移植物或实体器官与抗CD134抗体或抗CD278抗体、抗体-药物缀合物或配体-药物缀合物接触来耗尽表达CD134或CD278的供体细胞,例如表达CD134或CD278的活化的T细胞。在一种实施方案中,细胞、移植物或器官是同种异体的。

[0664] 在用目前的疗法移植后,GVHD的风险仍然是高的。本文公开的方法和组合物可以用于抑制人类患者的移植物抗宿主病(GVHD)。抗CD134ADC或抗CD278 ADC可以用于选择性地靶向将接受移植物(诸如干细胞移植物)的患者中的活化的T细胞。如本文描述的,抗CD134 ADC或抗CD278 ADC还可以用于通过靶向和耗尽将要接受或已经接受移植物(诸如但不限于HSC移植物)的人类患者中的CD134阳性或CD278阳性细胞来降低GVHD的风险。在某些实施方案中,本文公开的组合物和方法用于在移植疗法(例如,同种异体的HSC)后于患者中出现GVHD的症状之前治疗GVHD。

[0665] 本文描述的方法还可用于预防宿主抗移植物(HvG)反应。抗CD134-ADC或抗CD278 ADC也可以用作免疫抑制剂,以预防宿主抗移植物(HvG)反应,从而预防或降低同种异体移

植失败的风险。在处于HvG反应风险的患者中使用抗CD134 ADC或抗CD278 ADC将使得具有更大程度的HLA错配的供体细胞能够植入。另外的用途包括实体器官移植中的耐受性诱导,其中宿主抗移植反应被CD134-ADC或CD278-ADC预防或遏制。这些将包括使用或不使用造血干细胞移植进行的实体器官移植,包括其中器官是非人类来源的和/或被遗传修饰的异种移植。

[0666] 在一种实施方案中,在其中使用两个供体的同种异体移植物的环境中,抗CD134-ADC或抗CD278-ADC用于预防移植抗移植(GvG)。实例包括在成人和儿科患者中使用2个脐带血干细胞供体。GvG的预防将使得能够在移植后达到更快的造血(例如嗜中性粒细胞和血小板)重建,因为两种干细胞来源都将成功地植入。

[0667] 在一些实施方案中,移植是同种异体的。在一些实施方案中,移植是自体的。

[0668] 在一些实施方案中,移植是骨髓移植、外周血移植或脐带血移植。

[0669] 在一些实施方案中,移植包含造血细胞(例如,造血干细胞)。

[0670] 在本文描述的任何实施方案中,移植可以是任何实体器官或皮肤移植。在一些实施方案中,移植选自以下组成的组:肾脏移植、心脏移植、肝移植、胰腺移植、肺移植、肠移植和皮肤移植。

[0671] 本文描述的方法可用于治疗多发性硬化(MS)。MS是破坏性的中枢神经系统的自身免疫性炎症疾病。广泛接受的是,中枢神经系统(CNS)中的损伤由针对髓鞘内的(自身)抗原的自身免疫性攻击引起。负责MS中的组织损伤的机制涉及攻击髓鞘中蛋白质的自身反应性T细胞的活化。个体在15岁和50岁之间经历最初迹象是常见的。受影响的个体遭遇炎症脱髓鞘发作,产生疾病加重的典型过程—加剧(remittance)。

[0672] 本文描述的方法还可用于治疗人类系统性红斑狼疮(SLE)。SLE或狼疮是一种慢性自身免疫性疾病,其特征是针对自身抗原产生自身抗体。自身反应性B细胞被自身抗原驱动,包括双链DNA的抗体、核蛋白抗原的抗体和核糖核蛋白的抗体。促进B细胞耐受性损失和驱动自身抗体产生的因素是未知的。系统性狼疮几乎可以影响身体的任何器官或系统。系统性狼疮可以包括其中很少的症状(如果存在的话)是明显的时间段(“缓解”)和疾病变得更加活跃的其他时间(“急性发作(flare)”)。

[0673] 本文描述的方法还可用于治疗类风湿性关节炎(RA)。RA是一种初始攻击滑膜的系统性自身免疫性疾病,滑膜是内衬关节之间的腔并且分泌润滑液的结缔组织膜。虽然RA的原因是未知的,但感染因素、遗传因素和激素因素可能对RA有贡献。RA与异常的免疫相关,因为患有RA的患者的关节严重浸润有白细胞,诸如巨噬细胞和树突细胞,以及T细胞和B细胞。该疾病可以在任何年龄发生,但疾病发作的峰发生率在25岁和55岁之间。发生率随着年龄增加。疾病的发作通常是渐进的,伴有疲劳、持续多于一小时的晨僵、弥漫性肌肉疼痛、食欲不振和虚弱。最终,关节疼痛出现,伴有在不活动之后关节的发热、肿胀、压痛和僵硬。

[0674] 本文描述的方法还可用于治疗炎症肠病(IBD)。IBD的表现包括溃疡性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、淋巴细胞性结肠炎和胶原性结肠炎。IBD是一种自发性复发、免疫介导的胃肠道紊乱,其特征是不受控制的炎症和黏膜免疫系统的持续活化。CD4 T细胞被认为在人类IBD的发病机制中起至关重要的作用,这是因为它们流入发炎的黏膜。

[0675] 本文描述的方法特别可用于治疗银屑病。银屑病是一种慢性炎性皮肤病,其特征是红色、鳞状、凸起的斑块。银屑病由T细胞介导并且与导致细胞分裂增加和异常分化的

细胞因子水平的升高相关。银屑病是一种具有不同的严重程度的慢性复发性皮肤状况,并且也与严重的共病(co-morbidities)相关,所述共病包括银屑病关节炎、抑郁症、恶性肿瘤、代谢综合征、心血管发病率和死亡率以及自身免疫性疾病诸如炎症肠病(IBD)。

[0676] 本文描述的方法还可用于治疗1型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, Type 1 diabetes)。1型糖尿病是一种人类中的代谢紊乱,包括相对于他们的年龄和身高不超重的青少年发作患者,虽然1型糖尿病可以在任何年龄发生,但在早期年龄,通常在30岁之前,疾病快速发作。1型糖尿病被认为是自身免疫性病因学的疾病。CD4 T细胞和CD8 T细胞已经被涉及作为对 β 细胞(产生胰岛素的细胞)损伤的致病物。

[0677] 本文描述的方法还可用于治疗其他自身免疫性疾病,所述其他自身免疫性疾病包括但不限于,急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、艾迪生氏病(Addison's disease)、普秃、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征(APS)、再生障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性淋巴增生性综合征(ALPS)、自身免疫性卵巢炎、巴洛病(Balo disease)、白塞氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、恰加斯氏病(Chagas' disease)、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症脱髓鞘性多发性神经病、克罗恩氏病、瘢痕性类天疱疮、乳糜泻-疱疹性皮炎、冷凝集素病、CREST综合征、恶性萎缩性丘疹病(Degos disease)、盘状狼疮、自主神经异常、子宫内膜异位症、特发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯病(Grave's disease)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、化脓性汗腺炎、特发性和/或急性血小板减少性紫癜、特发性肺纤维化、IgA神经病变、间质性膀胱炎、幼年型关节炎、川崎病(Kawasaki's disease)、扁平苔癣、莱姆病(Lyme disease)、梅尼埃病(Meniere disease)、混合性结缔组织病(MCTD)、重症肌无力、神经性肌强直、斜视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)、视神经炎、奥德氏甲状腺炎(Ord's thyroiditis)、寻常型天疱疮、恶性贫血、多软骨炎、多肌炎和皮炎、原发性胆汁性肝硬化、结节性多动脉炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、原发性无丙种球蛋白血症、雷诺现象(Raynaud phenomenon)、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、风湿热、结节病、硬皮病、干燥综合征(Sjögren's syndrome)、僵人综合征、大动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎(也称为“巨细胞动脉炎”)、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、外阴痛(“外阴前庭炎”)和韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0678] 本文描述的组合物和方法可以用于治疗多种紊乱,包括但不限于非恶性血红蛋白病(例如,选自由镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血和威斯科特-奥尔德里奇综合征组成的组的血红蛋白病)。另外地或可选地,本文描述的组合物和方法可以用于治疗免疫缺陷,诸如先天性免疫缺陷。另外地或可选地,本文描述的组合物和方法可以用于治疗获得性免疫缺陷(例如,选自由HIV和AIDS组成的组的获得性免疫缺陷)。本文描述的组合物和方法可以用于治疗代谢紊乱(例如,选自由糖原贮积症、黏多糖贮积症、戈谢氏病、赫尔勒病、鞘脂贮积症和异染性脑白质营养不良组成的组的代谢紊乱)。另外地或可选择地,本文描述的组合物和方法可以用于治疗恶性肿瘤,诸如血液癌症(例如,白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常性综合征),以及其他癌症状况,包括神经母细胞瘤。

[0679] 在一种实施方案中,本文描述的ADC用于治疗或预防因白血病(例如急性髓细胞白血病)而受治疗的人类患者的GVHD,其中患者接受了同种异体移植,例如造血干细胞

(HSC)的同种异体移植物。本文描述的ADC还可以用于在移植物之前耗尽T细胞和促进同种异体移植的接受。

[0680] 在一种实施方案中,本文描述的ADC用于治疗或预防因代谢紊乱(例如遗传性代谢疾病)而受治疗的人类患者的GVHD,其中患者接受了同种异体移植物,例如脐带血细胞的同种异体移植物。本文描述的ADC还可以用于在移植物之前耗尽T细胞和促进同种异体脐带血细胞移植的接受。

[0681] 可以通过施用本文描述的组合物和方法治疗的另外的紊乱包括腺苷脱氨酶缺乏和重症联合免疫缺陷、高免疫球蛋白M综合征、切东病、遗传性淋巴组织细胞增多症、骨硬化症、成骨不全症、贮积症、重型地中海贫血、系统性硬化、系统性红斑狼疮、多发性硬化和幼年型类风湿性关节炎。

[0682] 根据本文公开的方法,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段或ADC可以施用至准备进行造血干细胞移植疗法的人类患者。

[0683] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其片段、ADC或可溶性配体可以与毒素(诸如本文描述的或本领域已知的细胞毒性分子)或Fc结构域共价缀合。例如,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体可以与细胞毒素共价缀合,所述细胞毒素诸如微管结合剂、美登素、美登木素生物碱、鹅膏蕈毒素、假单胞菌外毒素A、deBouganin、白喉毒素、诸如 α -鹅膏蕈碱、皂草素、奥瑞他汀、葱环霉素、加利车霉素、伊立替康、SN-38、倍癌霉素、吡咯并苯二氮卓类、吡咯并苯二氮卓类二聚体、吲哚并苯二氮卓类和吲哚并苯二氮卓类二聚体,或其变体。

[0684] 这种缀合可以使用本文描述的或本领域已知的共价键形成技术进行。抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以随后例如通过静脉内施用施用至患者,然后将外源性造血干细胞(诸如同种异体造血干细胞)移植至患者。

[0685] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在造血干细胞移植疗法之前、同时或之后以足以将宿主反应性T细胞的数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的量施用。供体T细胞计数的减少可以使用本领域已知的常规技术来监测,诸如通过对从患者抽取的血液样品中的表达特征性造血细胞表面抗原的细胞进行FACS分析来监测。例如,本领域技术医师可以在多个时间点从患者抽取血液样品并且通过进行FACS分析来确定供体CD134+或CD278+T细胞减少的程度,所述FACS分析使用与供体T细胞抗原结合的抗体来阐明样品中T细胞的相对浓度。

[0686] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以含有一种或更多种药学上可接受的赋形剂(诸如黏度调节剂)的水性溶液施用至患者。水性溶液可以使用本文描述的或本领域已知的技术灭菌。在将造血干细胞移植物施用至患者之前,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以例如从0.001mg/kg至100mg/kg的剂量被施用至患者。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间施用至患者,所述时间例如施用外源性造血干细胞移植物之前约1小时至约7天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5

天、6天或7天)或更早。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之前约3天施用。可选地,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间,例如在施用外源性造血干细胞移植物的同时施用至患者。此外,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间施用至患者,所述时间例如施用外源性造血干细胞移植体之后约1小时至约10天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天)或更长时间。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之后约3天至4天施用。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的量可以通过本领域已知的方法在患者的血浆中定量,以确定抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的浓度何时已达其最大值。

[0687] 然后患者可以接受诸如由施用抗体或其抗原结合片段或药物-抗体缀合物的同一医师或由不同医师进行的外源性造血干细胞的输注(例如,静脉内输注)。医师可以例如以从 1×10^3 个至 1×10^9 个CD34+细胞/kg的剂量向患者施用自体、同系或同种异体的造血干细胞的输注。医师可以监测造血干细胞移植物的植入,例如,通过在施用移植体之后从患者抽取血液样品并确定造血干细胞或造血谱系的细胞(诸如巨核细胞、凝血细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、原粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、小胶质细胞、粒细胞、单核细胞、破骨细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、T细胞和B细胞)的浓度的增加来监测。该分析可以在例如造血干细胞移植疗法之后1小时至6个月或更长时间(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周或更长时间)进行。发现造血干细胞或造血谱系的细胞的浓度在移植疗法之后相对于移植疗法之前的相应细胞类型的浓度已经增加(例如,增加1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、500%或更多),这提供了一种指示,即用抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物治疗已经成功地促进了移植的造血干细胞移植体的植入。

[0688] 根据本文公开的方法,抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC可以施用至处于GVHD风险或患有GVHD的人类患者。抗体、其片段、ADC或可溶性配体可以与毒素(诸如本文描述的或本领域已知的细胞毒性分子)或Fc结构域共价缀合。例如,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段或可溶性配体可以与细胞毒素共价缀合,所述细胞毒素诸如微管结合剂、美登素、美登木素生物碱、鹅膏蕈毒素、假单胞菌外毒素A、deBouganin、白喉毒素、诸如 α -鹅膏蕈碱、皂草素、奥瑞他汀、蒽环霉素、加利车霉素、伊立替康、SN-38、倍癌霉素、吡咯并苯二氮卓类、吡咯并苯二氮卓类二聚体、吲哚并苯二氮卓类和吲哚并苯二氮卓类二聚体,或其变体。

[0689] 这种缀合可以使用本文描述的或本领域已知的共价键形成技术进行。抗体、其抗原结合片段、或药物-抗体缀合物、或药物-配体缀合物随后可以通过例如静脉内施用施用

至处于GVHD风险的患者。抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物随后可以通过例如静脉内施用至患有GVHD的患者。例如,抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植外源性造血干细胞(诸如同种异体造血干细胞)之前、同时或之后施用至患者。

[0690] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在造血干细胞移植疗法之后以足以将宿主反应性T细胞的数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的量施用。供体T细胞计数的减少可以使用本领域已知的常规技术来监测,诸如通过对从患者抽取的血液样品中的表达特征性造血细胞表面抗原的细胞进行FACS分析来监测。例如,本领域技术医师可以在多个时间点从患者抽取血液样品并且通过进行FACS分析来确定供体CD134⁺或CD278⁺T细胞减少的程度,所述FACS分析使用与供体T细胞抗原结合的抗体来阐明样品中T细胞的相对浓度。

[0691] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以含有一种或更多种药学上可接受的赋形剂(诸如黏度调节剂)的水性溶液施用至患者。水性溶液可以使用本文描述的或本领域已知的技术灭菌。在将造血干细胞移植施用至患者之前,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以例如从0.001mg/kg至100mg/kg的剂量施用至患者。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进GVHD的预防和治疗的时间施用至患者,所述时间例如施用外源性造血干细胞移植之前1小时至7天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天)或更早。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之前约3天施用。可选地,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间,例如在施用外源性造血干细胞移植的同时施用至患者。此外,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间施用至患者,所述时间例如施用外源性造血干细胞移植之后约1小时至约10天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天)或更长时间。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之后约3天至4天施用。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的量可以通过本领域已知的方法在患者的血浆中定量,以确定抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的浓度何时已达其最大值。

[0692] 然后患者可以接受诸如由施用抗体或其抗原结合片段或药物-抗体缀合物的同一医师或由不同医师进行的外源性造血干细胞的输注(例如,静脉内输注)。医师可以例如以从 1×10^3 个至 1×10^9 个CD34⁺细胞/kg的剂量向患者施用自体或同种异体的造血干细胞的输注。

[0693] 本领域技术医师可以在向人类患者施用能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体诸如本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体之后,评价GVHD的临床表现。

[0694] 根据本文公开的方法,抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC可以施用至因造血干细胞移植而发展自身免疫性疾病的人类患者。根据本文公开的方法,本领域技术医师可以向人类患者施用能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体,诸如本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC。抗体、其片段或可溶性配体可以与毒素(诸如本文描述的或本领域已知的细胞毒性分子)或Fc结构域共价缀合。例如,抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段或可溶性配体可以与细胞毒素共价缀合,所述细胞毒素诸如微管结合剂、美登素、美登木素生物碱、鹅膏蕈毒素、假单胞菌外毒素A、deBouganin、白喉毒素、诸如 α -鹅膏蕈碱、皂草素、奥瑞他汀、葱环霉素、加利车霉素、伊立替康、SN-38、倍癌霉素、吡咯并苯二氮卓类、吡咯并苯二氮卓类二聚体、吲哚并苯二氮卓类和吲哚并苯二氮卓类二聚体,或其变体。

[0695] 这种缀合可以使用本文描述的或本领域已知的共价键形成技术进行。抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物随后可以通过例如静脉内施用施用至处于自身免疫性疾病(例如,多发性硬化、类风湿性关节炎、肠道疾病、银屑病、狼疮和1型糖尿病)风险的患者。例如,抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以施用至患有在移植外源性造血干细胞(诸如自体或同种异体的造血干细胞)之后发展的自身免疫性疾病的患者。

[0696] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在造血干细胞移植疗法之前以足以将宿主反应性淋巴细胞的数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的量施用。供体淋巴细胞计数的减少可以使用本领域已知的常规技术来监测,诸如通过对从患者抽取的血液样品中的表达特征性造血细胞表面抗原的细胞进行FACS分析来监测。例如,本领域技术医师可以在多个时间点从患者抽取血液样品并且通过进行FACS分析来确定CD134+或CD278+T细胞减少的程度,所述FACS分析使用与T细胞抗原结合的抗体来阐明样品中T细胞的相对浓度。针对自身免疫性疾病的效力可以通过本领域已知的测定(例如,来自血清样品的自身抗体应答测量、以及响应于自身抗原的T细胞增殖)来测量。

[0697] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以含有一种或更多种药学上可接受的赋形剂(诸如黏度调节剂)的水性溶液施用至患者。水性溶液可以使用本文描述的或本领域已知的技术灭菌。在将造血干细胞移植物施用至患者之前,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以例如从0.001mg/kg至100mg/kg的剂量施用至患者。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进自身免疫性疾病的预防和治疗的时间施用至患者,所述时间例如施用外源性造血干细胞移植物之前约1小时至约7天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天)或更早。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之前约3天施用。可选地,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间,例如在施用外源性造血干细胞移植物的同时施用至患者。此外,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在最佳地促进外源性造血干细胞的植入的时间施用至患者,所述时间例如施

用外源性造血干细胞移植后约1小时至约10天(例如,1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天)或更长时间。例如,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以在移植之后约3天至4天施用。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的量可以通过本领域已知的方法在患者的血浆中定量,以确定抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的浓度何时已达其最大值。

[0698] 然后患者可以接受诸如由施用抗体或其抗原结合片段或药物-抗体缀合物的同一医师或由不同医师进行的外源性造血干细胞的输注(例如,静脉内输注)。医师可以例如从 1×10^3 个至 1×10^9 个CD34+细胞/kg的剂量向患者施用自体或同种异体的造血干细胞的输注。

[0699] 本领域技术医师可以在向人类患者施用能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体诸如本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC之后,评价自身免疫性疾病的临床表现。

[0700] 根据本文公开的方法,抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC可以施用至处于自身免疫性疾病的风险或患有自身免疫性疾病的人类患者。根据本文公开的方法,本领域技术医师可以向人类患者施用能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段、ADC或可溶性配体,诸如本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC。抗体、其片段或可溶性配体可以与毒素(诸如本文描述的或本领域已知的细胞毒性分子)或Fc结构域共价缀合。

[0701] 这种缀合可以使用本文描述的或本领域已知的共价键形成技术进行。抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物随后可以通过例如静脉内施用施用至处于自身免疫性疾病(例如,多发性硬化、类风湿性关节炎、肠道疾病、银屑病、狼疮和1型糖尿病)风险的患者。抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物随后可以通过例如静脉内施用施用至患有自身免疫性疾病(例如,多发性硬化、类风湿性关节炎、肠道疾病、银屑病、狼疮和1型糖尿病)的患者。

[0702] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以足以将宿主反应性淋巴细胞的数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的量施用。供体淋巴细胞计数的减少可以使用本领域已知的常规技术来监测,诸如通过对从患者抽取的血液样品中的表达特征性造血细胞表面抗原的细胞进行FACS分析来监测。例如,本领域技术医师可以在多个时间点从患者抽取血液样品并且通过进行FACS分析来确定CD134+或CD278+T细胞减少的程度,所述FACS分析使用与T细胞抗原结合的抗体来阐明样品中T细胞的相对浓度。针对自身免疫性疾病的效力可以通过本领域已知的测定(例如,来自血清样品的自身抗体应答测量、以及响应于自身抗原的T细胞增殖)来测量。

[0703] 抗CD134抗体或抗CD278抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以含有一种或更多种药学上可接受的赋形剂(诸如黏度调节剂)的水性溶液施用至患者。水性溶液可以使用本文描述的或本领域已知的技术灭菌。在将造血干细胞移植施用至患者之前,抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物可以以例如从0.001mg/kg至100mg/kg的剂量施用至患者。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或

药物-配体缀合物可以在最佳地促进自身免疫性疾病的预防和治疗的时间施用至患者。抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的量可以通过本领域已知的方法在患者的血浆中定量,以确定抗体、其抗原结合片段、药物-抗体缀合物或药物-配体缀合物的浓度何时已达其最大值。

[0704] 本文的方法提供了可以特异性靶向特别是同种异体反应性T细胞的手段。在同种异体移植后,人类患者中经常产生同种异体反应性T细胞。本文描述的疗法的一个优点是,方法通过使用对CD134或CD278细胞的特异性靶向节省了(spare)患者的免疫系统,使得免疫系统在很大程度上保持完整,允许更好的免疫恢复和保护免受感染。因此,在某些实施方案中,方法在没有常规免疫抑制药物的情况下进行,所述常规免疫抑制药物例如,甲氨蝶呤(Trexall®)、环孢菌素、他克莫司(tacrolimus)(Prograf®)、霉酚酸酯(CellCept®)、西罗莫司(Rapamune®)、皮质类固醇(甲基强的松龙或泼尼松)、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、阿仑单抗(alemtuzumab)(Campath®)或环磷酰胺(Cytosan®)。

[0705] 在某些实施方案中,本文描述的方法和组合物还可以与调节疗法组合使用。如本文使用的,术语“调节(condition)”和“调节(conditioning)”是指藉以准备患者用于接受包含干细胞(特别是造血干细胞)的移植物的过程。这样的调节方法促进了造血干细胞移植物的植入。调节疗法包括向移植物接受者(患者)施用剂,诸如ADC,其在患者接受移植物(诸如HSC)之前从患者选择性地清除干细胞和/或免疫细胞。例如,通过向患者施用能够与由造血干细胞表达的抗原(诸如CD117或CD45)结合的抗体或其抗原结合片段,可以调节患者以便进行造血干细胞移植疗法。抗体可以与细胞毒素共价缀合以便形成ADC。将能够与干细胞和/或免疫细胞上的抗原结合的抗体、其抗原结合片段或药物-抗体缀合物施用至需要造血干细胞移植(包括同种异体干细胞移植)的患者可以例如通过选择性地耗尽内源性造血干细胞从而产生被外源性造血干细胞移植物填充的空位来促进干细胞植入物的植入。在一种实施方案中,本发明包括调节人类患者用于接受造血干细胞(HSC)移植的方法,从而在移植之前将有效量的包含抗CD117单克隆抗体或抗CD45单克隆抗体和细胞毒素(例如,鹅膏蕈毒素)的ADC施用至患者,其中在调节步骤之前、同时和/或之后还向患者施用抗CD134 ADC或抗CD278 ADC,以去除表达CD134或CD278的活化的T细胞。这样的组合疗法通过降低对所移植的同种异体细胞的同种异体移植物排斥的风险或者治疗对所移植的同种异体细胞的同种异体移植物排斥来支持同种异体移植。可以与本文公开的方法和组合物组合使用的调节方法的实例可以见于美国专利第10,111,966号;WO 2017/219025;和US 2016/0324982,其中每一个都通过引用并入本文。

[0706] 本领域技术医师可以在向人类患者施用能够与CD134或CD278结合的抗体、其抗原结合片段或可溶性配体诸如本文描述的抗CD134抗体或抗CD278抗体或ADC之后,评价自身免疫性疾病的临床表现。

实施例

[0707] 示出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供可以如何使用、制备和评价本文描述的组合物和方法的描述,并且预期所述实施例是对本发明的单纯示例,并且不预期所述实施例限制本发明人视为其发明的范围。

[0708] 实施例1:CD134在静息和活化的T细胞上的表达

[0709] 确定了CD134在活化的和静息的T细胞两者上的表达。如图1中示出的,与染色的0小时对照(图1,左起第一幅图)相比,56.9%的T细胞在活化后24小时为CD134阳性(图1,左起第三幅图)。

[0710] 在图2中,评价了来自三个个体健康供体对照的新鲜全血的调节性T细胞(Treg)上的CD134表达。简而言之,将50 μ l的全血添加到96孔U底板。用针对人类CD3、CD4、CD8、CD25和CD134的抗体在4 $^{\circ}$ C对细胞进行30分钟的染色。通过添加200 μ l的裂解缓冲液(Qiagen)并在室温孵育10分钟,进行两次,来裂解红细胞。将细胞在PBS中洗涤一次,并且然后使用固定溶液(eBiosciences)在室温于黑暗中固定45分钟。将细胞在Perm溶液(eBiosciences)中洗涤两次,然后重悬于50 μ l Perm溶液中,并用FoxP3抗体或相关同种型对照染色。将经染色的样品在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,用PBS洗涤,并在流式细胞仪上运行。将Treg细胞确定为CD3+CD4+CD25+FoxP3+。针对匹配的同种型对照对CD134水平进行门控(gated)。

[0711] 这些数据证明CD134在活化的T细胞上表达,但没有在静息的T细胞或Treg上显著表达。

[0712] 实施例2:T细胞抗体结合测定

[0713] 测试了抗CD134抗体以确定其是否可以与活化的T细胞结合。

[0714] 根据以下方案进行图3和图4中描述的T细胞结合测定。从外周血单核细胞中负选择原代人类CD3+T细胞。在AimV培养基中用0.5:1的珠:细胞比例的抗CD3/抗CD28珠(Invitrogen)刺激细胞过夜。第二天,每个孔铺板20,000个活细胞,并用一级抗体(抗CD134抗体或抗CD278抗体)的滴定在4 $^{\circ}$ C染色4小时。在4 $^{\circ}$ C添加恒定量的二级抗小鼠AF488染料30分钟。洗涤后,在流式细胞仪上运行板,并基于AF488通道中的几何平均荧光强度确定结合。

[0715] 如图3中示出的,抗CD134克隆(抗体Ber-ACT35(小鼠IgG1))显示出与活化的T细胞的结合。抗体Ber-ACT35是鼠抗人类CD134抗体(Biolegend;目录#350002(日期为2019年1月17日))。抗CD134抗体443318(大鼠抗人类CD134抗体(大鼠IgG2a);Novus;目录#MAB3388-SP(日期为2019年1月17日))和抗CD134抗体7D6(小鼠抗人类CD134抗体(小鼠IgG1);Thermo Fisher Scientific,目录#MA5-1648(日期为2019年1月17日))也显示出高于阴性对照水平的与活化的T细胞的结合。小鼠IgG1和大鼠IgG2a用作阴性对照并且没有显示出结合。

[0716] 图4A描述了抗CD278抗体与活化的T细胞的结合。抗体C398.4A(仓鼠抗人类CD278抗体(BioLegend;目录#313502(日期为2019年1月17日))、抗体ISA-3(小鼠抗人类CD278抗体;Thermo Fisher;目录#14-9948-82(日期为2019年1月17日))、抗体669222(小鼠抗人类CD278抗体;Novus;目录#MAB6975(日期为2019年1月17日))、抗体669238(小鼠抗人类CD278抗体;Novus;目录#MAB69752-SP(日期为2019年1月17日))、抗体669230(小鼠抗人类CD278抗体;Novus;目录#MAB69751-SP)、抗CD278抗体DX29(小鼠抗人类CD278抗体;BD Biosciences;目录#557801(日期为2019年1月17日))、抗体3G4(小鼠抗人类;Novus;目录#H00029851-M02(日期为2019年1月17日))和抗体1G1(小鼠抗人类;Novus;目录#H00029851-M01(日期为2019年1月17日))。观察到抗体C398.4A、ISA-3、DX29和669238的结合高于同种型对照水平。

[0717] 图4A还包括了抗CD137抗体(“137-BBK2”)的结果,抗CD137抗体用作阳性对照,因为活化的T细胞的特征在于细胞表面上CD137的表达。图4B示出了图4A中的相同数据,但与

阳性对照(即抗CD45抗体)的结果进行了比较。活化的T细胞的特征在于细胞表面上CD45的高水平表达,并且因此图4B中的数据验证了图4A中使用的结合测定。

[0718] 图4C描述了抗CD134抗体与活化的T细胞的结合(注意这些数据与图3中的数据相同)。图4D示出了图3和图4A中的相同数据,但与来自阳性对照(即抗CD45抗体)的结果进行了比较。活化的T细胞的特征在于细胞表面上CD45的高水平表达,并且因此图4D中的数据验证了图4C中使用的结合测定。

[0719] 实施例3:抗CD134 ADC和抗CD278 ADC杀伤原代人类T细胞

[0720] 原代人类T细胞在靶向CD134或CD278的ADC和相关对照的存在下活化。被测试的ADC包括阴性的鹅膏素人类IgG1同种型对照(即M295)、抗CD134-鹅膏蕈碱ADC(即M299)、抗CD278 ADC(即M301)以及另一种抗CD278 ADC(即M300),M295是不与CD134或CD278结合并经由MC可裂解接头与 α 鹅膏蕈碱缀合的抗体(在图5和图6A中被称为“hIgG1-鹅膏蕈碱”),M299是经由MC可裂解接头与 α 鹅膏蕈碱缀合的抗体Ber-ACT35(ACT35)(在图5中被称为“CD134-鹅膏蕈碱”,并且在图6A中被称为“CD134-ACT35-mIgG1-鹅膏蕈碱”),M301是经由MC可裂解接头与 α 鹅膏蕈碱缀合的抗体669238(在图5中被称为“CD278-鹅膏蕈碱”,并且在图6A中被称为“CD278-669238-mIgG1-鹅膏蕈碱”),M300是经由MC可裂解接头与 α 鹅膏蕈碱缀合的抗体DX29(在图6A中被称为“CD278-DX29-mIgG1-鹅膏蕈碱”)。因此,毒素和接头在图5和图6A中测试的ADC之间是共同的。

[0721] 图5和图6中的T细胞杀伤测定如下进行:将冷冻保存的经负选择的原代人类T细胞解冻并且用0.5:1的珠:细胞比例的抗CD3/抗CD28珠(Invitrogen)刺激。在测定开始时,将 2×10^4 个T细胞接种在384孔板的每个孔中,并以30nM和0.003nM之间的多种浓度将抗体添加至细胞,然后放置在37°C和5%CO₂的培养箱中。细胞在培养4天后通过流式细胞术分析。细胞用活力标志物Live/Dead Yellow(Invitrogen)染色,并在体积流式细胞仪上运行。有活力的活化的细胞以及有活力的未活化的细胞的数目通过FSC对SSC确定。

[0722] 图5中的结果显示,与同种型hIgG1-鹅膏蕈碱ADC对照(即M295)相比,在暴露于抗CD278-669238-鹅膏蕈碱ADC(即M301)或抗CD134-ACT35-鹅膏蕈碱ADC(即M299)时,有活力的活化的(不成熟)T细胞的数目显著减少。因此,CD134-鹅膏蕈碱ADC和CD278-鹅膏蕈碱ADC两者在用活化的T细胞进行的T细胞测定中显示出杀伤。如上文描述的,hIgG1-鹅膏蕈碱ADC(即M295)用作阴性对照,并且此外,CD134-鹅膏蕈碱ADC和CD278-鹅膏蕈碱ADC包含mIgG抗体。还有约40%的ADC未缀合。图6A中的结果重现了图5中描述的结果,但还包括抗CD278-DX29-鹅膏蕈碱ADC(即M300)的结果。这些数据证明抗CD278-DX29-鹅膏蕈碱ADC(即M300)同样能够杀伤活化的T细胞。

[0723] 图6B中显示的结果显示出,与同种型hIgG1-MMAF ADC对照(即M303)相比,在暴露于抗CD134-ACT35-MMAF ADC(即M307)、抗CD278-DX29-MMAF ADC(即M308)和抗CD278-669238-MMAF ADC(即M309)时,有活力的活化的(不成熟)T细胞的数量减少。图5和图6一起证明了用本文使用的特定接头与鹅膏蕈碱缀合的抗CD134抗体和抗CD278抗体比用本文使用的特定接头与MMAF缀合的那些抗体更有效。

[0724] 实施例4:用Fab-皂草素进行的T细胞杀伤测定

[0725] 遵循实施例3中描述的方案,在T细胞杀伤测定中测试了与Fab-皂草素组合施用的抗CD134抗体和抗CD278抗体。结果在图7A和图7B中提供。

[0726] 图7A中描述的结果包括多种阳性对照(即,具有Fab-SAP的抗体)和多种阴性对照(即,没有Fab-SAP的抗体)。这些结果表明抗CD137抗体BBK2(Thermo Fisher;目录号MA5-13739)和mIgG1同种型对照在Fab-皂草素的存在下施用能够有效杀伤T细胞。结果显示,无论抗体如何,Fab-皂草素组中的细胞数量都较低,因为这些Fab-皂草素对细胞具有基线毒性(即同种型对照和抗CD134抗体BBK2在最低稀释度具有相似的细胞损失水平)。这些结果还表明,抗CD137抗体BBK2与Fab-皂草素的组合比同种型mIgG1与Fab-皂草素的组合更有效地杀伤T细胞,这可能是由于抗CD137抗体与活化的T细胞的结合更强,活化的T细胞在细胞表面表达CD137。图7B中的结果显示,抗CD134抗体(ACT35)和抗CD278抗体(DX29和669238)两者,当与Fab-皂草素组合施用,与具有Fab-皂草素的抗CD137抗体BBK2相似的水平有效杀伤活化的T细胞。

[0727] 下文的表中提供了抗体描述的要点:

样品 ID/M#	mAb/L-T 描述
M295	hIgG 同种型-MC-可裂解- α -鹅膏蕈碱
M299	纯化的抗人类 CD-134 (OX40) Be-ACT35 (ACT35)-MC-可裂解- α -鹅膏蕈碱
[0728] M300	纯化的小鼠抗人类 CD278 (mIgG1 DX-29)-MC-可裂解- α -鹅膏蕈碱
M301	抗 ICOS (669238) MA69752-SP-MC-可裂解- α -鹅膏蕈碱
M303	hIgG 同种型-MC-MMAF
M307	纯化的抗人类 CD-134 (OX40) Be-ACT35 (ACT35)-MC-MMAF
M308	纯化的小鼠抗人类 CD278 (mIgG1 DX-29)-MC-MMAF
M309	抗 ICOS (669238) MA69752-SP-MC-MMAF

[0729] 序列表

序列标识符	描述	序列
[0730] SEQ ID NO: 1	人类CD134 (NCBI参考序列: NP_003318.1)	MCVGARRLRGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGD TYPNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRP CGPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLC TATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGH FSPGDNOACKPWTNCTLAGKHTLOPASNSSDAIC EDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTS QGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAIL LALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQA DAHSTLAKI
SEQ ID NO: 2	人类CD278 (NCBI参考序列: NP_036224.1)	MKSGLWYFFLFLCLRIKVLGTGEINGSANYEMFIFHN GGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGQILCDLTKTKG SGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDSHAN YYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLK FWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDP NGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

[0731] 其他实施方案

[0732] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体和单独地指示通过引用并入的相同程度。

[0733] 虽然已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但是将理解,本发明能够具有进一步的修改,并且本申请意图覆盖本发明的任何变化形式、用途或修改,所述本发明的任何变化形式、用途或修改在总体上遵循本发明的原则,并且包括在本发明所属领域内已

知或惯用实践之内的并且可以被应用于上文阐述的必要特征并且落入权利要求书的范围的本发明的这样的偏离。

[0734] 其他实施方案在权利要求书内。

序列表

- <110> 美真达治疗公司
 <120> 用于耗尽CD134+细胞的组合物和方法
 <130> M103034 1380W0 (0206.7)
 <140>
 <141>
 <150> 62/619,106
 <151> 2018-01-18
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
           20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
           35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
           50           55           60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65           70           75           80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
           85           90           95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
           100          105          110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
           115          120          125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
           130          135          140
Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145          150          155          160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
           165          170          175
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
  
```

	180		185		190
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu					
	195		200		205
Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val					
	210		215		220
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu					
225		230		235	240
Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly					
	245		250		255
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser					
	260		265		270
Thr Leu Ala Lys Ile					
	275				
<210> 2					
<211> 199					
<212> PRT					
<213> 智人 (Homo sapiens)					
<400> 2					
Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys					
1	5		10		15
Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile					
	20		25		30
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val					
	35		40		45
Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp					
	50		55		60
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu					
65		70		75	80
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu					
	85		90		95
Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser					
	100		105		110
Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu					
	115		120		125
His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro					
	130		135		140
Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu					
145		150		155	160
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro					

				165					170					175				
Asn	Gly	Glu	Tyr	Met	Phe	Met	Arg	Ala	Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser			
				180					185					190				
Arg	Leu	Thr	Asp	Val	Thr	Leu												
				195														

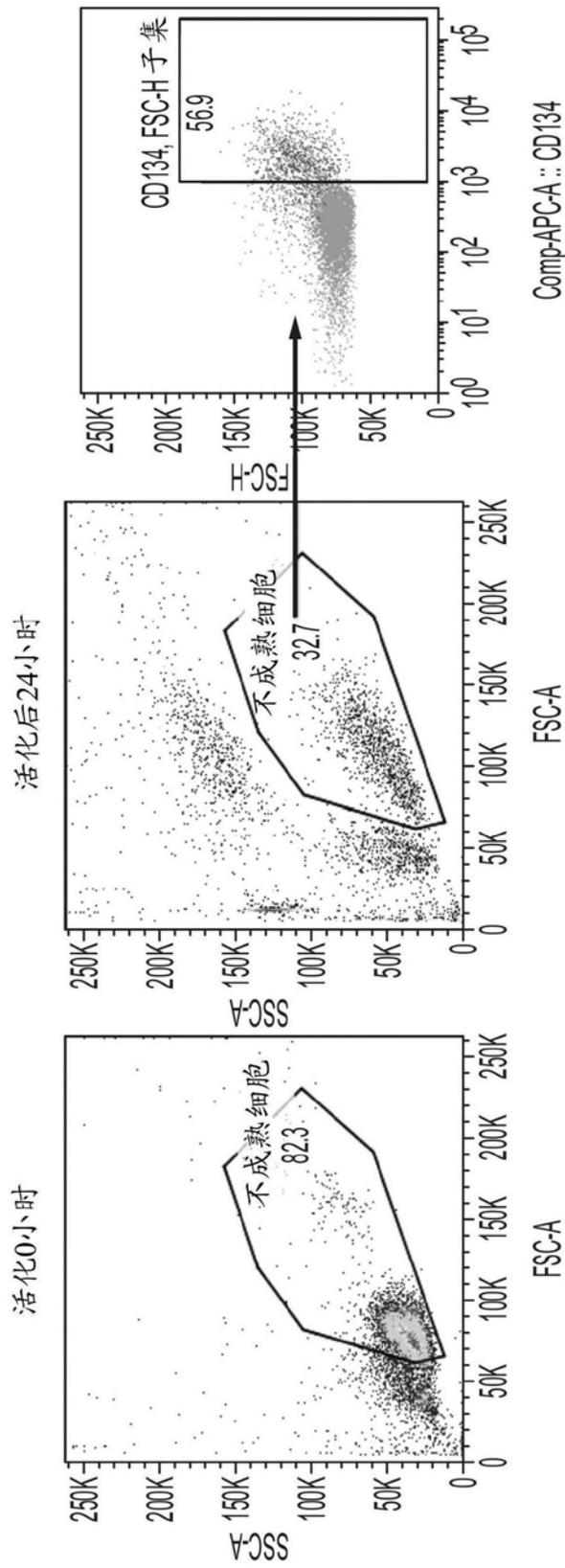


图1

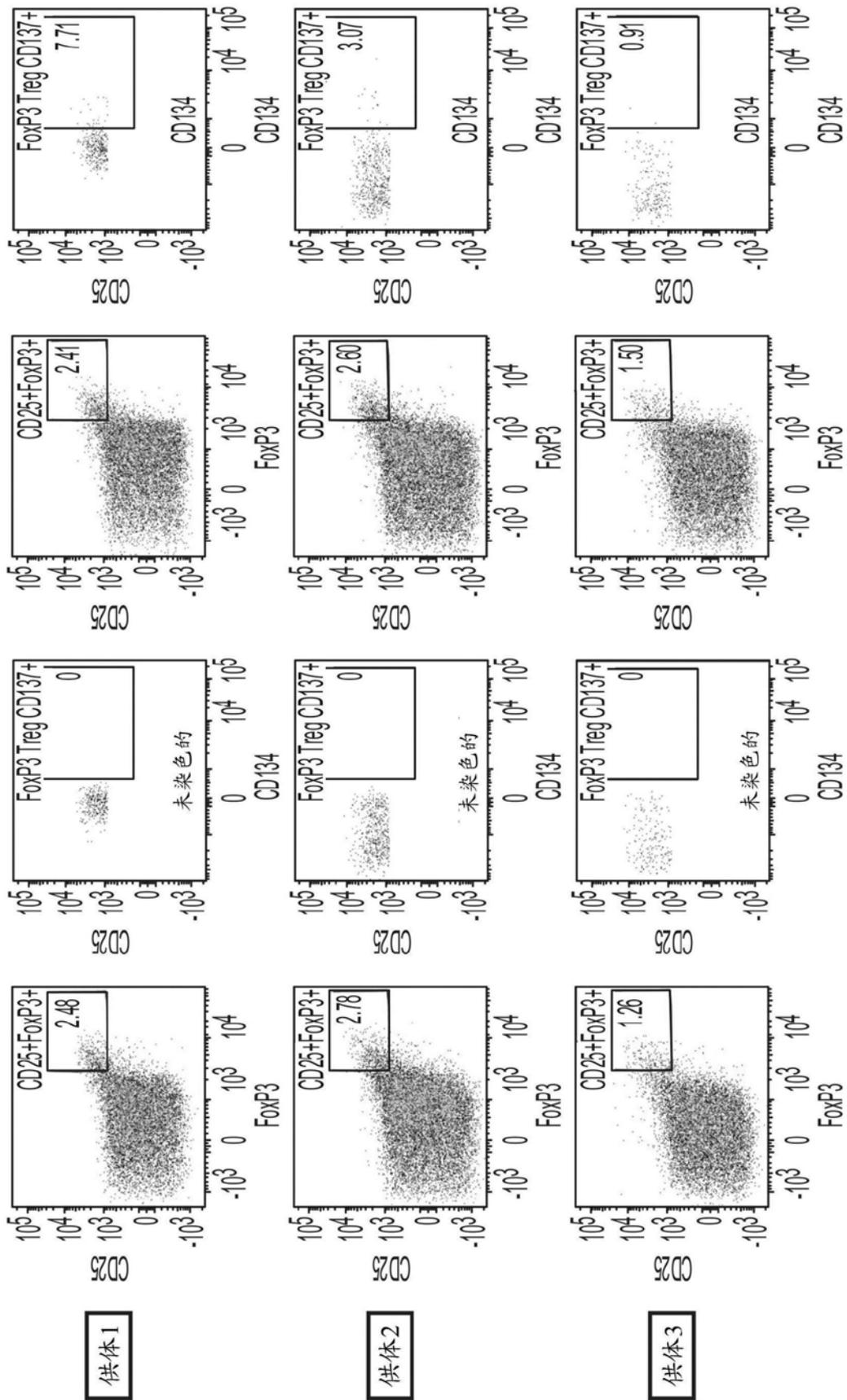


图2

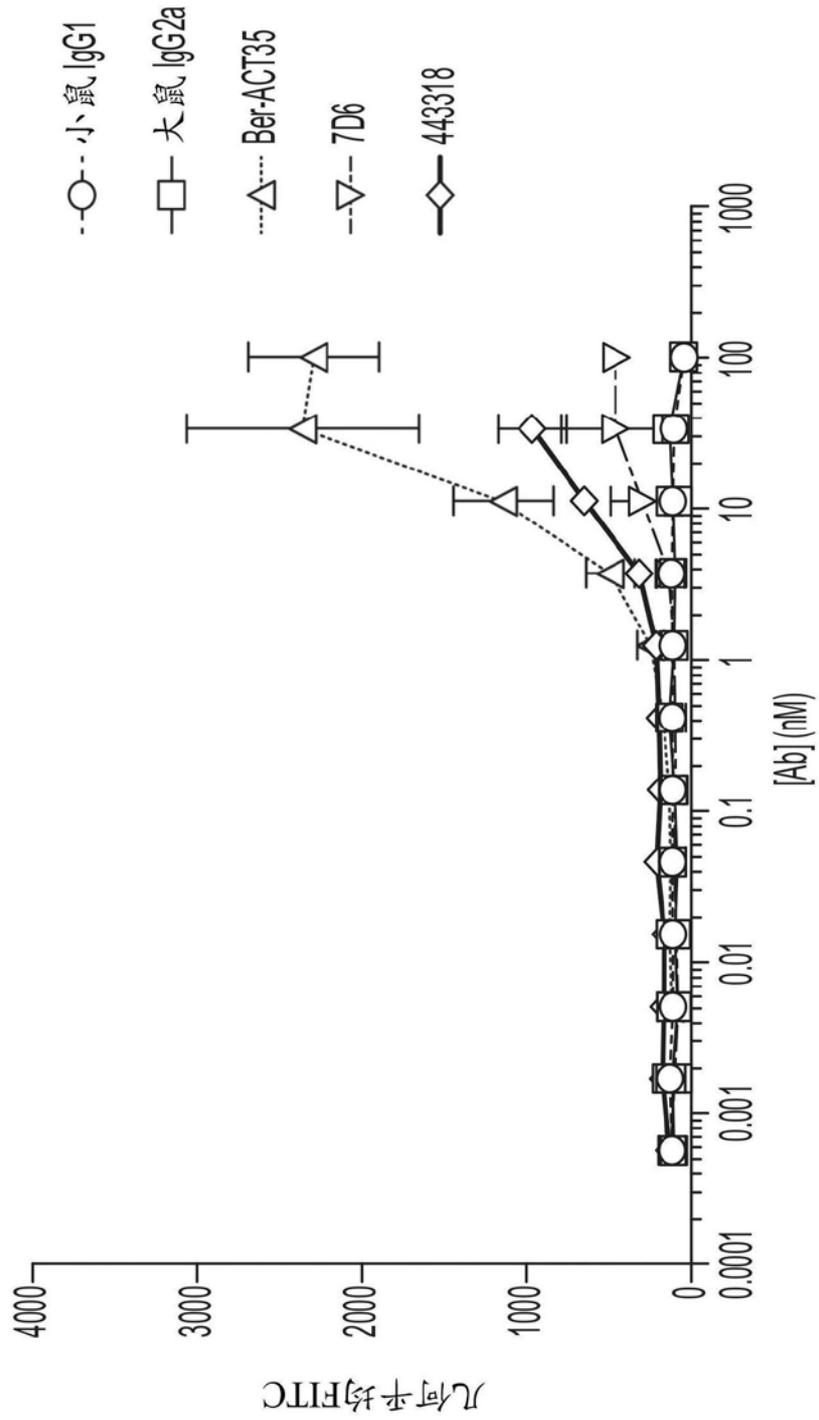


图3

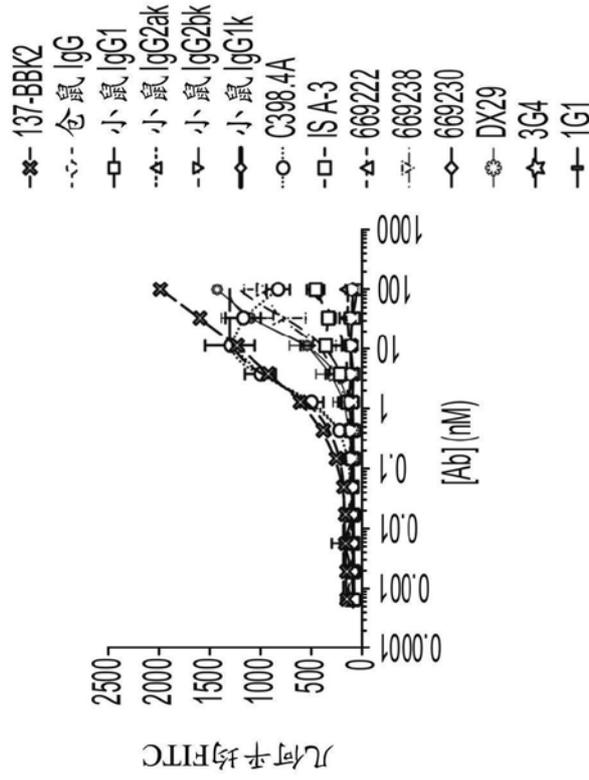


图4A

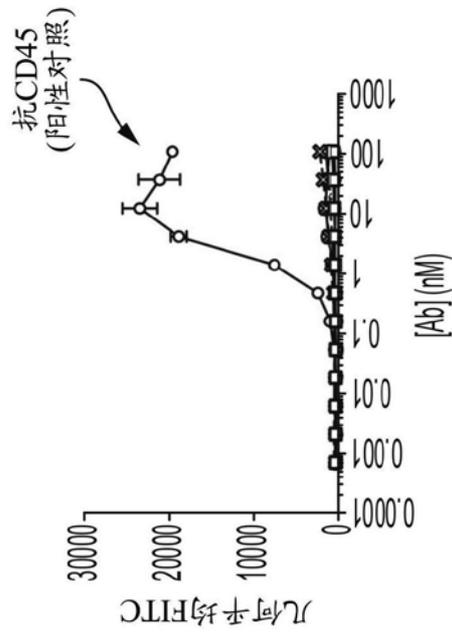


图4B

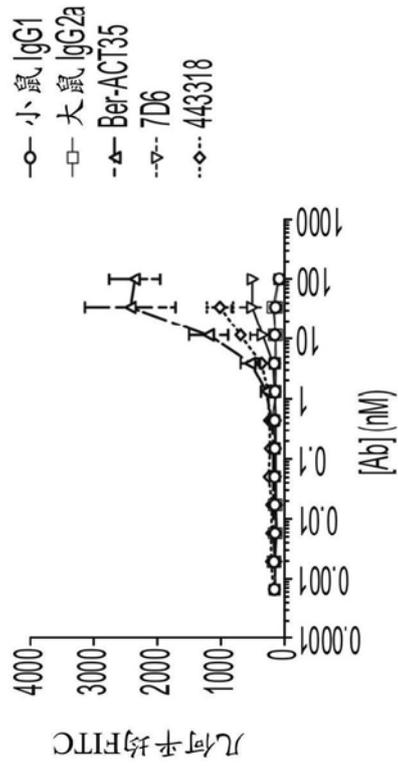


图4C

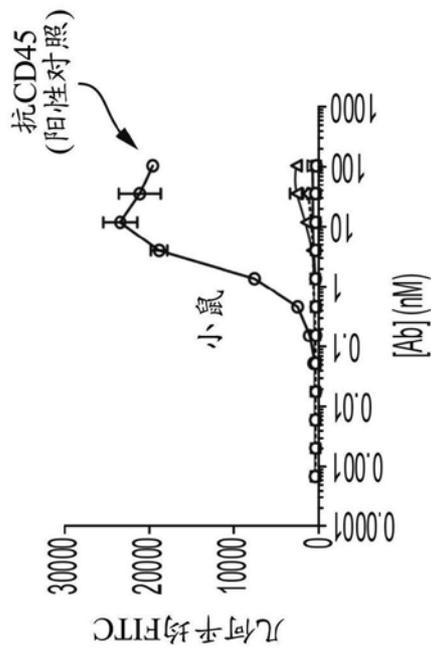


图4D

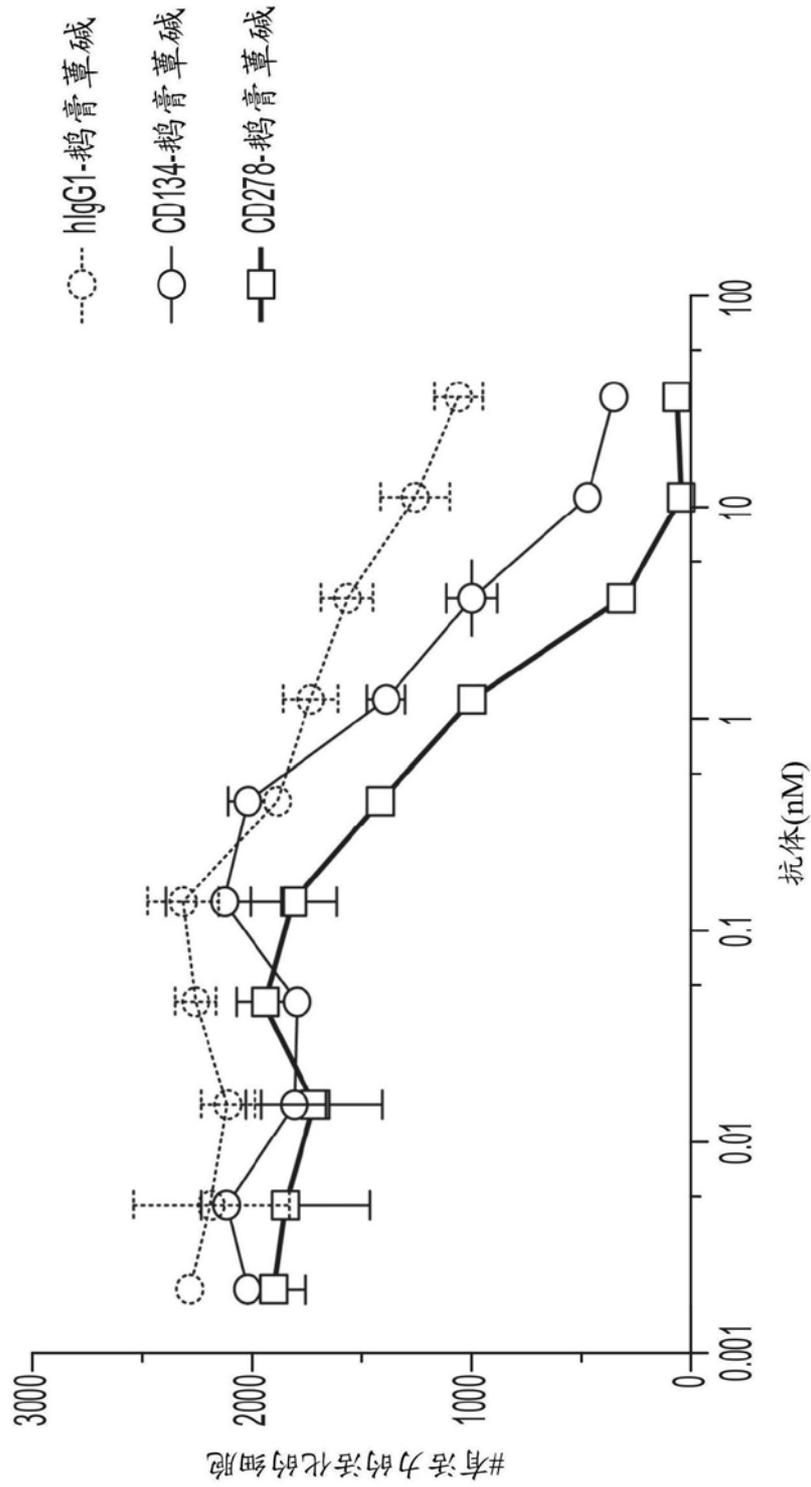


图5

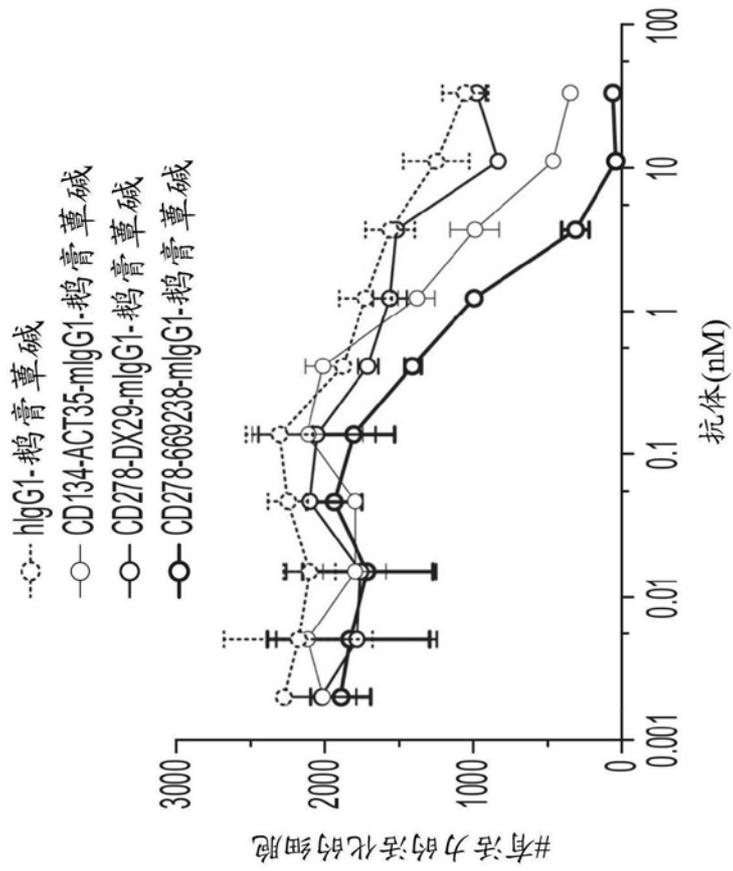


图6A

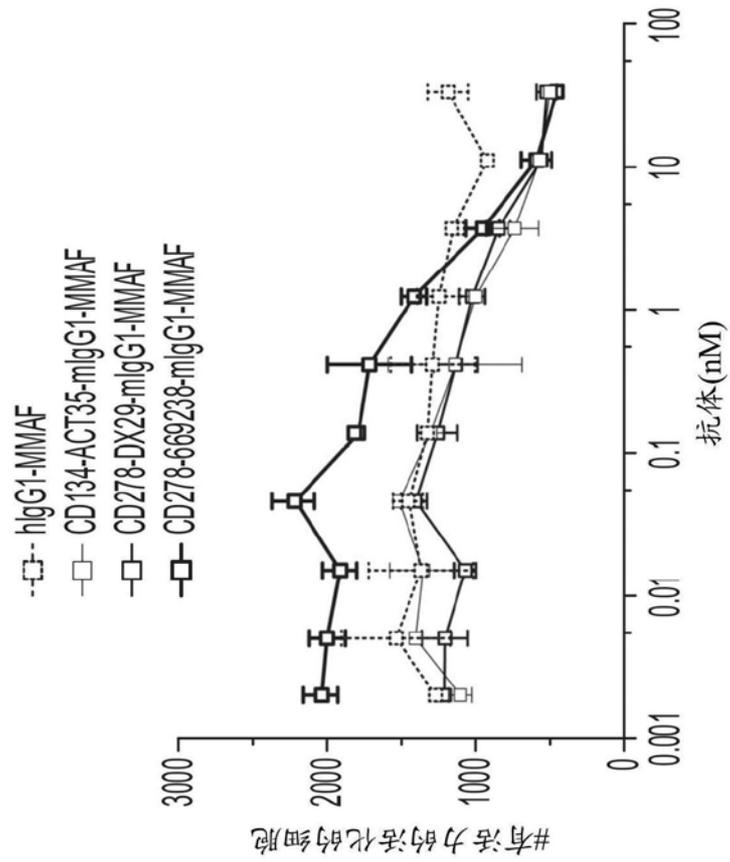


图6B

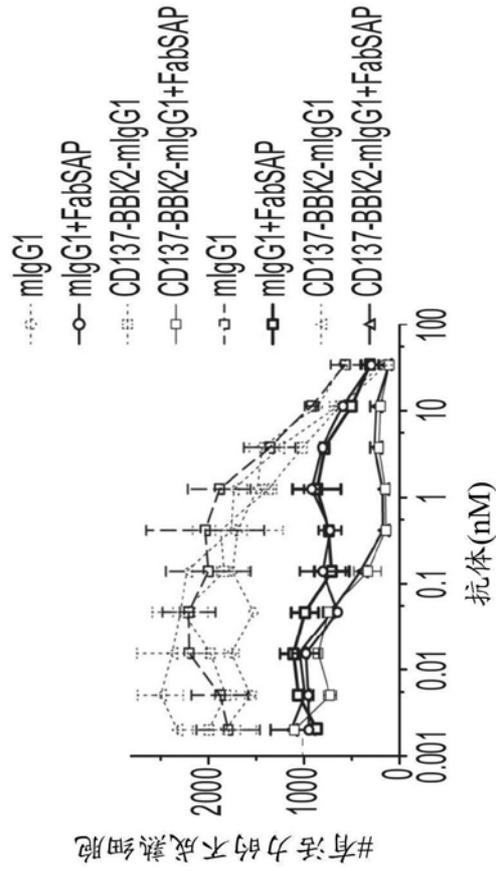


图7A

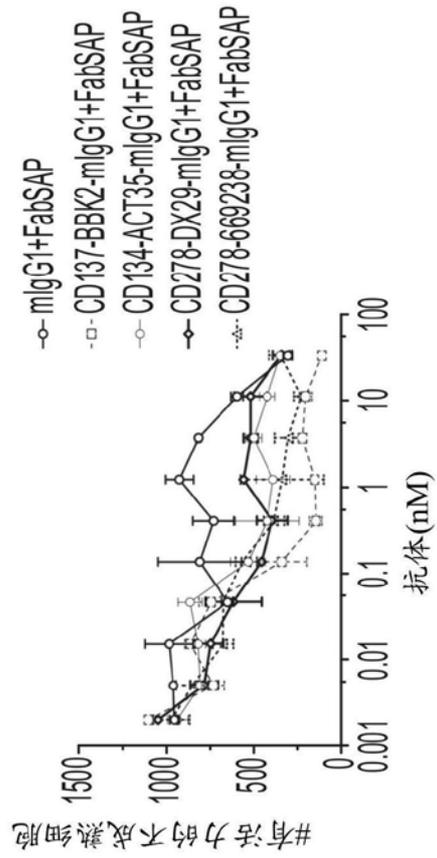


图7B