(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107735093 A
(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201680034011.9

(22)申请日 2016.06.09

(30)优先权数据
62/175,121 2015.06.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/036631 2016.06.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/201065 EN 2016.12.15

(71)申请人 西雅图基因公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 M·K·萨瑟兰 L·韦斯滕多夫 D·萨斯曼

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶家蓉 余颖

(51)Int.Cl.
A61K 31/5513(2006.01)
A61K 31/5517(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
C07K 16/28(2006.01)

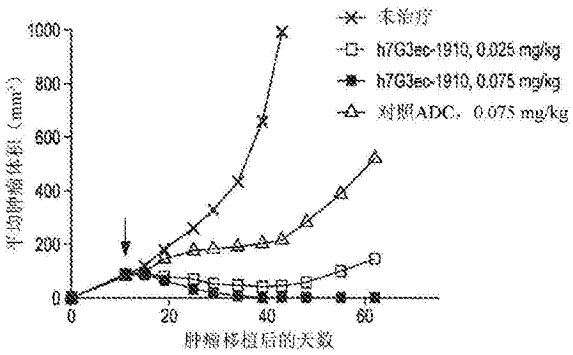
权利要求书5页 说明书26页
序列表10页 附图6页

(54)发明名称

CD123抗体和其结合物

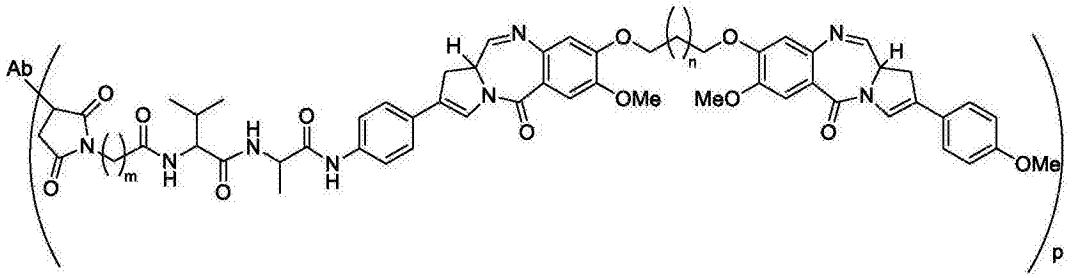
(57)摘要

本发明提供了与CD123特异性结合的鼠类、嵌合和人类化抗体和其结合物。



CN 107735093 A

1.一种具有下式的抗CD123抗体-药物结合物化合物，



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物；其中

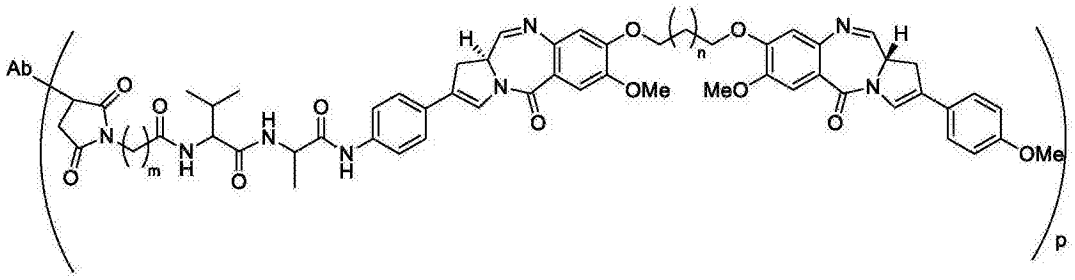
下标n为1或3；

下标m为2到5

Ab为抗CD123完整抗体或其抗原结合片段，包含具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的轻链可变区；

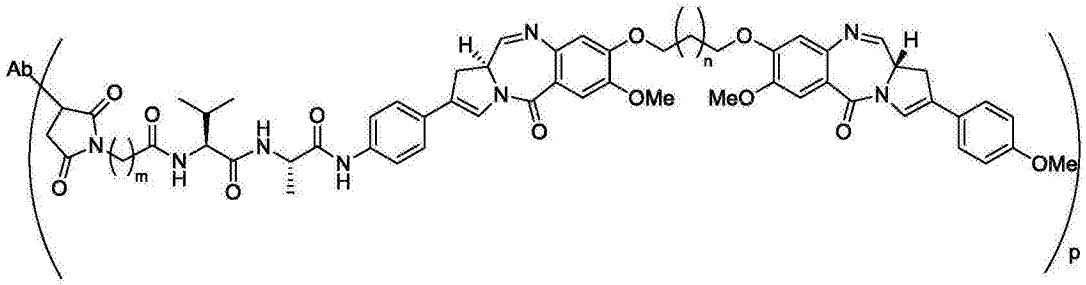
下标p为1到4的整数。

2.根据权利要求1所述的具有下式的化合物，



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物。

3.根据权利要求1所述的具有下式的化合物，



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物。

4.根据权利要求1到3中任一项所述的化合物，其中n为1。

5.根据权利要求1到3中任一项所述的化合物，其中n为3。

6.根据权利要求1到5中任一项所述的化合物，其中m为5。

7.根据权利要求1到6中任一项所述的化合物，其中与Ab的连接通过Ab中改造的半胱氨酸残基的硫原子实现。

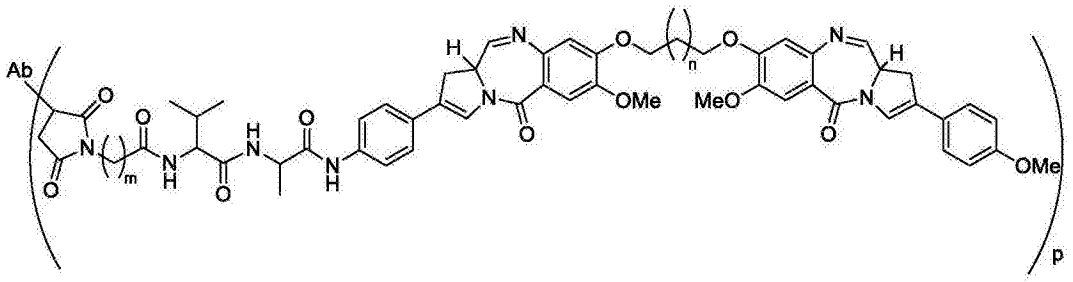
8.根据前述权利要求中任一项所述的化合物，其中Ab包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列并与人重链恒定区融合；并且所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列并与人轻链恒定区融合。

9.根据权利要求8所述的化合物，其中Ab包含具有SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的重

链和具有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的轻链，并且与Ab的连接通过硫原子或根据EU编号索引系统在所述重链恒定区的位置239的改造的半胱氨酸残基实现。

10.根据前述权利要求中任一项所述的化合物，其中p为2。

11.一种药物组合物，包含抗CD123抗体-药物结合物分子群体，所述分子具有下式：



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物；其中

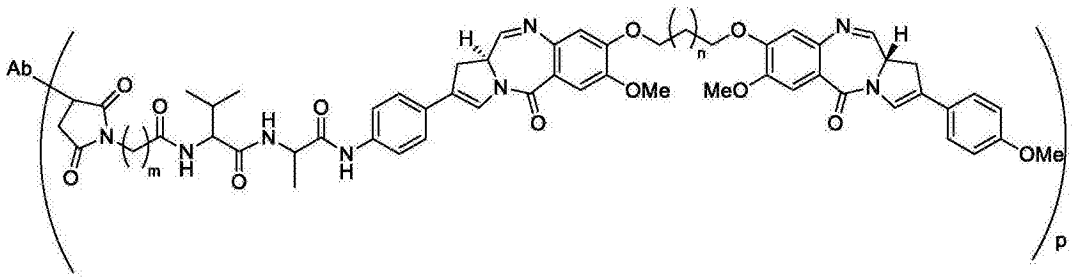
下标n为1到3；

下标m为2到5

Ab为抗CD123完整抗体或其抗原结合片段，包含具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的轻链可变区；

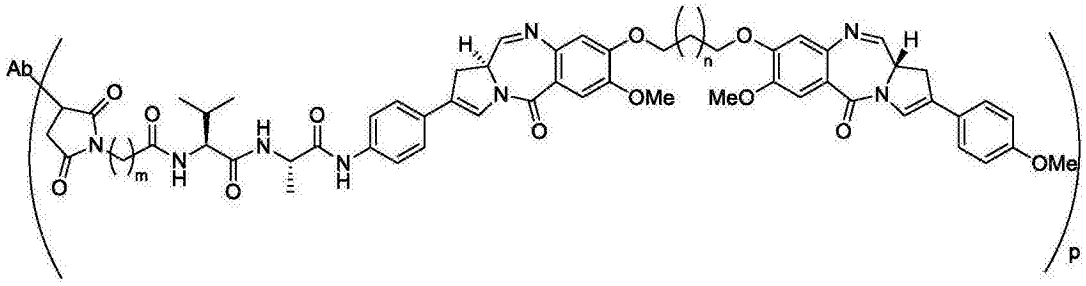
下标p为1到4的整数；并且所述组合物的平均药物载荷为约2。

12.根据权利要求11所述的药物组合物，其中所述抗体-药物结合物分子具有下式：



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物。

13.根据权利要求11所述的药物组合物，其中所述抗体-药物结合物分子具有下式：



或者药学上盐、溶剂合物，或所述盐的溶剂合物。

14.根据权利要求11到13中任一项所述的药物组合物，其中n为1。

15.根据权利要求11到13中任一项所述的药物组合物，其中n为3。

16.根据权利要求11到15中任一项所述的药物组合物，其中m为5。

17.根据权利要求11到16中任一项所述的药物组合物，其中与Ab的连接通过Ab中改造的半胱氨酸残基的硫原子实现。

18.根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物，其中Ab包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列并与人重链恒定区融合；并且所

述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列并与人轻链恒定区融合。

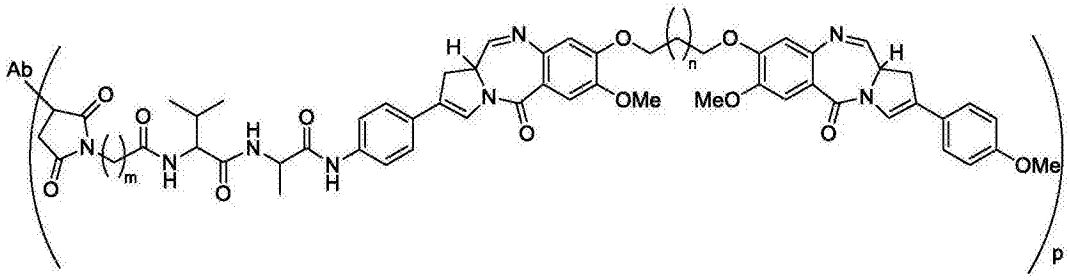
19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中Ab包含具有SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的轻链,并且与Ab的连接通过硫原子或根据所述EU编号索引系统在所述重链恒定区的位置239的改造的半胱氨酸残基实现。

20.根据权利要求11到19中任一项所述的药物组合物,其中p为1或2。

21.根据权利要求11到20中任一项所述的药物组合物,为含水形式。

22.根据权利要求11到20中任一项所述的药物组合物,为冻干形式。

23.一种抗体-药物结合物组合物,包含抗CD123抗体-药物结合物分子群体,所述分子具有下式:



或者药学上盐、溶剂合物,或所述盐的溶剂合物;其中

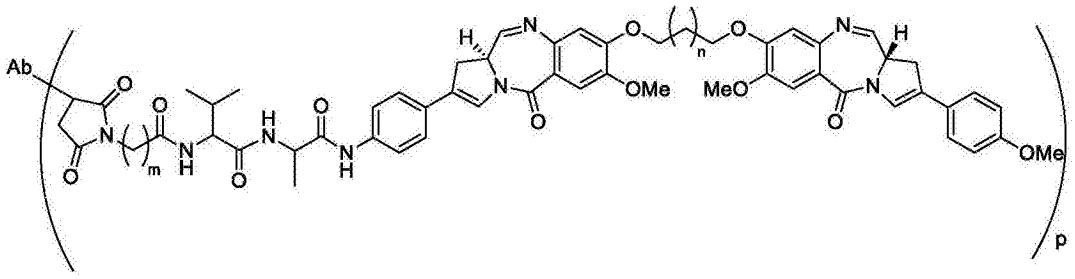
下标n为1到3;

下标m为2到5

Ab为抗CD123完整抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的轻链可变区;并且

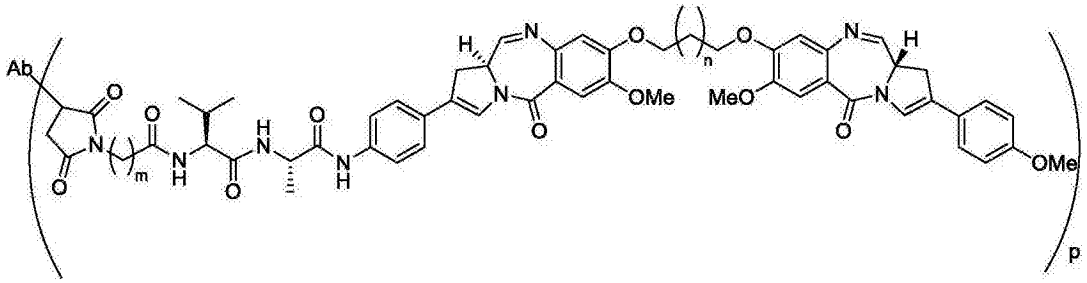
下标p为1到4的整数;并且所述组合物的平均药物载荷为约2。

24.根据权利要求23所述的组合物,其中所述抗体-药物结合物分子具有下式:



或者药学上盐、溶剂合物,或所述盐的溶剂合物。

25.根据权利要求23所述的组合物,其中所述抗体-药物结合物分子具有下式:



或者药学上盐、溶剂合物,或所述盐的溶剂合物。

26.根据权利要求23到25中任一项所述的组合物,其中n为1。

27.根据权利要求23到25中任一项所述的组合物,其中n为3。

28.根据权利要求23到27中任一项所述的组合物，其中m为5。

29.根据权利要求23到28中任一项所述的组合物，其中与Ab的连接通过Ab中改造的半胱氨酸残基的硫原子实现。

30.根据权利要求23到29中任一项所述的组合物，其中Ab包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列并与人重链恒定区融合；并且所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列并与人轻链恒定区融合。

31.根据权利要求30所述的组合物，其中Ab包含具有SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的轻链，并且与Ab的连接通过硫原子或根据所述EU编号索引系统在所述重链恒定区的位置239的改造的半胱氨酸残基实现。

32.一种抗CD123完整抗体或其抗原结合片段，包含具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的轻链可变区。

33.根据权利要求32所述的抗体，其中所述重链可变区与重链恒定区融合；并且所述轻链可变区与轻链恒定区融合。

34.根据权利要求32所述的抗体，包含具有SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的轻链。

35.一种治疗患有表达CD123的癌症的患者的方法，包含给所述患者施用有效方案的根据权利要求11到21中任一项所述的药物组合物。

36.根据权利要求35所述的方法，其中所述癌症为急性骨髓性白血病(AML)。

37.根据权利要求35所述的方法，其中所述癌症为骨髓增生异常综合征(MDS)、B-细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、毛细胞白血病、范可尼贫血、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、霍奇金病、未成熟T细胞急性淋巴细胞白血病(未成熟T-ALL)、伯基特淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)，或套细胞淋巴瘤。

38.根据权利要求32到34中任一项所述的完整抗体或抗原结合片段，与细胞毒性剂结合。

39.根据权利要求38所述的完整抗体或抗原结合片段，其中所述细胞毒性剂为美登醇、阿里他汀、吡咯并[1,4]苯二氮卓、吲哚啉并苯二氮卓，或恶唑烷并苯二氮卓。

40.一种药物组合物，包含根据权利要求38或39所述的完整抗体或其抗原结合片段。

41.一种抗CD123完整抗体或其抗原结合片段，包含具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的重链可变区，条件是H20被M或V占据，H38被K或R占据，H48被I占据，H66被K或R占据，H67被A占据，H69被L占据，H71被V占据，H73被R占据，H81被E或H占据，H82A被S或N占据，并且H93被T占据；以及具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的轻链可变区，条件是L2被F占据，L19被A或V占据，L21被I或M占据，L22被N或S占据，L38被L占据。

42.根据权利要求41所述的完整抗体或其抗原结合片段，为HALA、HALB、HBLA、HBLB，或HCLB。

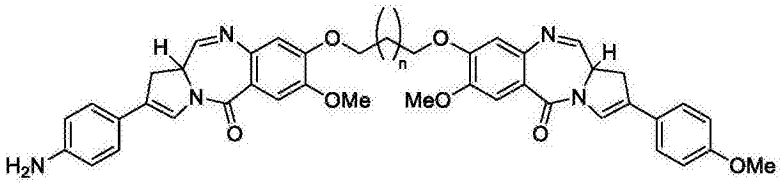
43.根据权利要求41或42所述的抗体，其中所述重链可变区与重链恒定区融合；并且所述轻链可变区与轻链恒定区融合。

44.根据权利要求41到43中任一项所述的完整抗体或抗原结合片段，与细胞毒性剂结合。

45.根据权利要求44所述的完整抗体或抗原结合片段，其中所述细胞毒性剂为美登醇、

阿里他汀、吡咯并[1,4]苯二氮卓、吲哚啉并苯二氮卓,或恶唑烷并苯二氮卓。

46.根据权利要求45所述的完整抗体或抗原结合片段,其中所述细胞毒性剂为



其中下标n为1或3;或其药学上可接受的盐、溶剂合物,或所述盐的溶剂合物。

47.一种药物组合物,包含根据权利要求44或45或46所述的完整抗体或其抗原结合片段。

CD123抗体和其结合物

背景技术

CD123是IL-3受体的70kD蛋白跨膜α链，也称作IL3R-α。已知CD123会在原代AML样品上表达，并且在许多恶性细胞上已经有过报道。本发明提供了CD123抗体和其结合物。

发明内容

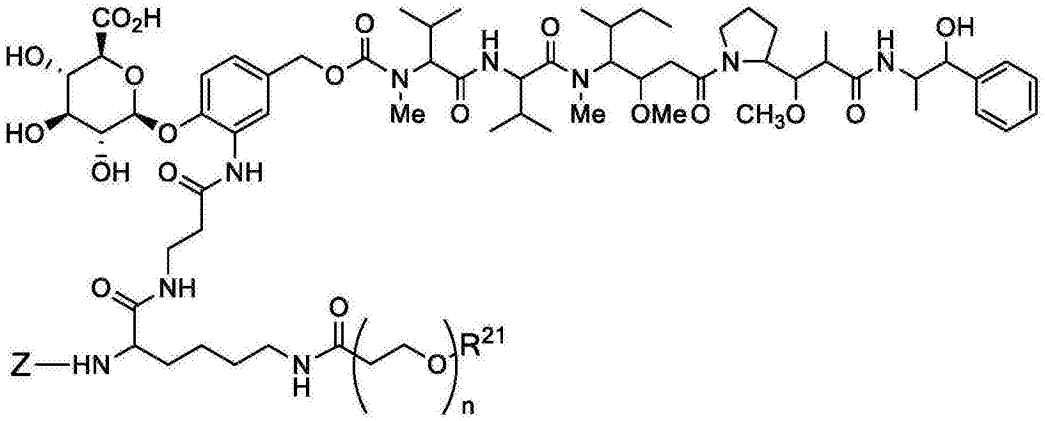
[0001] 本文提供了抗CD123抗体和CD123定向的抗体-药物结合物。特别地，本文提供了CD123定向的吡咯并苯二氮卓("PBD")抗体-药物结合物，以及使用此类结合物来治疗表达CD123的病症的方法。优选抗CD123抗体为嵌合或人类化形式的鼠类7G3抗体(Sun等，Blood，1996，87(1)：83-92)。鼠类7G3抗体包含具有SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列的轻链可变区。用于本文的优选人类化7G3抗体是使用人种系序列hIGHv1-2和重链可变区的J外显子J_H-1以及人种系序列hIGKv4-1和轻链可变区的J外显子J_K-2构建的抗体。特别优选的人类化7G3抗体包含SEQ ID NO:1中所示重链可变区和SEQ ID NO:2中所示轻链可变区。

用于本发明的抗体可以是完整抗体或其抗原结合片段。人类化7G3抗体可具有与重链恒定区融合的成熟重链可变区和与轻链恒定区融合的成熟轻链可变区。重链恒定区可以是天然存在的或突变形式的人恒定区(例如SEQ ID NO:5、用半胱氨酸替代位置239的丝氨酸的重链IgG1恒定区、(S239C)或SEQ ID NO:6)。重链恒定区可以是IgG1同种型。示范性的轻链恒定区氨基酸序列在SEQ ID NO:7中列出

本文所述的嵌合或人类化7G3抗体与药物连接物结合，包括PBD药物连接物，以提供CD123抗体-药物结合物。连接可通过常规或位点特异性结合方法实现。示范性的连接通过根据Kabat中所列EU索引在重链恒定区的位置239的改造的半胱氨酸实现。CD123定向的抗体-药物结合物用来治疗表达CD123的疾病，包括表达CD123的癌症，例如AML。

在其它实施例中，本文所述的嵌合或人类化7G3抗体与药物连接物结合，包括葡糖苷酸-PEG化的MMAE药物连接物，以提供CD123抗体-药物结合物。

在进一步的实施例中，与人类化7G3抗体连接的药物连接物具有下式：



或其药学上可接受的盐，其中Z表示具有能够与抗体上的官能团反应形成与其的共价连接的反应位点的有机基团，n为8到36，R^{PR}为氢或保护基团，R^{21}为聚乙二醇基团的封端单

元。

在本公开的一些实施例中，n值可为8到14。在本公开的其它实施例中，n值为10到12。在本公开的进一步的实施例中，n值为12。在另一个实施例中，R^{21}为-CH_3或-$CH_2CH_2CO_2H$。

在另一个实施例中，任何所公开的PEG化的MMAE抗体-药物结合物具有8的p值。在另一个实施例中，药物连接物通过抗体的链间二硫化物的半胱氨酸残基与抗体连接。

附图说明

图1显示测试人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物针对与CD33相比表达低拷贝的CD123的MDR+阳性的AML细胞系KG-1的体外细胞毒性分析结果。尽管拷贝数低，但是h7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物仍显示出强有力的活性。

图2显示测试人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物针对与CD33相比表达低拷贝的CD123的MDR+阳性AML细胞系Kasumi-1的体外细胞毒性分析结果。尽管拷贝数低，但是h7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物仍显示出强有力的活性。

图3显示AML异种移植模型THP-1的结果，显示人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物展示出强有力的活性，尽管拷贝数低。活性与CD33抗体-药物结合物相当，尽管拷贝数更低。

图4显示AML异种移植模型KG1-INV的结果，显示人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物展示出强有力的活性和与CD33抗体-药物结合物相当的活性，尽管拷贝数更低。

图5显示鼠类7G3抗体的重链可变区和人类化vHA、vHB和vHC重链的氨基酸序列，以及所选人种系受体可变区序列。

图6显示鼠类7G3抗体的轻链可变区和人类化vLA和vLB轻链的氨基酸序列，以及所选人种系受体可变区序列。

图7显示AML异种移植模型HNT-34的结果，显示人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物展示出强有力的细胞毒活性。

图8显示一种AML异种移植模型(弥散性Molm-13AML模型)的结果，显示人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物展示出强有力的细胞毒活性。

图9显示一种AML异种移植模型(原代MDR+AML弥散性模型)的结果，显示人类化7G3ec SGD-1910抗体-药物结合物展示出强有力的细胞毒活性。

定义

如本文所使用的术语“单克隆抗体”是指抗体由基本上同质的抗体群体得到的抗体，即组成所述群体的各单独抗体都是相同的，除了可能的可以少量天然存在的变种。修饰词“单克隆”表示由基本上同质的抗体群体得到的抗体的特征，但不能解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。例如，根据本发明待用的单克隆抗体可通过首先被Kohler等在(1975)Nature 256:495中所述的杂交瘤方法制得，或者可通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4816567)制得。“单克隆抗体”可使用例如Clackson等(1991)Nature,352:624-628和Marks等(1991)J.Mol.Biol.,222:581-597中所述的技术从噬菌体抗体库分离，或者可通过其它方法制得。本文所述的抗体为单克隆抗体。

抗体通常以分离形式提供。这意味着相对于由其生产或纯化产生的干扰蛋白和其它污染物而言抗体通常为至少50％w/w纯，但是并不排除抗体可能与过量的药学上可接受的载体或旨在帮助其使用的其它运载体结合。有时相对于来自生产或纯化的干扰蛋白和污染物

而言抗体为至少60％、70％、80％、90％、95或99％w/w纯。抗体(包括分离抗体)可与细胞毒性剂结合并作为抗体药物结合物提供。

“分离的”多聚核苷酸是指已经被确认并分离的多聚核苷酸和/或从其天然物的组分回收的多聚核苷酸。

单克隆抗体与其靶抗原的特异性结合意思是至少10^6、10^7、10^8、10^9,或$10^{10}M^{-1}$的亲和力。特异性结合在强度上可检测地更高,并且可与发生在至少一个不相关靶点的非特异性结合区别。特异性结合可以是特定官能团之间键的形成或特定空间拟合(例如锁钥类型)的结果,而非特异性结合则通常是范德华力的结果。CD123定向的抗体-药物结合物和抗CD123抗体与CD123特异性结合。

基本抗体结构单元为亚单元的四聚体。每个四聚体包括两组相同的多肽链对,每对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括由约100到110个或更多个氨基酸组成的可变区,主要负责抗原识别。该可变区首先被表达与可切割信号肽链接。有时无信号肽的可变区称作成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区意思是无轻链信号肽的轻链可变区。轻链分类为κ或λ。重链分类为γ、μ、α、δ,或ε,并将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,下标和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区域连接,重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区域。(一般可参见Fundamental Immunology(Paul,W.,编辑,第2版,Raven Press,纽约,1989年,第7章,针对所有目的通过引用整体并入本文)。每组轻链/重链对的成熟可变区形成抗体结合位点。因此,完整抗体具有两个结合位点。各链均展示由三个高变区(也称作互补决定区或CDR)连接而成的相对保守的骨架区(FR)的相同总结构。来自每对的两条链的CDR通过骨架区连成一行,使得能够与特异性表位结合。从N-端到C-端,轻链和重链均包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4结构域。每个结构域的氨基酸分配根据以下文献中的定义进行:Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州,1987年和1991年)或Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987年);Chothia等,Nature 342:878-883(1989年)。Kabat还提供了广泛使用的编号惯例(Kabat编号系统),其中为不同重链可变区之间或不同轻链可变区之间相应的残基分配相同的编号。对重链恒定区编号通过Kabat(Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州,1987年和1991年)中所列EU索引进行。

术语“抗体”包括完整抗体和其抗原结合片段。“完整抗体”是包含抗原结合可变区以及轻链恒定结构域(C_L)和重链恒定结构域C_H1、C_H2、C_H3和C_H4的抗体,以适于所述抗体种类。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。抗体片段与它们衍生自的完整抗体竞争,以与包括分离的重链、轻链Fab、Fab’、$F(ab')_2$、F(ab)c、双价抗体、结构域抗体、纳米抗体和Fv的靶标特异性结合。各片段可通过重组DNA技术,或者通过完整免疫球蛋白的酶催化分离或化学分离产生。术语“抗体”还包括二价抗体(同源二聚体Fv片段)或微型抗体(V_L-V_H-C_H3)、双特异性抗体等。双特异性或双功能抗体是具有两组不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体(参见例如Songsivilai和Lachmann,Clin.Exp.Immunol.,79:315-321(1990年);Kostelny等,J.Immunol.,148:1547-53(1992年))。

术语“患者”包括接受预防性治疗或治疗性治疗的人和其它哺乳动物对象。

为了将氨基酸取代归类为保守性或非保守性的目的，氨基酸被分组如下：第I组(疏水性侧链)：met、ala、val、leu、ile；第II组(中性亲水性侧链)：cys、ser、thr；第III组(酸性侧链)：asp、glu；第IV组(碱性侧链)：asn、gln、his、lys、arg；第V组(影响链取向的残基)：gly、pro；以及第VI组(芳香侧链)：trp、tyr、phe。保守性取代涉及同类氨基酸之间的取代。非保守性取代是这些类中的一类的一个成员与另一类的一个成员之间的交换。

序列一致性百分比使用通过Kabat编号惯例最大比对的抗体序列来确定。在比对后，如果对象抗体区域(例如重链或轻链的完整的成熟可变区)是与参照抗体的相同区域进行对比，则对象和参照抗体区域之间的序列一致性百分比是将对象和参照抗体区域中相同的氨基酸所占据的位置的数量除以两个区域的比对位置总数，不计算空位，乘以100转化为百分比。

“包含”一个或多个所述元素的组合物或方法可包括未特定述及的其它元素。例如，包含抗体的组合物可仅含有抗体或者含有抗体和其它成分。

术语“治疗有效量”或‘有效量”是指可有效治疗哺乳动物的疾病或病症的抗体-药物结合物的量。在癌症情况下，结合物的治疗有效量可减少癌细胞的数量；减小肿瘤尺寸；抑制(即一定程度上减缓，优选停止)癌细胞向周边器官的浸润；抑制(即一定程度上减缓，优选停止)肿瘤转移；抑制肿瘤生长；以及/或缓解与癌症相关的一种或多种症状。对于癌症治疗，效能可例如通过评估疾病进展时间(TTP)和/或测定应答率(RR)来测量。术语“有效方案”是指足以实现治疗所述病症的所施用结合物的量和剂量频率的组合。

除非上下文另外指出，术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指目的为抑制或减缓(减轻)不希望的生理学改变或病症(例如癌症的进展或扩散)的治疗性治疗。有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的缓解、疾病程度的减轻、疾病的稳定(即不恶化)状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或减轻、以及消退(部分或全部)，不管可察觉得到还是察觉不到。“治疗(treatment)”意思还可以是与不接受治疗的预期存活期相比延长存活期。需要治疗的对象包括患有可察觉得到的疾病的对象。需要治疗的对象还可包括患有察觉不到的疾病的对象，例如针对表达CD123的病症在治疗后接受到完全应答但仍需要进行治疗以防止复发的患者。

术语“药学上可接受的”意思是联邦政府或州政府管理部门批准的或可由其批准的，或者在美国药典或其它公认的用于动物、以及更特别地人的药典中所示。术语“药学上相容的成分”是指药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂，或运载体，抗CD123抗体或抗体-药物结合物与其一起施用到对象。

短语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的有机或无机盐。示范性的盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯盐、溴盐、碘盐、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸根、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖质酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1’亚甲基双-(2羟基3萘甲酸盐))盐。药学上可接受的盐可包括另一种分子，例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它反离子。反离子可以是可稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机基团。另外，药学上可接受的盐在其结构中可具有一个以上的带电原子。多电荷原子为药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个反离子。因此，药学上可接受的盐可

具有一个或多个带电原子和/或一个或多个反离子。

在本发明的上下文中，溶剂合物是通过与溶剂分子配位形成固态或液态复合物的本发明化合物的那些形式。水合物是溶剂合物的一种特定形式，其中与水发生配位。在本发明的上下文中优选的溶剂合物为水合物。

除非上下文中另外清楚地指出，术语“约”包括在所述值的标准偏差内的值。

具体实施方式

I.概述

本发明部分基于抗体-药物结合物(包括靶向CD123的PBD抗体-药物结合物)在杀死表达CD123+的细胞方面特别有效这一发现。特别地，发现高亲和力7G3人类化抗体可使用种系hIGHv1-2和J外显子J_H-1(针对重链可变区受体序列)以及种系hIGKv4-1和J外显子J_K-2(针对轻链可变区受体序列)通过将位于一个或多个关键位点的残基转变回鼠类抗体或鼠种系序列来构建。对于重链，这些关键位点包括位置H20、H38、H48、H66、H67、H69、H71、H73、H81、H82A和H93中的一个或多个。对于轻链，这些关键位点包括位置L2、L19、L21、L22和L38中的一个或多个。特别地，高亲和力7G3人类化抗体在不需要进行亲和力成熟化同时保持鼠类抗体的CDR的一致性的情况下构建。高亲和力7G3人类化抗体还可以作为抗体药物结合物的一部分进行有效药物递送。当与SGD-1910PBD药物连接物结合时，所得h7G3ec PBD结合物对一组AML细胞系和原代AML样品的活性很高，不受低CD123拷贝数和MDR+状态的影响。h7G3后的“ec”标识表示抗体在重链的位置239(通过Kabat中所列EU索引进行编号)具有半胱氨酸取代

II.目标分子

除非另外指出，CD123和IL-3Rα互换使用，并且是指人CD123或IL-3Rα。一个示范性的人序列被分配UniProtKB/Swiss-Prot编号-P26951。

III.本发明抗体

人类化抗体通常是改造的抗体，其中来自非人类“供体”抗体的CDR被接枝到人“受体”抗体序列中(参见例如Queen,US5,530,101和5,585,089;Winter,US5,225,539;Carter,US6,407,213;Adair,US5,859,205;以及Foote,US6,881,557)。受体抗体序列可以是例如成熟人抗体序列、此类序列的复合物、人抗体序列的共有序列，或种系区域序列。

因此，人类化抗体是一些或所有CDR全部来自或基本上来自非人类供体抗体并且可变区骨架序列和恒定区(如果存在的话)全部来自或基本上来自人抗体序列的抗体。类似地，人类化重链具有至少一个、两个、并且通常所有三个全部来自或基本上来自供体抗体重链的CDR，以及基本上来自人重链可变区骨架和恒定区序列的重链可变区骨架序列和重链恒定区(如果存在的话)。类似地，人类化轻链具有至少一个、两个、并且通常所有三个全部来自或基本上来自供体抗体轻链的CDR，以及基本上来自人轻链可变区骨架和恒定区序列的轻链可变区骨架序列和轻链恒定区(如果存在的话)。与纳米抗体和双价抗体不同，人类化抗体通常包含人类化重链和人类化轻链。当至少60％、85％、90％、95％或100％的相应残基(如Kabat所定义)在各自CDR之间相同时，人类化抗体或人抗体中的CDR基本上来自非人类抗体中相应的CDR，或者基本上与其相同。在一些实施例中，当在每个CDR中不存在多于3个保守性氨基酸取代时，人类化抗体或人抗体中的CDR基本上来自非人类抗体中相应的CDR，

或者基本上与其相同。当至少70％、80％、85％、90％、95％或100％的Kabat定义的相应残疾相同时，抗体链的可变区骨架序列或抗体链的恒定区分别基本上来自人可变区骨架序列或人恒定区。在本发明的一些人类化抗体中，在抗体的重链可变骨架区中存在至少6个鼠类7G3反向突变，在抗体的轻链可变区中存在至少2个鼠类7G3反向突变。

尽管人类化抗体经常会结合所有6个小鼠抗体CDR(优选如Kabat所定义)，但是它们还可使用小于所有的小鼠抗体CDR(例如至少3、4，或5个)CDR制得(例如，Pascalis等，J.Immunol.169:3076,2002年;Vajdos等，Journal of Molecular Biology,320:415-428,2002年;Iwahashi等，Mol.Immunol.36:1079-1091,1999年;Tamura等，Journal of Immunology,164:1432-1441,2000年)。

可基于其可能对CDR构型和/或抗原结合的影响选择人可变区骨架残基的某些氨基酸用来进行取代。对此类可能的影响的研究通过建模、考察特定位置的氨基酸的特征，或对特定氨基酸的取代或诱变的效果的经验观察来进行。

本发明提供了针对CD123抗原的抗体。优选的抗体是得在鼠类7G3抗体的嵌合抗体或人类化抗体。对于重链可变区，优选受体序列为种系V_H外显子hIGHv1-2，对于J外显子(J_H)为外显子J_H-1。对于轻链可变区，优选受体序列为外显子hIGKv4-1，对于J外显子为J_K-2。

一个示范性的抗CD123抗体是这样的人类化抗体：其包括SEQ ID NO:1中所示重链CDR和SEQ ID NO:2中所示轻链CDR，并另外具有与SEQ ID NO:1的一致性为至少90％、91％、92％、93％、94％或95％的成熟重链可变区和与SEQ ID NO:2的一致性为至少90％、91％、92％、93％、94％或95％的成熟轻链可变区。CDR如Kabat所定义。优选地，重链可变结构域骨架的以下氨基酸残基保持如下：H48被I占据，H67被A占据，H69被L占据，H71被V占据，H73被R占据，H93被T占据，并且轻链的以下氨基酸残基保持如下：L2被F占据，L38被L占据。在一些方面，重链的以下氨基酸残基保持如下：H20被M占据，H38被K占据，H48被I占据，H66被K占据，H67被A占据，H69被L占据，H71被V占据，H73被R占据，H81被H占据，H82A被N占据，H93被T占据，并且轻链可变结构域骨架的以下氨基酸残基保持如下：L2被F占据，L38被L占据。在一些方面，重链可变结构域骨架的以下氨基酸残基给出如下：H20被M或V占据，H38被K或R占据，H48被I占据，H66被K或R占据，H67被A占据，H69被L占据，H71被V占据，H73被R占据，H81被E或H占据，H82A被S或N占据，H93被T占据，并且轻链可变结构域骨架的以下氨基酸残基给出如下：L2被F占据，L19被A或V占据，L21被I或M占据，L22被N或S占据，L38被L占据。

因此，本文提供了包含SEQ ID NO:1中所示重链可变区和SEQ ID NO:2中所示轻链可变区的人类化抗体，条件是H20被M或V占据，H38被K或R占据，H48被I占据，H66被K或R占据，H67被A占据，H69被L占据，H71被V占据，H73被R占据，H81被E或H占据，H82A被S或N占据，H93被T占据，并且轻链的以下氨基酸残基给出如下：L2被F占据，L19被A或V占据，L21被I或M占据，L22被N或S占据，L38被L占据。

小鼠m7G3抗体的人类化形式包括3个示例性人类化重链成熟可变区(HA-HC)和2个示例性人类化轻链成熟可变区(LA-LB)。这些链的排列包括HALA、HALB、HBLA、HBLB、HCLA和HCLB。这些排列中，HCLA是优选的。HCLA包含SEQ ID NO:1中所示重链和SEQ ID NO:2中所示轻链。但是，可使用HALA、HALB、HBLA、HBLB和HCLB中的任一种来替代HCLA。

在一些方面，针对人CD123的人类化7G3抗体的表观解离常数(kd)优选在0.1nM到10nM的范围内，更优选在0.1nM到5nM的范围内，优选在1nM到3nM或2nM到约3nM的范围内。在一些

方面，本发明抗体具有在针对人CD123的鼠类7G3抗体的表观解离常数的0.1到1.5倍，或者甚至0.5到2倍的范围内的表观解离常数。在一些方面，针对人CD123的抗体的表观解离常数(kd)为约2.7。

A.恒定区的选择

人类化7G3抗体的重链和轻链可变区可与人恒定区的至少一部分链接。恒定区的选择可部分取决于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和/或补体依赖性细胞毒性是否为所期望的。例如，人同位素IgG1和IgG3具有强烈的补体依赖性细胞毒性，人同种型IgG2具有弱的补体依赖性细胞毒性并且人IgG4缺少补体依赖性细胞毒性。人IgG1和IgG3还会引起比人IgG2和IgG4更强的细胞介导的效应子功能。轻链恒定区可以是λ或κ。抗体可表达为含有2个轻链和2个重链的四聚体，表达为重链、轻链，表达为Fab、Fab'、F(ab')2和Fv，或者表达为其中重链和轻链下标结构域通过间隔区(spacer)链接的单链抗体。

人恒定区在不同个体间显示同种异形变化和异同种异型(isoallotypic)变化，也就是，恒定区在不同个体中在一个或多个多态性位点可不同。异同种异型与同种异型的不同处在于识别异同种异型的血清会结合到一个或多个其它同种型的非多态性区域。

在轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个或几个氨基酸，例如重链的C-端赖氨酸，可能缺失或在一部分或全部分子中衍生。可在恒定区中进行取代，以减小或增加像补体介导的细胞毒性或ADCC这样的效应子功能(参见例如，Winter等，美国专利号5,624,821；Tso等，美国专利号5,834,597；Lazar等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA103:4005，2006年)，或延长在人类中的半衰期(参见例如，Hinton等，J.Biol.Chem.279:6213，2004年)。

可对恒定区进行修饰，以容许与药物连接物的位点特异性结合。此类技术包括使用天然存在的或改造的半胱氨酸残基、二硫桥键、聚组氨酸序列、糖工程标签和转谷氨酰胺酶识别序列。针对使用细菌谷氨酰胺转移酶的位点特异性结合的示范性取代是N297S或N297Q。针对使用改造的半胱氨酸的位点特异性结合的示范性取代是S239C。还可将抗体片段修饰，用于与药物连接物的位点特异性结合，参见例如，Kim等，Mol Cancer Ther2008年；7(8)。

B.重组抗体的表达

人类化或嵌合7G3抗体可通过重组表达产生。重组多聚核苷酸构建体通常包括可操作地链接到抗体链的编码序列的表达控制序列，包括天然相关的启动子区域或异源启动子区域。优选地，表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦载体结合到适当的宿主中，便将宿主保持在适合高水平表达核苷酸序列、以及收集和纯化交叉反应抗体的条件下。

哺乳动物细胞是用来表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸片段的优选宿主。参见Winnacker，From Genesto Clones，(VCH出版社(VCHPublishers)，纽约，1987年)。本领域已经开发了许多能够分泌完整异源蛋白的合适的宿主细胞系，包括CHO细胞系(例如DG44)、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞、以及不产生抗体的骨髓瘤细胞(包括Sp2/0和NS0)。优选地，细胞是非人源的。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列，例如复制起始点、启动子、增强子(Queen等，Immunol.Rev.89:49(1986年))、以及像核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列这样的必要的处理信息位点。优选的表达控制序列是来自内源基因、细胞肥大病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co

等,J.Immunol.148:1149(1992年)。

一旦被表达,抗体可根据本领域的标准步骤纯化,包括HPLC纯化、柱色谱、凝胶电泳法等(一般可参见,Scopes,Protein Purification(施普林格出版社(Springer-Verlag),纽约,1982年))。

IV.核酸

本发明进一步提供了编码本文所述的任何人类化重链和轻链的核酸。通常,核酸还会编码与成熟重链和轻链可变区融合的信号肽。核酸上的编码序列可以可操作地与调控序列连接,以确保像启动子、增强子、核糖体结合位点、转录终止信号等这样的编码序列的表达。编码重链和轻链的核酸可以分离形式存在,或者可克隆到一种或多种载体中。核酸可通过例如固态合成或重叠寡聚核苷酸的PCR来合成。编码重链和轻链的核酸可连接为例如在表达载体内的一个连续核酸,或者可以为分离的,例如每个克隆到其本身的表达载体中。

在一个实施例中,本公开提供了编码包含HA、HB,或HC中所示氨基酸序列的抗体重链可变区的分离的多聚核苷酸。例如,所述分离的多聚核苷酸可编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的抗体重链可变区。该分离的多聚核苷酸可进一步编码人IgG重链恒定区。IgG恒定区的同种型为例如IgG1、IgG2、IgG3,或IgG4。在一个实施例中,IgG恒定区的同种型为IgG1。在另一个实施例中,编码后的IgG1恒定区具有包含位于残基239(即S239C,根据Kabat中所列EU索引系统)的取代的氨基酸序列。本公开还提供了包含编码抗体重链可变区的分离的多聚核苷酸的表达载体,并进一步提供了包含该表达载体的宿主细胞,所述抗体重链可变区包含HA、HB,或HC(例如SEQ ID NO:1或其变体)中所示氨基酸序列。在一些实施例中,宿主细胞为哺乳动物宿主细胞,例如CHO细胞。

在另一个实施例中,本公开提供了编码包含LA或LB中所示氨基酸序列的抗体轻链可变区的分离的多聚核苷酸。例如编码包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列抗体轻链可变区的分离的多聚核苷酸。该分离的多聚核苷酸可进一步编码人IgG轻链恒定区。IgG轻链恒定区的同种型为例如κ恒定区。本公开还提供了包含编码抗体轻链可变区的分离的多聚核苷酸的表达载体,并进一步提供了包含该表达载体的宿主细胞,所述抗体轻链可变区包含LA或LB(例如SEQ ID NO:2或其变体)中所示氨基酸序列。在一些实施例中,宿主细胞为哺乳动物宿主细胞,例如CHO细胞。

在另一个实施例中,本公开提供了编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的抗体重链可变区和包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗体轻链可变区的一种分离的多聚核苷酸或多种多聚核苷酸,重链可变结构域和轻链可变结构域形成与人CD123特异性结合的抗体或抗原结合片段。本公开还提供了包含编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的抗体重链可变区和包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗体轻链可变区的一种分离的多聚核苷酸或多种多聚核苷酸的表达载体。还提供了包含一种表达载体或多种表达载体的宿主细胞。宿主细胞优选为哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

在另一个实施例中,本公开提供了第一载体和第二载体,其包含编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的抗体重链可变区的多聚核苷酸和编码包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗体轻链可变区的多聚核苷酸,重链可变结构域和轻链可变结构域形成与人CD123特异性结合的抗体或抗原结合片段。提供了包含载体的宿主细胞,优选为哺乳动物宿主细胞,例如CHO细胞。

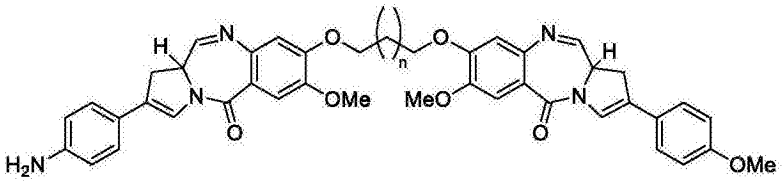
V.抗体-药物结合物

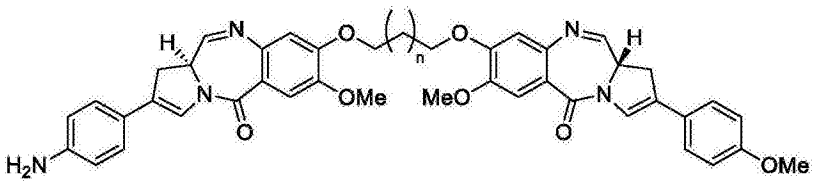
抗CD123抗体可与细胞毒性基团或细胞抑制基团结合，形成抗体-药物结合物(ADC)。细胞毒性剂(例如化疗剂)、前药转化酶、放射性同位素或化合物，或毒素(这些基团共同称作治疗剂)是特别适于与抗体结合的基团。例如，抗CD123抗体可与像化疗剂这样的细胞毒性剂，或毒素(例如像例如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素，或肉毒素这样的细胞抑制剂或杀细胞剂)结合。可用类型的细胞毒性剂的实例包括例如DNA小沟结合剂(minor groove binder)、DNA烷基化剂和微管干扰剂。示范性的细胞毒性剂包括例如阿里他汀、喜树碱、卡奇霉素、倍癌霉素、依托泊苷、美登醇(例如DM1、DM2、DM3、DM4)、紫杉醇、苯二氮卓类(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓、吲哚啉并苯二氮卓和恶唑烷并苯二氮卓)和长春花生物碱。示范性的抗体-药物结合物包括基于阿里他汀的抗体-药物结合物(意思是药物组分为阿里他汀药物)、美登醇抗体-药物结合物(意思是药物组分为美登醇药物)和苯二氮卓抗体药物结合物(意思是药物组分为苯二氮卓(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓、吲哚啉并苯二氮卓和恶唑烷并苯二氮卓))。

用来将治疗剂与抗体结合的技术是众所周知的。(参见例如Alley等，Current Opinionin Chemical Biology 2010年14:1-9;Senter,CancerJ.,2008年,14(3):154-169)。治疗剂可以会降低其活性除非它被从抗体切掉(例如通过水解，通过蛋白水解降解，或通过切割剂)的方式结合。在一些方面，治疗剂通过在表达CD123的癌细胞的细胞内环境中对切割敏感但对细胞外环境不是特别敏感的可切割连接物与抗体连接，使得结合物在它被表达CD123的癌细胞内化时从抗体切割(例如，在内体小泡中或者，例如借助于pH敏感性或蛋白酶敏感性，在溶酶体环境中或在质膜微囊环境中)。在一些方面，治疗剂还可通过不可切割连接物与抗体连接。

本发明的发明人已经发现，包含PBD药物连接物的靶向CD123的ADC对于治疗表达CD123的病症特别有效。

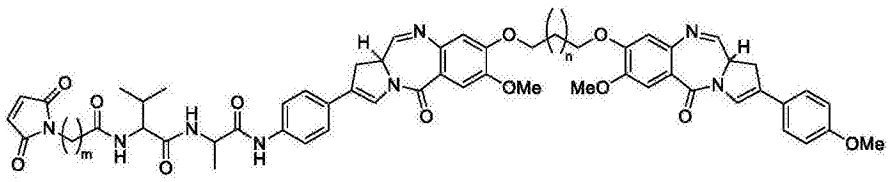
可用于本发明的优选PBD如下：





或药学上盐、溶剂合物，或盐的溶剂合物;其中下标n为1或3。

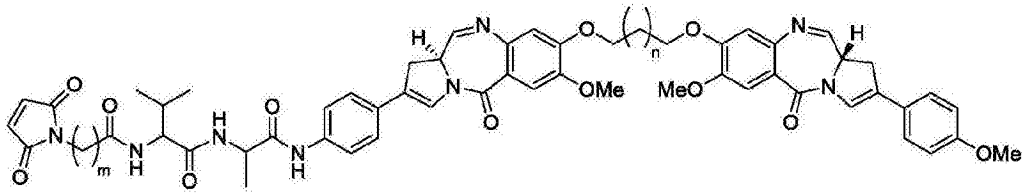
用于本发明的一种优选PBD药物连接物表示为以下式I：



(I)

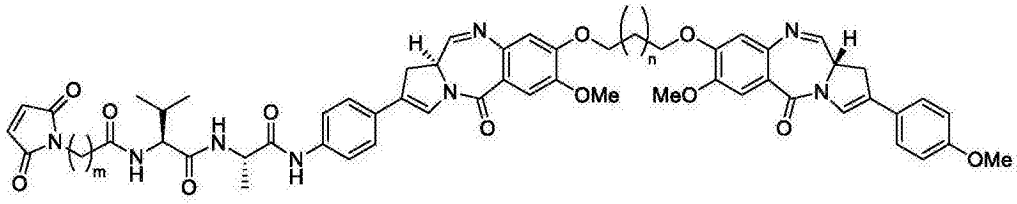
或药学上盐、溶剂合物，或盐的溶剂合物;其中下标n为1或3，下标m为2到5的整数。

药物连接物的PBD药物组分的优选立体化学如以下式Ia所示：



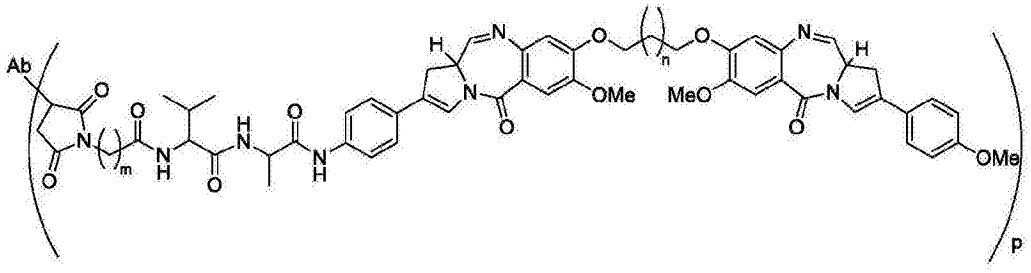
（Ia）

SGD-1910PBD药物连接物的PBD药物和连接物组分的优选立体化学如以下式Ib所示：

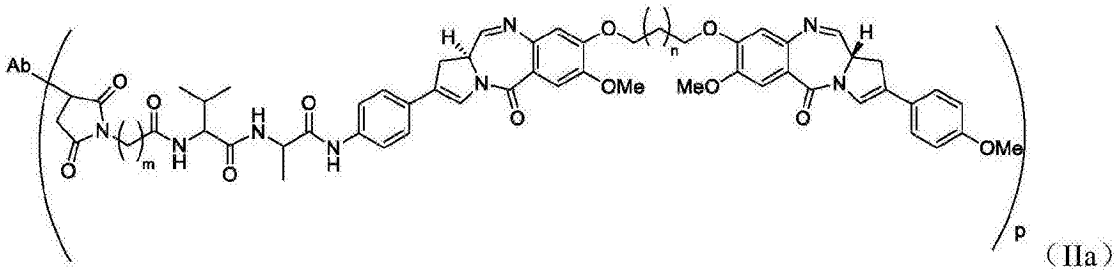


（Ib）

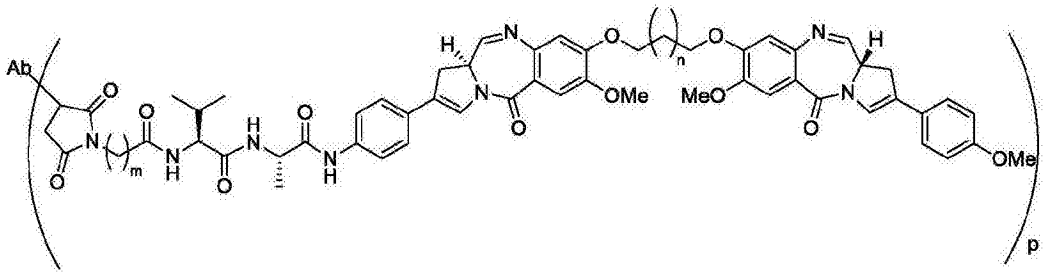
PBD药物连接物与本发明的人类化CD123抗体结合，产生如以下式II、IIa和IIb所示的靶向CD123的抗体-药物结合物



（II）



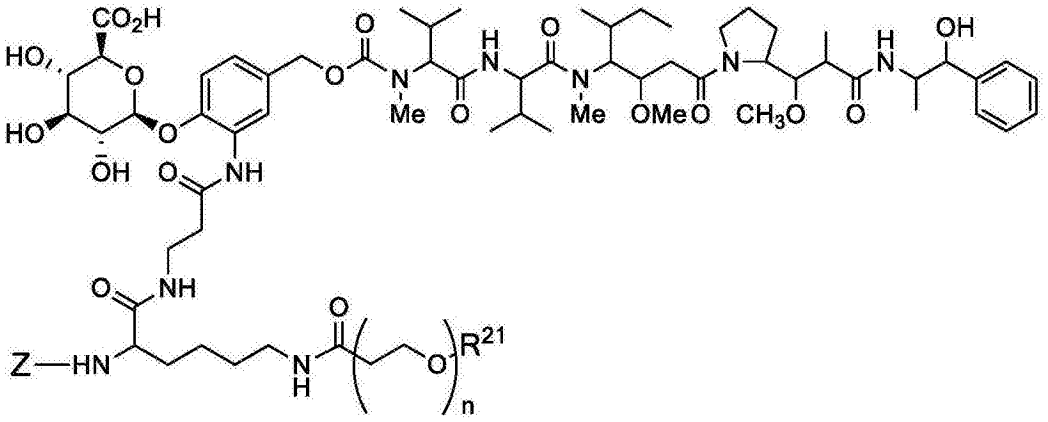
（IIa）



（IIb）

或药学上盐、溶剂合物，或盐的溶剂合物；其中下标n为1或3；下标m为2到5的整数；下标p为1到4的整数。

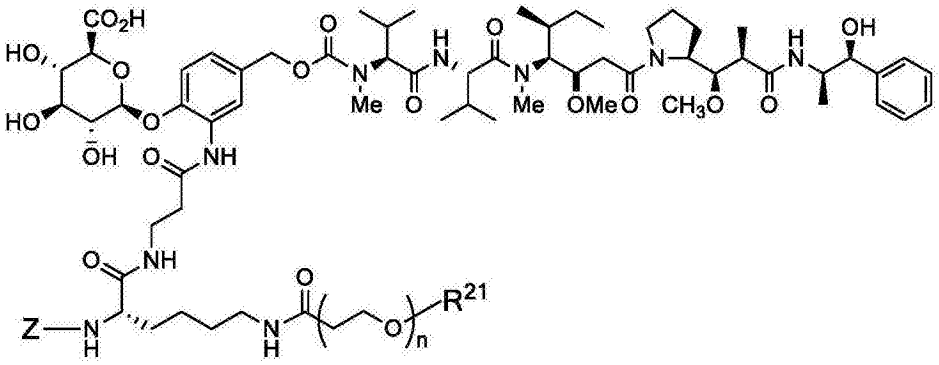
示范性的药物连接物包括MMAE药物连接物。聚乙二醇聚合物作为侧链与可切割β-葡糖苷酸MMAE药物连接物的结合提供了在异种移植模型中具有与非PEG化的对照相比降低的血浆清除率和增加的抗肿瘤活性的抗体药物结合物。因此，用来与本发明抗体连接的特别有利的药物连接物如下。



（V）

或其药学上可接受的盐。

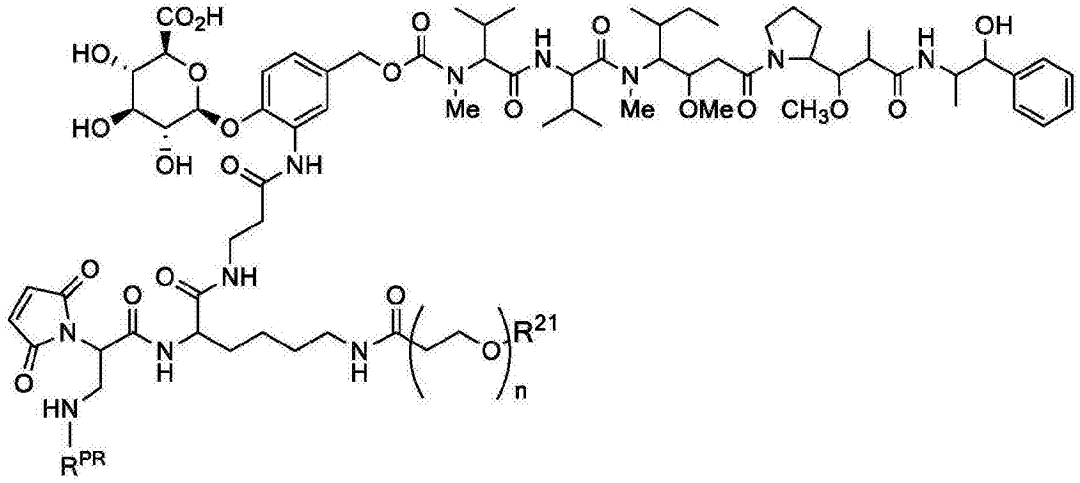
此类药物连接物的优选立体化学如下所示：



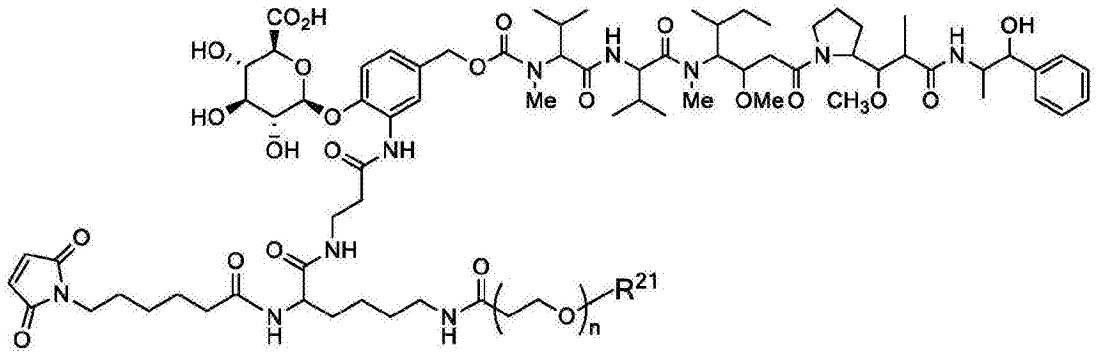
（Va）

或其药学上可接受的盐，其中，对于式V和式Va，Z表示具有能够与抗体上的官能团反应形成与其的共价连接的反应位点的有机基团，n为8到36，最优选为8到14（最优选为12），R^{21}为聚乙二醇基团的封端单元，优选为$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$。

优选的Z基团是含有马来酰亚胺的基团。特别优选的Z基团显示于以下药物连接物中：



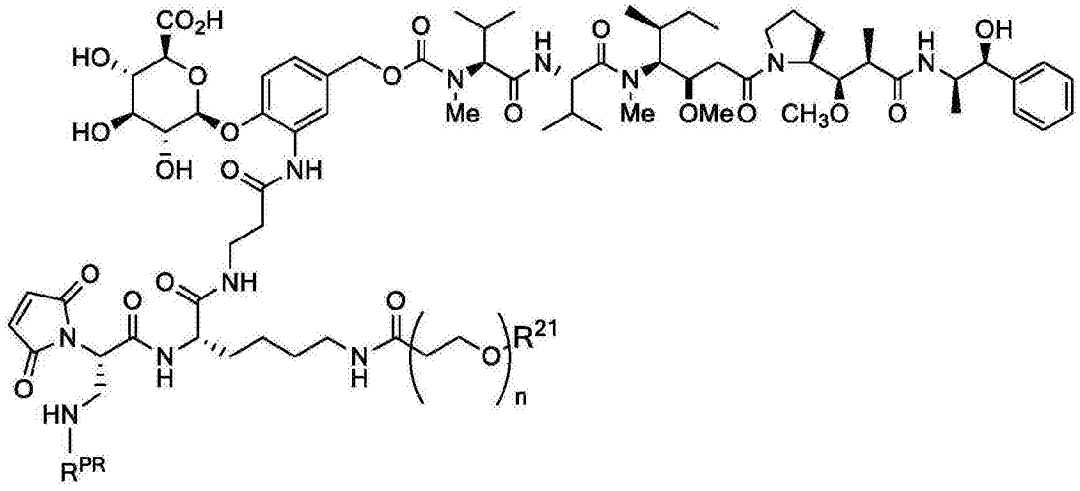
（VI）



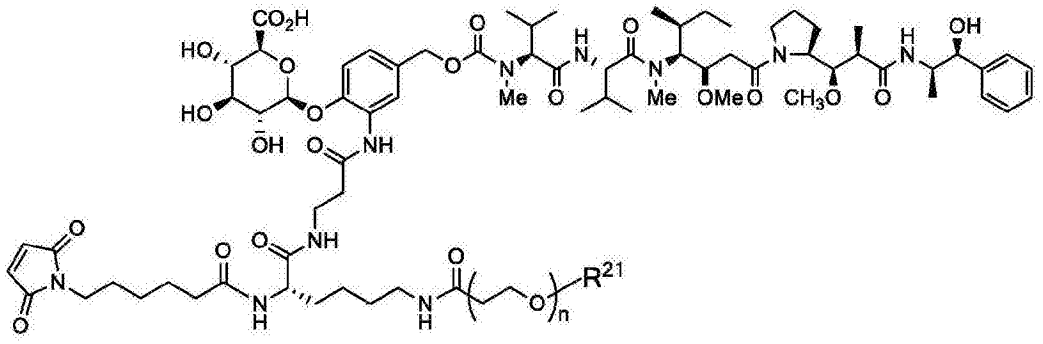
（VII）

或其药学上可接受的盐。

此类药物连接物的优选立体化学如下所示：



（VIa）



（VIIa）

或其药学上可接受的盐，其中对于式VI、Via、VII和VIIa，n为8到36，最优选为8到14（最优选为12），R^{PR}为氢或保护基团，例如对酸不稳定的保护基团，例如BOC，R^{21}为聚乙二醇基团的封端单元，优选为$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$。

如上所述，R^{PR}可以是氢或保护基团。如本文所使用的保护基团是指会暂时性或永久性阻碍多官能团化合物中的反应位点的基团。当其在分子中的其它地方进行所期望的化学转化需要的反应条件下、以及在当需要时对新形成的分子进行纯化时能够防止或避免不希望的反应或保护基团的过早丢失，并且可在不会不利地影响该新形成的分子的结构或立体化学完整性的条件下被除去时，保护基团即为合适的保护基团。合适的氨基保护基团包括对酸不稳定的氮保护基团，包括Isidro-Llobel等在《氨基酸保护基团(Amino acid-protecting groups)》Chem.Rev.(2009年)109:2455-2504中提供的那些。通常，对酸不稳定的氮保护基团会将伯胺或仲胺基团转化为其相应的氨基甲酸酯，包括氨基甲酸叔丁酯、氨基甲酸烯丙酯和氨基甲酸苄酯。

如上所述，R^{21}为聚乙二醇基团的封端单元。技术人员应理解，聚乙二醇单元可在末端用各种各样的有机基团(通常相对没有活性的那些)封端。烷基和取代的烷基是优选的，包括例如$-C_{1-10}alkyl$、$-C_{2-10}alkyl-CO_2H$、$-C_{2-10}alkyl-OH$、$-C_{2-10}alkyl-NH_2$、$C_{2-10}alkyl-NH(C_{1-3}alkyl)$，或$C_{2-10}alkyl-N(C_{1-3}alkyl)_2$。

一般而言，对于PEG化的MMAE药物连接物，每个抗体连接有1到16个药物连接物。

药物载荷-“p”

参考式II、IIa和IIb所示的靶向CD123的抗体-药物结合物，下标p表示抗体分子的药物载荷(与抗体分子连接的药物分子数)并且是整数值。在包含抗体-药物结合物分子群体的组合物中，平均药物载荷(例如在所述群体中每个抗体的药物连接物分子平均数量)是重要的质量特性，这是由于它会确定可递送到细胞的药物的量。平均药物载荷可以是整数值或非整数值，但通常为非整数值。最佳平均药物载荷会根据药物或药物连接物组合的特性而改变。

在一些方面，抗体-药物结合物组合物的不均一性会取决于用来将药物连接物分子与抗体分子结合的结合技术。例如，在一些方面，用来将药物连接物分子与抗体分子结合的结合技术会导致就抗体上的药物连接物分子分布而言和/或就抗体分子上的药物连接物数量而言不均一的抗体-药物结合物组合物(例如当通过链间二硫化物使用非位点特异性技术进行结合时)。在其它方面，用来结合药物连接物分子的结合技术会导致就配体分子上的药物连接物分子的分布而言和/或就抗体分子上的药物连接物分子数量而言基本上均一的抗

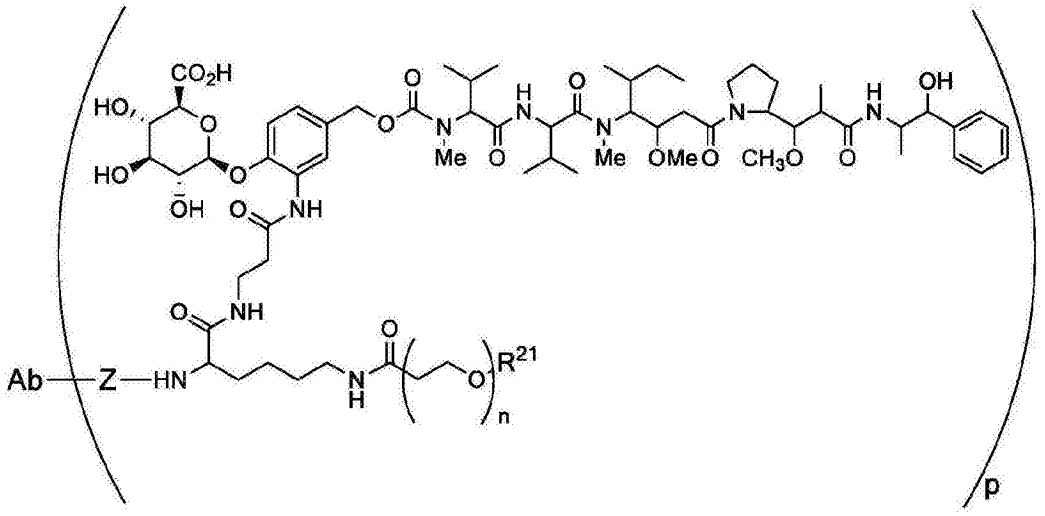
体-药物结合物组合物(例如当使用位点特异性结合技术时)。不管位点特异性方法还是非位点特异性方法,通常都还会存在较小百分比的未结合的抗体分子。所述百分比的未结合的抗体分子包括在平均药物载荷值中。

在本发明的优选方面,当提及包含抗体-药物结合物化合物群体的组合物时,平均药物载荷为约2到约14,优选约2到约10。对于PBD抗体药物结合物,例如本文示范的那些,特别优选的平均药物载荷为约2。在一些方面,抗体-药物结合物化合物群体中的个别抗体分子的实际药物载荷为1到4、1到3或1到2,占主导地位的药物载荷为2。在优选方面,通过位点特异性结合技术(例如将改造的半胱氨酸引入抗体)获得约2的平均药物载荷

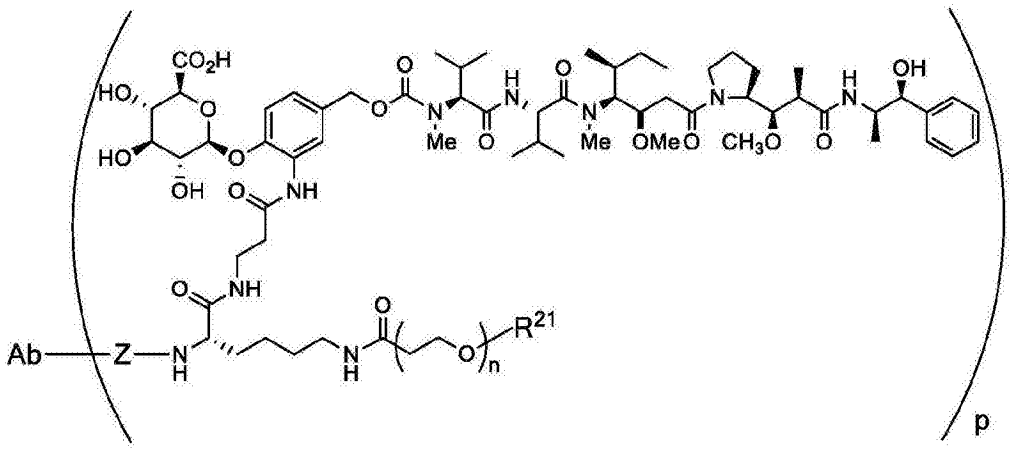
在本发明的一些其它方面,当提及包含抗体-药物结合物化合物群体的组合物时,平均药物载荷为约3或约4,并且抗体-药物结合物化合物群体中的个别抗体分子的实际药物载荷为1到8。

对于MMAE PEG化的ADC,例如本文示范的那些,特别优选的平均药物载荷为约8。在示范性的实施例中,药物连接物与还原的链间二硫化物的半胱氨酸残基结合。在一些方面,抗体-药物结合物化合物群体中的个别抗体分子的实际药物载荷为1到10(或者6到10或6到8),占主导地位的药物载荷为8。如果例如除了链间二硫化物以外药物连接物还与引入的半胱氨酸残基(例如根据EU索引在位置239引入的半胱氨酸残基)结合,即可获得更高的药物载荷。

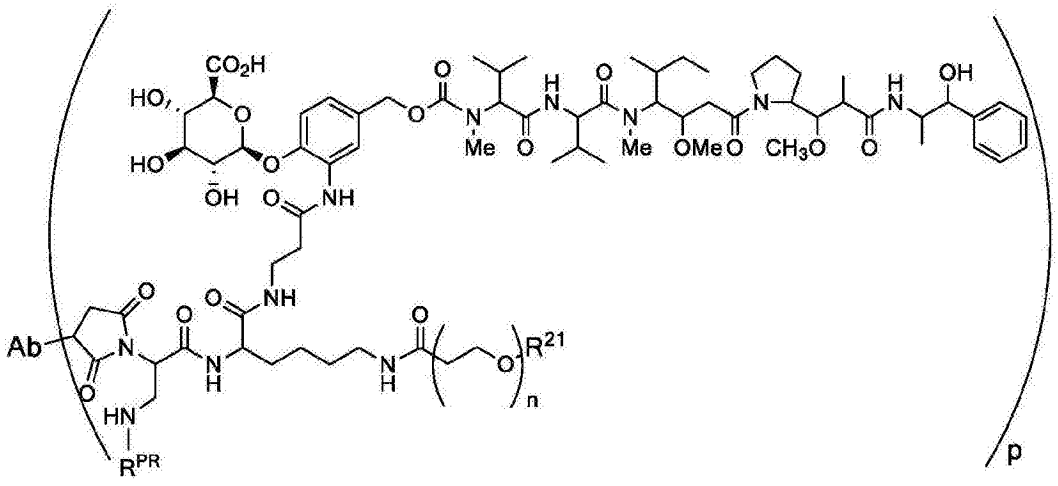
示范性的ADC包括以下:



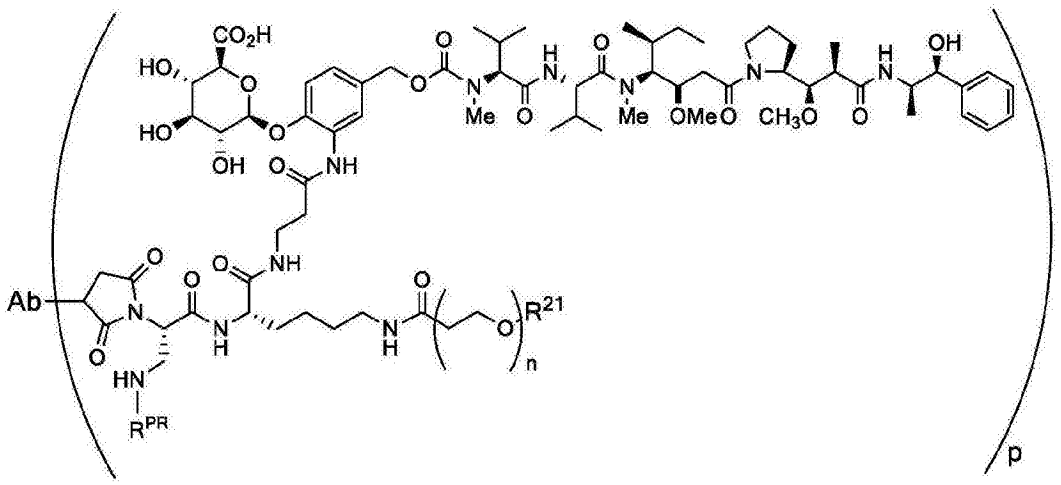
（IX）



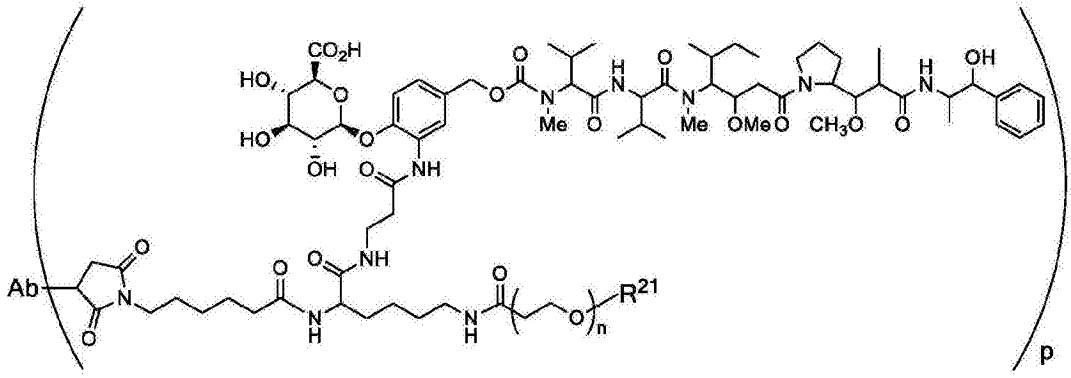
（IXa）



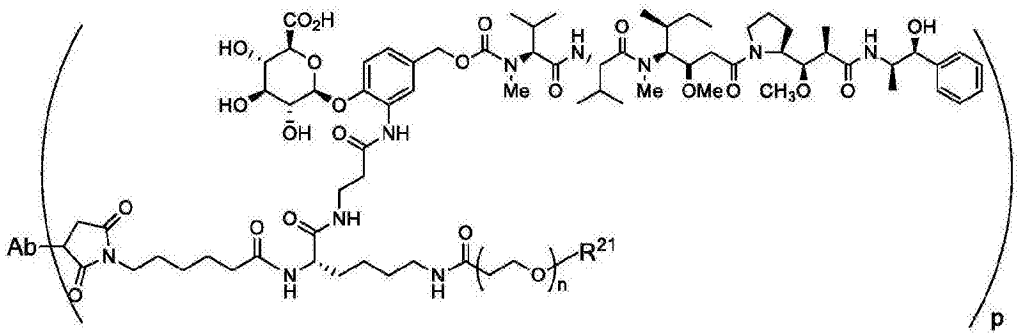
（X）



（Xa）



（XI）



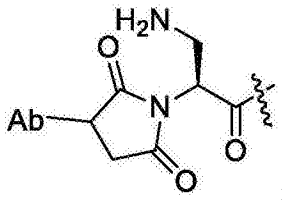
（XIa）

或其药学上可接受的盐，其中n为8到36，最优选为8到14（最优选为12），R^{PR}为氢或保护基团，例如对酸不稳定的保护基团，例如BOC，R^{21}为聚乙二醇基团的封端单元，优选为$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$，Ab表示抗CD48抗体，p表示1到16的整数，当提及个别抗体分子或提及约4或约6到约14的平均药物载荷时，p优选表示1到14、6到12、6到10，或8到10的整数，当提及抗体分子群体时，p优选表示约8。

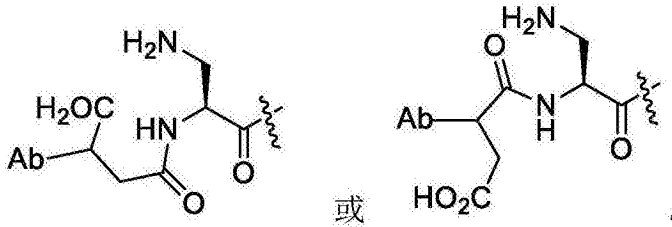
如上所述，药物连接物的PEG（聚乙二醇）部分可为8到36，但是已经发现，具有12个乙氧基单元的PEG是特别优选的。已经发现，更长的PEG链可导致更慢的清除，而更短的PEG链可导致降低的活性。因此，在所有以上实施例中下标n优选为8到14、8到12、10到12或10到14，最优选为12。

可使用多分散PEG、单分散PEG和独特PEG来制造本发明PEG化的抗体药物结合物。多分散PEG是尺寸和分子量不均一的混合物，而单分散PEG则通常从不均一混合物纯化，并因此会提供单一的链长度和分子量。优选PEG单元为独特PEG，其为以分步方式而不是通过聚合工艺合成的化合物。独特PEG提供具有限定的和指定的链长度的单独分子。对于下标“p”，当提及抗体-药物结合物群体时，下标“n”的值可以是平均数值，并且可以是整数数值或非整数数值。

在优选实施例中，抗体与药物连接物的共价连接通过抗体的巯基官能团与药物连接物的马来酰亚胺官能团相互作用实现，形成硫取代的琥珀酰亚胺。巯基官能团可在配体的自然状态下的配体单元上存在，例如在自然存在的残基(链间二硫化物残基)中存在，或者可通过化学修饰或通过生物改造，或者两者的组合引入配体中。应理解，抗体取代的琥珀酰亚胺可以水解形式存在。例如，在优选实施例中，ADC由当与抗体链接时表示为以下结构的琥珀酰亚胺基团组成



或者由当与抗体链接时表示为以下结构的其相应的酸-酰胺基团组成：



波浪线表示连接到药物连接物的剩余部分。

在由结合反应进行的制备中，每个配体单元的药物连接物单元平均数目可通过像质谱、ELISA分析、HIC和HPLC这样的常规方法来表征。还可以确定以p计的配体-连接物-药物结合物的定量分布。在一些情况下，将p为某一确定值的同质配体-药物结合物从具有其它药物载荷的配体-药物结合物的分离、纯化和表征可通过像反相HPLC或电泳法这样的方法实现。

VI.治疗应用

本文所述的靶向CD123的抗体-药物结合物可用来治疗表达CD123的病症，例如表达CD123的癌症。通常，此类癌症显示在蛋白(例如通过免疫分析法)或RNA水平下测量的可检测水平的CD123。一些此类癌症显示与相同类型的非癌性组织(优选来自相同患者)相比水平增加的CD123。任选地，癌症中CD123的水平在进行治疗之前进行测量。

与CD123表达相关的癌症的实例包括骨髓性疾病，例如急性骨髓性白血病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS)。其它癌症包括B-细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、毛细胞白血病、范可尼贫血、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、霍奇金病、未成熟T细胞急性淋巴细胞白血病(未成熟T-ALL)、伯基特淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)，或套细胞淋巴瘤。

本发明的方法包括治疗患有表达CD123的癌症的患者，包含给患者施用本发明的抗体-药物结合物。癌症可以是任何表达CD123的癌症，包括例如AML、MDS、B-ALL、毛细胞白血病、范可尼贫血、BPDCN、霍奇金病、未成熟T-ALL、伯基特淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、CLL，或套细胞淋巴瘤。

一些癌细胞在蛋白表达的增加提高治疗剂从癌细胞的排出后会对治疗剂产生抗性。此类蛋白包括P-糖蛋白、多抗药性相关蛋白、肺抗性相关蛋白和乳腺癌抗性蛋白。癌细胞中的抗药性的检测可由技术人员操作。检测排出蛋白的抗体或分析可从例如普洛麦格公司(Promega)、密理博公司(Millipore)、艾博抗公司(Abcam)和西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)商业获得。待被本方法治疗的癌症可以是表达CD123的多抗性癌症。在一些方面，癌症将会是多抗药性CD123+AML。

CD123定向的抗体-药物结合物按照会延迟发作、降低严重程度、抑制进一步恶化和/或改善至少一种癌症标志或症状的有效方案(意思是剂量、给药途径和给药频率)给药。

CD123定向的结合物的示范性剂量包括约1.0μg/kg到约10mg/kg、1.0μg/kg到约5mg/kg、1.0μg/kg到约5mg/kg、约1.0μg/kg到约1.0mg/kg、约10μg/kg到约3mg/kg、约10μg/kg到约2mg/kg、约1.0μg/kg到1.0mg/kg，或约1.0μg/kg到500.0μg/kg或约1.0μg/kg到80.0、100.0，或200.0μg/kg。

CD123定向的PBD结合物的示范性剂量通常为约1.0μg/kg到1.0mg/kg，或约1.0μg/kg到500.0μg/kg或约1.0μg/kg到80.0、100.0，或200.0μg/kg，尽管可考虑其它剂量。

给药可通过多种给药途径进行。在某些实施例中，结合物通过肠外给药，例如静脉内、肌内，或皮下。对于用来治疗癌症的ADC的给药，可通过静脉内或皮下给药递送到系统循环中。在一个特别实施例中，给药通过静脉内递送进行。静脉内给药可通过例如像30-90分钟这样的时间段内的输注或通过单独推注进行。在一些方面，给药会在垂直插入的中心导管中通过缓慢IV推送(即超过30-60秒)进行。

给药频率取决于许多不同该因素，包括给药方式、靶标位点、患者(不管患者是人还是动物)的生理状态和施用的其它药物。频率可以是每天一次、每周一次、每月一次、每季度一次，或者对患者状态或正在治疗的癌症的进展的变化作出响应而在不规则时间间隔。静脉内给药的示范性频率在连续过程的治疗中在每周两次与每季度两次之间，尽管更频繁或更不频繁的给药也是可能的。静脉内给药的其它示范性频率在连续过程的治疗中是每三周一次或者在每周一次或每月一次之间，尽管更频繁或更不频繁的给药也是可能的。对于皮下给药，示范性的给药频率是每天一次到每月一次，尽管更频繁或更不频繁的给药也是可能的。

用于肠外给药的药物组合物优选为无菌的和基本上等渗的，并且在GMP条件下制造。药物组合物可以单位剂量形式(即单次给药的剂量)提供。药物组合物可使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂进行配制。配制取决于所选给药途径。对于注射，结合物可在水溶液中进行配制，优选在像Hank溶液、Ringer溶液，或者生理盐水或乙酸盐缓冲液这样的生理学相容的缓冲液中进行配制(为了降低注射位置的不舒适感)。所述溶液可含有像悬浮剂、稳定剂和/或分散剂这样的配制剂。或者，抗体可为冻干形式，以用于在使用前与合适的运载体(例如无菌无热原的水)进行改造。液体配制物中结合物浓度的变化可以很广泛。在一些方面，ADC以约0.5mg/ml到约30mg/ml、约0.5mg/ml到约10mg/ml、约1mg/ml到

约10mg/ml、约2mg/ml到约10mg/ml，或约2mg/ml到约5mg/ml的浓度存在。

使用本发明的结合物进行治疗可与化疗、放疗、干细胞疗法、手术、以及能够有效对抗正在治疗的病症的其它治疗方法(包括针对正在治疗的特别病症的标准护理)结合。因此，本发明包括治疗本文所述疾病和病症的方法，所述方法可作为单一疗法，或者在与例如标准护理或用来治疗此类疾病和/或病症的在研药物的联合疗法中使用。用来治疗癌症的方法包括给需要治疗的患者施用与另外的抗癌药物或治疗癌症的其它药物组合的有效量的本发明的CD123定向的抗体-药物结合物。

联合疗法的一个实例包含7+3方案，其包括7天阿糖胞苷和3天蒽环类抗生素，例如(但不限于)道诺红菌素或去甲氧柔红霉素。在一个实施例中，7+3方案的阿糖胞苷和蒽环类抗生素在联合疗法中与本发明的CD123定向的抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，7+3方案的阿糖胞苷和蒽环类抗生素在联合疗法中与本发明的人类化7G3抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，7+3方案的阿糖胞苷和蒽环类抗生素在联合疗法中与本发明的h7G3EC-SGD-1910一起施用。在一些实施例中，CD123定向的抗体-药物结合物和7+3方案的组合被施用到60岁或更年轻的患者。

联合疗法另一个实例包含如上所述的7+3方案加克拉屈滨。在一个实施例中，7+3方案加克拉屈滨在联合疗法中与本发明的CD123定向的抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，7+3方案加克拉屈滨在联合疗法中与本发明的人类化7G3抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，7+3方案加克拉屈滨在联合疗法中与本发明的h7G3EC-SGD-1910一起施用。

联合疗法的另一个实例包含去甲基化药物，例如(但不限于)地西他滨或氮杂胞苷。在一个实施例中，去甲基化药物在联合疗法中与本发明的CD123定向的抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，去甲基化药物在联合疗法中与本发明的人类化7G3抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实施例中，去甲基化药物在联合疗法中与本发明的h7G3EC-SGD-1910一起施用。

在一些实施例中，CD123定向的抗体-药物结合物和去甲基化药物的组合被施加到未接受治疗的、难以进行常规治疗的，或对此类治疗应答后复发的患者。在一些实施例中，CD123定向的抗体-药物结合物和去甲基化药物的组合被用来治疗老年患者，例如60岁或更老的患者。其它虚弱的或不合适的患者可使用CD123定向的抗体-药物结合物和去甲基化药物的组合来治疗，例如拒绝标准诱导/巩固疗法或者不是标准诱导/巩固疗法的候选人的患者。另外，鉴于观察到高强度化疗缺乏成效，风险疾病特征较差的老年患者也可以使用所述组合进行治疗。差的疾病风险特征是已知的，并在例如Hou等的Leukemia 28:50-58(2014年)中进行了描述。

用于联合疗法的其它药物和方案包括阿糖胞苷、高剂量阿糖胞苷、羟基脲、克罗拉滨、米托蒽醌、氟达拉滨、拓扑替康、依托泊苷、MEC(米托蒽醌、依托泊苷和阿糖胞苷)、CLAG-M(克拉屈滨、阿糖胞苷、米托蒽醌和非格司亭)、以及FLAG-IDA(氟达拉滨、阿糖胞苷、去甲氧柔红霉素和非格司亭)。在一个实施例中，羟基脲、克罗拉滨、米托蒽醌、氟达拉滨、拓扑替康、依托泊苷、MEC(丝裂霉素、依托泊苷和阿糖胞苷)、CLAG-M(克拉屈滨、阿糖胞苷、米托蒽醌和非格司亭)、以及FLAG-IDA(氟达拉滨、阿糖胞苷、去甲氧柔红霉素和非格司亭)中的一种或多种在联合疗法中与本发明的CD123定向的抗体-药物结合物一起施用。在进一步的实

施例中，阿糖胞苷、高剂量阿糖胞苷、羟基脲、克罗拉滨、米托蒽醌、氟达拉滨、拓扑替康、依托泊苷、MEC(米托蒽醌、依托泊苷和阿糖胞苷)、CLAG-M(克拉屈滨、阿糖胞苷、米托蒽醌和非格司亭)、以及FLAG-IDA(氟达拉滨、阿糖胞苷、去甲氧柔红霉素和非格司亭)中的一种或多种在联合疗法中与本发明的人类化7G3抗体-药物结合物一起施用。

在进一步的实施例中，阿糖胞苷、高剂量阿糖胞苷、羟基脲、克罗拉滨、米托蒽醌、氟达拉滨、拓扑替康、依托泊苷、MEC(米托蒽醌、依托泊苷和阿糖胞苷)、CLAG-M(克拉屈滨、阿糖胞苷、米托蒽醌和非格司亭)、以及FLAG-IDA(氟达拉滨、阿糖胞苷、去甲氧柔红霉素和非格司亭)中的一种或多种在联合疗法中与本发明的h7G3EC-SGD-1910一起施用。

本发明的任何特征、步骤、元素、实施例，或方面可与任何其它的一起组合使用，除非另外特别指出。尽管为了清楚和理解目的本发明通过说明和实例的方式较为详细地进行了描述，但显而易见的是，可在所附权利要求书的范围内进行某些改变和修改。

实例

方法

竞争结合分析

将十万个CD123阳性细胞转移到96孔板，并在具有5nM AlexaFluor-488标记的m7G3和递增浓度(从0.01nM到680nM)的未标记的杂合、人类化或鼠类7G3mAb的冰上孵育1小时。将细胞离心，用PBS洗涤3次，并重新悬浮于125μL PBS+1％BSA溶液中。使用流式细胞仪分析荧光，并使用饱和荧光信号的百分比来确定结合的标记的7G3mAb的百分比。通过将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量应答曲线推衍出EC50。

饱和结合分析

将十万个CD123阳性细胞(被转染以表达人或猕猴CD123的HEK-293F细胞)转移到96孔板。以1250nM到13.5pM的浓度加入AlexaFluor-488标记的CD123mAb并将细胞在冰上孵育30分钟。细胞通过离心沉淀，用PBS+1％BSA溶液洗涤3次，并重新悬浮于125μL PBS+1％BSA中。使用流式细胞仪分析荧光，并使用饱和荧光信号百分比来确定结合的百分比，并随后计算表观Kd。

体外细胞毒性分析

将AML细胞系或原代AML细胞用抗体-药物结合物(ADC)在37℃下处理96小时。在一些试验中包括非抗原结合ADC作为阴性对照。细胞系的细胞活力使用CelltiterGlo(普洛麦格公司，麦迪逊，威斯康辛州)根据制造商的说明进行测量。将细胞在室温下用CelltiterGlo试剂孵育25分钟，在Envision板读取器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)，沃尔瑟姆，马萨诸塞州)上测量发光。对于原代AML细胞，AML母细胞的活力通过流式细胞计量术使用Annexin V和碘化丙锭染色测量。结果记录为IC50，与运载体处理的细胞相比产生50％的活力降低(对照＝100％)需要的化合物浓度。

体内活性研究

皮下AML模型

SCID小鼠用5×10^6个THP-1或2×10^6个KG-1AML肿瘤细胞进行皮下接种。用卡尺检测肿瘤生长，并使用式(0.5×[长度×宽度^2])来计算平均肿瘤体积。当平均肿瘤体积达到大约100mm^{3}时，各小鼠(n＝8/组)不进行治疗，或者腹膜内施用单次剂量的CD123ADC或非结合对照ADC。对于KG-1模型，在治疗性给药之前大约4小时将小鼠用人IVIg治疗(10mg/kg的单次

腹膜内注射)，以最小化测试ADC与AML细胞上的Fc受体的相互作用。当肿瘤体积达到大约1000mm^{3}时将小鼠安乐死。所有动物步骤在实验动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案下在国际实验动物评估和认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)认可的设施中进行。

抗体药物结合物的生产

抗体药物结合物使用本文所述的抗CD123抗体如WO2011/130613所述制备。IgG1mAb的半胱氨酸突变体的制备在US20100158909中进行了一般描述。药物连接物SGD-1910通过引入抗体的IgG1链的位置239的半胱氨酸残基的硫醇基团与抗CD123抗体结合，并且平均药物载荷为每个抗体约2个药物。在239位置具有半胱氨酸的抗体带有标识EC。

结果

人类化mAb的设计和测试

使用hIGHv1-2.02/IGHJ1.01重链可变区人种系和hIGKV4-1.01/IGHJ2.01轻链可变区人种系作为人受体序列构建了几种人类化7G3抗体。抗体在待回复突变到小鼠抗体或小鼠种系序列的氨基酸残基的选择上不同。基于与其它变体相比其(i)结合特征、(ii)递送药物的能力和(iii)回复突变的数量，指定为HCLA(SEQ ID NO:1中所示重链(vHC)和SEQ ID NO:2中所示轻链(vLA))的抗体被选作前导人类化7G3抗体。

指定为HALA(具有指定为vHA的重链可变区和指定为vLA的轻链可变区的抗体)、HALB(具有指定为vHA的重链可变区和指定为vLB的轻链可变区的抗体)、HBLA(具有指定为vHB的重链可变区和指定为vLA的轻链可变区的抗体)、HBLB(具有指定为vHB的重链可变区和指定为vLB的轻链可变区的抗体)、HCLB(具有指定为vHC的重链可变区和指定为vLB的轻链可变区的抗体)的抗体可在本发明中用来替代HCLA抗体。vHA、vHB、vHC、vLA和vLB序列可参见图5和图6。不管针对表达CD123的AML细胞系(表1)进行测试，还是针对过度表达人或赛诺(cyno)CD123的HEK293细胞(表2)进行测试，嵌合和各种人类化形式的7G3的结合亲和力都是类似的。

表1-表达人CD123的Molm-13AML细胞上人类化CD123mAb变体的EC50结合测定

7G3 变体	Molm-13 EC50 (nM)
m7G3	4.3
嵌合 7G3	2.0
HALA	5.5
HALB	4.1
HBLA	2.8
HBLB	3.5
HCLA	2.6
HCLB	2.1

表2-针对表达人和赛诺CD123的细胞人类化CD123mAb的亲和力测量

7G3变体	HEK293F-hCD123	HEK293F-赛诺CD123
m7G3	2.7nM	4.6nM
嵌合7G3	2.7	4.7

h7G3,G1	2.7	5.3
h7G3EC	2.7	6.6

h7G3EC-SGD-1910的体外抗肿瘤活性

与SGD-1910(吡咯并苯二氮卓二聚体药物连接物)结合的h7G3EC抗体的细胞毒活性针对表达CD123和CD33的一组AML细胞系进行评估。其活性与结合到SGD-1910的抗CD33抗体(CD33-SGD-1910)的活性进行对比。如表3所示,AML细胞系通常表达与CD33相比更低拷贝数的CD123。h7G3EC-SGD-1910ADC对11个CD123阳性AML细胞系中的10个具有活性(应答细胞系的平均IC50为7ng/mL,范围为0.02ng/ml到38ng/ml),而CD33-SGD-1910则对12个所测试的AML细胞系中的12个具有强有力的活性(平均IC50为26ng/mL,范围为0.04ng/ml到181ng/ml)。图1和图2示出与CD33相比h7G3EC-SGD-1910对两个表达低拷贝的CD123的MDR阳性的AML细胞系强有力的活性。与7300拷贝的CD33相比KG1-INV细胞系表达5000拷贝的CD123。与16000拷贝的CD33相比Kasumi-1细胞系表达2000拷贝的CD123。未观察到h7G3EC-SGD-1910对不表达CD123的HEL9217AML细胞系的细胞毒活性。另外还发现,h7G3EC-SGD-1910对17个从AML患者分离的原代样品中的15个具有活性(参见表4,应答样品的平均IC50为1ng/mL,范围为0.06ng/ml到6.5ng/ml)。相比之下,CD33-SGD-1910对17个原代AML样品中的10个具有活性(应答样品的平均IC50为2ng/mL,范围为0.23ng/ml到7.7ng/ml)。当非结合ADC针对AML细胞系或原代AML样品进行测试时未观察到活性(IC50>1000ng/ml)。总而言之,这些数据说明,h7G3EC-SGD-1910选择性地靶向表达CD123的细胞,并显示了对AML细胞系和原代AML患者样品强有力的细胞毒活性,不管MDR状体如何。

表3-h7G3EC-SGD-1910和CD33-SGD-1910药物结合物针对AML细胞系的体外活性

细胞系	CD123 受体数量	CD33 受体数量	MDR 状态	IC50, ng/ml	
				h7G3EC-SGD-1910	CD33-SGD-1910
HNT-34	24400	<20000	-	0.35	76
Molm-13	20000	38000	-	0.08	0.25
THP-1	8000	18000	-	24	5
NOMO-1	7000	15000	-	38	12
SKM-1	6600	24000	-	2.5	3.5
MV4-11	26100	18500	+/-	0.02	0.04
KG-1	9400	29000	+	0.8	1
KG1-INV	5000	7300	+	0.6	9
GDM-1	5500	5900	+	3.5	181
Kasumi-1	2000	16000	+	1	3.5
TF1a	2600	17000	+	>1000	3
HEL9217	0	19000	+	>1000	17

MDR,多抗药性;+,染料排出>背景以上2倍

表4-h7G3EC-1910和CD33-SGD-1910药物结合物对原代AML样品的体外活性

样品名称	CD123 表达（MFI）	CD33 表达（MFI）	MDR 状态	IC50（ng/mL）	
				h7G3EC-SGD-1910	CD33-SGD-1910
FH037	483	1593	+	0.68	>2.5
FH016	596	137	+	1.4	>2.5
FH025	1190	2527	+	6.5	7.7
FH034	1204	4125	+	0.22	1
FH023	2277	4987	无数据	0.06	0.23
FH038	2947	4031	+	0.18	1.3
FH018	3142	2435	+	0.12	0.34
FH036	3262	5068	+	0.16	0.31
FH026	4599	3999	+	0.22	0.39
FH028	828	549	-	2	>2.5
FH019	1480	472	-	>2.5	>2.5
FH022	1485	257	无数据	0.56	>2.5
FH020	1517	1603	+	2.5	2.8
FH027	418	2841	-	>2.5	>2.5
FH021	1558	99	+	1.6	>2.5
FH029	1824	1356	+	0.46	3
FH024	2403	897	+	2	3

MFI,平均荧光强度

MDR,多抗药性;+,染料排出>背景以上2倍

h7G3EC-SGD-1910的体内抗肿瘤活性

h7G3EC-SGD-1910的活性在两个皮下AML异种移植模型THP-1和KG-1中进行测试。如图3所示针对MDR阴性的THP-1模型(8000拷贝的CD123;18000拷贝的CD33)和如图4所示针对MDR阳性的KG-1肿瘤模型(7000拷贝的CD123,20000拷贝的CD33),给带有所建立的(～100mm^3)肿瘤的SCID小鼠施用h7G3EC-SGD-1910或非结合对照ADC(h00EC-SGD-1910)。与未治疗的小鼠和非结合对照ADC治疗的小鼠($p<0.0001$)相比,使用h7G3EC-SGD-1910进行治疗显著降低了肿瘤生长。使用靶向CD123的ADC观察到的抗肿瘤活性具有剂量依赖性。对于THP-1肿瘤,0.1mg/kg的单次剂量在8只治疗的小鼠中的2只中导致了完全且持久的肿瘤消退(图3)。0.3mg/kg的更高剂量在8只治疗的小鼠中的8只中导致了完全且持久的消退,并且肿瘤翻两番的中位日期(median day)在第85天研究结束时尚未达到。在MDR阳性的KG-1肿瘤模型中(图4),0.1mg/kg的单次剂量的h7G3EC-SGD-1910在8只治疗的小鼠中的1只中导致了完全且持久的肿瘤消退。另一方面,0.3mg/kg的单次剂量在8只治疗的小鼠中有1只产生完全消退,有3只产生完全且持久的肿瘤消退(与未治疗的小鼠相比$p<0.008$)。相反,类似施用非结合对照ADC(h00EC-SGD-1910)的小鼠中的肿瘤在第35天体积翻了两番,与未治疗的小鼠并无显著不同。给予0.1mg/kg或0.3mg/kg CD33-SGD-1910的小鼠的抗肿瘤应答与h7G3EC-SGD-1910的类似(图4)。数据说明h7G3EC-SGD-1910在与CD33相比表达更低CD123抗原水平的AML异种移植模型中显示显著的剂量依赖性抗肿瘤活性。

附加体内AML模型

方法

皮下AML模型

SCID小鼠用5×10^6个HNT-34AML肿瘤细胞进行皮下接种。用卡尺监测肿瘤生长,并使用

式(0.5×[长度×宽度^2])计算平均肿瘤体积。当平均肿瘤体积达到大约100mm^{3}时,各小鼠(n=8/组)不进行治疗,或者腹膜内施用单次剂量的CD123ADC或非结合对照ADC。当肿瘤体积达到大约1000mm^{3}时将小鼠安乐死。所有动物步骤在实验动物护理和使用委员会批准的方案下在国际实验动物评估和认可委员会认可的设施中进行。

弥散性AML模型

对于Molm-13模型,将5×10^{6}个细胞注射到SCID小鼠的侧尾静脉中,并且不进行治疗,或者在7天后腹膜内施用单次剂量的CD123ADC或非结合对照ADC。在治疗性给药之前大约4小时用人IVIg治疗(10mg/kg的单次腹膜内注射)小鼠,以最小化测试ADC与AML细胞上的Fc受体的相互作用。对动物进行观察并将其安乐死,以获得疾病进展的迹象,例如后肢麻痹或超过15%的体重损失。对于原代AML异种移植模型,在静脉内注射7×10^{5}个来自患有复发AML的患者的原代白血病细胞(06227;澳赛尔斯公司(AllCells),艾莫利维尔,加利福尼亚州)的1天前,将NOD/SCID/IL-2Rγ裸鼠(NSG;杰克逊实验室(Jackson Laboratory),巴尔港,缅因州)用1Gy照射。通过人CD45+/CD33+细胞的流式细胞术染色对血液和骨髓中的疾病负荷进行定期监测,并且当肿瘤负荷达到65%时开始治疗。为了监测治疗效果,从麻醉下的小鼠的上髁间的股骨凹口区域获得少量骨髓,并通过流式细胞计量术进行分析。使用GraphPad Prism对数据进行作图和分析。

结果

h7G3EC-SGD-1910的活性在一个皮下AML异种移植模型(HNT-34)和两个弥散性AML模型(Molm-13和原代AML模型)中进行了进一步的测试。如图7所示,给带有所建立的(~100mm^3)MDR阴性的HNT-34肿瘤(CD123拷贝数~24,000)的SCID小鼠施用h7G3EC-SGD-1910或非结合对照ADC。与未治疗的小鼠和非结合对照ADC治疗的小鼠($p<0.0001$)相比,用h7G3EC-SGD-1910进行治疗显著降低了肿瘤生长。使用靶向CD123的ADC观察到的抗肿瘤活性具有剂量依赖性。0.025mg/kg的单次剂量在8只治疗的小鼠中的2只中导致了完全且持久的肿瘤消退(图7)。0.075mg/kg的更高剂量在8只治疗的小鼠中的7只中导致了完全且持久的消退。对于CD123-ADC组,肿瘤翻两番的中位日期在第62天研究结束时尚未达到。

在MDR阴性的Molm-13弥散性AML模型中(图8,CD123拷贝数~20,000),在第7天施用0.01mg/kg或0.03mg/kg的单次剂量的h7G3EC-SGD-1910显著改善了小鼠的存活期。与对照组的22天到25天相比,经CD123-ADC治疗的小鼠的存活期大于80天(与未治疗、hIVIg,或非结合对照ADC相比$p<0.0001$)。使用来自患有复发AML的患者的原代白血病细胞(MDR+)在异种移植模型中还展示了CD123-ADC的抗白血病应答。将原代人白血病细胞移植到NSG小鼠中,并容许在骨髓中生长到65%的肿瘤负荷(CD123拷贝数~2200)。在第0天和第11天给小鼠施用0.3mg/kg CD123-SGD-1910(图9)。治疗的小鼠中的肿瘤负荷在第24天显著降低,并且直到第64天研究结束时仍保持在所降低的水平上。

数据说明h7G3EC-SGD-1910在几个表达不同CD123抗原水平并且不受MDR状态影响的AML异种移植模型(包括使用来自患有AML的人类患者的原代肿瘤细胞的模型)中具有显著的剂量依赖性抗肿瘤活性。

非正式序列表

SEQ ID NO:1,HC重链可变区

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQAPGQGLEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVD

RSISTAYMHLNRLRSDDTAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:2,LA轻链可变区

DFVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKRSEQ ID NO:3,HC重链,突变型IgG1在根据Kabat中所列EU索引的位置239处具有半胱氨酸取代

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQAPGQGLEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVD RSISTAYMHLNRLRSDDTAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:4,LA轻链

DFVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:5,突变体重链恒定区(在根据Kabat中所列EU索引的位置239处具有半胱氨酸取代)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:6,天然存在的重链恒定区

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:7,轻链恒定区

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:8,鼠类7G3抗体重链可变区

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVD RSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO:9,鼠类7G3抗体轻链可变区

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS GTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKRSEQ ID NO:10-人类化7G3的CDR-H1的氨基酸序列

DYYMK

SEQ ID NO:11-人类化7G3的CDR-H2的氨基酸序列

DIIPSNGATFYNQKFKG

SEQ ID NO:12-人类化7G3的CDR-H3的氨基酸序列

SHLLRASWFAY

SEQ ID NO:13-人类化7G3的CDR-L1的氨基酸序列

KSSQSLLNSGNQKNYLT

SEQ ID NO:14-人类化7G3的CDR-L2的氨基酸序列

WASTRES

SEQ ID NO:15-人类化7G3的CDR-L3的氨基酸序列

QNDYSYPYT

序列表

<110> SEATTLE GENETICS公司

<120> CD123抗体和其结合物

<130> IL3R-00211PC

<150> US 62/175,121

<151> 2015-06-12

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> HC的重链可变区

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LA的轻链可变区

<400> 2

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 3

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有在根据Kabat中所列EU索引的位置239处具有半胱氨酸取代的突变IgG1的HC的重链

<400> 3

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys
450

<210> 4
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> LA的轻链
<400> 4

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 5

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 突变重链恒定区(在根据Kabat中所列EU索引的位置239处具有半胱氨酸取代)

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 6
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 天然存在的重链恒定区
<400> 6
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 轻链恒定区
<400> 7
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 鼠类7G3抗体重链可变区
<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 9
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 鼠类7G3抗体轻链可变区
<400> 9

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 人类化7G3的CDR-H1的氨基酸序列
<400> 10
Asp Tyr Tyr Met Lys
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 人类化7G3的CDR-H2的氨基酸序列
<400> 11
Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 人类化7G3的CDR-H3的氨基酸序列
<400> 12
Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类化7G3的CDR-L1的氨基酸序列

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人类化7G3的CDR-L2的氨基酸序列

<400> 14

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

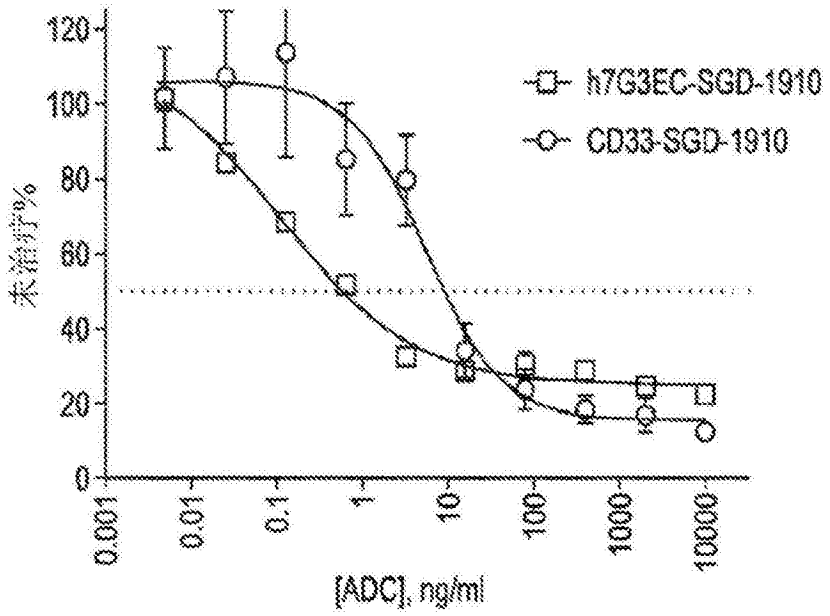
<213> 人工

<220>

<223> 人类化7G3的CDR-L3的氨基酸序列

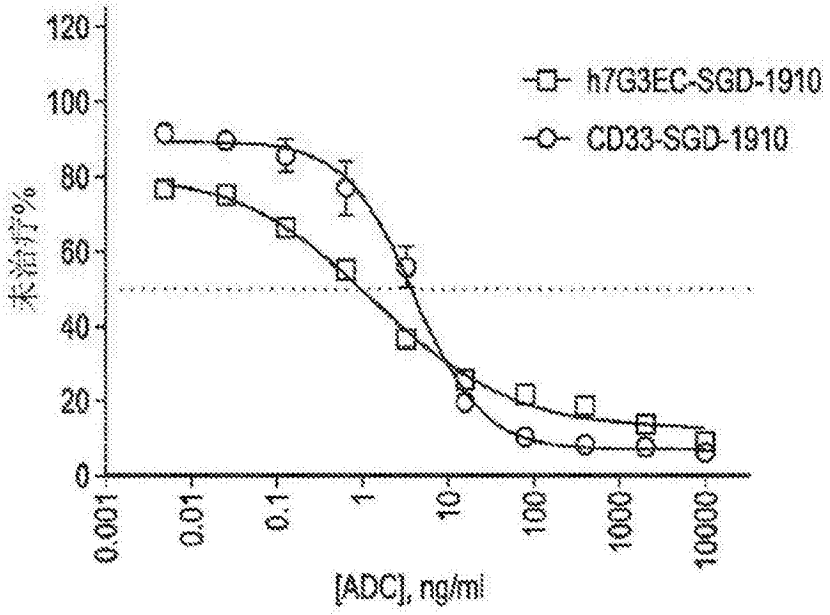
<400> 15

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5



	CD33-SGD-1910	h7G3EC-SGD-1910
x50	9.079	0.5689

图1



	CD33-SGD-1910	h7G3EC-SGD-1910
x50	3.662	0.9470

图2

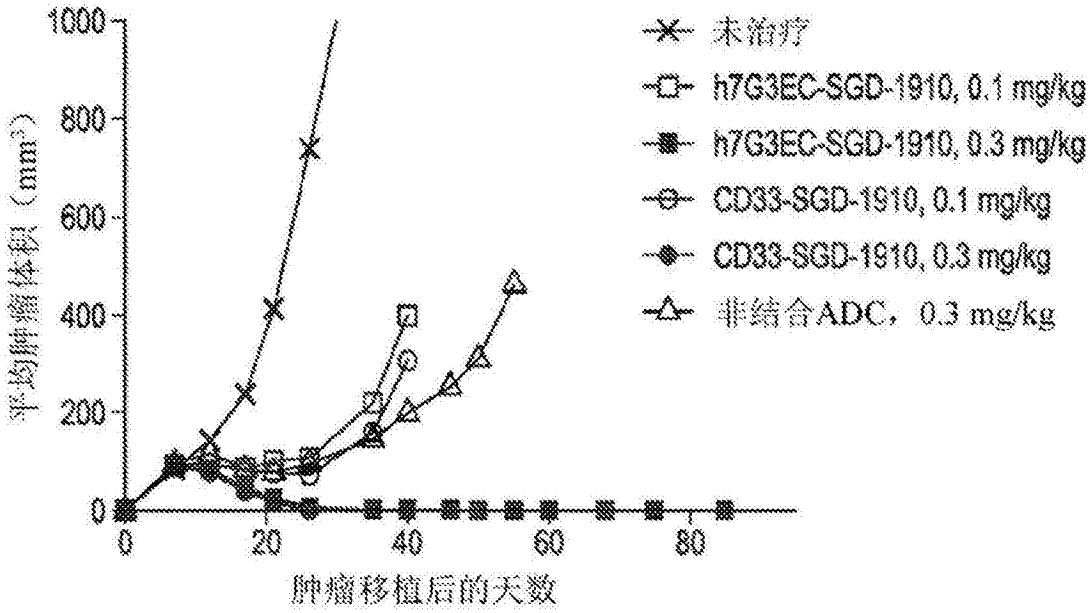

1000
800
600
400
200
0
平均肿瘤体积（mm³）
0
20
40
60
80
肿瘤移植后的天数
未治疗
h7G3EC-SGD-1910, 0.1 mg/kg
h7G3EC-SGD-1910, 0.3 mg/kg
CD33-SGD-1910, 0.1 mg/kg
CD33-SGD-1910, 0.3 mg/kg
非结合ADC，0.3 mg/kg

图3

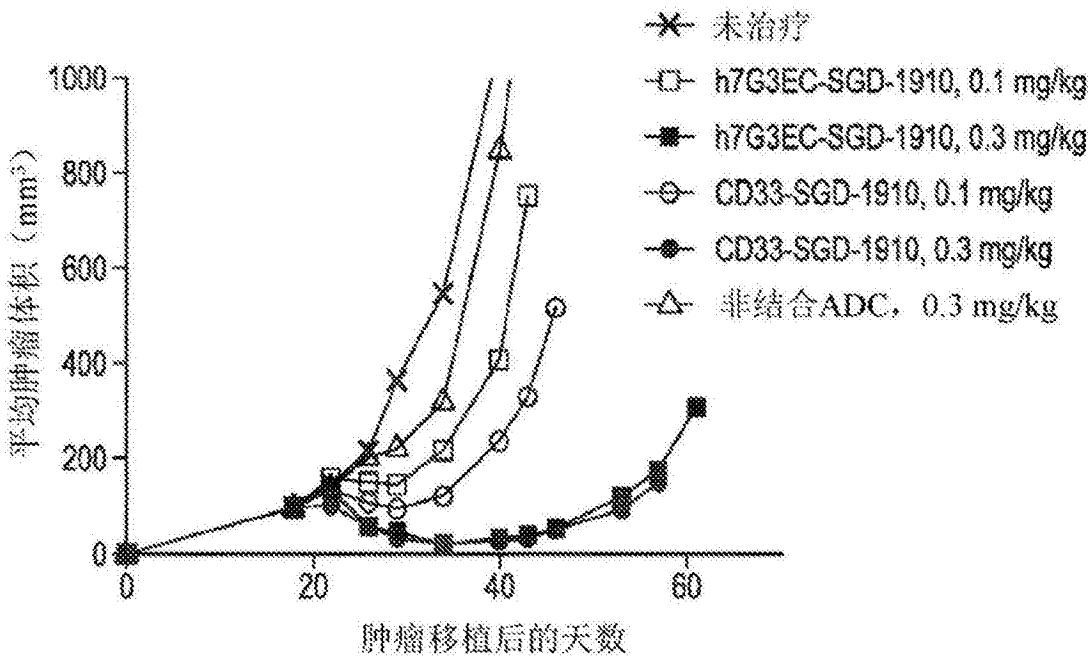

1000
800
600
400
200
0
平均肿瘤体积（mm³）
0
20
40
60
肿瘤移植后的天数
未治疗
h7G3EC-SGD-1910, 0.1 mg/kg
h7G3EC-SGD-1910, 0.3 mg/kg
CD33-SGD-1910, 0.1 mg/kg
CD33-SGD-1910, 0.3 mg/kg
非结合ADC，0.3 mg/kg

图4

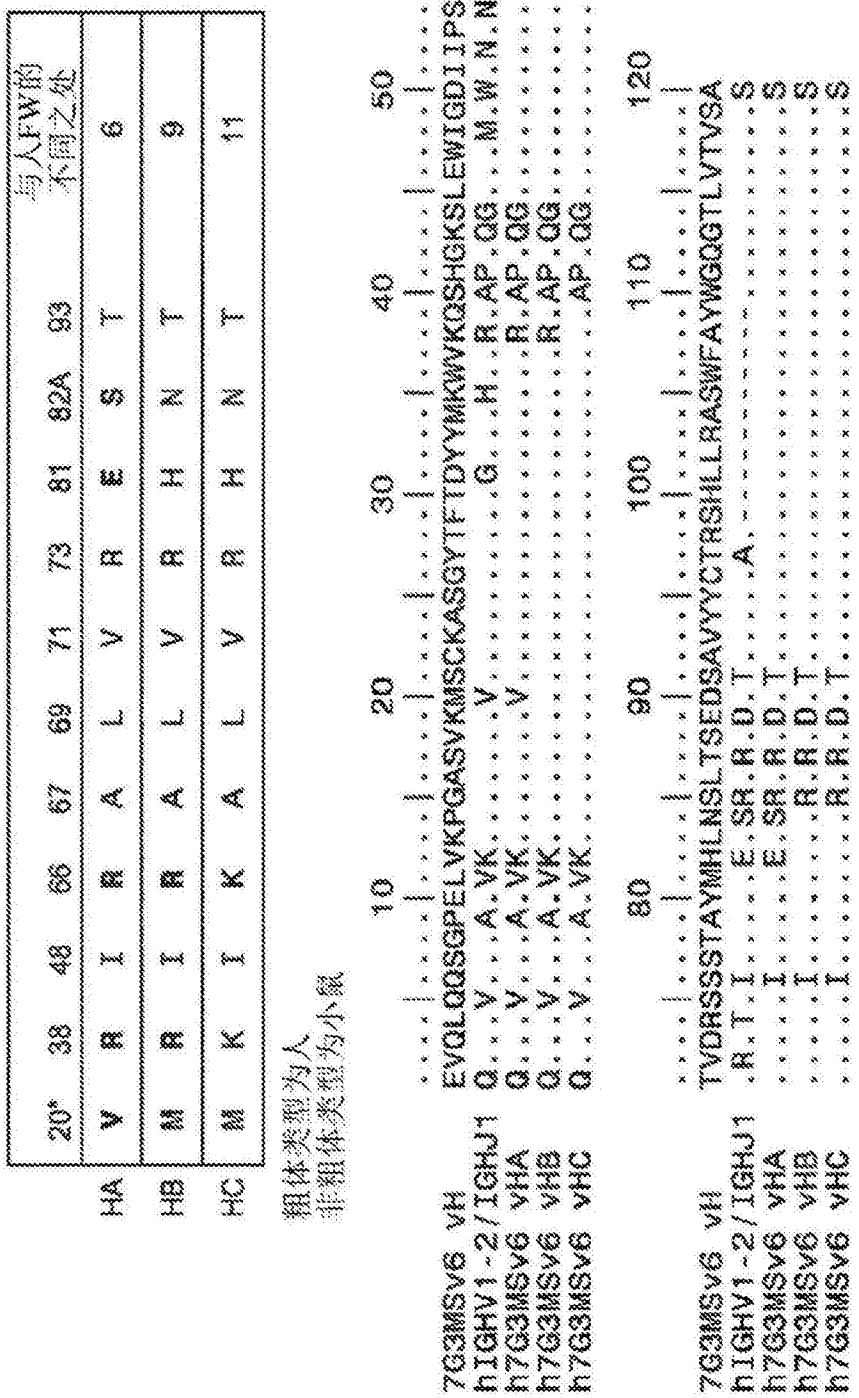

与人FW的不同之处
20* 38 48 66 67 69 71 73 81 82A 93
HA V R I R A L V R E S T 6
HB M R I R A L V R H N T 9
HC M K I K A L V R H N T 11
粗体类型为人
非粗体类型为小鼠
7G3MSv6 vH EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATL
hIGHV1-2/IGHJ1 Q...V...A.VK.....V.....G...H..R.AP.QG...M.W.N.NS.G.N.A...Q.RV.M
h7G3MSv6 vHA Q...V...A.VK.....V.....R.AP.QG.....R...
h7G3MSv6 vHB Q...V...A.VK.....R.AP.QG.....R...
h7G3MSv6 vHC Q...V...A.VK.....AP.QG.....
7G3MSv6 vH TVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSA
hIGHV1-2/IGHJ1 .R.T.I.....E.SR.R.D.T.....A.----------.....S
h7G3MSv6 vHA .....I.....E.SR.R.D.T.....S
h7G3MSv6 vHB .....I.....R.R.D.T.....S
h7G3MSv6 vHC .....I.....R.R.D.T.....S

图5

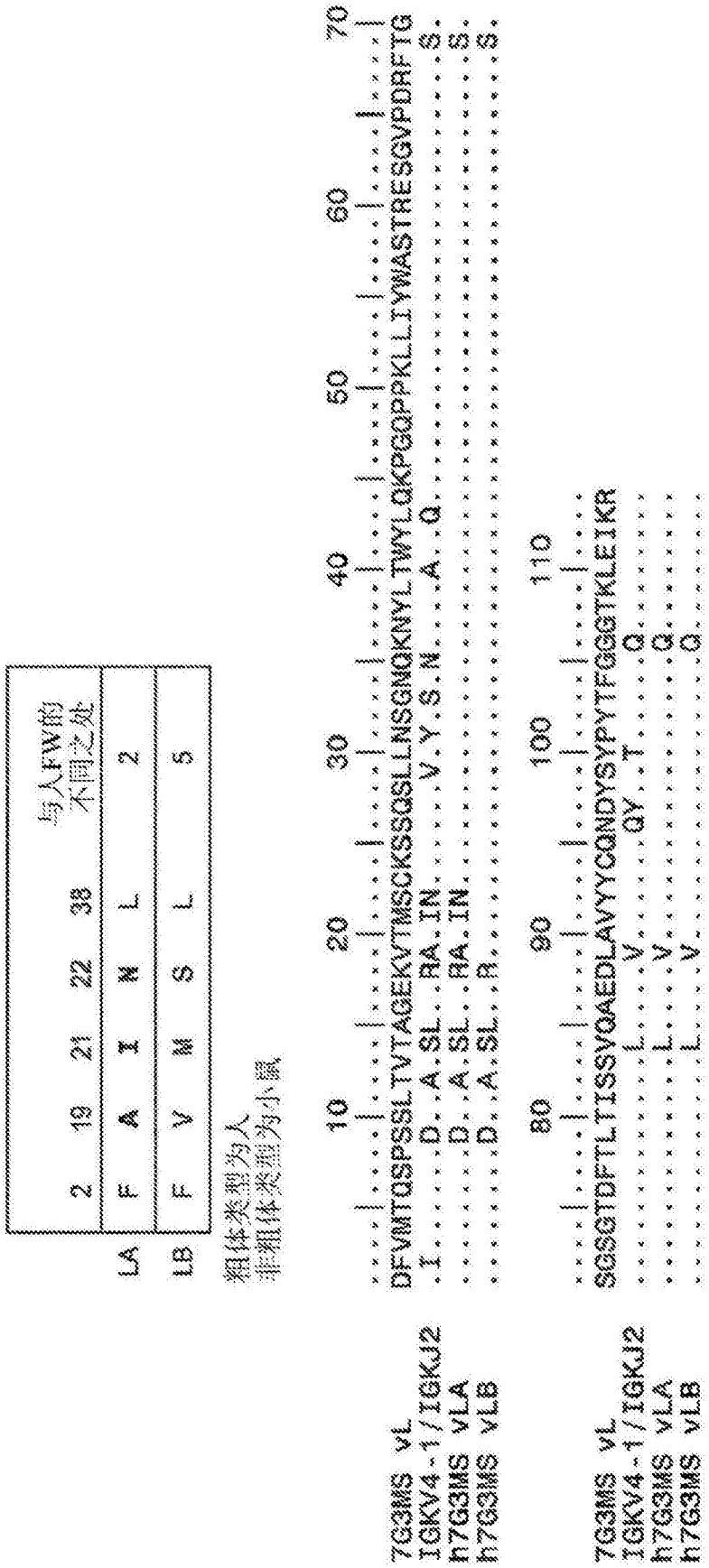

与人FW的不同之处
2 19 21 22 38
LA F A I W L 2
LB F V M S L 5
粗体类型为人
非粗体类型为小鼠
10 20 30 40 50 60 70
DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTG
7G3MS vL .I.....D..A.SL..RA.IN.....V.Y.S.N....A..Q.....S.
IGKV4-1/IGKJ2 .I.....D..A.SL..RA.IN.....V.Y.S.N....A..Q.....S.
h7G3MS vLA .I.....D..A.SL..RA.IN.....V.Y.S.N....A..Q.....S.
h7G3MS vLB .I.....D..A.SL..R.....V.Y.S.N....A..Q.....S.
80 90 100 110
7G3MS vL SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKR
IGKV4-1/IGKJ2 .....L.....V.....QY..T.....Q.....
h7G3MS vLA .....L.....V.....Q.....
h7G3MS vLB .....L.....V.....Q.....

图6

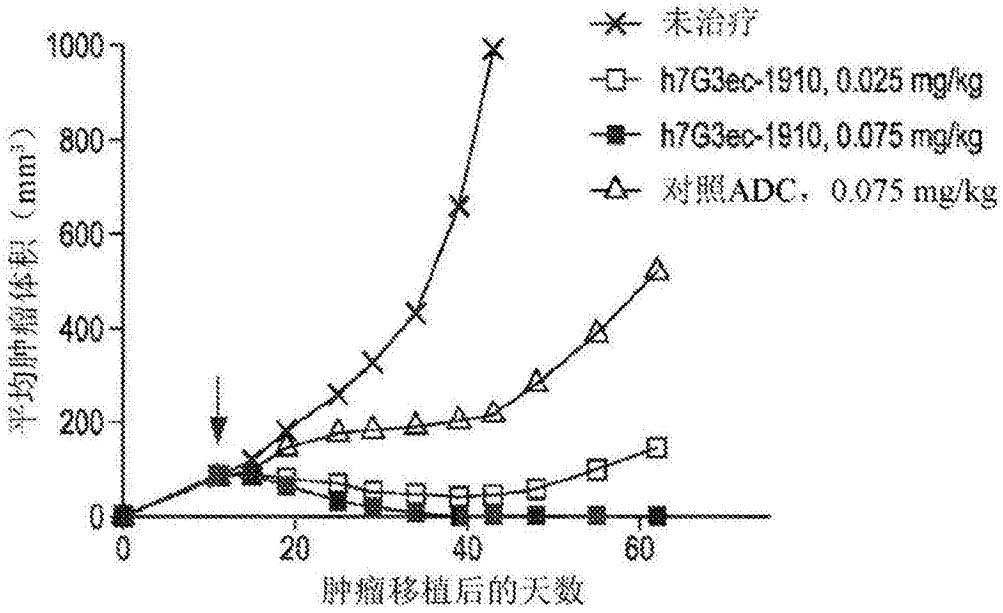

未治疗
h7G3ec-1910, 0.025 mg/kg
h7G3ec-1910, 0.075 mg/kg
对照ADC，0.075 mg/kg
平均肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
肿瘤移植后的天数

图7

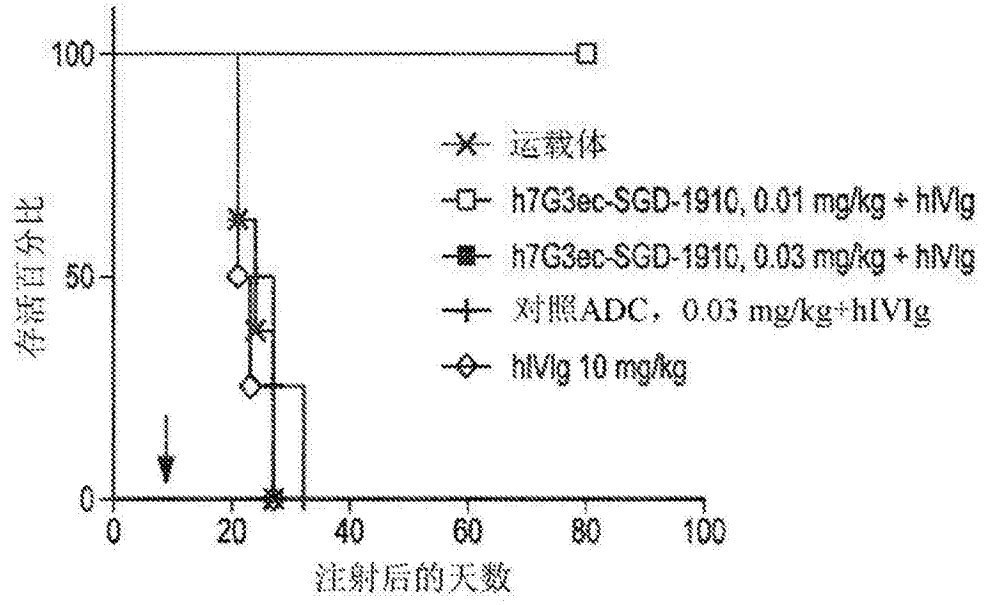

运载体
h7G3ec-SGD-1910, 0.01 mg/kg + hIVIg
h7G3ec-SGD-1910, 0.03 mg/kg + hIVIg
对照ADC，0.03 mg/kg+hIVIg
hIVIg 10 mg/kg
存活百分比
100
50
0
0
20
40
60
80
100
注射后的天数

图8

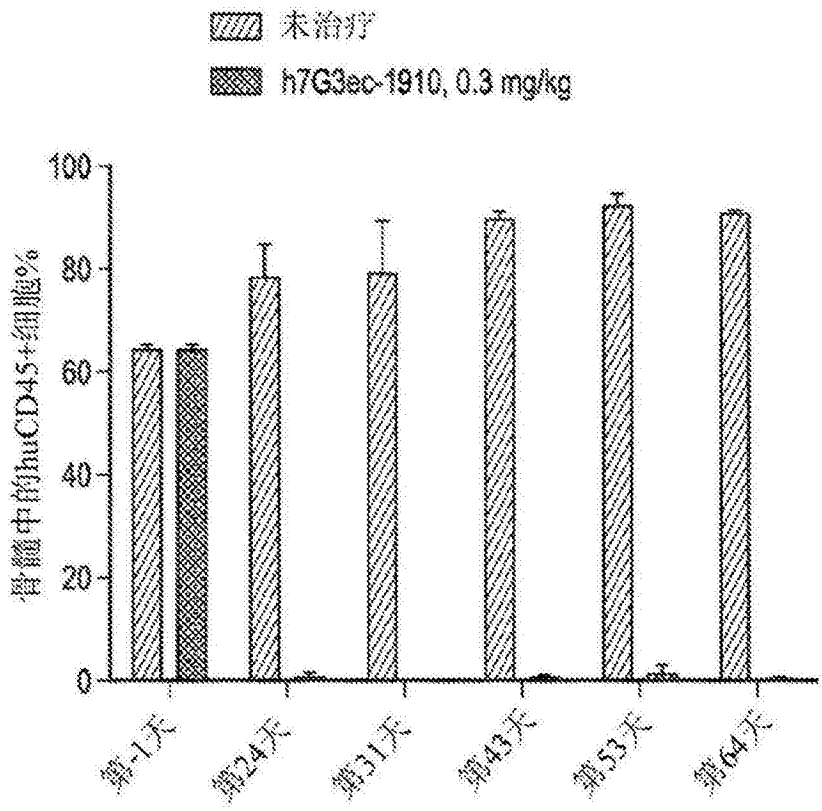

未治疗
h7G3ec-1910, 0.3 mg/kg
骨髓中的huCD45+细胞%
100
80
60
40
20
0
第-1天
第24天
第31天
第43天
第53天
第64天

图9