



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120248124 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202510430627.9

(22) 申请日 2016.06.28

(30) 优先权数据

62/186,161 2015.06.29 US

62/338,203 2016.05.18 US

62/346,730 2016.06.07 US

(62) 分案原申请数据

201680038058.2 2016.06.28

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 Y·科夫通 D·塔瓦瑞斯 芮凌云

T·奇藤登

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 毛云贝

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/65 (2017.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书18页 说明书316页
序列表(电子公布) 附图54页

(54) 发明名称

抗CD123抗体及其缀合物和衍生物

(57) 摘要

本公开总体上涉及结合至CD123抗原(白细胞介素3受体的 α 链或IL-3Ra)的抗体、其抗原结合片段、多肽以及免疫缀合物。本公开还涉及使用此类CD123结合分子来诊断和治疗诸如B细胞恶性肿瘤的疾病的方法。

1. 一种抗体或其抗原结合片段,其:

(a) 结合人CD123/IL3-R α 抗原的氨基酸101至346内的表位,以及

(b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

i) 至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:

SEQ ID NO:4、11和15;和

ii) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20和23;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:

SEQ ID NO:18、22和25。

2. 一种抗体或其抗原结合片段,其:

(a) 结合人CD123抗原的氨基酸1至100内的表位,以及

(b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖,其中IC₅₀值为0.1nM或更小(例如,0.08nM、0.05nM、0.03nM),其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

i) 至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:

SEQ ID NO:4、11和15;和

ii) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20和23;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:

SEQ ID NO:18、22和25。

3. 一种多肽,其包含如权利要求1或2所述的V_H序列和V_L序列。

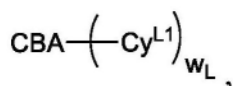
4. 一种细胞,其产生如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽。

5. 一种产生如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的多肽的方法,所述方法包括:

(a) 培养如权利要求4所述的细胞;以及,

(b) 自所述培养的细胞分离所述抗体、其抗原结合片段或多肽。

6. 一种免疫缀合物,其具有下式:

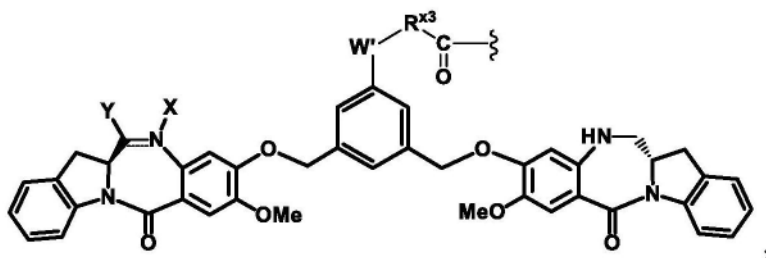
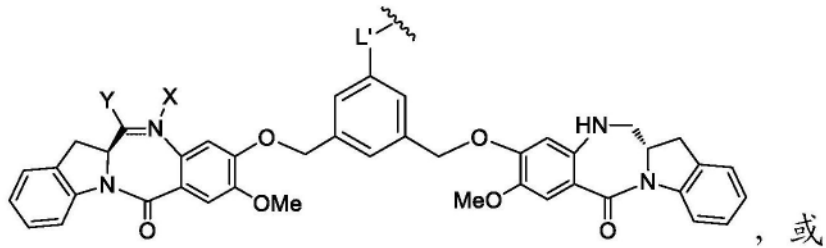


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至 Cy^{L1} ;

W_L 是1至20的整数;并且

Cy^{L1} 由以下各式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或 $-SO_3M$;

W' 是 $-NR^e$;

R^e 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n是2至6的整数;

R^k 是-H或-Me;

R^{k3} 是 (C_1-C_6) 烷基;

L' 由以下各式表示:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-(B1')$;或

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-(B3')$;

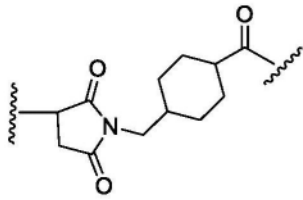
R_5 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;

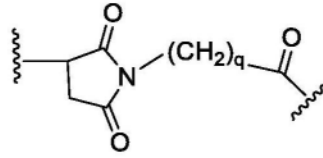
R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地是-H、 (C_1-C_3) 烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

m是1至6的整数;并且

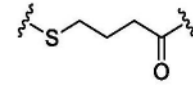
Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



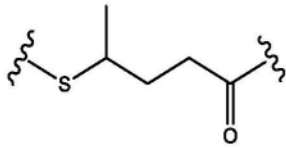
(b1);



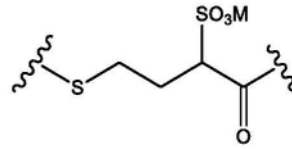
(b2);



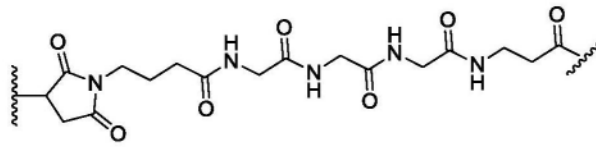
(b3);



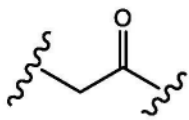
(b4);



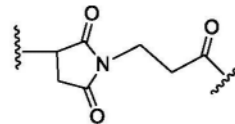
(b5);



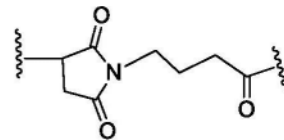
(b6);



(b7);

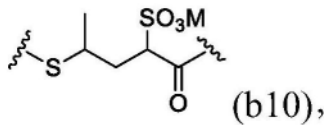


(b8);



(b9);

以及



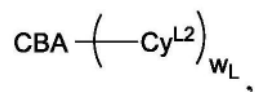
(b10),

其中:

q是1至5的整数;并且

M是H⁺或阳离子。

7. 一种免疫缀合物,其具有下式:

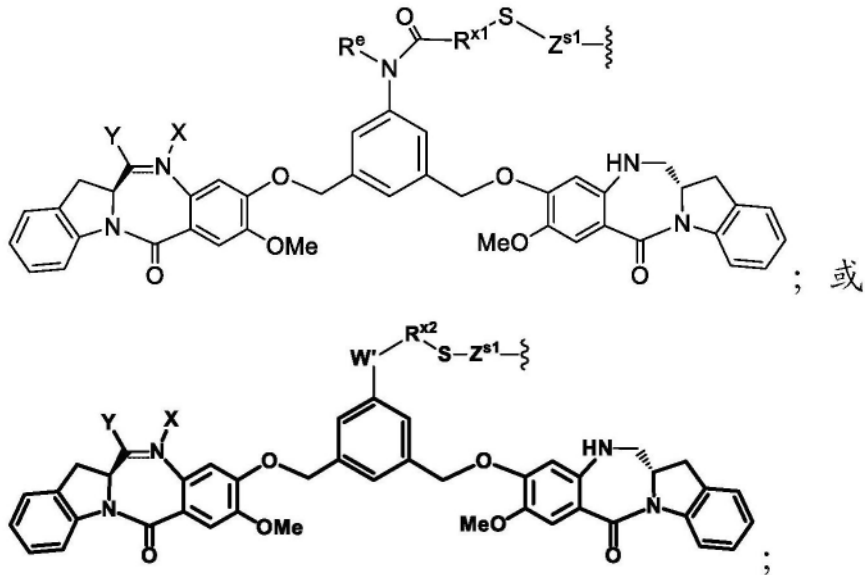


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至Cy^{L2};

w_L是1至20的整数;并且

Cy^{L2}由以下各式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

R^{x1}和R^{x2}独立地是(C₁-C₆)烷基;

R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

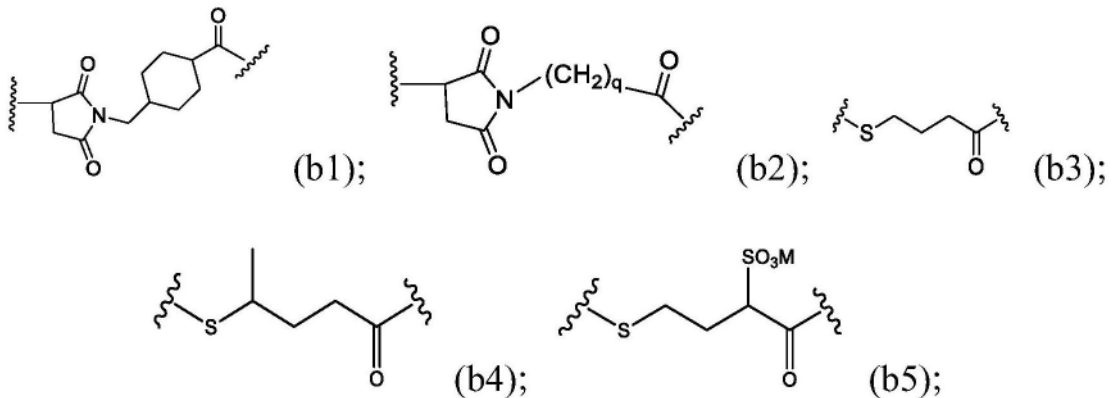
W'是-NR^{e'};

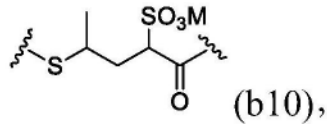
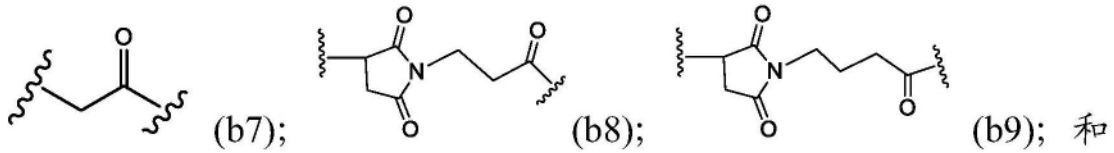
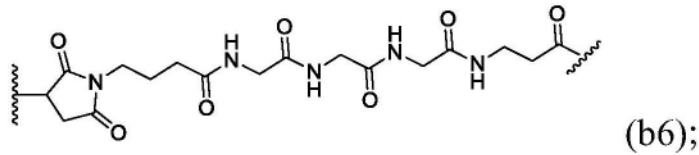
R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n是2至6的整数;

R^k是-H或-Me;

Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



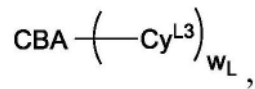


其中:

q是1至5的整数;并且

M是-H⁺或阳离子。

8. 一种免疫缀合物,其具有下式:

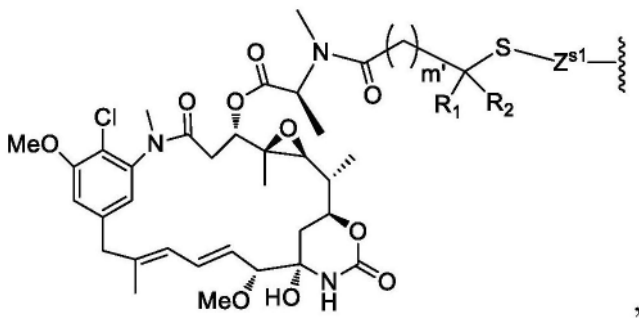


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽,其通过Lys残基共价连接至Cy^{L3};

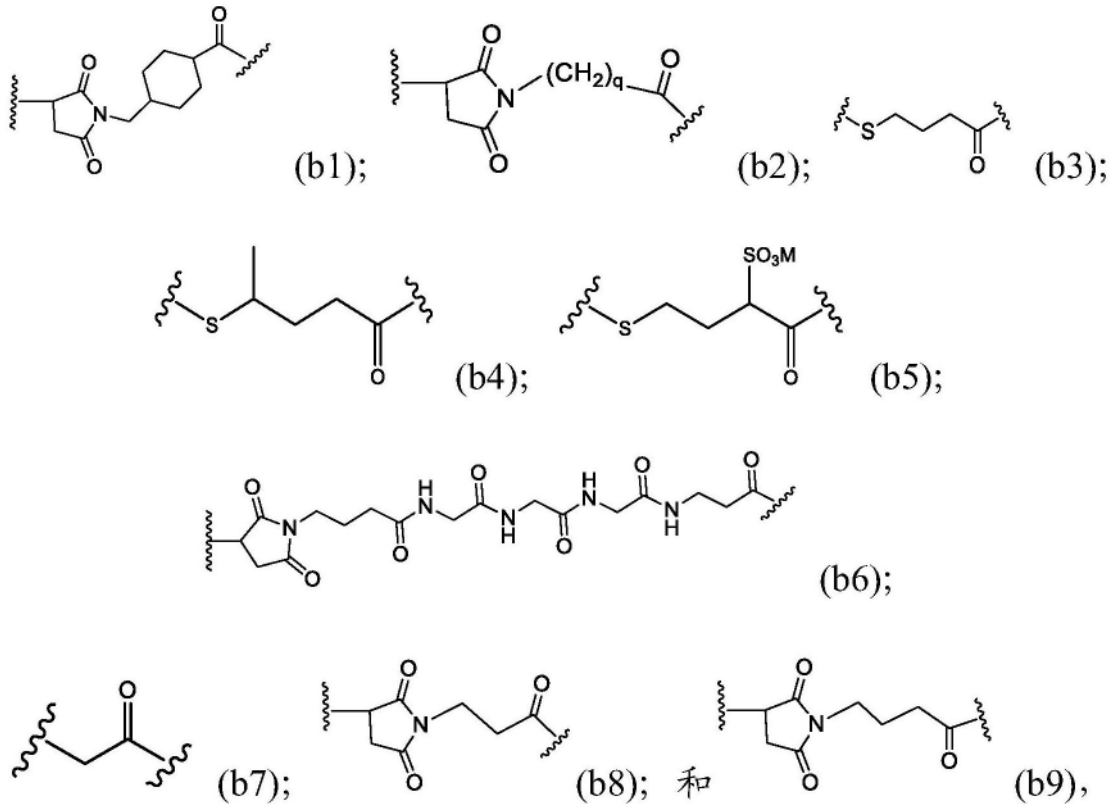
w_L是1至20的整数;

Cy^{L3}由下式表示:



m'是1或2;

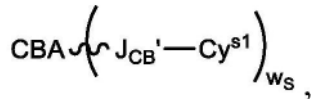
R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



其中:

q是1至5的整数;并且M是H⁺或阳离子。

9.一种免疫缀合物,其具有下式:

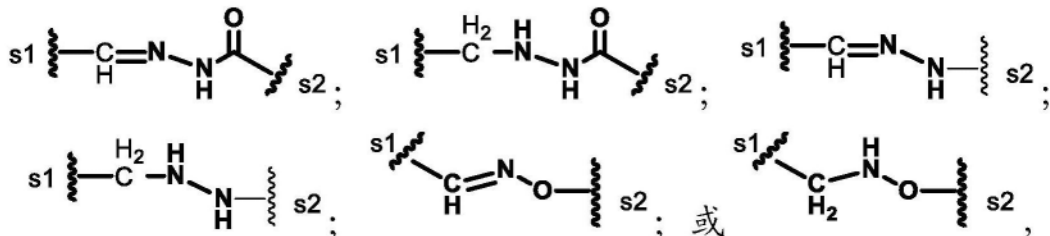


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

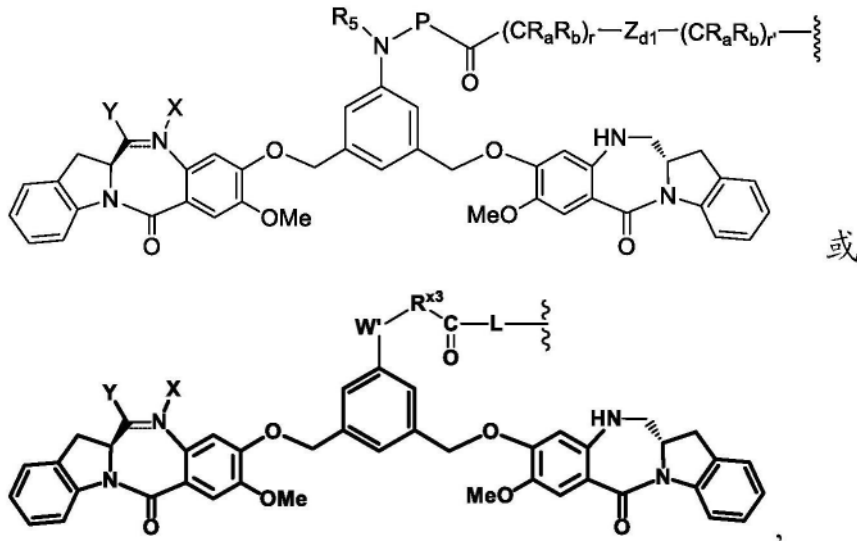
w_s是1、2、3或4;

J_{CB'}是通过使来源于如权利要求1或2所述的所述抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s1}上的醛反应性基团反应而形成的部分,并且由以下各式表示:



其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s1}共价连接的位点;

Cy^{s1}由以下各式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

Z_{d1}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

r和r'独立地是1至6的整数;

W'是-NR^{e'};

R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n是2至6的整数;

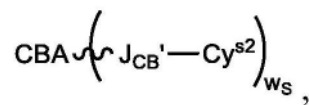
R^k是-H或-Me;

R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

L是-NR₉-(CR_aR_b)_r或不存在;并且

r''是0至6的整数。

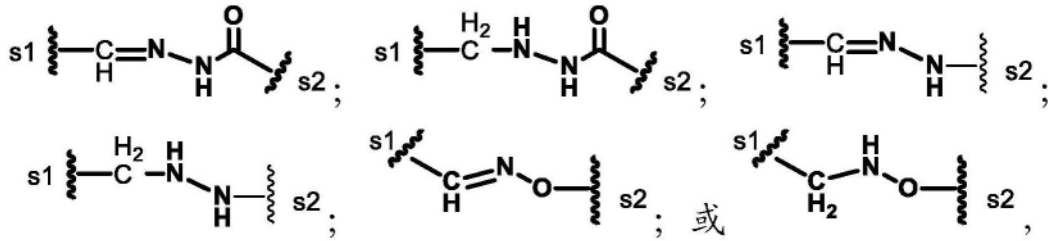
10. 一种免疫缀合物,其具有下式:



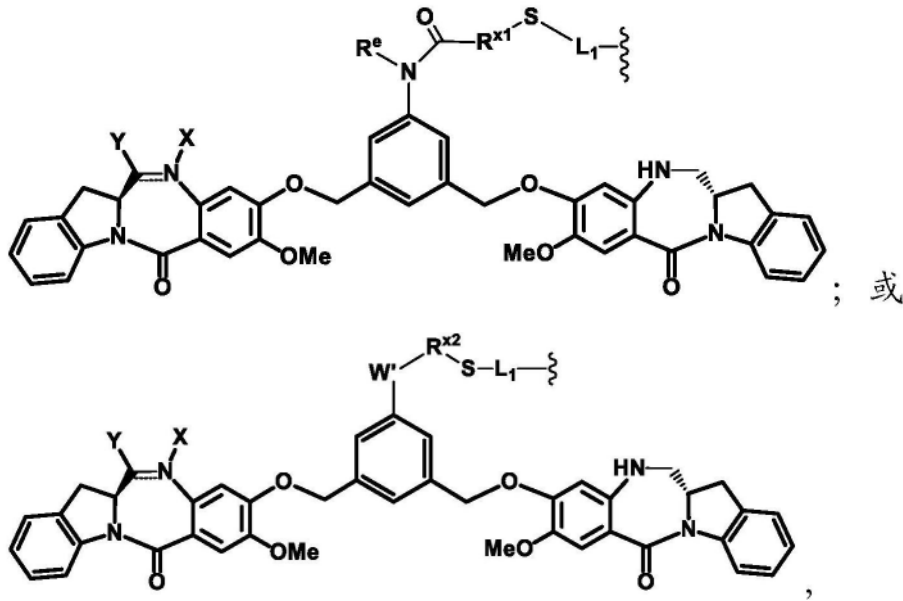
其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

J_{CB'}是通过使来源于如权利要求1或2所述的所述抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s2}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:



其中s1是与所述CBA共价连接的位点；并且s2是与 Cy^{s2} 共价连接的位点； Cy^{s2} 由以下各式表示：



或其药学上可接受的盐，其中：

介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键，其限制条件是当其是双键时，X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基；并且当其是单键时，X是-H或胺保护部分，且Y是-OH或 $-\text{SO}_3\text{M}$ ；

M是 H^+ 或阳离子；

R^{x1} 是 (C_1-C_6) 烷基；

R^e 是-H或 (C_1-C_6) 烷基；

W' 是 $-\text{NR}^e$ ，

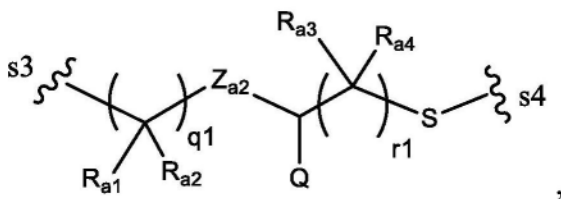
R^e 是 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ；

n是2至6的整数；

R^k 是-H或-Me；

R^{x2} 是 (C_1-C_6) 烷基；

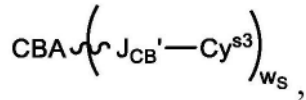
L_1 由下式表示：



其中：

s3是与所述基团 J_{CB} '共价连接的位点；

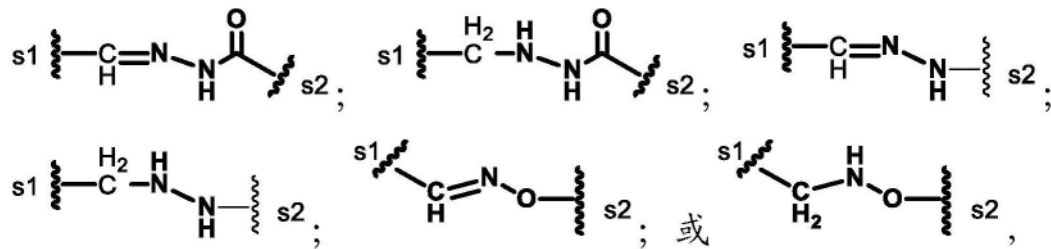
s4是与Cy^{s2}上的-S-基团共价连接的位点；
 Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-；
 R₉是-H或(C₁-C₃)烷基；
 Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团；
 R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基；并且
 q1和r1各自独立地是0至10的整数，其限制条件是q1和r1不均是0。
 11.一种免疫缀合物，其具有下式：



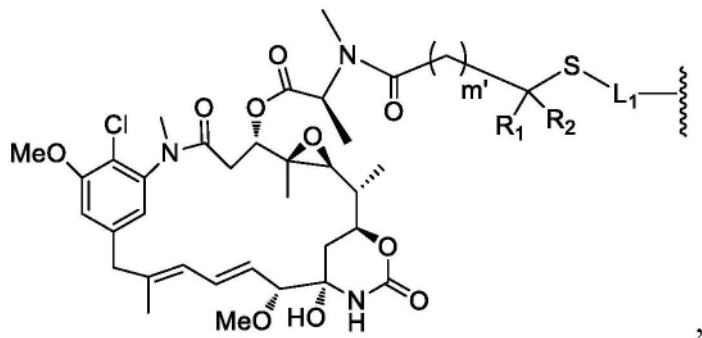
其中：

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽，其共价连接至J_{CB'}基团；

J_{CB'}是通过使来源于如权利要求1或2所述的所述抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s3}上的醛反应性基团反应而形成的部分，且由以下各式表示：

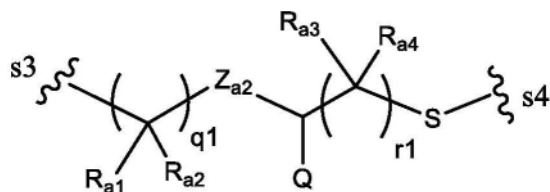


其中s1是与所述CBA共价连接的位点；并且s2是与Cy^{s3}共价连接的位点；
 Cy^{s3}由下式表示：



其中：

m'是1或2；
 R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基；
 L₁由下式表示：



其中:

s3是与所述基团 J_{CB} '共价连接的位点;

s4是与 Cy^{s3} 上的-S-基团共价连接的位点;

Z_{a2} 是不存在、 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;

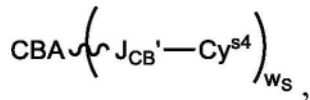
R_9 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

R_{a1} 、 R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 在每次出现时独立地是H或 (C_1-C_3) 烷基;并且

q1和r1各自独立地是0至10的整数,其限制条件是q1和r1不均是0。

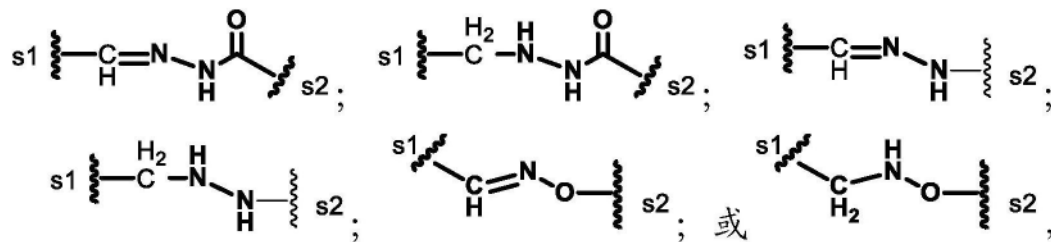
12.一种免疫缀合物,其具有下式:



其中:

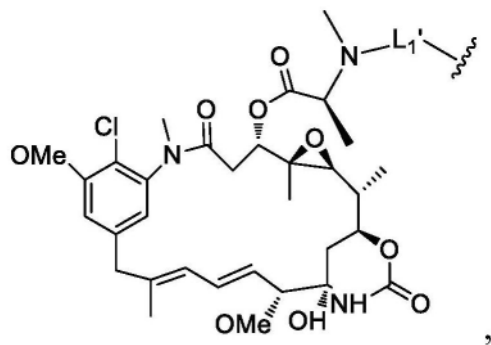
CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽,其共价连接至 J_{CB}' 基团;

J_{CB}' 是通过使来源于如权利要求1或2所述的所述抗体或其抗原结合片段或如权利要求3所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与 Cy^{s4} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

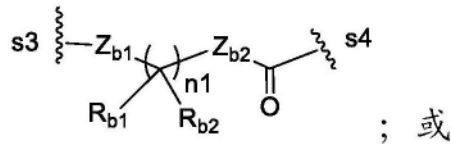


其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与 Cy^{s4} 共价连接的位点;

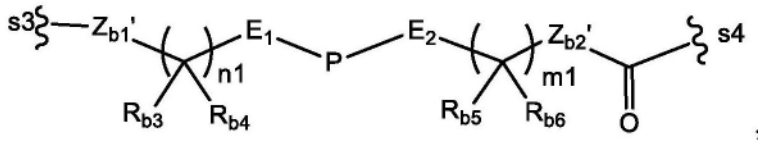
Cy^{s4} 由以下各式表示:



L_1' 由以下各式表示:



; 或



其中:

s3是与所述基团J_{CB}'基团共价连接的位点;s4是与Cy^{s4}上的-NMe-基团共价连接的位点;Z_{b1}和Z_{b2}两者均不存在,或Z_{b1}和Z_{b2}中的一者不存在且另一者是-CH₂-O-或-O-CH₂-;Z_{b1}'和Z_{b2}'各自独立地是不存在、-CH₂-O-、-O-CH₂-、-NR₉-C(=O)-CH₂-或-CH₂-C(=O)-NR₉-;R₉是H或(C₁-C₃)烷基;

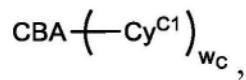
n1和m1各自独立地是1至6的整数;

E₁和E₂中的一者是-C(=O)-且另一者是-NR₉-;或E₁和E₂中的一者是-C(=O)-或-NR₉-且另一者不存在;

P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;并且

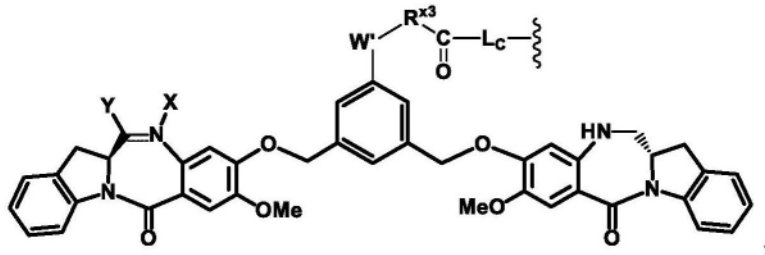
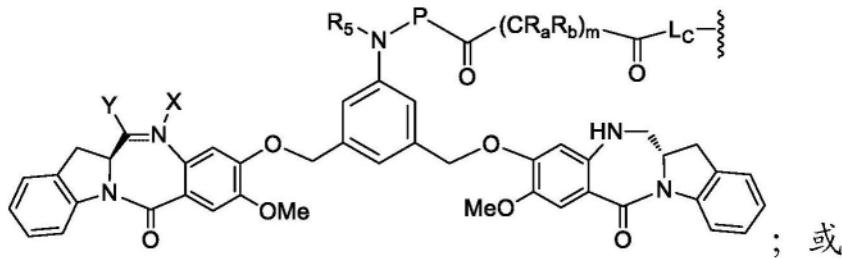
R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}在每次出现时各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基。

13. 一种免疫缀合物,其由下式表示:



其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C1};w_c是1或2;Cy^{C1}由以下各式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

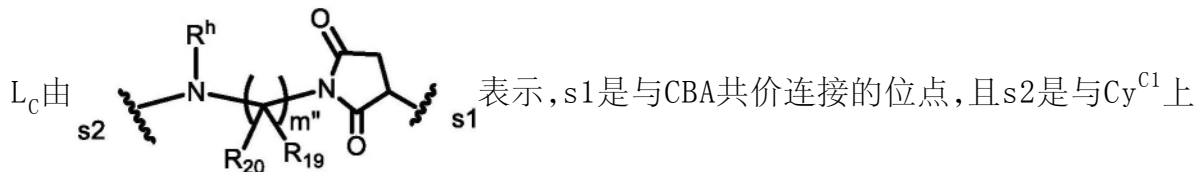
W'是-NR^{e'};

R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

n是2至6的整数;

R^k是-H或-Me;

R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;并且



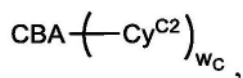
的-C(=O)-基团共价连接的位点;其中:

R₁₉和R₂₀在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

m''是介于1与10之间的整数;并且

R^h是-H或(C₁-C₃)烷基。

14.一种免疫缀合物,其由下式表示:

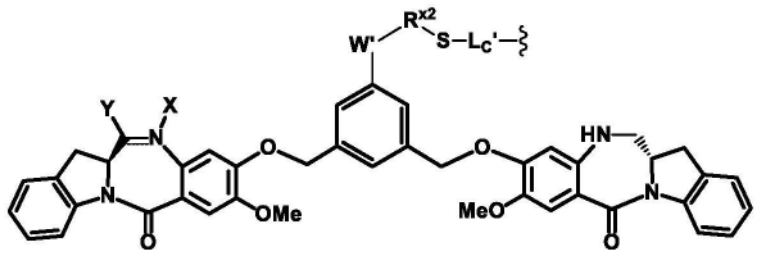
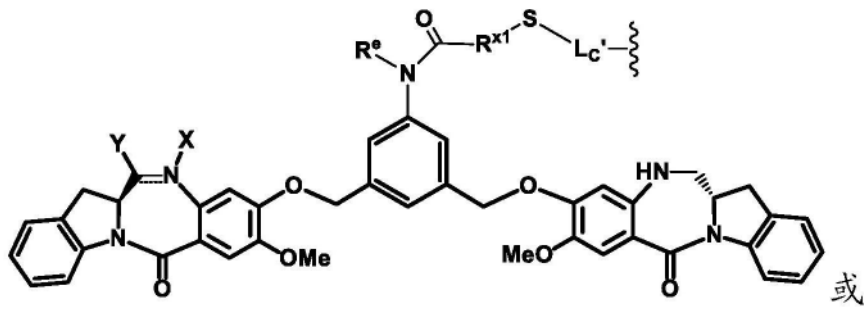


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C2};

W_c 是1或2;

Cy^{C2} 由以下各式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或 $-SO_3M$,且M是 H^+ 或阳离子;

R^{x1} 是 (C_1-C_6) 烷基;

R^e 是-H或 (C_1-C_6) 烷基;

W' 是 $-NR^e$;

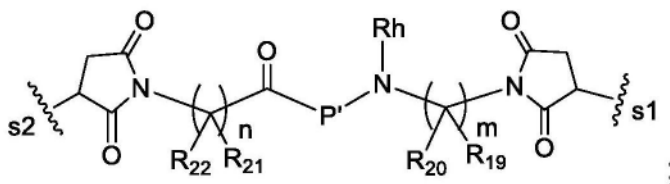
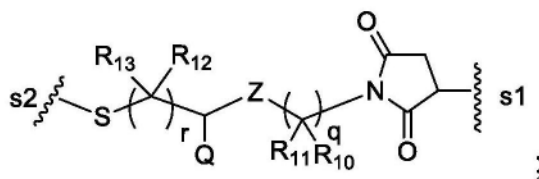
R^e 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n是2至6的整数;

R^k 是-H或-Me;

R^{x2} 是 (C_1-C_6) 烷基;

L_c' 由以下各式表示:



其中:

s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与 Cy^{C2} 上的-S-基团共价连接的位点;

Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

Q是-H、带电荷的取代基或可离子化基团;

R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

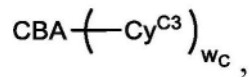
q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

15. 一种免疫缀合物,其具有下式:

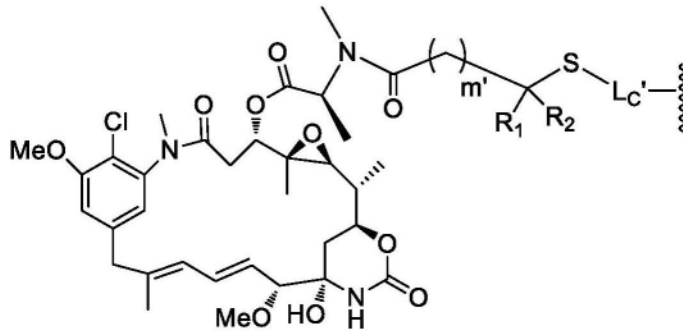


其中:

CBA是如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C3};

w_c是1或2;

Cy^{C3}由下式表示:

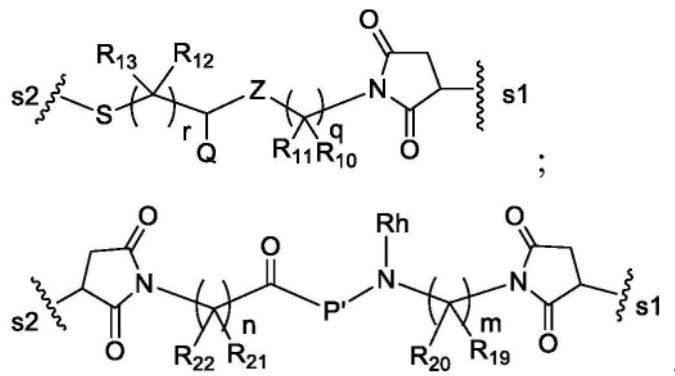


其中:

m'是1或2;

R₁和R₂各自独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

L_c'由以下各式表示:



其中:

s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C3}上的-S-基团共价连接的位点;

Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

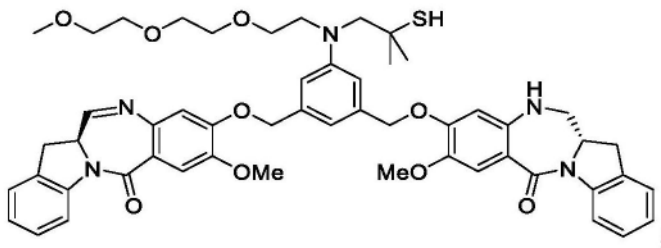
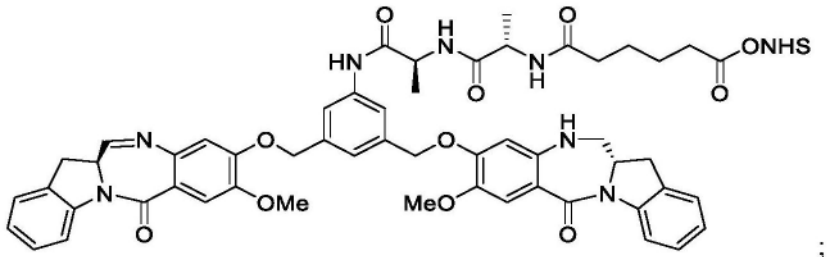
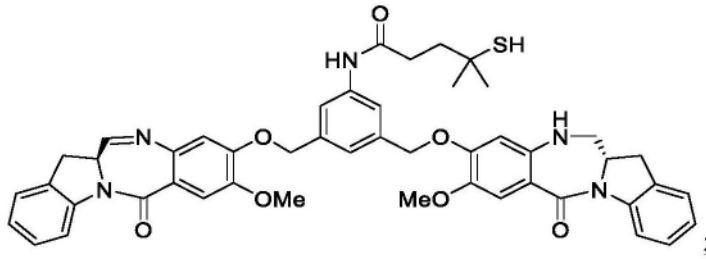
R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基；
q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数；
m和n各自独立地是介于0与10之间的整数；
 R^h 是-H或(C₁-C₃)烷基；并且
P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

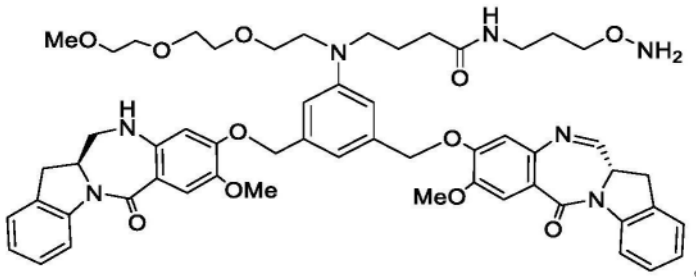
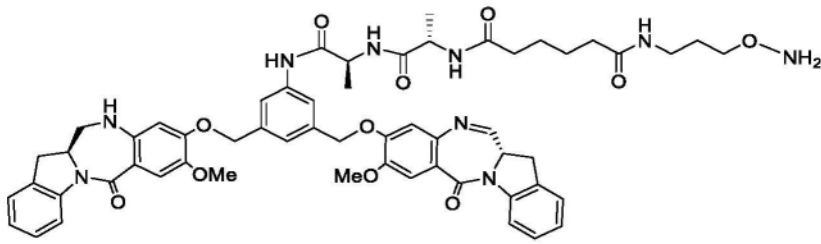
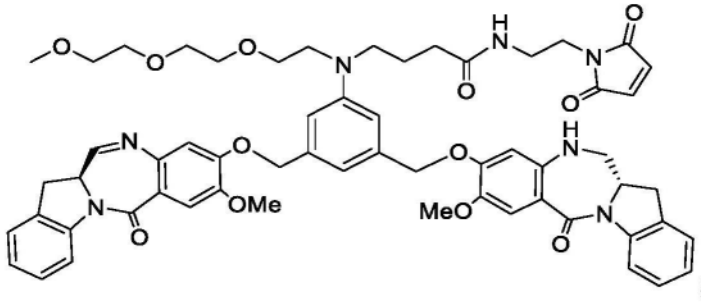
16. 一种药物组合物,其包含如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽,或如权利要求6-15中任一项所述的免疫缀合物,和药学上可接受的载体。

17. 如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽,或如权利要求6-15中任一项所述的免疫缀合物,或如权利要求16所述的药物组合物在制备用于抑制表达CD123的细胞生长的药物的用途,其中所述细胞为肿瘤细胞,所述抑制包括使所述细胞与如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽,或如权利要求6-15中任一项所述的免疫缀合物,或如权利要求16所述的药物组合物接触。

18. 如权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求3所述的多肽,或如权利要求6-15中任一项所述的免疫缀合物,或如权利要求16所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的细胞增殖性病症的药物的用途,其中所述细胞增殖性病症的细胞表达CD123,其中所述细胞增殖性病症选自由以下各项组成的组:急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B细胞谱系急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、骨髓发育不良综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤和霍奇金氏白血病(HL)。

19. 一种细胞毒性化合物,其由以下各式表示:





抗CD123抗体及其缀合物和衍生物

[0001] 本申请是申请日为2016年6月28日、申请号为201680038058.2、发明名称为“抗CD123抗体及其缀合物和衍生物”的发明专利申请的申请日为2016年6月28日、申请号为202210033457.7、发明名称为“抗CD123抗体及其缀合物和衍生物”的分案申请的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求2015年6月29日提交的美国临时申请号62/186,161、2016年5月18日提交的美国临时申请号62/338,203和2016年6月7日提交的美国临时申请号62/346,730的提交日期的权益。以上引用的申请中的每一者的全部内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0004] 本发明总体上涉及结合CD123抗原(白细胞介素-3受体的 α 链或IL-3R α)的抗体、其抗原结合片段、多肽和免疫缀合物。本发明还涉及使用此类CD123结合分子来诊断和治疗诸如B细胞恶性肿瘤的疾病的方法。

发明背景

[0006] CD123(白细胞介素3受体 α , IL-3R α)是作为白细胞介素3受体(IL-3R)复合物的一部分的40kDa分子。细胞因子白细胞介素3(IL-3)驱动多能干细胞早期分化成红细胞、骨髓细胞和淋巴祖细胞。CD123表达于CD34⁺定向祖细胞上,而非由CD34⁺/CD38⁻正常造血干细胞(HSC)表达。CD123由嗜碱性粒细胞、肥大细胞、浆细胞样树突状细胞表达,一些表达由单核细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞进行,并且低或无表达由嗜中性粒细胞和巨核细胞进行。一些非造血组织,诸如胎盘、睾丸莱氏细胞、某些脑细胞元件和一些内皮细胞,也表达CD123。然而,在那里的表达主要是细胞质表达。

[0007] 据报道CD123由白血病母细胞(“白血病原始细胞”)和白血病干细胞(LSC)表达(Jordan等人,Leukemia 14:1777-1784,2000;Jin等人,Blood 113:6603-6610,2009)。在人正常前体群体中,CD123由造血祖细胞(HPC)的一个子集而非由正常HSC表达。据报道CD123还由浆细胞样树突状细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞表达,且在较小程度上由单核细胞和嗜酸性粒细胞表达。

[0008] 已报道CD123在广泛范围的血液学恶性肿瘤,包括急性骨髓性白血病(AML)和骨髓发育不良综合征(MDS)中过度表达于恶性细胞上(Muñoz等人,Haematologica 86(12):1261-1269,2001)。CD123的过度表达在AML中与不良预后相关(Tettamanti等人,Br.J.Haematol.161:389-401,2013)。认为AML和MDS出现在通常呈休眠状态(即,非快速分裂的细胞)的白血病干细胞(LSC)小群体中并由其不朽化,且因此抵抗细胞死亡(细胞凋亡)和常规化学治疗剂。LSC的特征在于CD123的过度表达,而CD123不存在于正常人骨髓中的相应正常造血干细胞群体中(Jin等人,Blood 113:6603-6610,2009;Jordan等人,Leukemia 14:1777-1784,2000)。CD123表达还与多种其他恶性肿瘤/恶性肿瘤前期相关:慢性骨髓性

白血病 (CML) 祖细胞 (包括原始细胞危象 CML); 霍奇金氏里-斯二氏 (RS) 细胞; 转化的非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL); 一些慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) ($CD11c^+$); 急性 T 成淋巴细胞性白血病 (T-ALL) 的子集 (16%, 最不成熟, 主要是成人)、浆细胞样树突状细胞 (pDC) (DC2) 恶性肿瘤和 $CD34^+/CD38^-$ 骨髓发育不良综合征 (MDS) 骨髓细胞恶性肿瘤。

[0009] AML 是以转化的骨髓祖细胞在骨髓中的增殖和积聚为特征的克隆性疾病, 其最终导致造血衰竭。AML 发病率随年龄而增加, 且老年患者与年轻患者相比通常具有较差治疗结果 (Robak 等人, *Clin. Ther.* 2: 2349-2370, 2009)。令人遗憾的是, 在当前, 大部分患有 AML 的成人死于其疾病。

[0010] 针对 AML 的治疗最初集中于诱导缓解 (诱导疗法)。在实现缓解后, 治疗转而集中于巩固这种缓解 (缓解后或巩固疗法) 且在一些情况下维持疗法。针对 AML 的标准缓解诱导范式是利用蒽环类/阿糖胞苷组合的化学疗法, 随后以通常利用较高剂量的与诱导期间所使用的相同的药物的巩固化学疗法或干细胞移植, 这取决于患者耐受强化治疗的能力和单独化学疗法的治愈可能性而定 (参见 Roboz, *Curr. Opin. Oncol.* 24: 711-719, 2012)。

[0011] 频繁用于诱导疗法的药剂包括阿糖胞苷和蒽环类。阿糖胞苷还称为 AraC, 其通过干扰 DNA 合成来杀死癌细胞和其他快速分裂的正常细胞。与 AraC 治疗相关的副作用包括因白细胞产生减少而造成对感染的抗性降低; 因血小板产生减少而造成流出血; 以及由于红血细胞可能减少而造成贫血。其他副作用包括恶心和呕吐。蒽环类 (例如, 柔红霉素、阿霉素和伊达比星) 具有若干种作用模式, 包括抑制 DNA 和 RNA 合成、破坏 DNA 的高级结构和产生细胞破坏性游离氧自由基。蒽环类的最重要的不利作用是心脏毒性, 其限制施用终生剂量且在一定程度上限制其适用性。

[0012] 因此, 令人遗憾的是, 尽管在新诊断的 AML 的治疗方面取得实质性进展, 但 20% 至 40% 的患者在利用标准诱导化学疗法的情况下未实现缓解, 且预计进入第一完全缓解的患者中有 50% 至 70% 在 3 年内复发。在复发时或对于患有抗性疾病的患者的最优策略仍不确定。在处于第一次或后续缓解中的 AML 患者中, 已确定干细胞移植是抗白血病疗法的最有效形式 (Roboz, 2012)。

[0013] 抗体-药物缀合物 (ADC) 和其他细胞结合剂-药物缀合物正作为对多种癌症具有功效的一类强力抗肿瘤剂而出现。细胞结合剂-药物缀合物 (诸如 ADC) 通常由三个独特元件构成: 细胞结合剂 (例如, 抗体); 接头; 和细胞毒性部分。常规地, 细胞毒性药物部分共价连接于抗体上的赖氨酸残基或通过还原链间二硫键而获得的半胱氨酸残基, 从而产生 ADC, 所述 ADC 是携带连接在抗体分子上的不同位置处的不同数目的药物的非均匀混合物。

发明概述

[0015] 本发明是基于出人意料的发现, 即本发明的缀合物对各种表达 CD123 的癌细胞, 尤其是具有至少一个消极预后因素的白血病非常有效。

[0016] 本发明的一个方面提供一种抗体或其抗原结合片段, 其: (a) 结合人 CD123/IL3-R α 抗原的氨基酸 101 至 346 内的表位, 且 (b) 抑制抗原阳性 TF-1 细胞中的 IL3 依赖性增殖。

[0017] 在某些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段结合人 CD123 抗原的氨基酸 101 至 204 内的表位。在另一实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段结合人 CD123 抗原的氨基酸 205 至 346 内的表位。

[0018] 本发明的一个相关方面提供一种抗体或其抗原结合片段,其:(a) 结合人CD123抗原的氨基酸1至100内的表位,且(b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖,其中 IC_{50} 值为0.1nM或更小(例如,0.08nM、0.05nM、0.03nM)。

[0019] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制白血病干细胞或白血病原始细胞但不抑制造血干细胞的增殖。

[0020] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在0.3nM或更低,诸如介于0.01nM与0.3nM之间、介于0.01nM与0.2nM之间、介于0.01nM与0.19nM之间、介于0.01nM与0.18nM之间、介于0.01nM与0.15nM之间或介于0.01nM与0.1nM之间的解离常数(K_d)下结合至人CD123抗原阳性细胞。

[0021] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合至食蟹猴CD123。例如,所述抗体或其抗原结合片段可在介于0.05与0.3nM之间、介于0.05与0.2nM之间、介于0.05nM与0.19nM之间、介于0.05nM与0.18nM之间、介于0.05nM与0.15nM之间或介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段以实质上类似的结合亲和力结合至人和食蟹猴CD123。例如,所述抗体或其抗原结合片段可在介于0.05与0.3nM之间、介于0.05与0.2nM之间或介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。 K_d 可通过流式细胞术、表面等离子体共振或放射免疫测定来测量。

[0022] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在0.5nM或更低的浓度下抑制抗原阳性TF-1细胞中至少50%的IL3依赖性增殖。

[0023] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11、15和70;和b) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20、23和72;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21、24和71;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。

[0024] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11和15;和b) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20和23;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。

[0025] 在某些实施方案中,所述保守氨基酸取代包括CDR中的至少一Lys被Arg取代。

[0026] 在某些实施方案中,所述抗体是包含小鼠CDR区的CDR移植人源化抗体,且其中所述抗体的一个或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)个重链和/或轻链框架区维尼尔区(vernier zone)残基具有小鼠起源。

[0027] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 免疫球蛋白重链可变

区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:34的N末端的第二个残基Xaa是Phe。在其他实施方案中,Xaa是Val。

[0029] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。

[0031] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser,且除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys(即,EU/OU编号位置442处的Cys);和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。

[0033] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:38中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。

[0034] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。

[0035] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。

[0037] 在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:38、34、56和54的N末端的第二个残基Xaa是Phe。在其他实施方案中,Xaa是Val。

[0038] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0039] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a)免疫球蛋白重链区,其

具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;和b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。

[0040] 在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:54或56的N末端的第二个残基Xaa是Phe。在其他实施方案中,Xaa是Val。

[0041] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:1中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:2或3中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:4中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0042] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:6、7、8、9或10中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:19或20中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0043] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:13或14中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:23中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:24中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:25中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0044] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) V_H 序列,其与选自自由以下各项组成的组的参考 V_H 序列至少95%相同:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或b) V_L 序列,其与选自自由以下各项组成的组的参考 V_L 序列至少95%相同:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。在某些实施方案中,所述 V_H 序列与SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38)中的一个至少99%相同,和/或其中所述 V_L 序列与SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)中的一个至少99%相同。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含:a) V_H 序列,其选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或b) V_L 序列,其选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含SEQ ID NO:26的 V_H 序列和SEQ ID NO:27的 V_L 序列,或SEQ ID NO:28的 V_H 序列和SEQ ID NO:29的 V_L 序列,或SEQ ID NO:30的 V_H 序列和SEQ ID NO:31的 V_L 序列,或SEQ ID NO:34的 V_H 序列和SEQ ID NO:35的 V_L 序列。

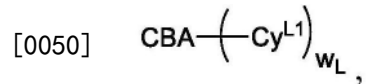
[0045] 在某些实施方案中,所述抗体是鼠类抗体、非人哺乳动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。例如,所述人源化抗体可以是CDR移植抗体或表面重构的抗体。在某些实施方案中,所述抗体是全长抗体。在某些实施方案中,所述其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v-V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG ΔCH₂、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。

[0046] 本发明的另一方面提供一种多肽,其包含主题抗体或其抗原结合片段中任一者的 V_H 和 V_L 序列。所述多肽可以是与并非假单胞菌毒素的蛋白质的融合体。

[0047] 本发明的另一方面提供一种细胞,其产生本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽。

[0048] 本发明的另一方面提供一种产生本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽的方法,所述方法包括:(a) 培养本发明的细胞;和(b) 自所述培养的细胞分离出所述抗体、其抗原结合片段或多肽。在某些实施方案中,所述细胞是真核细胞。

[0049] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:

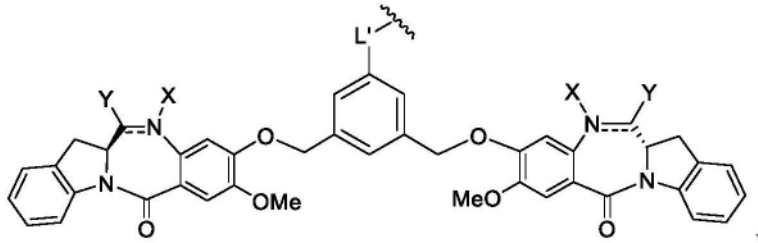
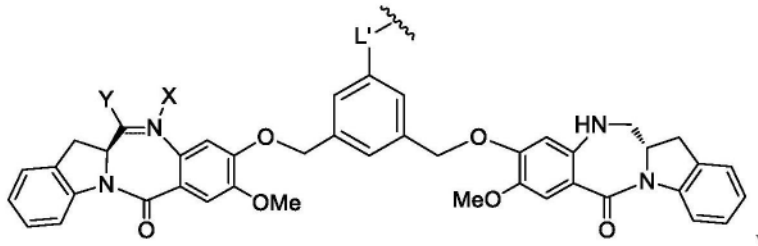


[0051] 其中:

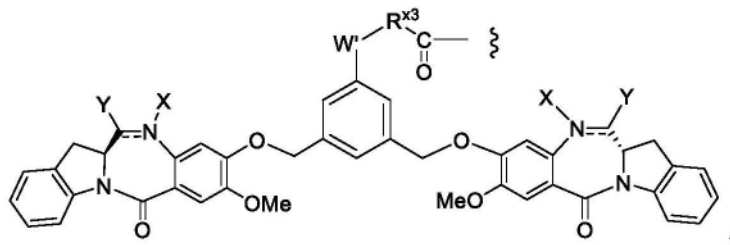
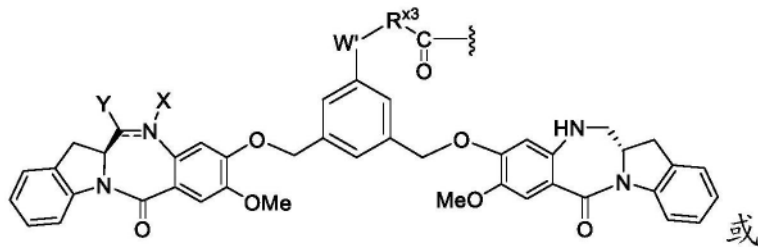
[0052] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至 Cy^{L1} ;

[0053] w_L 是1至20的整数;并且

[0054] Cy^{L1} 由以下各式表示:



[0055]



[0056] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0057] 介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;[0058] W'是-NR^{e'};[0059] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0060] n是2至6的整数;

[0061] R^k是-H或-Me;[0062] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

[0063] L'由以下各式表示:

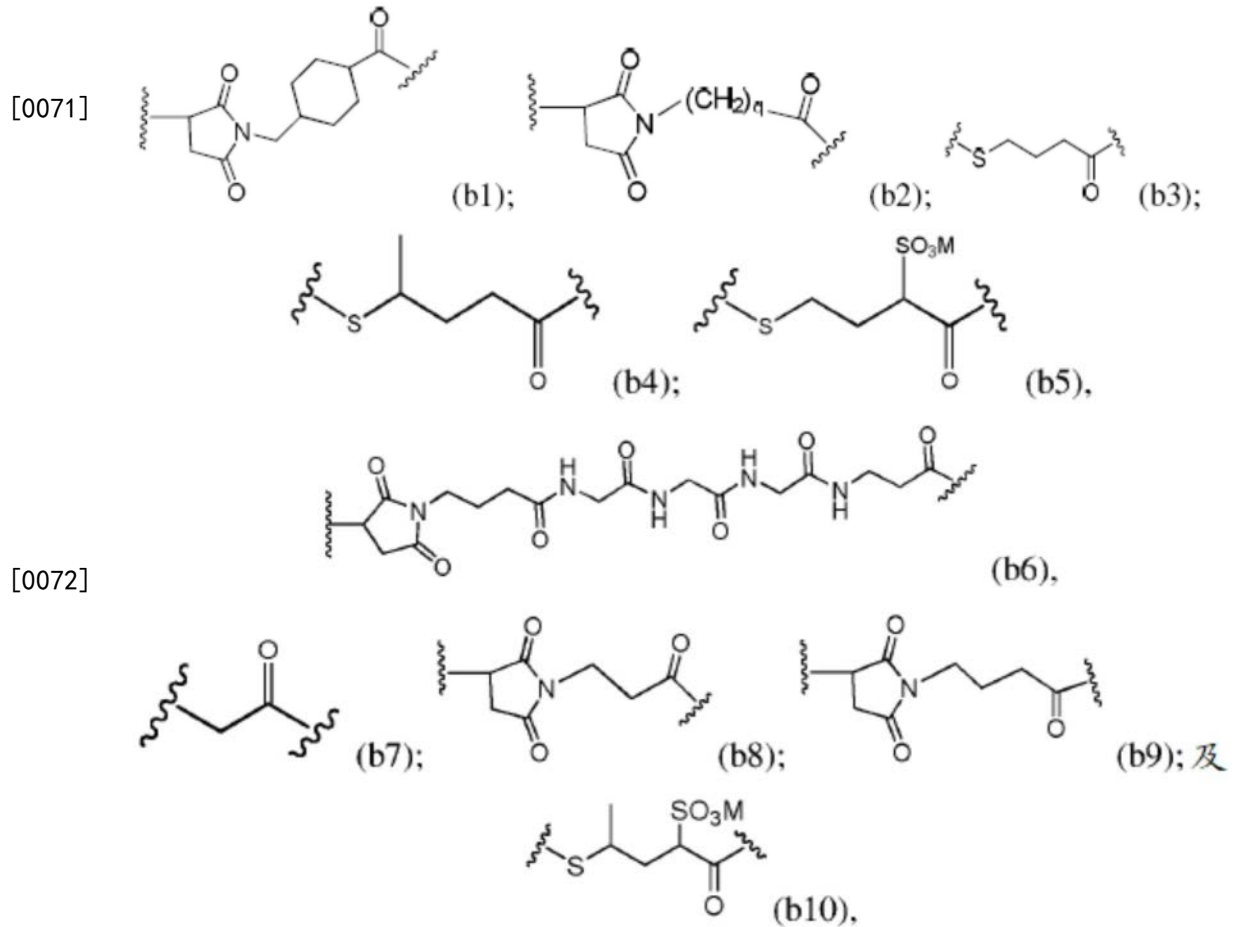
[0064] -NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-(B1');或[0065] -NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-(B3');[0066] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0067] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;

[0068] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地是-H、(C_1 - C_3)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

[0069] m是1至6的整数;并且

[0070] Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



[0073] 其中:

[0074] q是1至5的整数;并且

[0075] M是 H^+ 或阳离子。

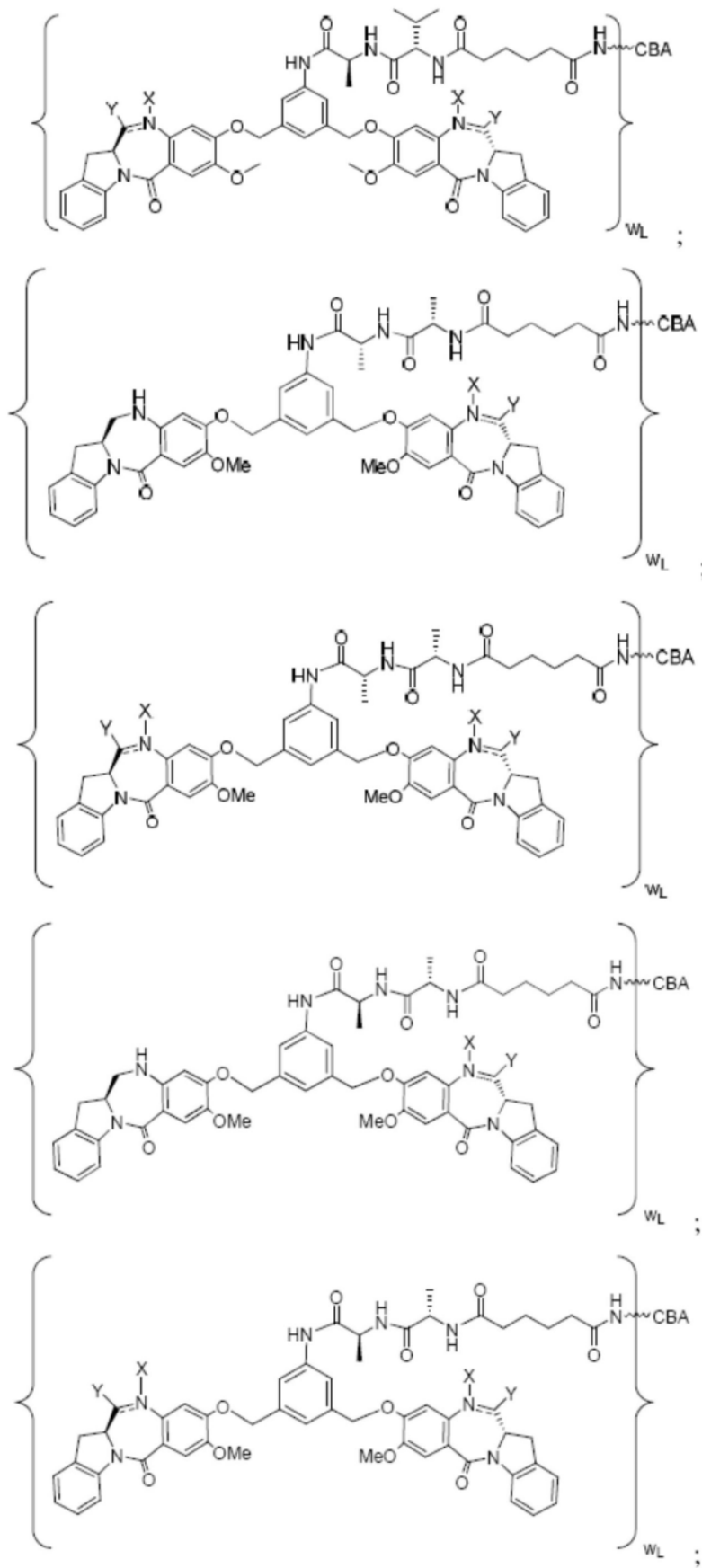
[0076] 在某些实施方案中, R_a 和 R_b 两者均是H;并且 R_5 是H或Me。

[0077] 在某些实施方案中,P是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如,P可选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

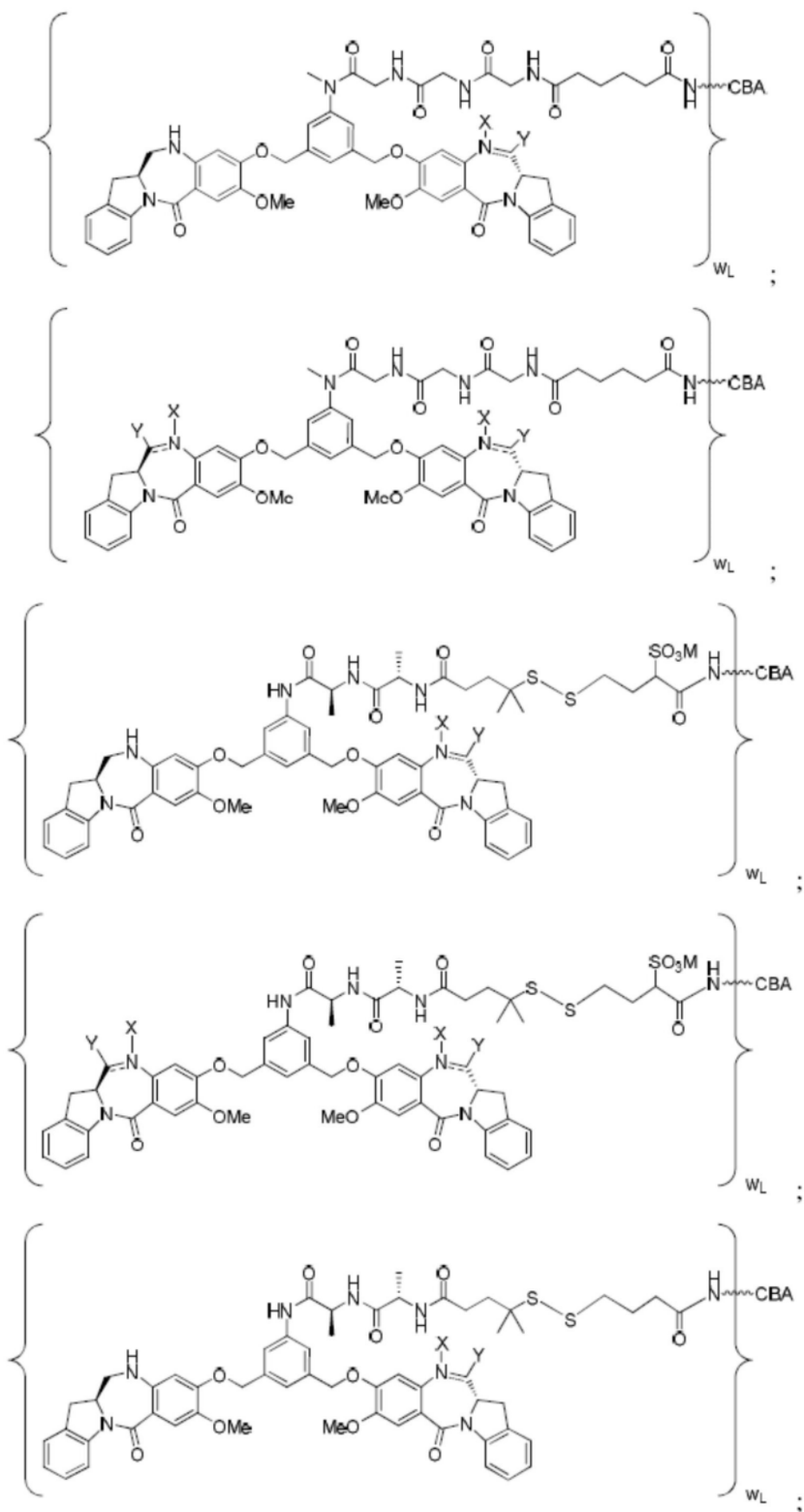
[0078] 在某些实施方案中,Q是- SO_3M 。

[0079] 在某些实施方案中,所述免疫缀合物由以下各式表示:

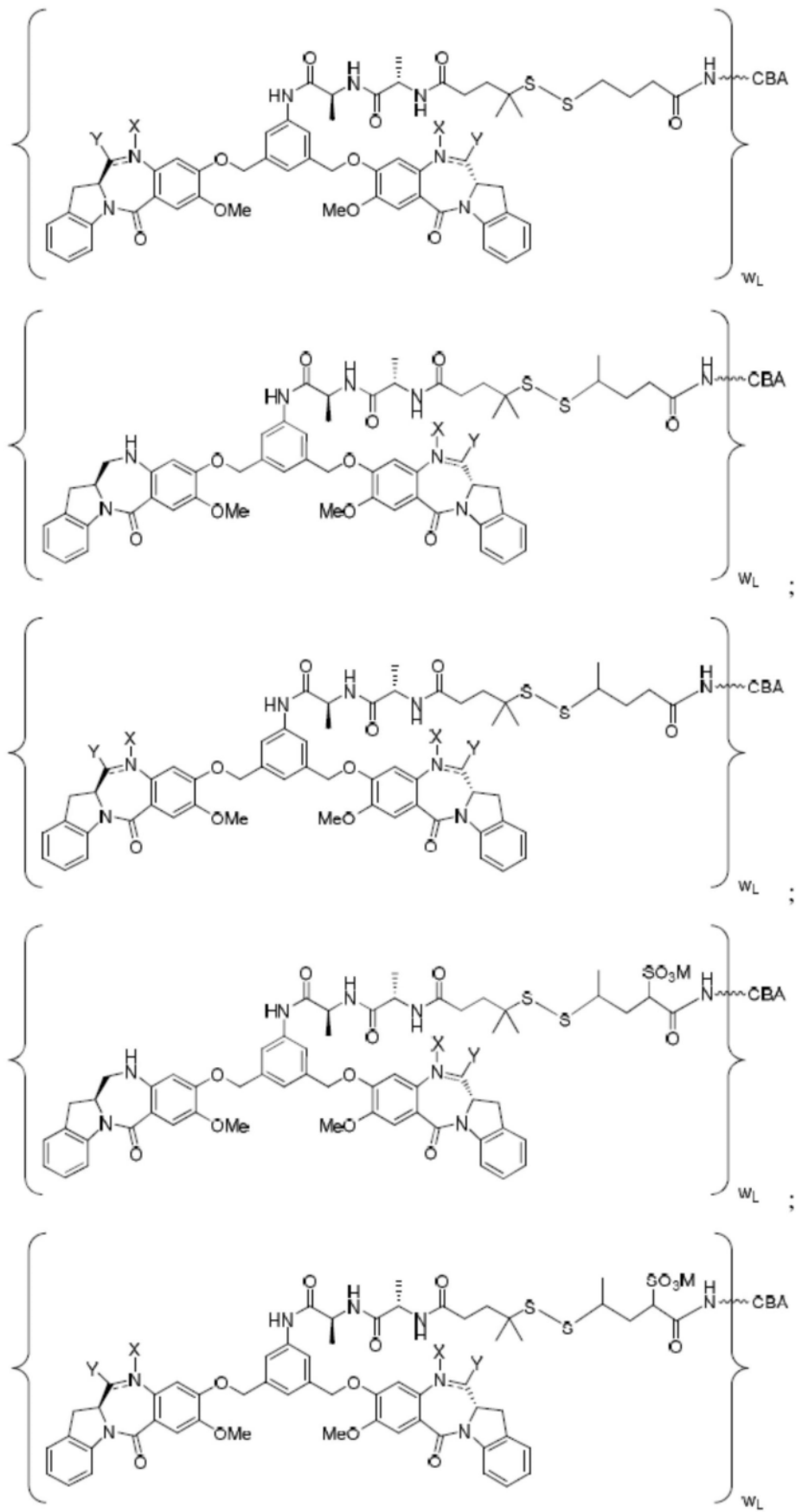
[0081]



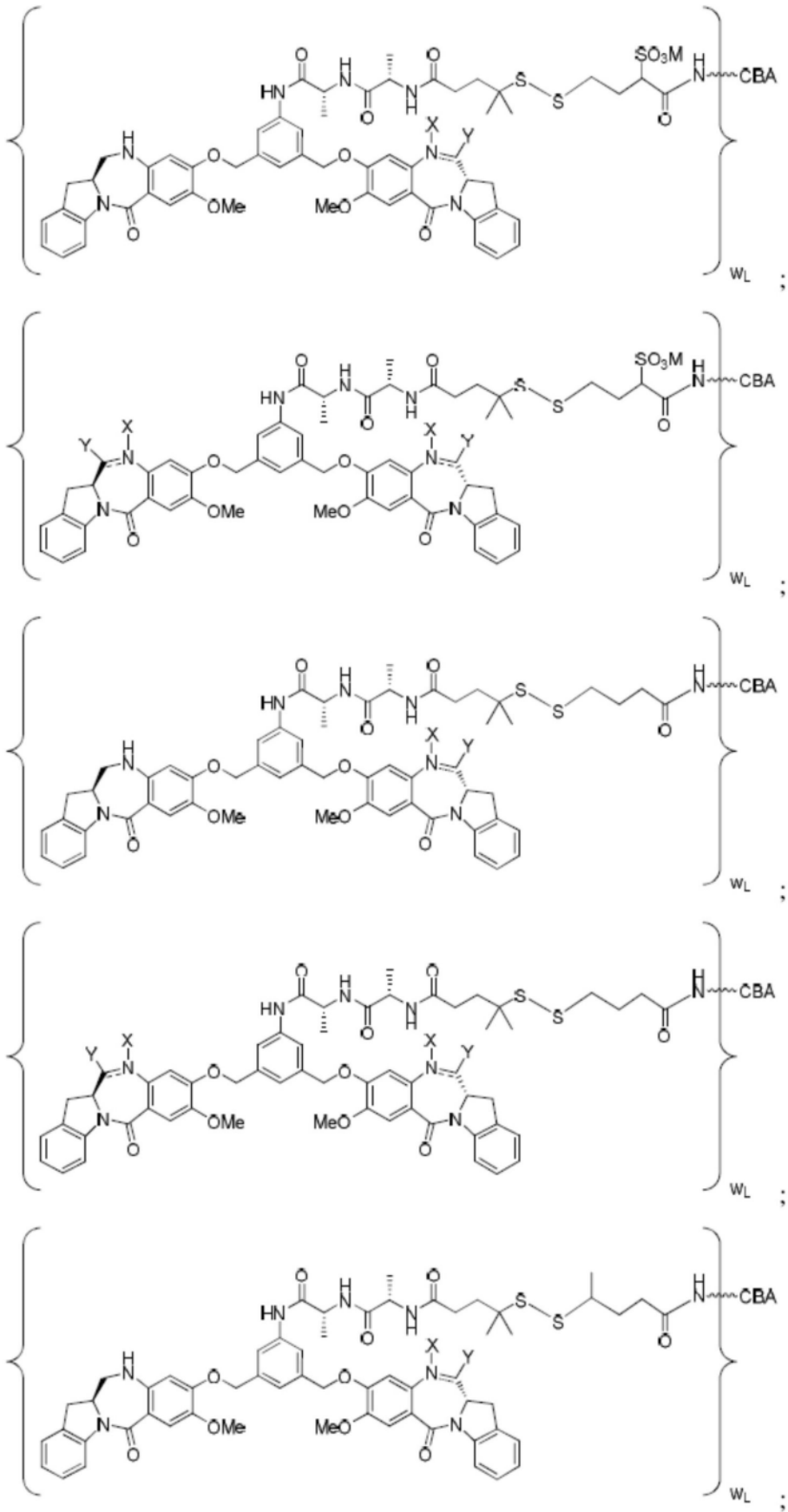
[0082]



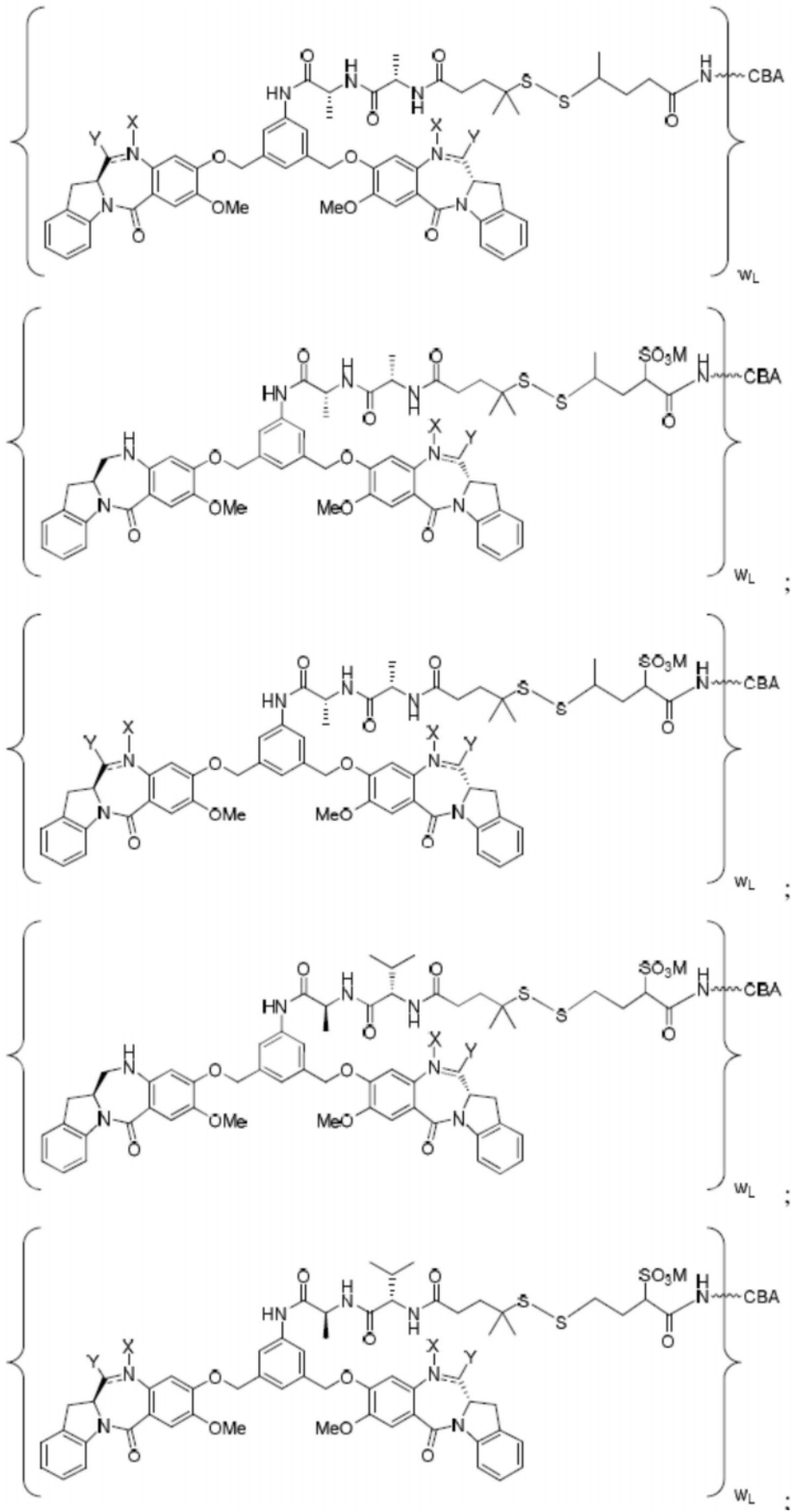
[0083]



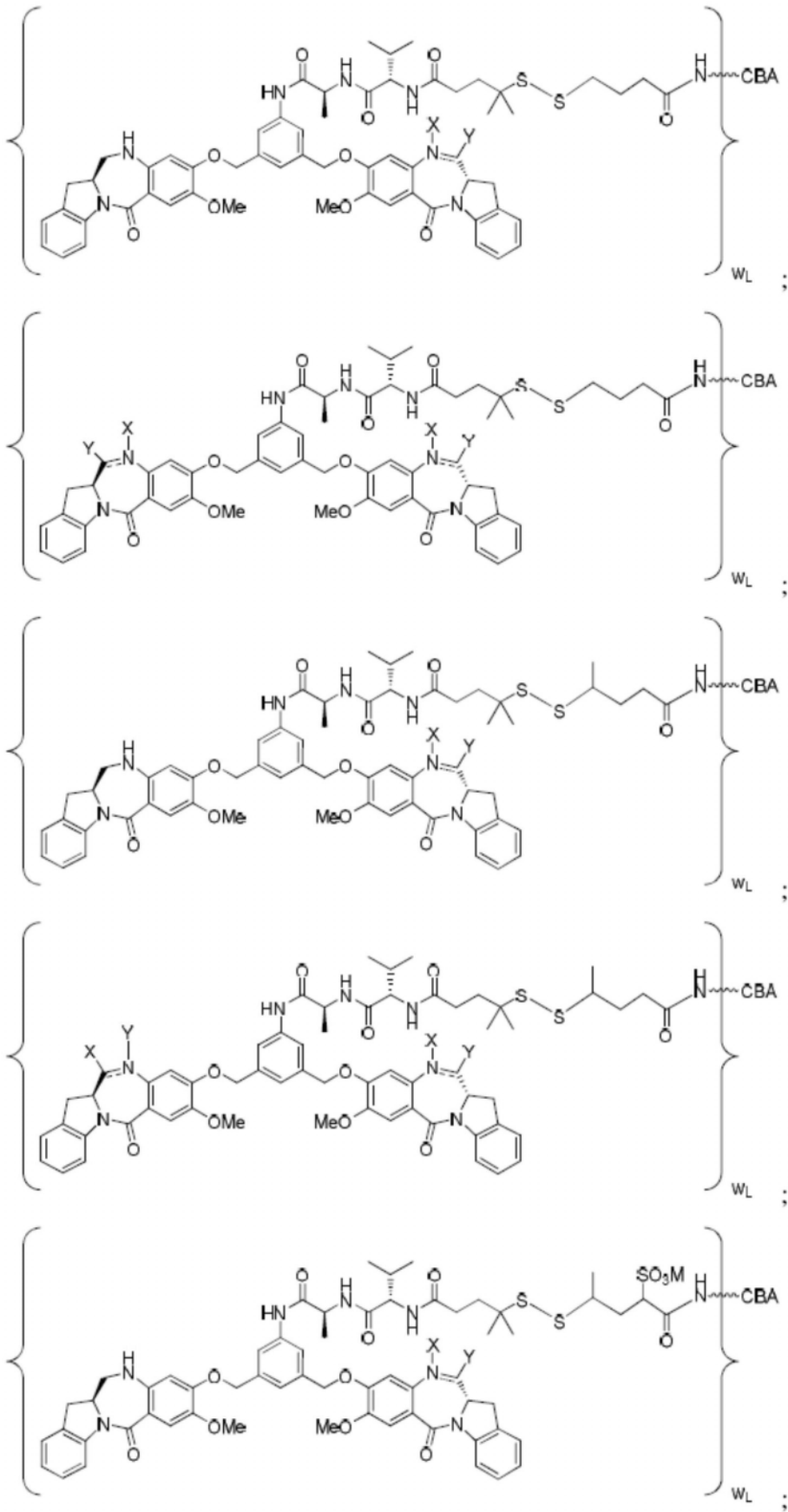
[0084]

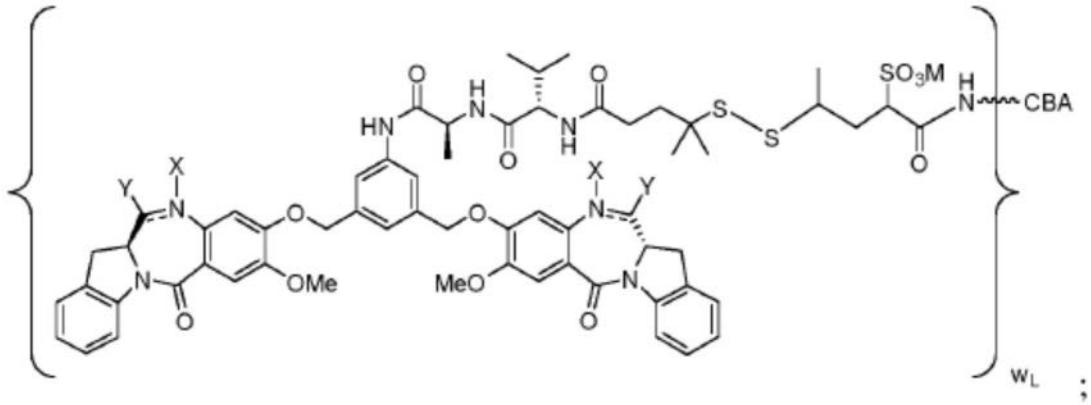


[0085]

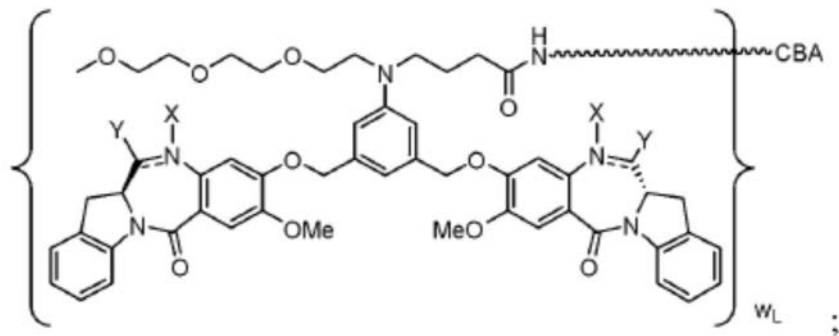
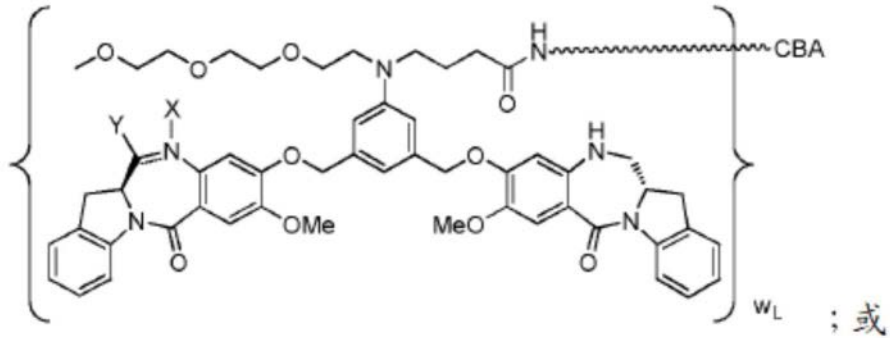


[0086]



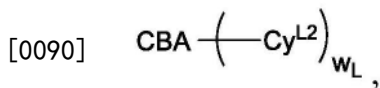


[0087]



[0088] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数;介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0089] 一个相关方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:

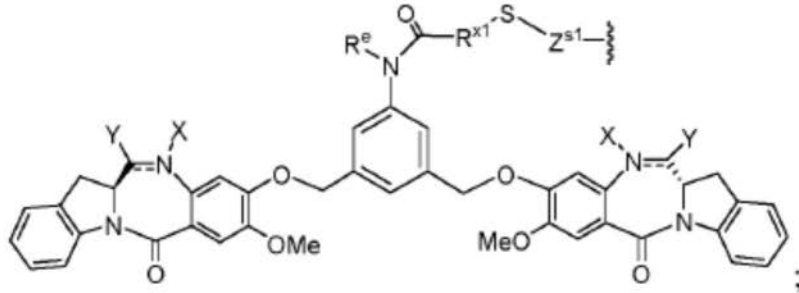
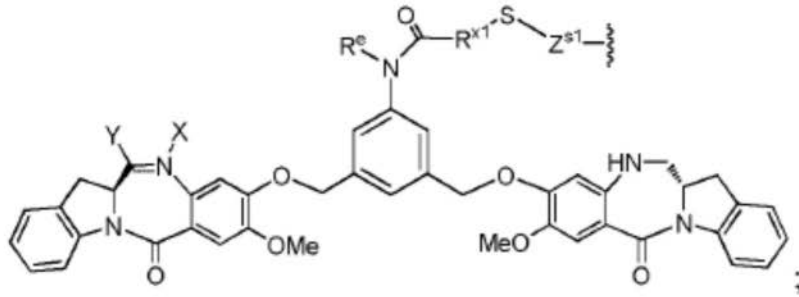


[0091] 其中:

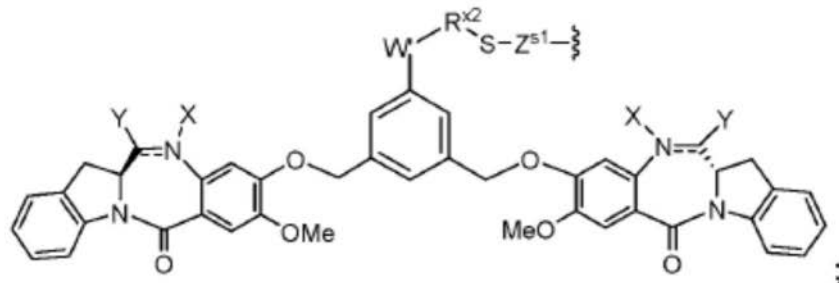
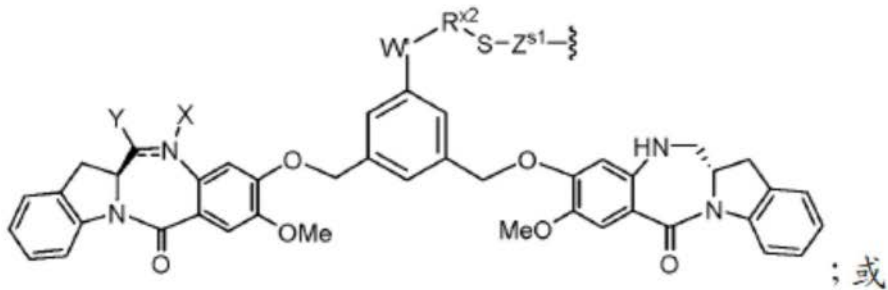
[0092] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至 Cy^{L2} ;

[0093] w_L 是1至20的整数;并且

[0094] Cy^{L2} 由以下各式表示:



[0095]

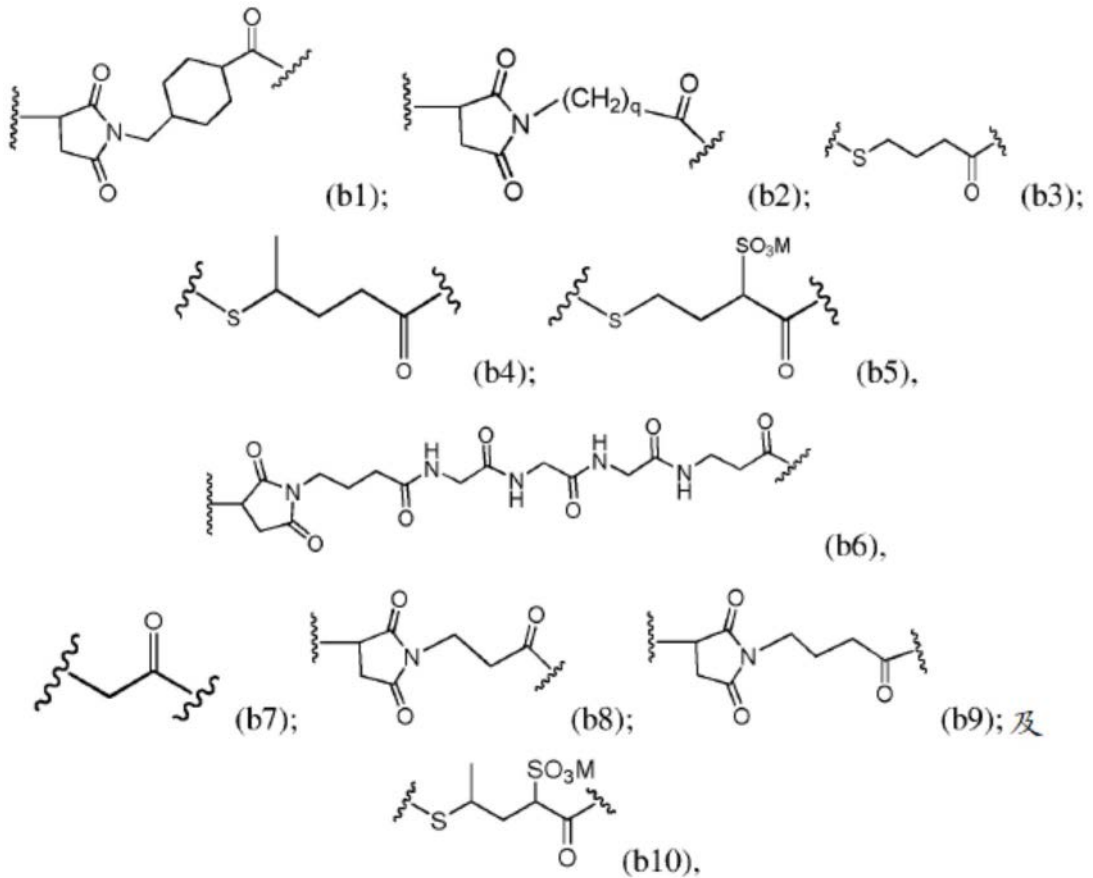


[0096] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0097] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;[0098] R^{x1}和R^{x2}独立地是(C₁-C₆)烷基;[0099] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;[0100] W'是-NR^{e'};[0101] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0102] n是2至6的整数;

[0103] R^k是-H或-Me;[0104] Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



[0106] 其中:

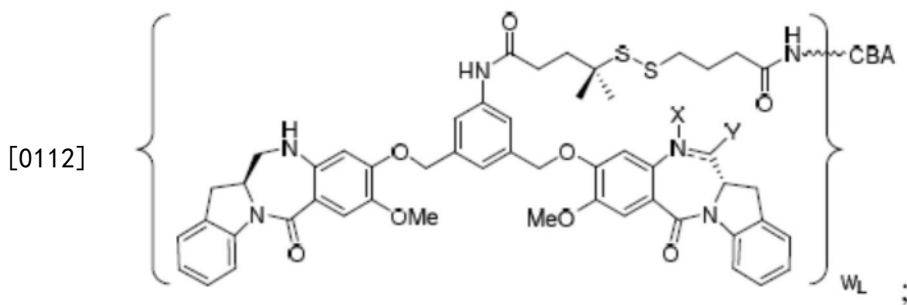
[0107] q是1至5的整数;并且

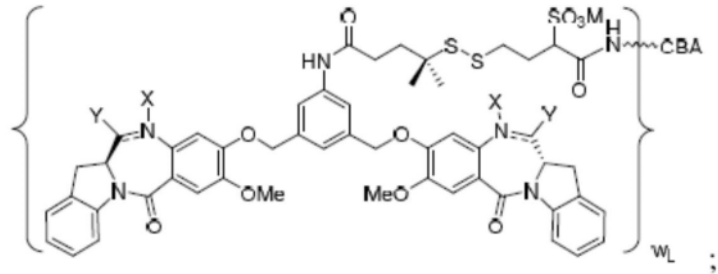
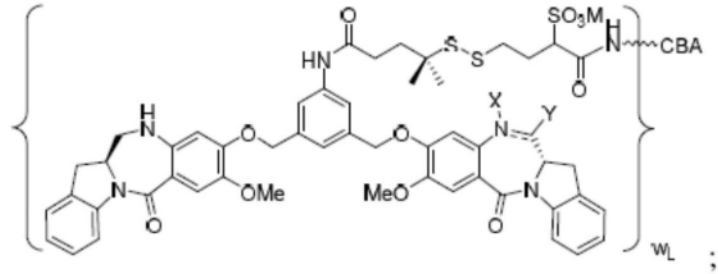
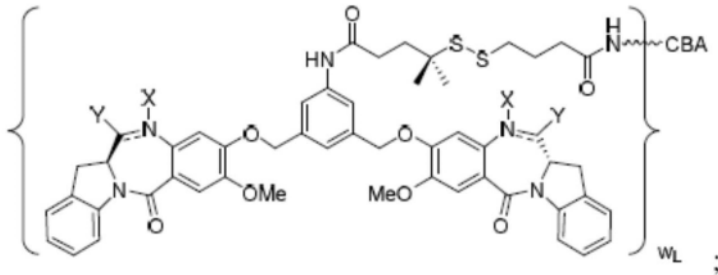
[0108] M是-H⁺或阳离子。

[0109] 在某些实施方案中,R^e是H或Me;R^{x1}和R^{x2}独立地是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;并且p是0、1、2或3。

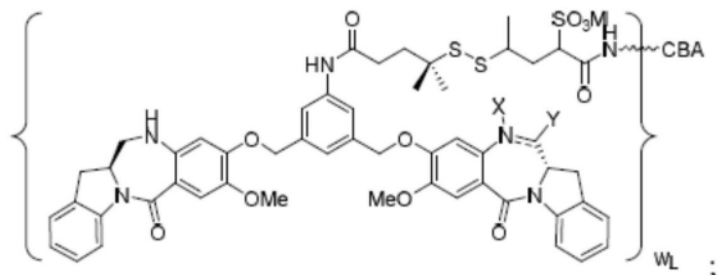
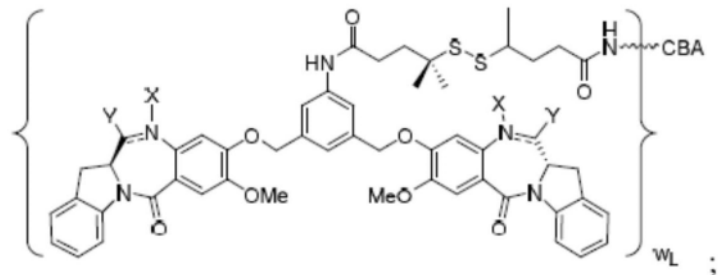
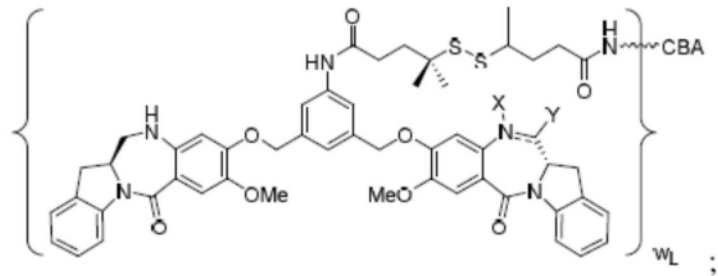
[0110] 在某些实施方案中,R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[0111] 在某些实施方案中,所述免疫缀合物由以下各式表示:

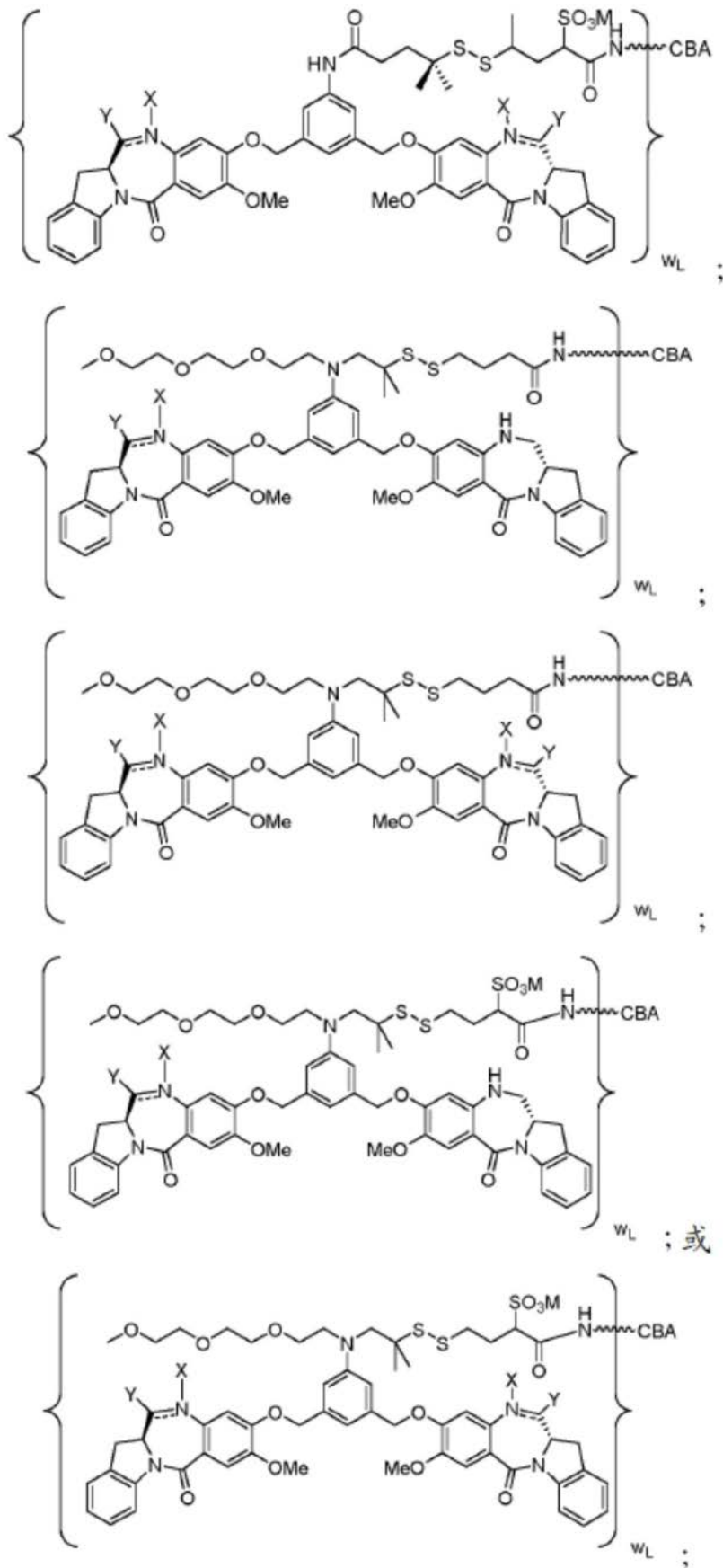




[0113]



[0114]

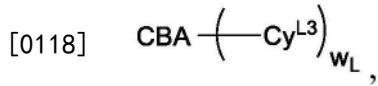


[0115] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数;介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH

或-SO₃M。

[0116] 在某些实施方案中,介于N与C之间的双线==表示双键,X不存在且Y是-H。在某些实施方案中,介于N与C之间的双线==表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。在某些实施方案中,M是H⁺、Na⁺或K⁺。

[0117] 本发明的另一相关方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:

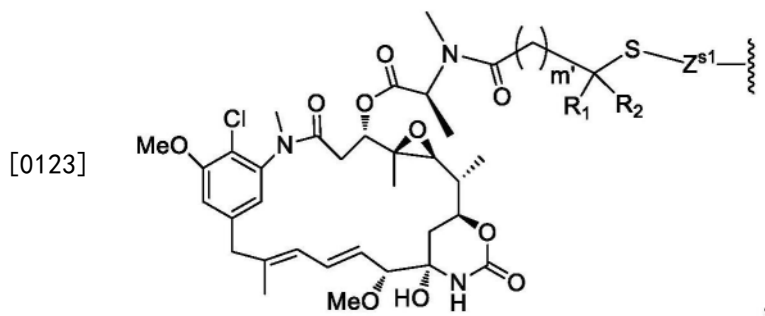


[0119] 其中:

[0120] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多肽,其通过Lys残基共价连接至Cy^{L3};

[0121] w_L是1至20的整数;

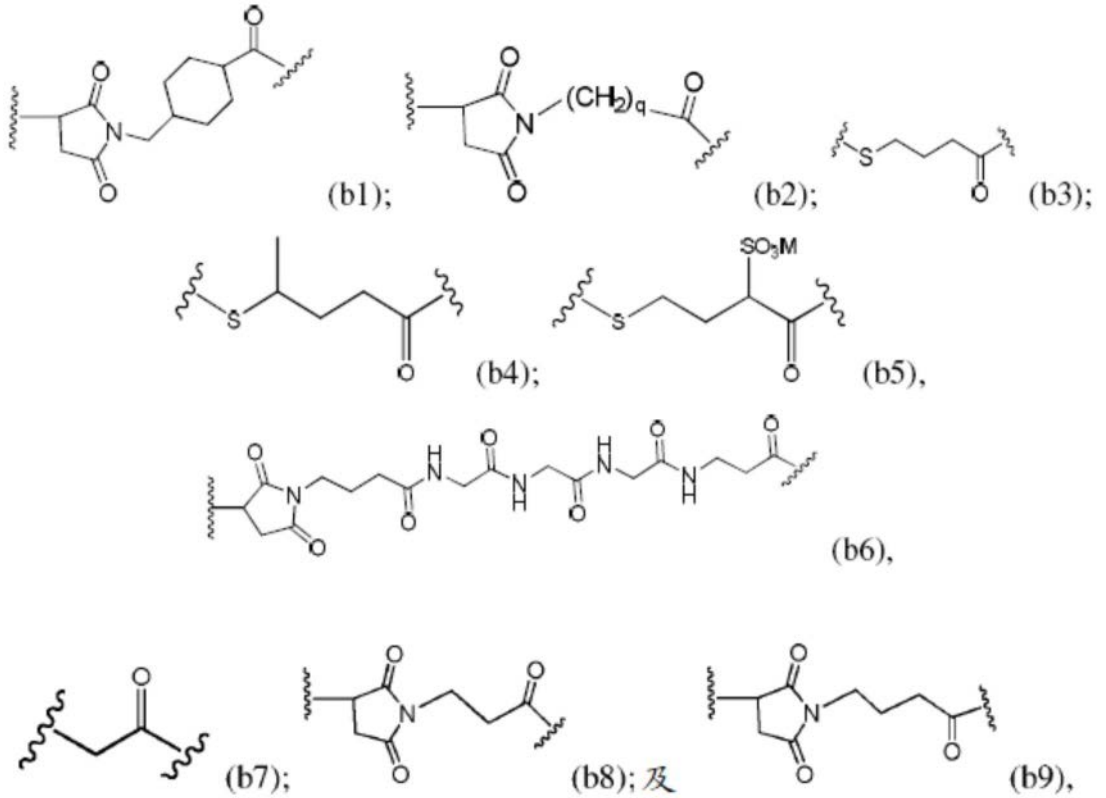
[0122] Cy^{L3}由下式表示:



[0124] m'是1或2;

[0125] R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0126] Z^{S1}选自以下各式中的任一者:



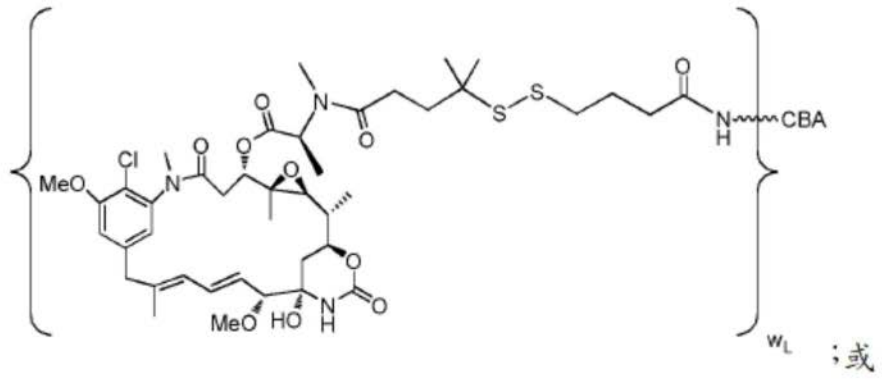
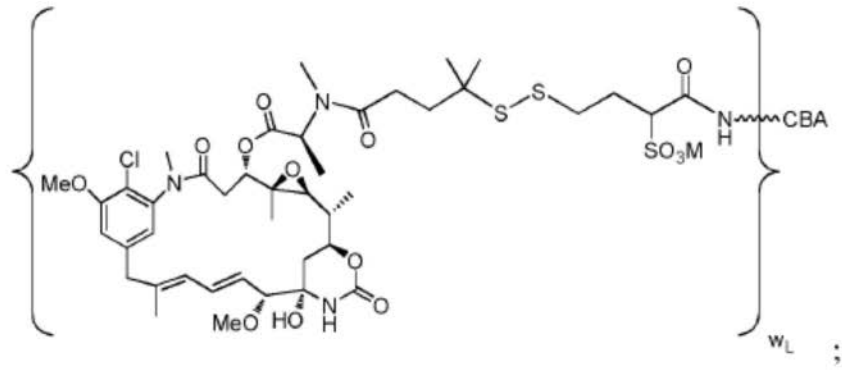
[0128] 其中:

[0129] q 是1至5的整数;并且

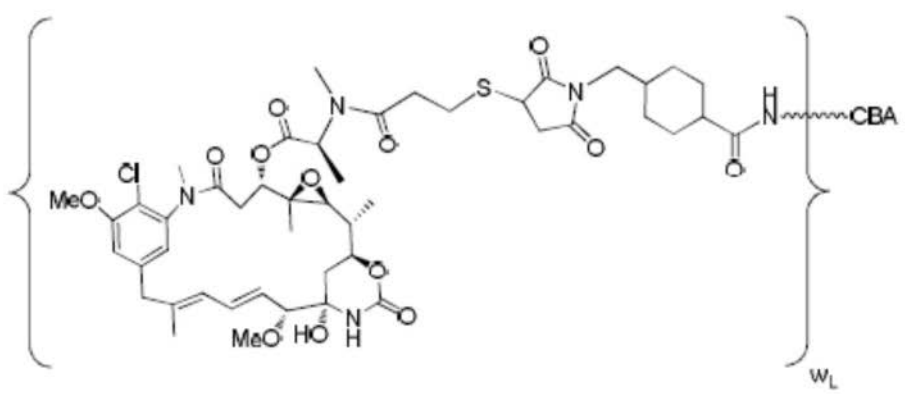
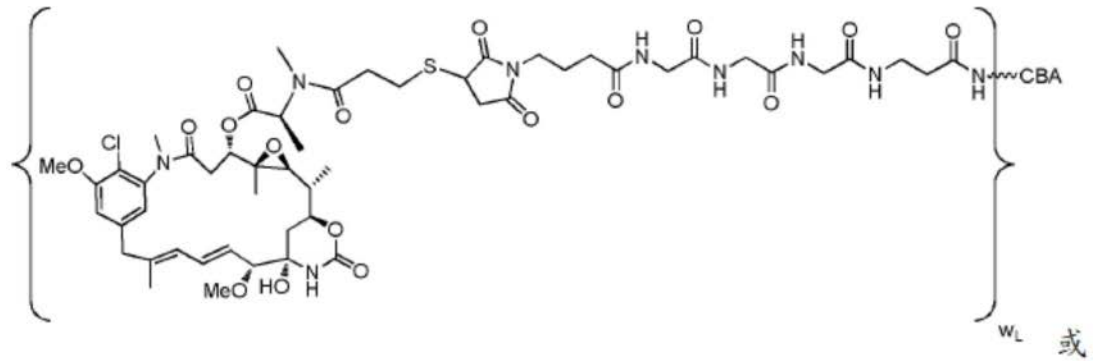
[0130] M 是 H^+ 或阳离子。

[0131] 在某些实施方案中, m' 是1,并且 R_1 和 R_2 两者均是 H 。在某些其他实施方案中, m' 是2,并且 R_1 和 R_2 两者均是 Me 。

[0132] 在某些实施方案中,所述免疫缀合物由以下各式表示:



[0133]



[0134] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数。在某些实施方案中,M是H⁺、Na⁺或K⁺。

[0135] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:

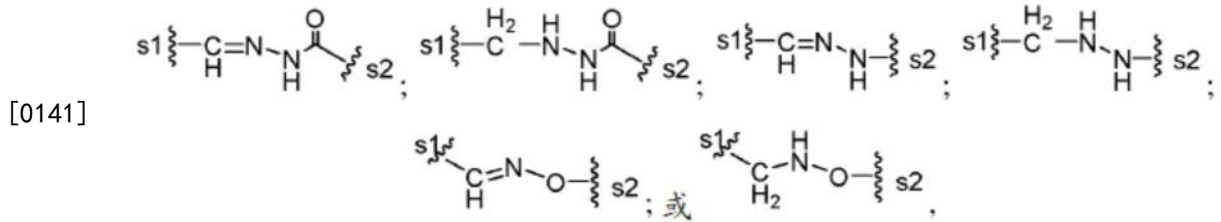


[0137] 其中:

[0138] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其共价连接至J_{CB}'基团;

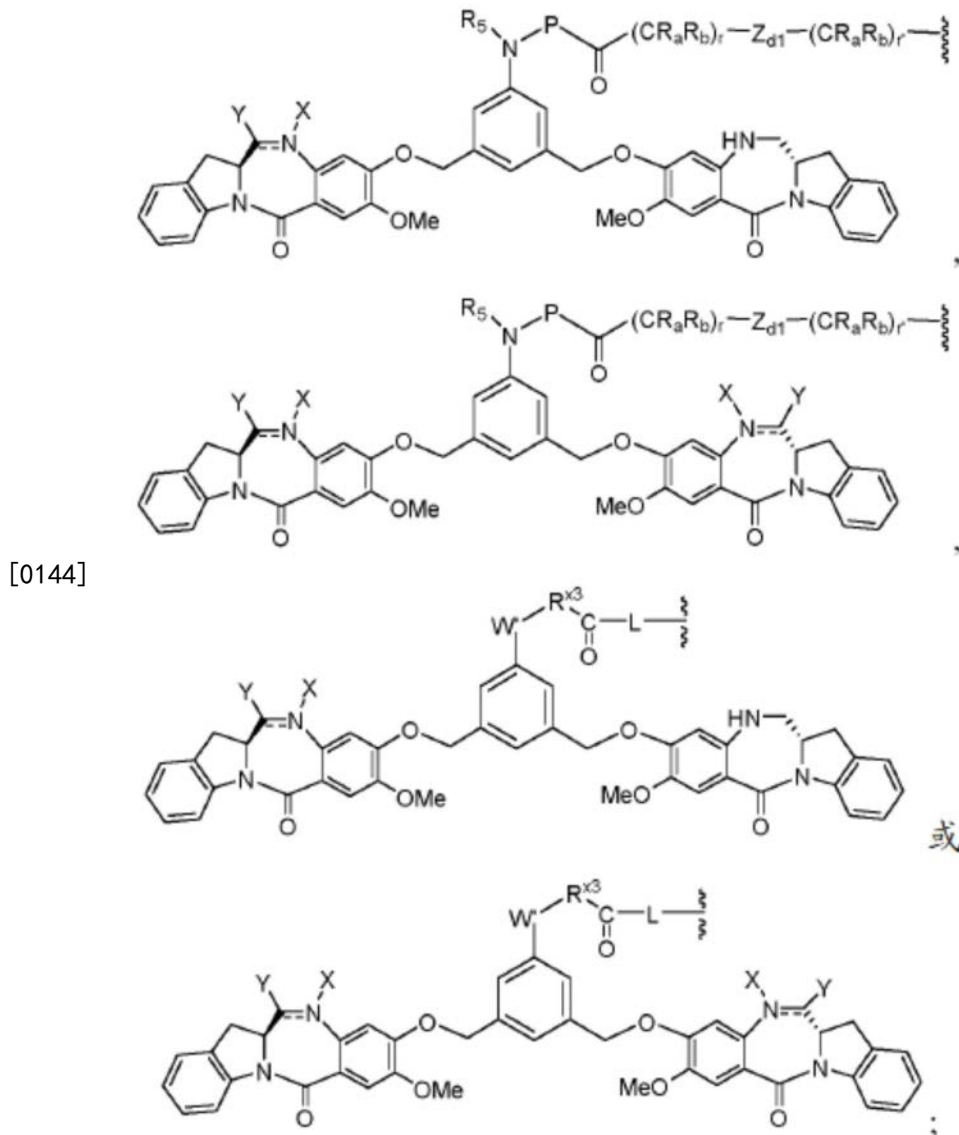
[0139] W_S是1、2、3或4;

[0140] J_{CB}'是通过使来源于本发明的所述抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分(其中所述2-羟基乙胺部分可以是丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸、4-羟基鸟氨酸或2,4-二氨基-5-羟基戊酸残基的一部分)的氧化的醛基与Cy^{s1}上的醛反应性基团反应而形成的部分,并且由以下各式表示:



[0142] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s1}共价连接的位点;

[0143] Cy^{s1}由以下各式表示:



[0145] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0146] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[0147] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0148] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[0149] Z_{d1}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[0150] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0151] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

[0152] r和r'独立地是1至6的整数;

[0153] W'是-NR^{e'};

[0154] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0155] n是2至6的整数;

[0156] R^k是-H或-Me;

[0157] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

[0158] L是-NR₉-(CR_aR_b)_r或不存在;并且

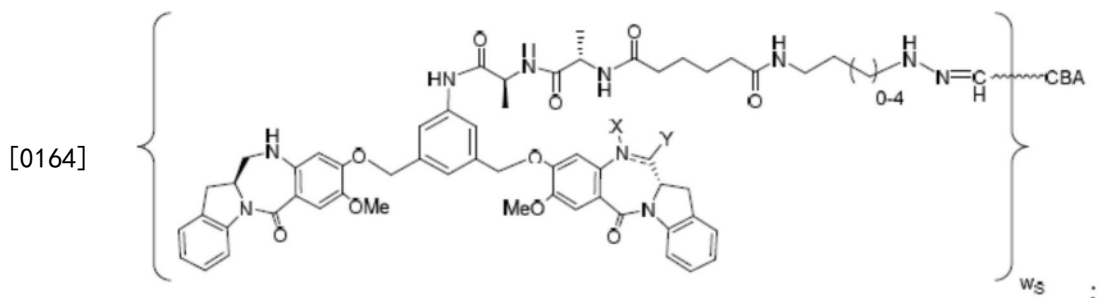
[0159] r"是0至6的整数。

[0160] 出于简单起见,在将Ser叙述为N末端残基的以下每种情况下,应理解,在适用的情况下,尤其就Thr而言,涵盖其他2-羟基乙胺部分作为丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸、4-羟基鸟氨酸或2,4-二氨基-5-羟基戊酸残基的一部分。

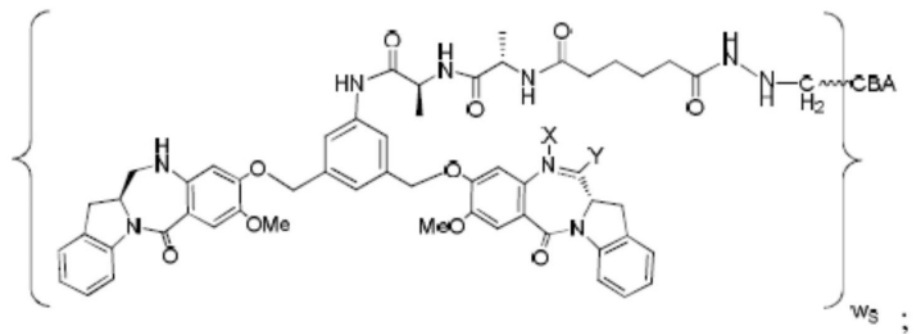
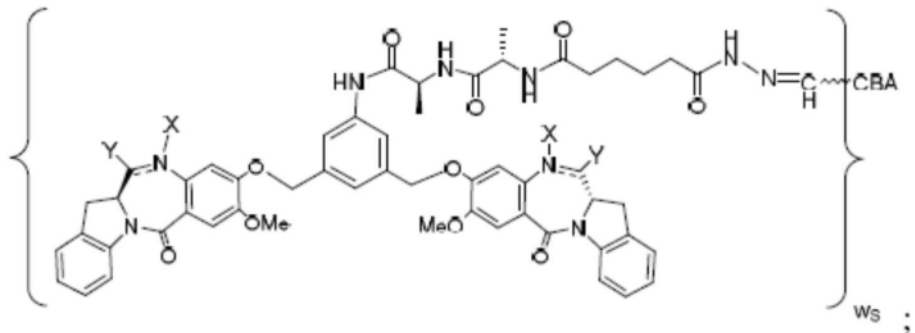
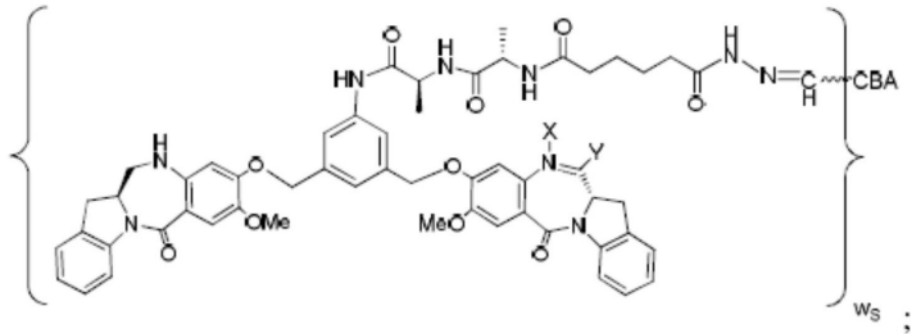
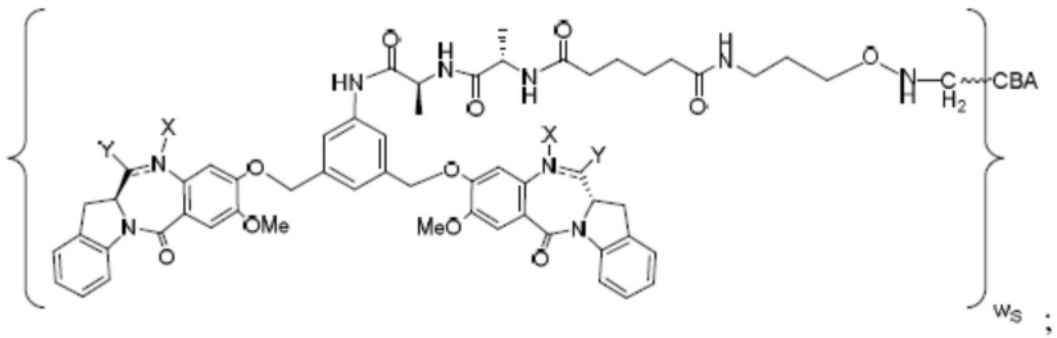
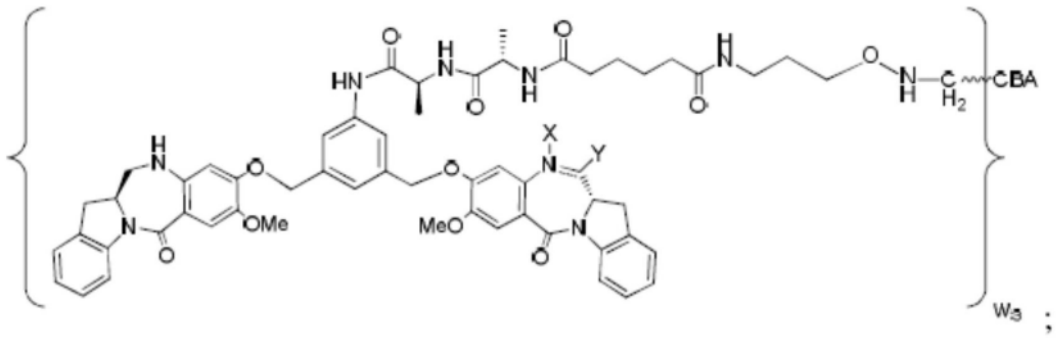
[0161] 在某些实施方案中,R_a和R_b两者均是H,并且R₅和R₉两者均是H或Me。

[0162] 在某些实施方案中,P是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如,P可选自由以下各项组成的组:Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。在某些实施方案中,Q是-SO₃M。

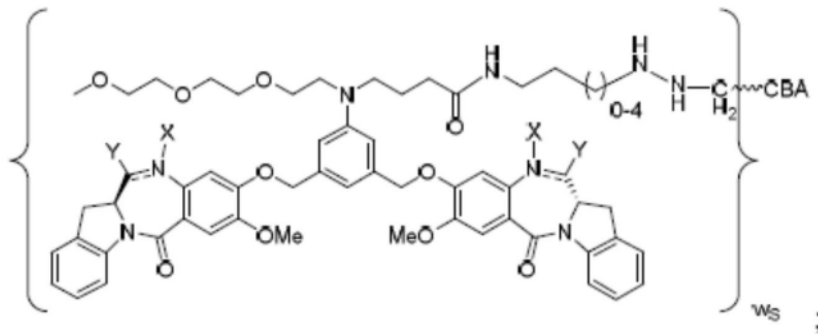
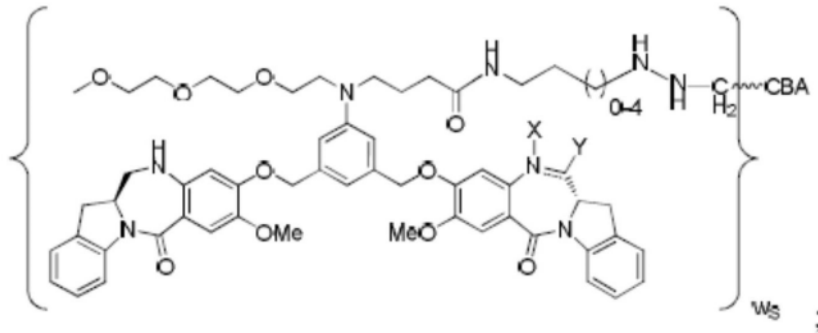
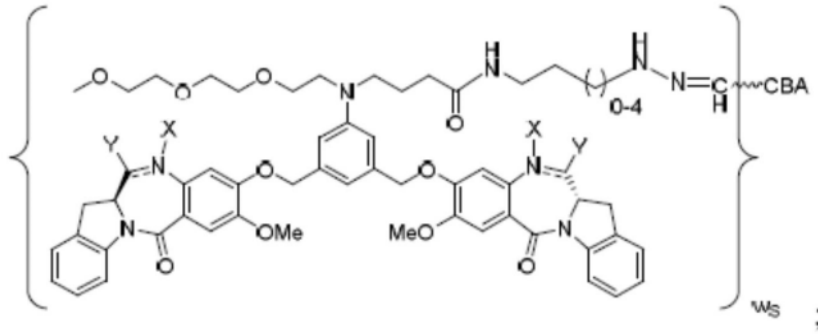
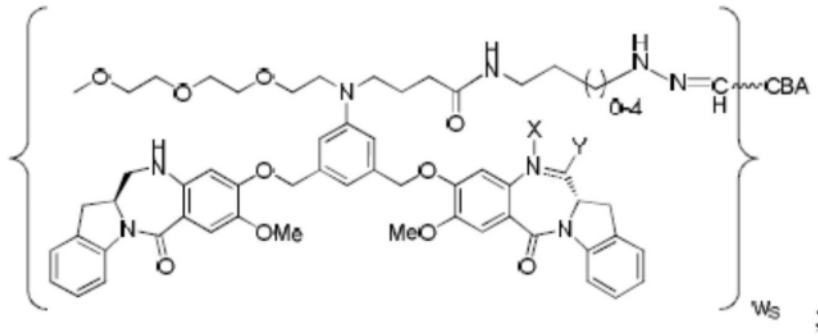
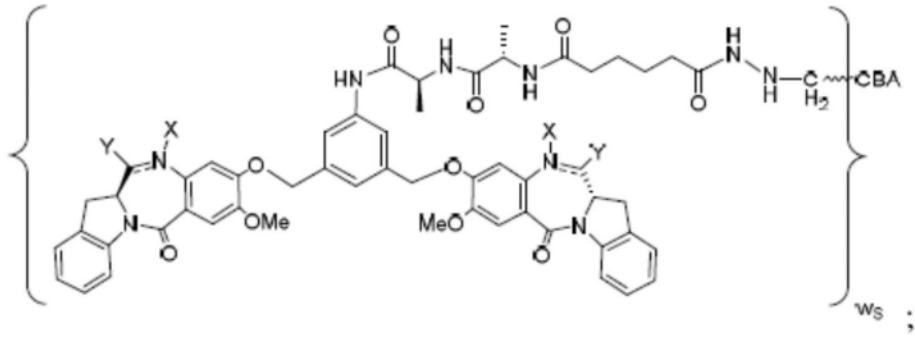
[0163] 在某些实施方案中,所述免疫缀合物由以下各式表示:



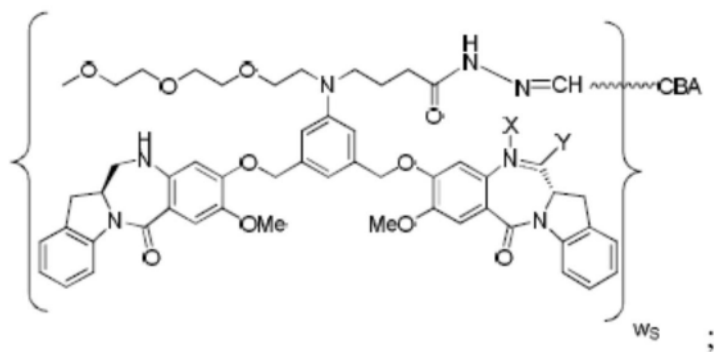
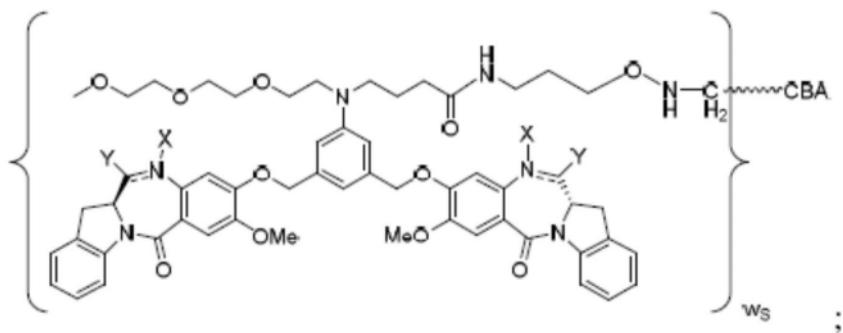
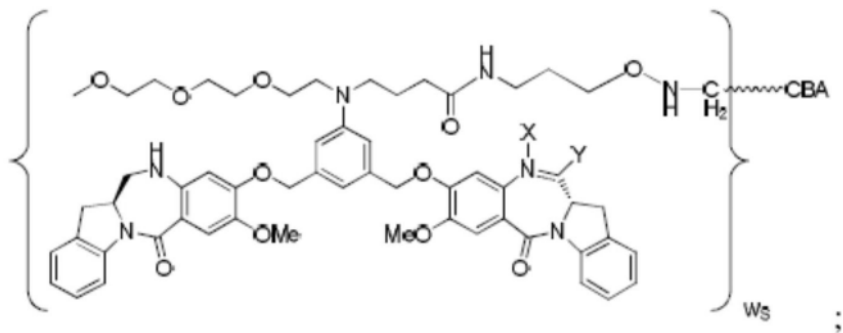
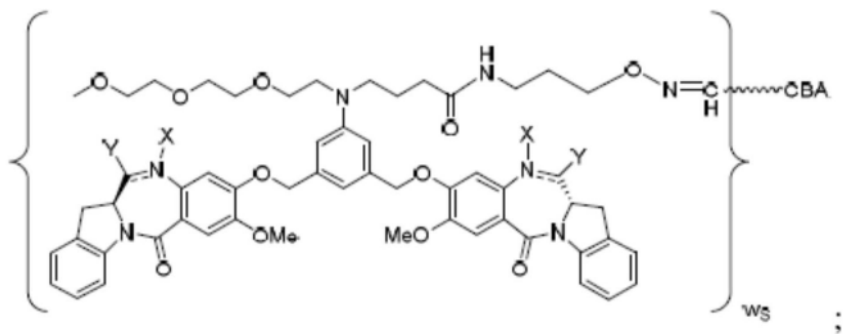
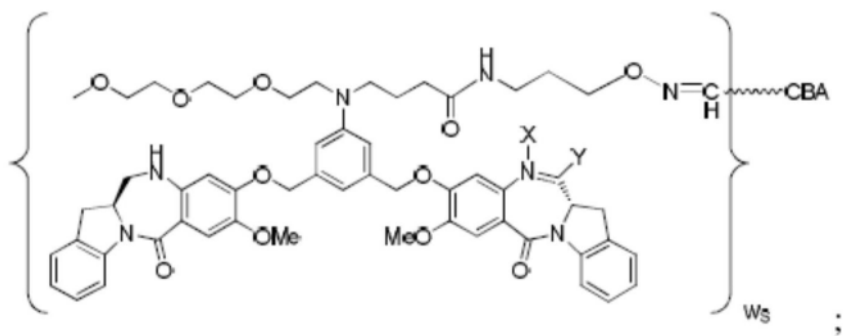
[0166]

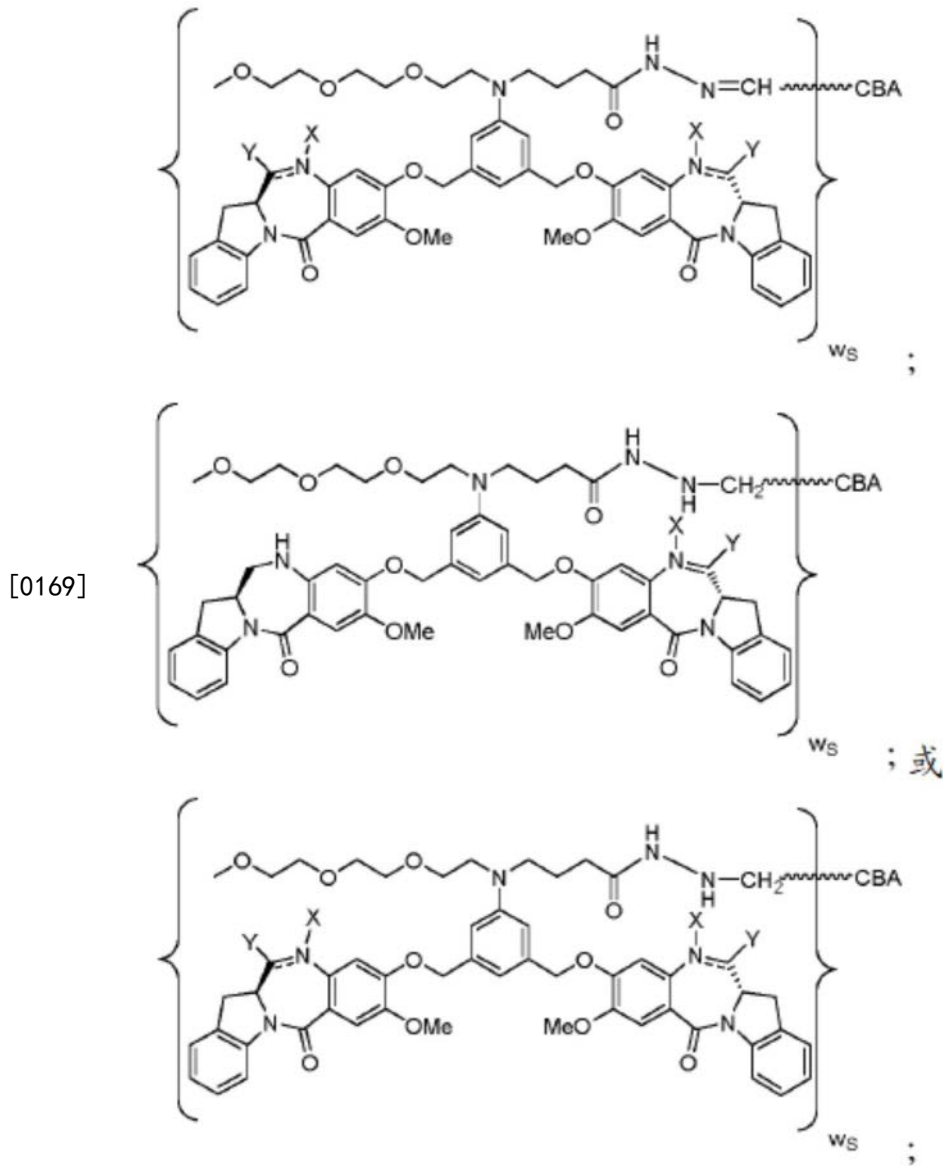


[0167]



[0168]





[0170] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

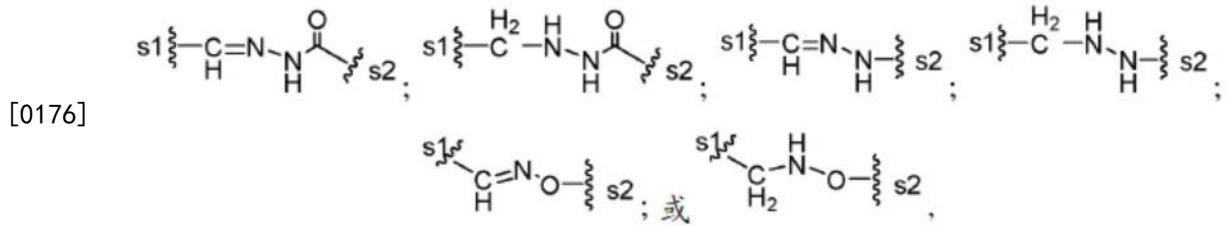
[0171] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:



[0173] 其中:

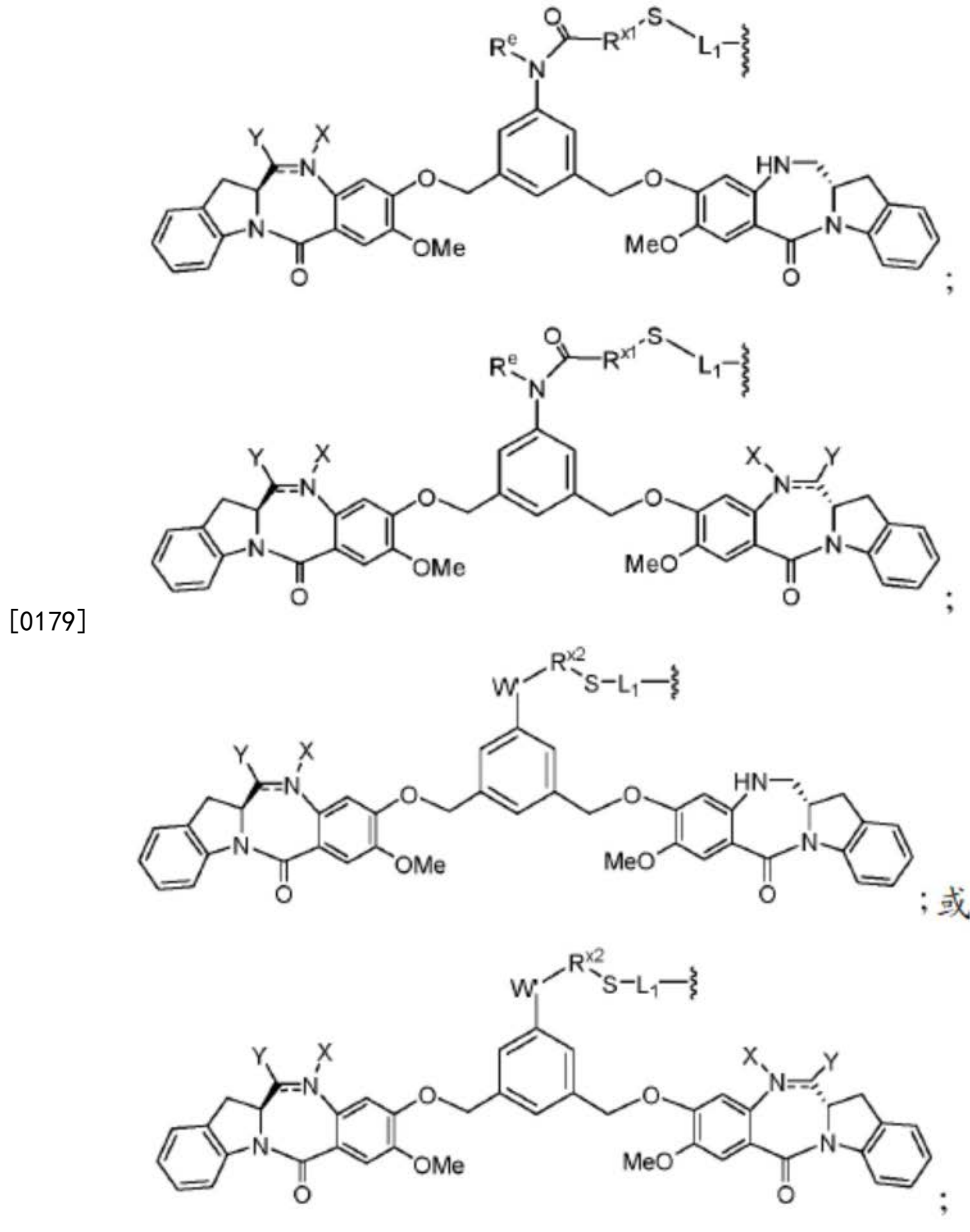
[0174] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

[0175] J_{CB'}是通过使来源于本发明的所述抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s2}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:



[0177] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点；并且s2是与Cy^{s2}共价连接的位点；

[0178] Cy^{s2}由以下各式表示：



[0180] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0181] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键，其限制条件是当其是双键时，X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基；并且当其是单键时，X是-H或胺保护部分，且Y是-OH或-SO₃M；

[0182] M是H⁺或阳离子；

[0183] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基；

[0184] R^e 是 -H 或 (C_1-C_6) 烷基;

[0185] W' 是 $-NR^{e'}$;

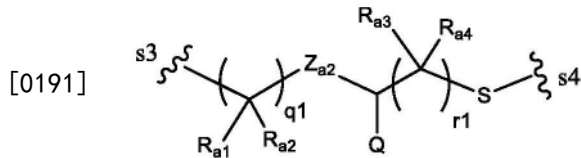
[0186] $R^{e'}$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

[0187] n 是 2 至 6 的整数;

[0188] R^k 是 -H 或 -Me;

[0189] R^{x2} 是 (C_1-C_6) 烷基;

[0190] L_1 由下式表示:



[0192] 其中:

[0193] s_3 是与基团 J_{CB} 共价连接的位点;

[0194] s_4 是与 Cy^{s2} 上的 -S- 基团共价连接的位点;

[0195] Z_{a2} 是不存在、 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;

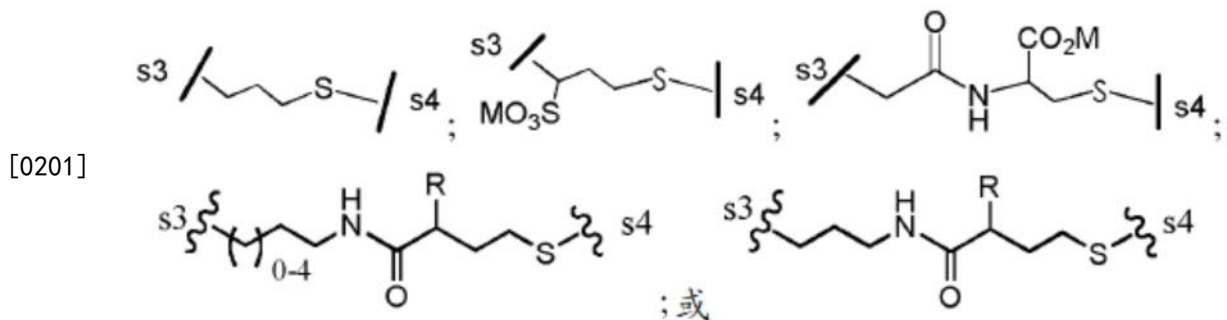
[0196] R_9 是 -H 或 (C_1-C_3) 烷基;

[0197] Q 是 H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0198] R_{a1} 、 R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 在每次出现时独立地是 H 或 (C_1-C_3) 烷基; 并且

[0199] q_1 和 r_1 各自独立地是 0 至 10 的整数, 其限制条件是 q_1 和 r_1 不均是 0。

[0200] 在某些实施方案中, $-L_1-$ 由以下各式表示:

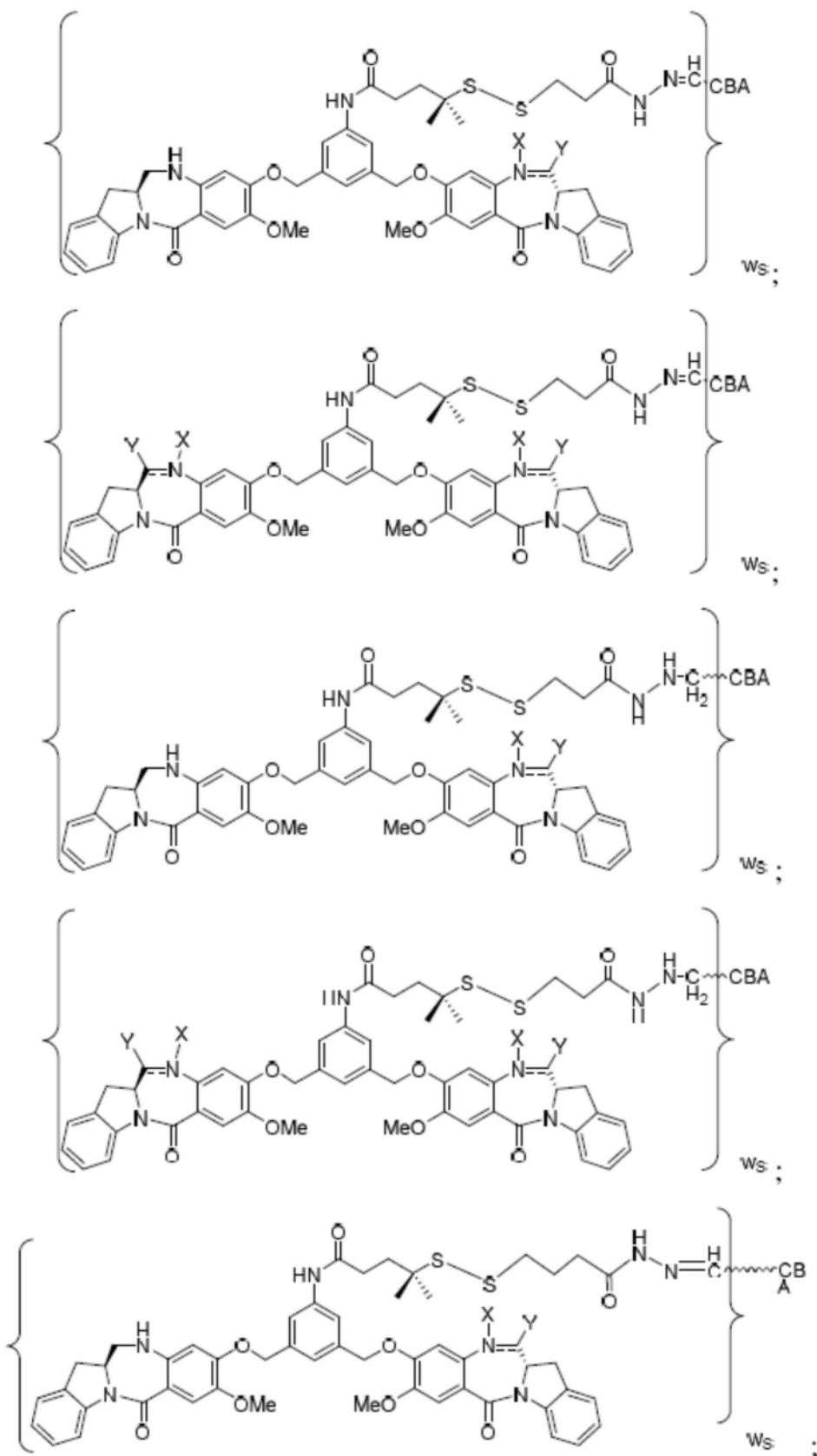


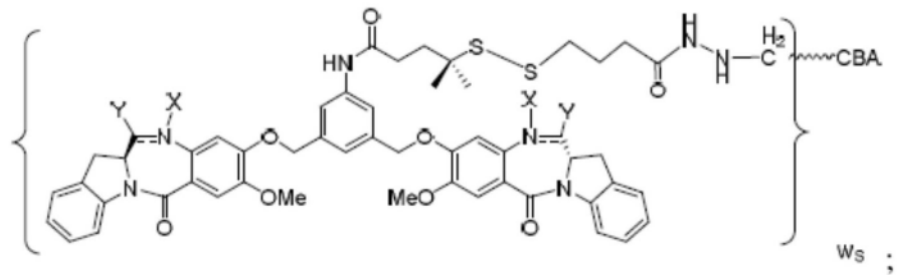
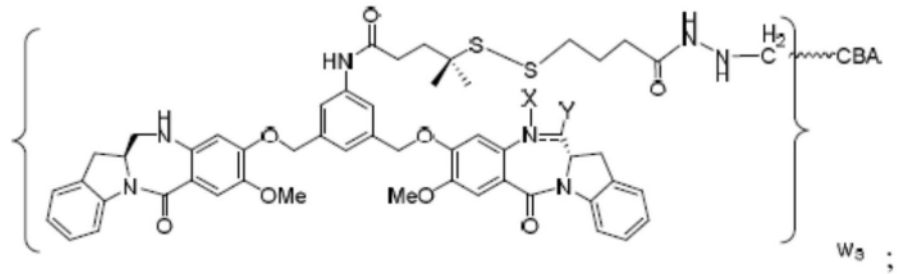
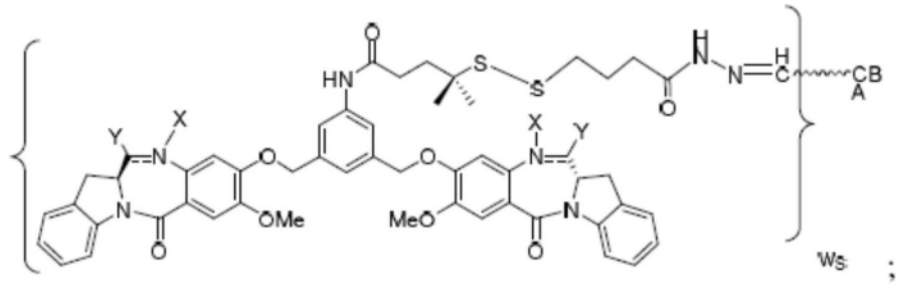
[0202] 或其药学上可接受的盐, 其中 R 是 H 或 $-SO_3M$ 。

[0203] 在某些实施方案中, R^e 是 H 或 Me; 并且 R^{x1} 是 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, 且 R^{x2} 是 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, 其中 R^f 和 R^g 各自独立地是 -H 或 (C_1-C_4) 烷基; 并且 p 是 0、1、2 或 3。在某些实施方案中, R^f 与 R^g 相同或不同且选自 -H 和 -Me。

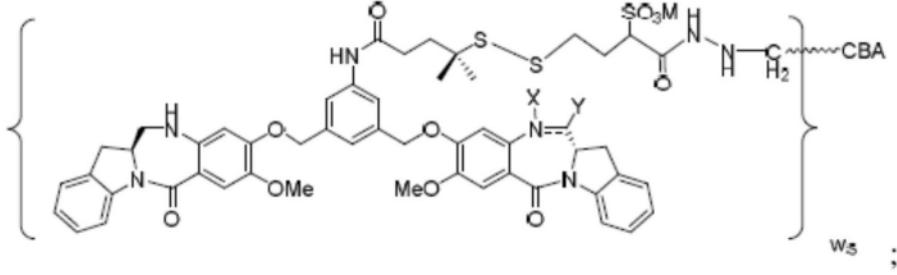
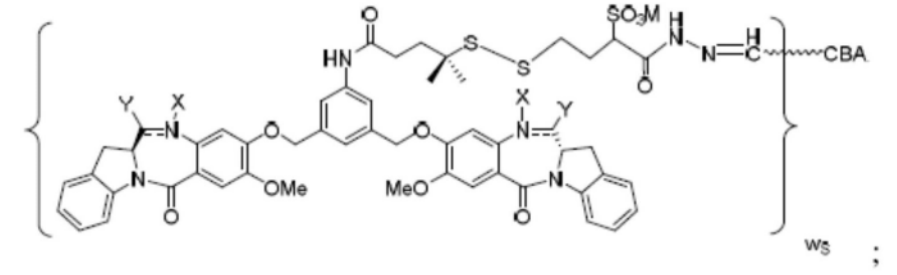
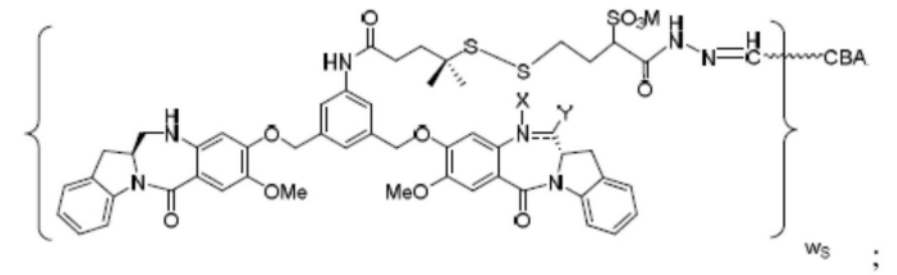
[0204] 在某些实施方案中, 所述免疫缀合物由以下各式表示:

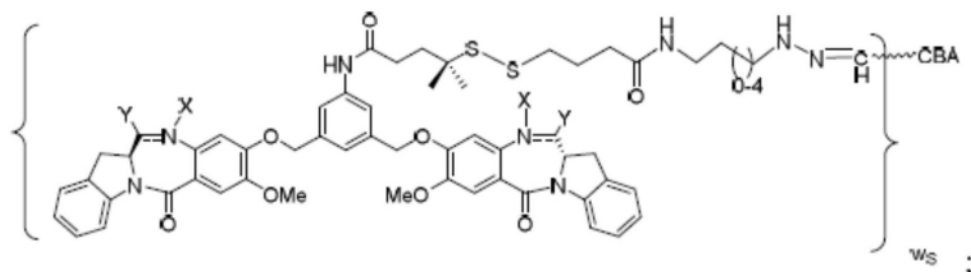
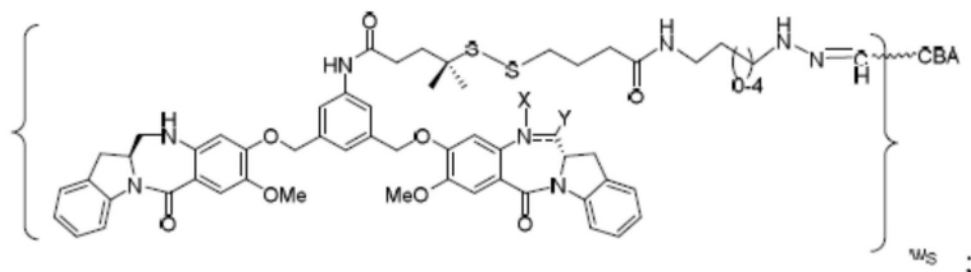
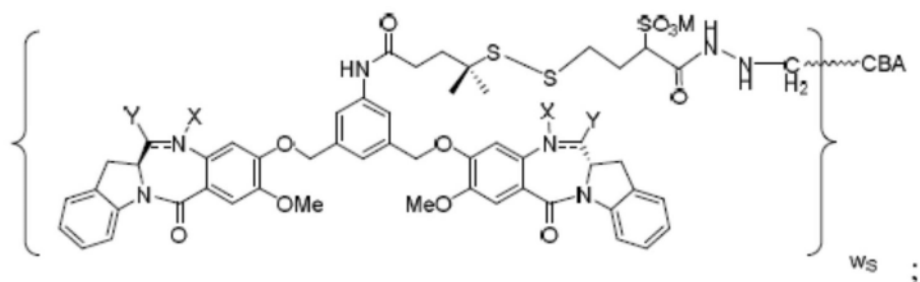
[0205]



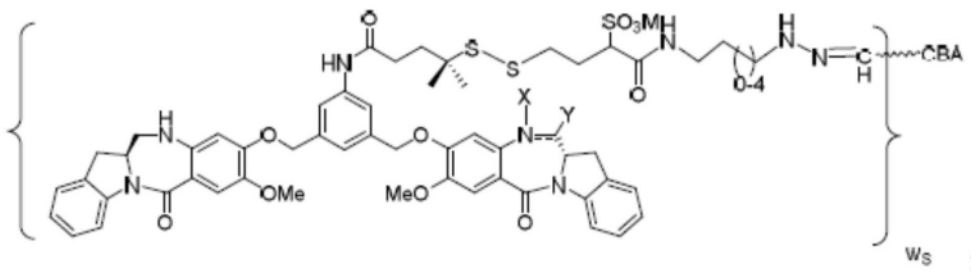
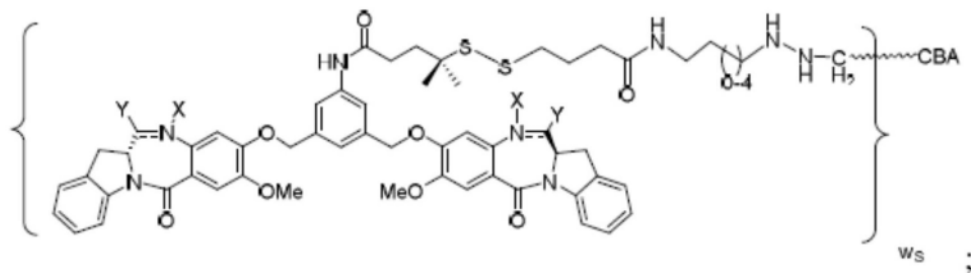
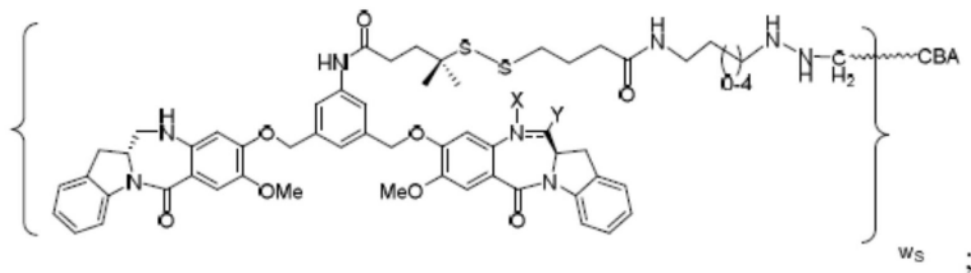


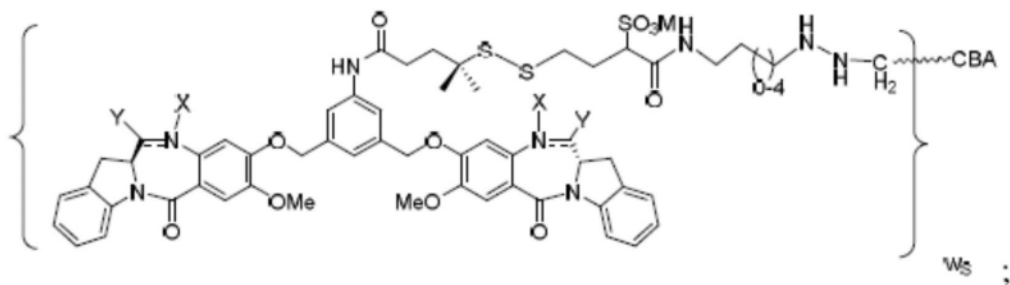
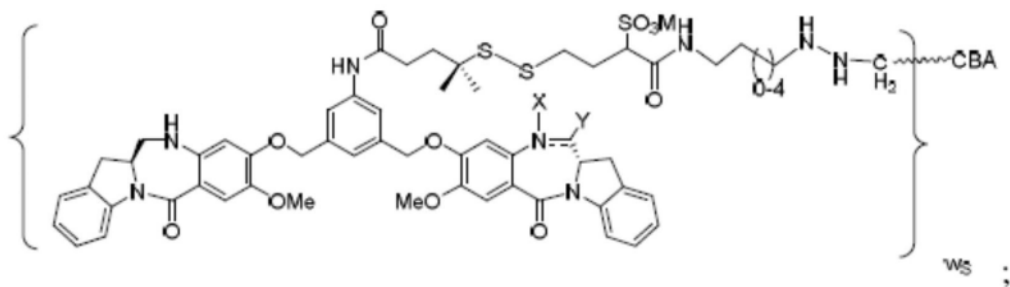
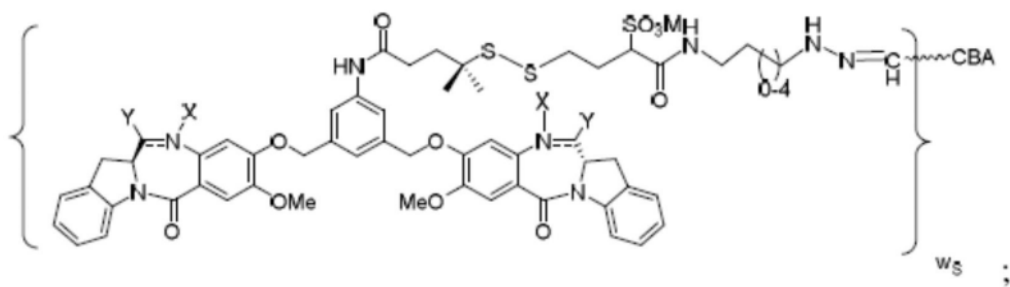
[0206]



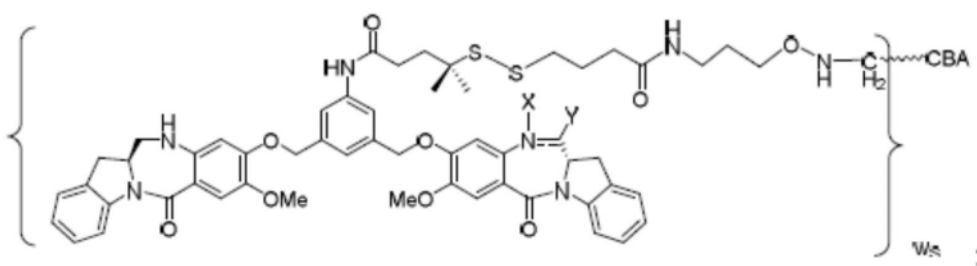
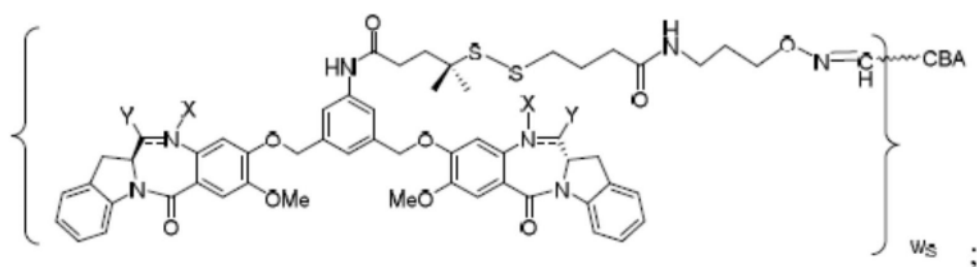
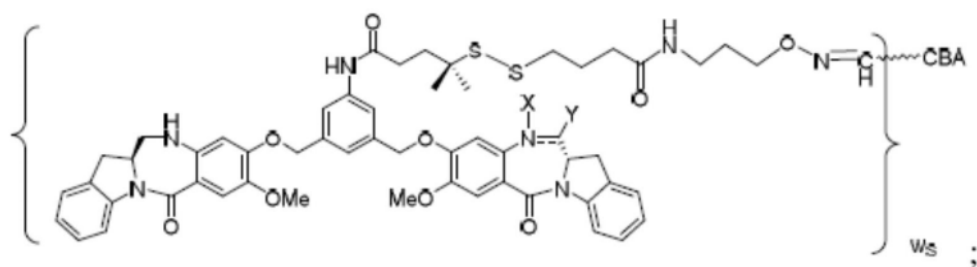


[0207]

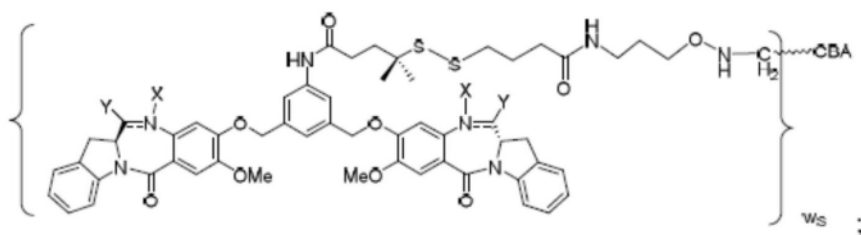
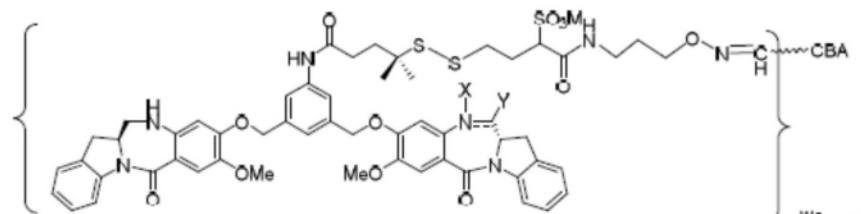
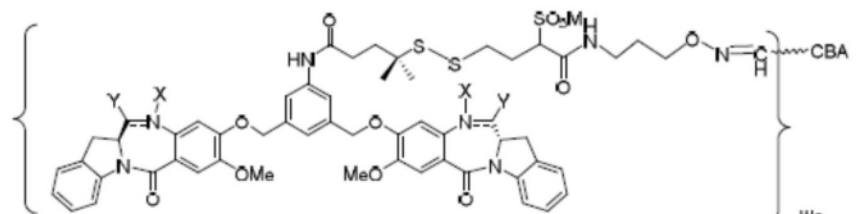
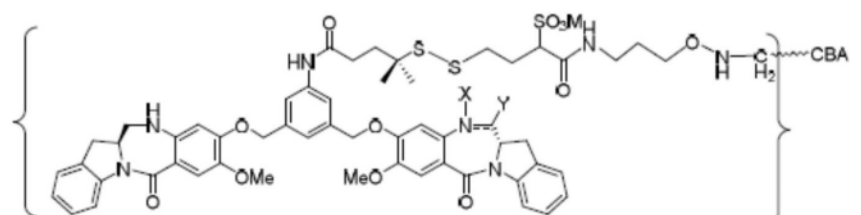
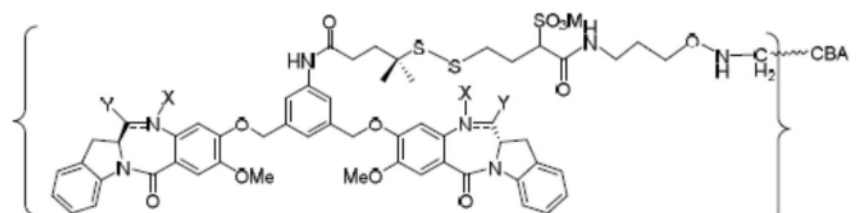
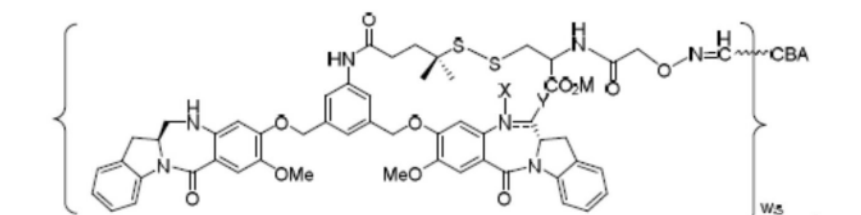
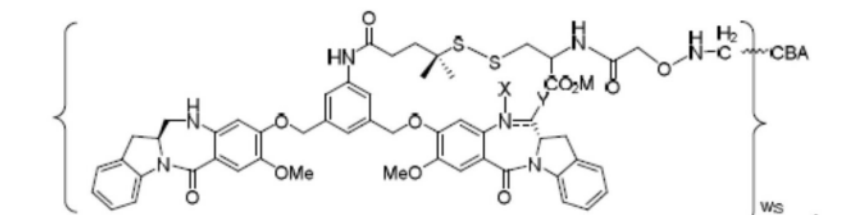


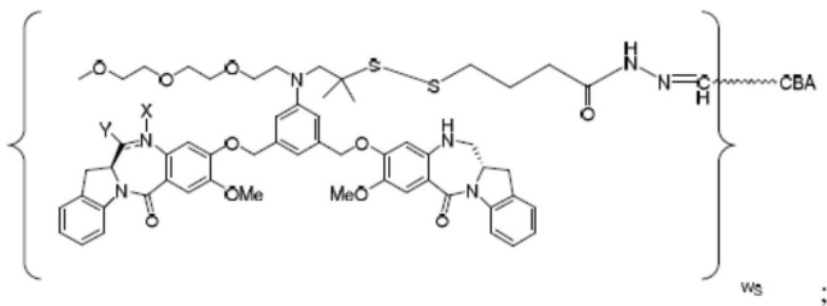
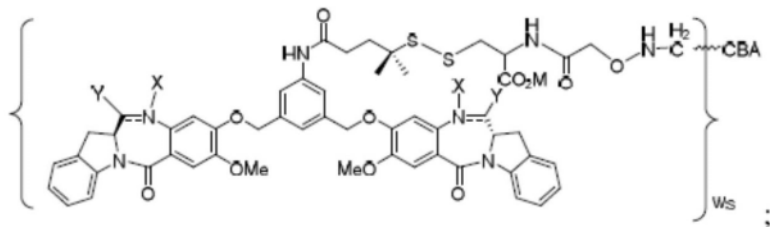
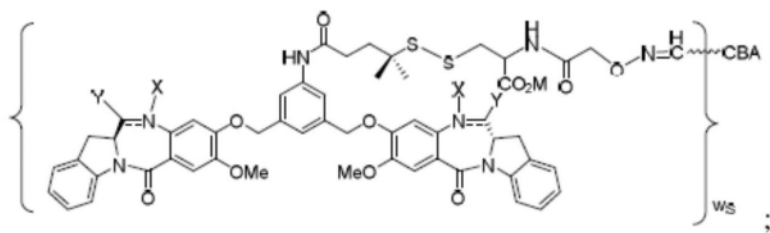


[0208]

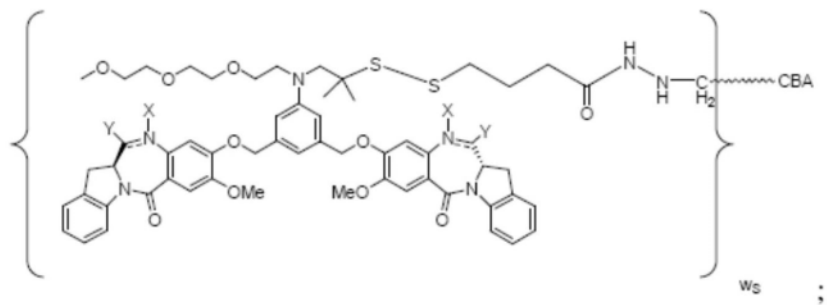
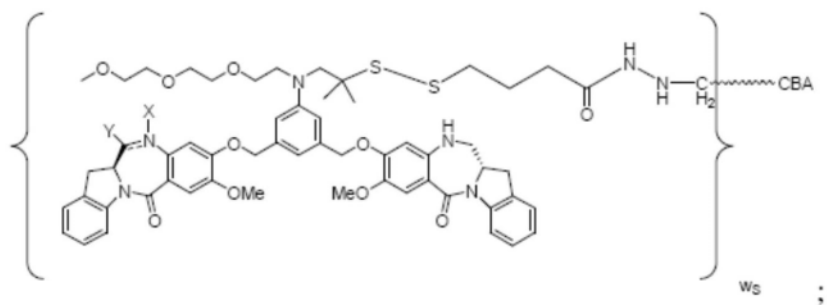
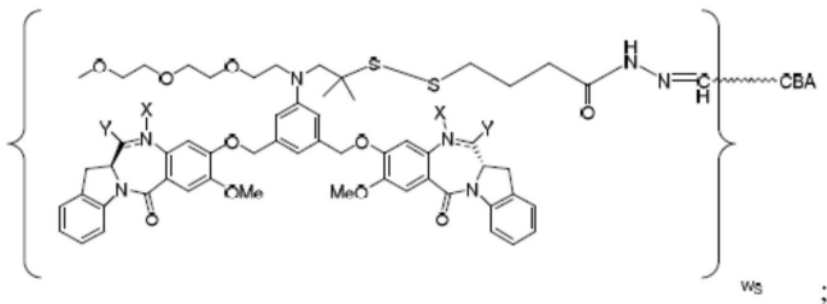


[0209]

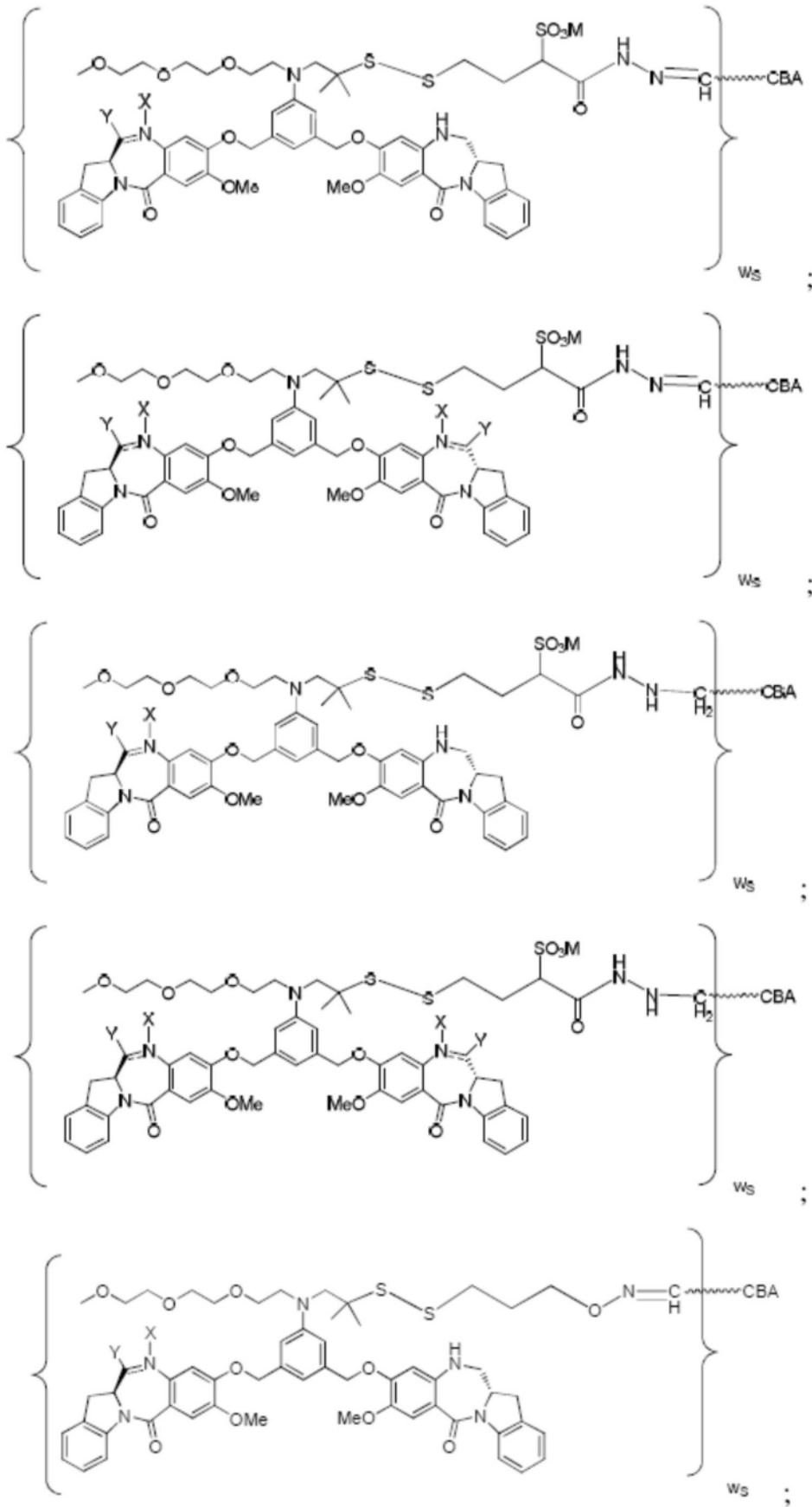
w_s ;w_s ;w_s ;w_s ;w_s ;w_s ;w_s ;



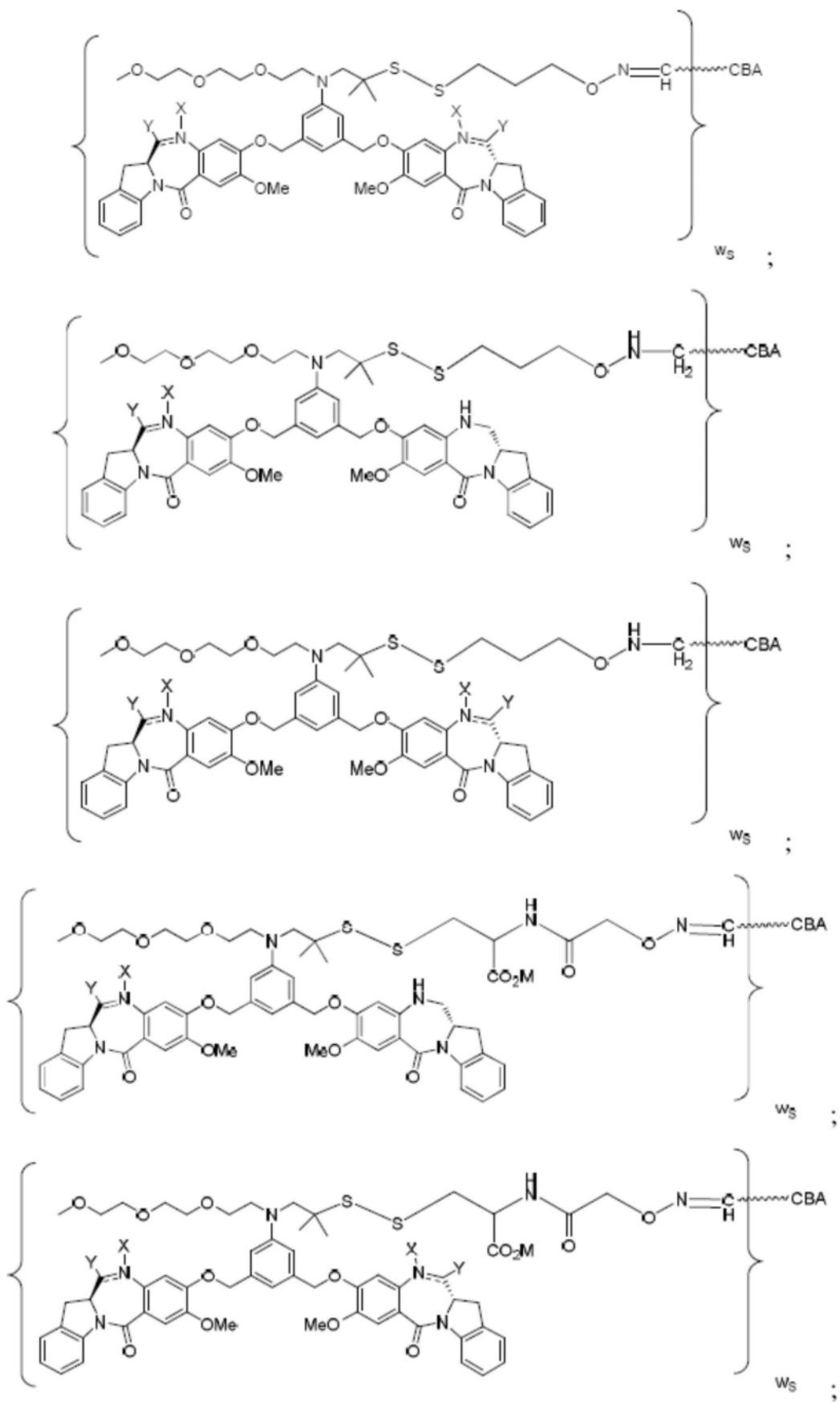
[0210]



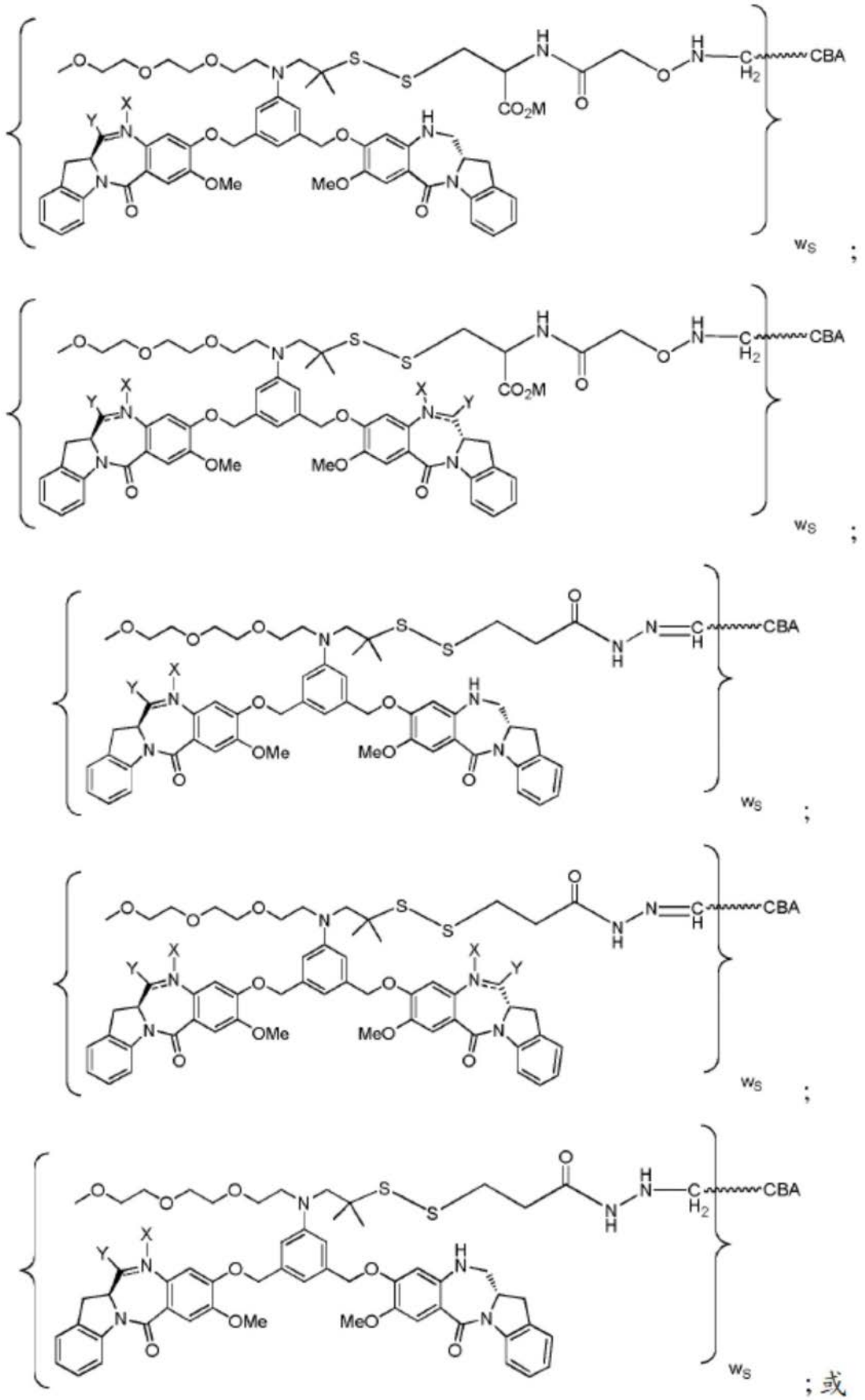
[0211]

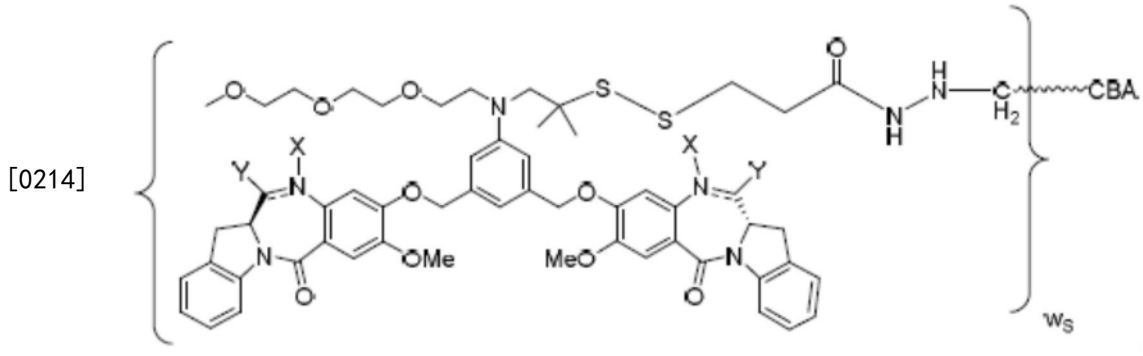


[0212]



[0213]





[0215] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线=表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H;并且Y是-OH或-SO₃M。

[0216] 在某些实施方案中,介于N与C之间的双线=表示双键,X不存在且Y是-H。

[0217] 在某些实施方案中,介于N与C之间的双线=表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。在某些实施方案中,M是H⁺、Na⁺或K⁺。

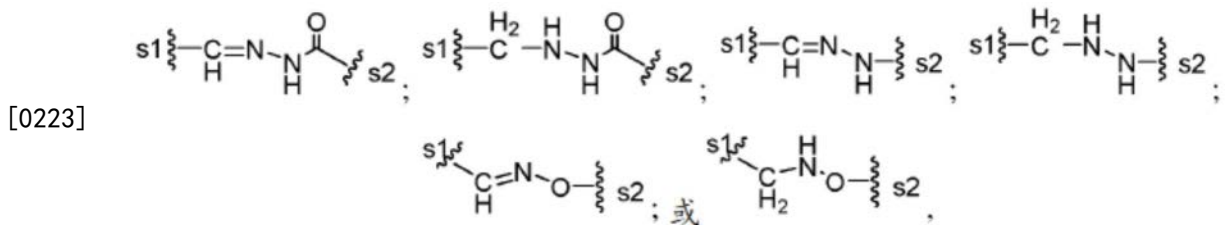
[0218] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:



[0220] 其中:

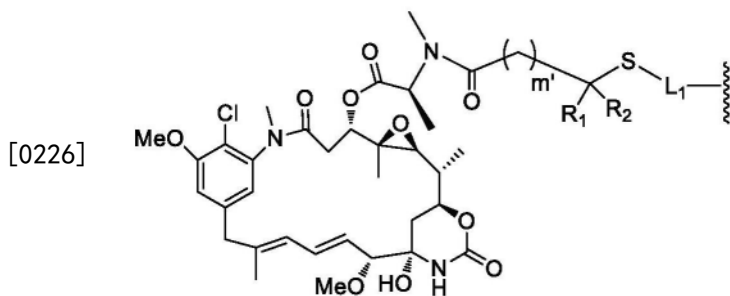
[0221] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

[0222] J_{CB'}是通过使来源于本发明的所述抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s3}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:



[0224] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s3}共价连接的位点;

[0225] Cy^{s3}由下式表示:

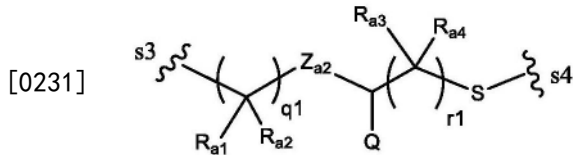


[0227] 其中:

[0228] m'是1或2;

[0229] R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0230] L_1 由下式表示:



[0232] 其中:

[0233] s_3 是与基团 J_{CB} 共价连接的位点;

[0234] s_4 是与 Cy^{s3} 上的-S-基团共价连接的位点;

[0235] Z_{a2} 是不存在、-C(=O)- NR_9 -或- NR_9 -C(=O)-;

[0236] R_9 是-H或(C₁-C₃)烷基;

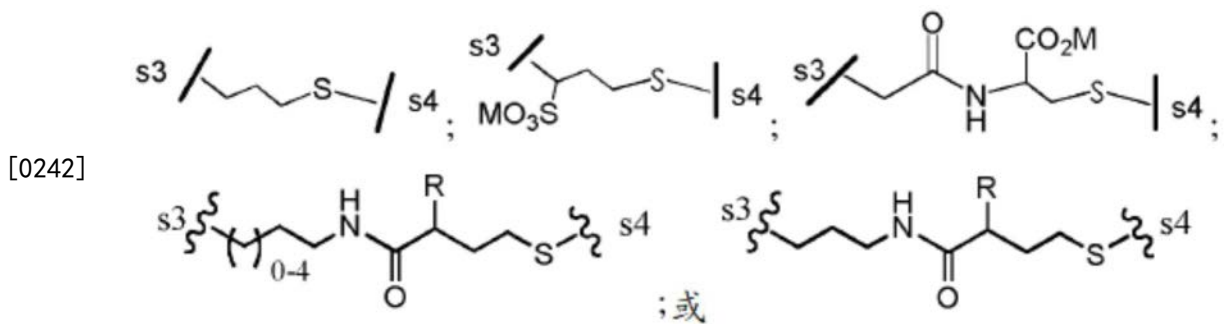
[0237] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0238] R_{a1} 、 R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0239] q_1 和 r_1 各自独立地是0至10的整数,其限制条件是 q_1 和 r_1 不均是0。

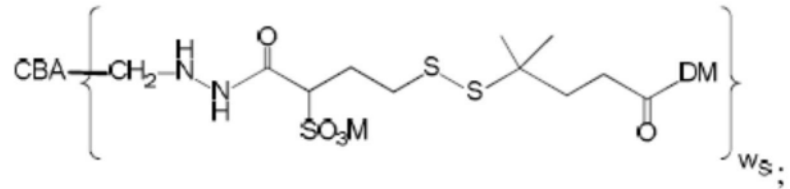
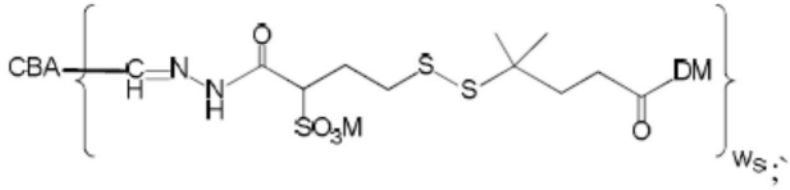
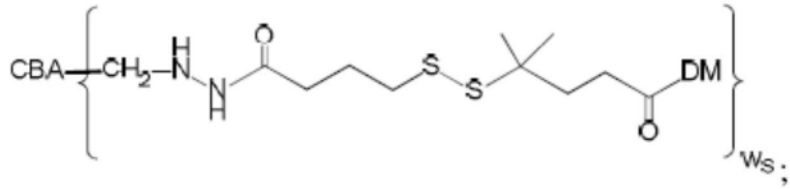
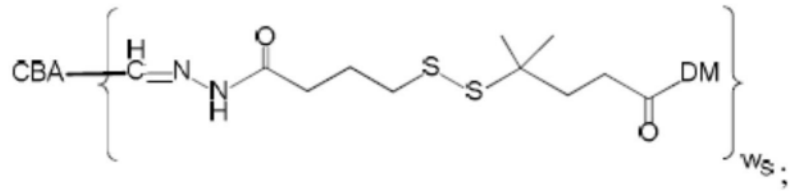
[0240] 在某些实施方案中, m' 是1,且 R_1 和 R_2 两者均是H。在某些实施方案中, m' 是2,且 R_1 和 R_2 两者均是Me。

[0241] 在某些实施方案中,- L_1 -由以下各式表示:

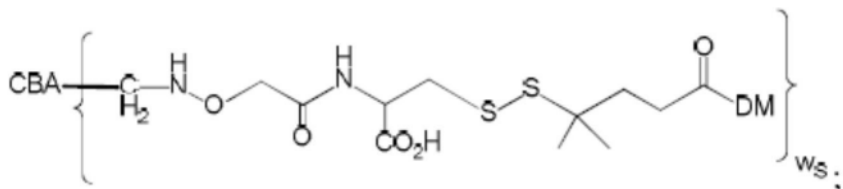
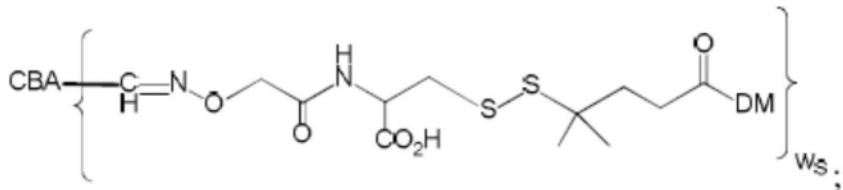
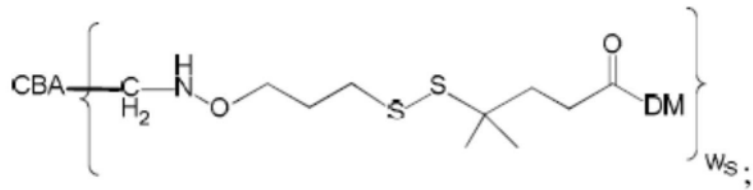
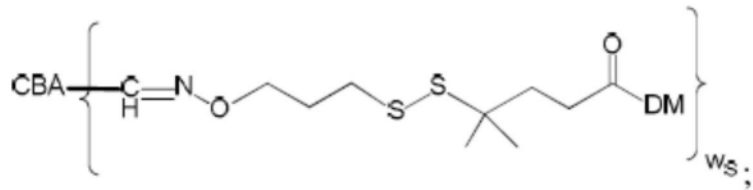


[0243] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M且M是H⁺或阳离子。

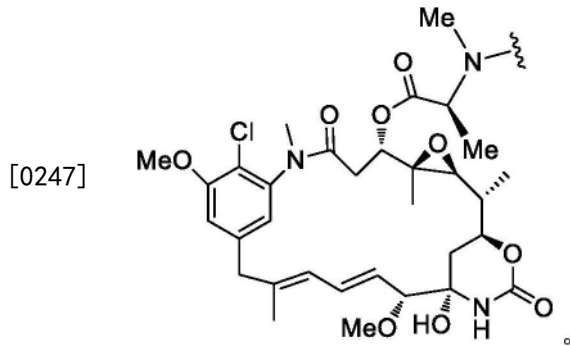
[0244] 在某些实施方案中,所述免疫缀合物由以下各式表示:



[0245]



[0246] 或其药学上可接受的盐;其中DM由下式表示:



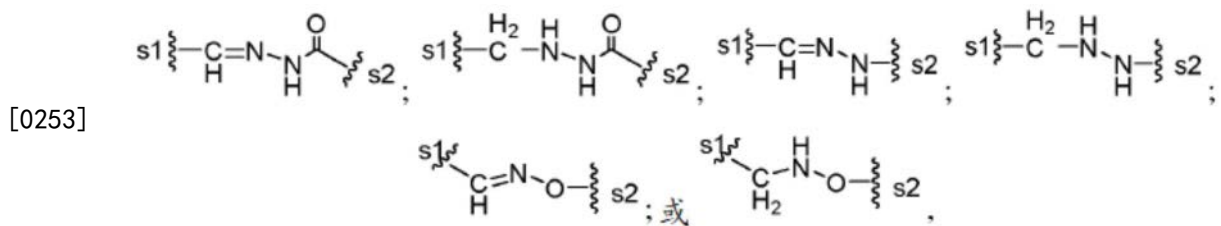
[0248] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:



[0250] 其中:

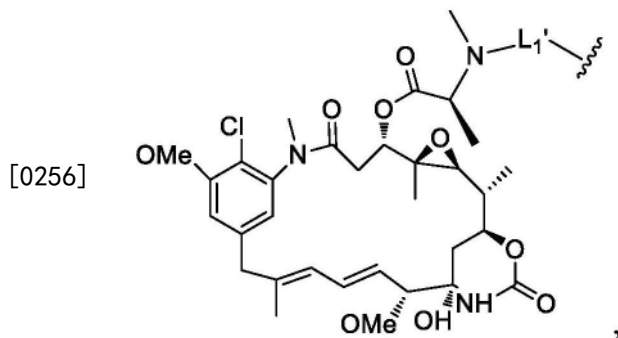
[0251] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽,其共价连接至 $J_{CB'}$ 基团;

[0252] $J_{CB'}$ 是通过使来源于本发明的所述抗体或其抗原结合片段或本发明的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与 Cy^{s4} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

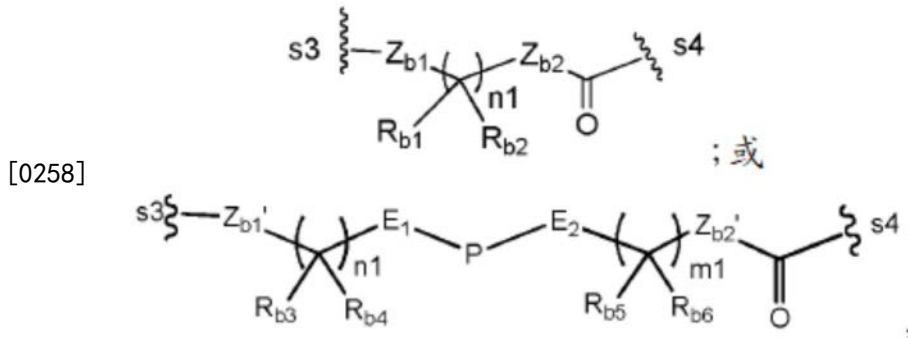


[0254] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与 Cy^{s4} 共价连接的位点;

[0255] Cy^{s4} 由以下各式表示:



[0257] L_1' 由以下各式表示:



[0259] 其中:

[0260] s3是与J_{CB}'基团共价连接的位点;

[0261] s4是与Cy^{s4}上的-NMe-基团共价连接的位点;

[0262] Z_{b1}和Z_{b2}两者均不存在,或Z_{b1}和Z_{b2}中的一者不存在且另一者是-CH₂-O-或-O-CH₂-;

[0263] Z_{b1}'和Z_{b2}'各自独立地是不存在、-CH₂-O-、-O-CH₂-、-NR₉-C(=O)-CH₂-或-CH₂-C(=O)-NR₉-;

[0264] R₉是H或(C₁-C₃)烷基;

[0265] n1和m1各自独立地是1至6的整数;

[0266] E₁和E₂中的一者是-C(=O)-且另一者是-NR₉-;或E₁和E₂中的一者是-C(=O)-或-NR₉-且另一者不存在;

[0267] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;并且

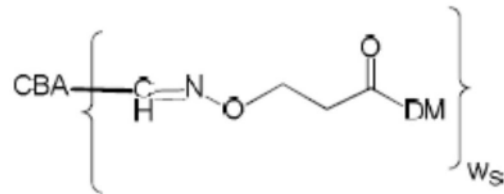
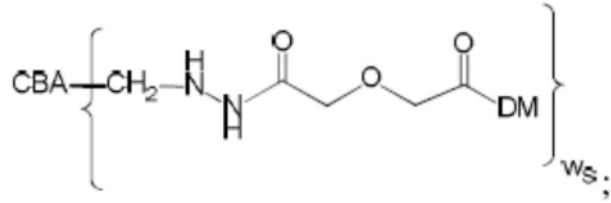
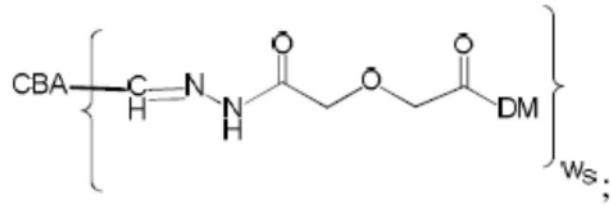
[0268] R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}在每次出现时各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基。

[0269] 在某些实施方案中,R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}都是H。在某些实施方案中,R₉是H。

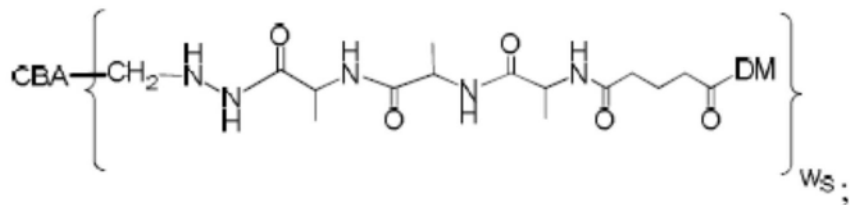
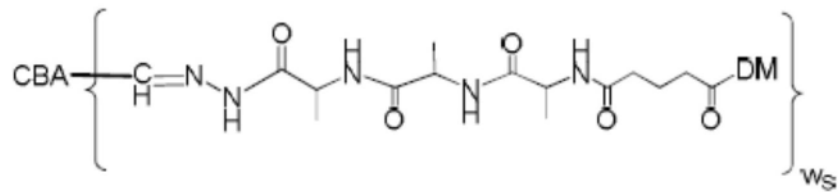
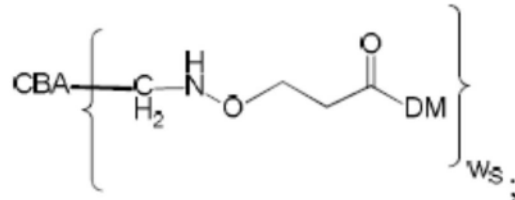
[0270] 在某些实施方案中,Z_{b1}'和Z_{b2}'两者均不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-O-;并且Z_{b2}'不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-C(=O)-NR₉-;并且Z_{b2}'是-O-CH₂-或不存在。

[0271] 在某些实施方案中,P是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如,P可选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala和D-Ala-D-Ala。

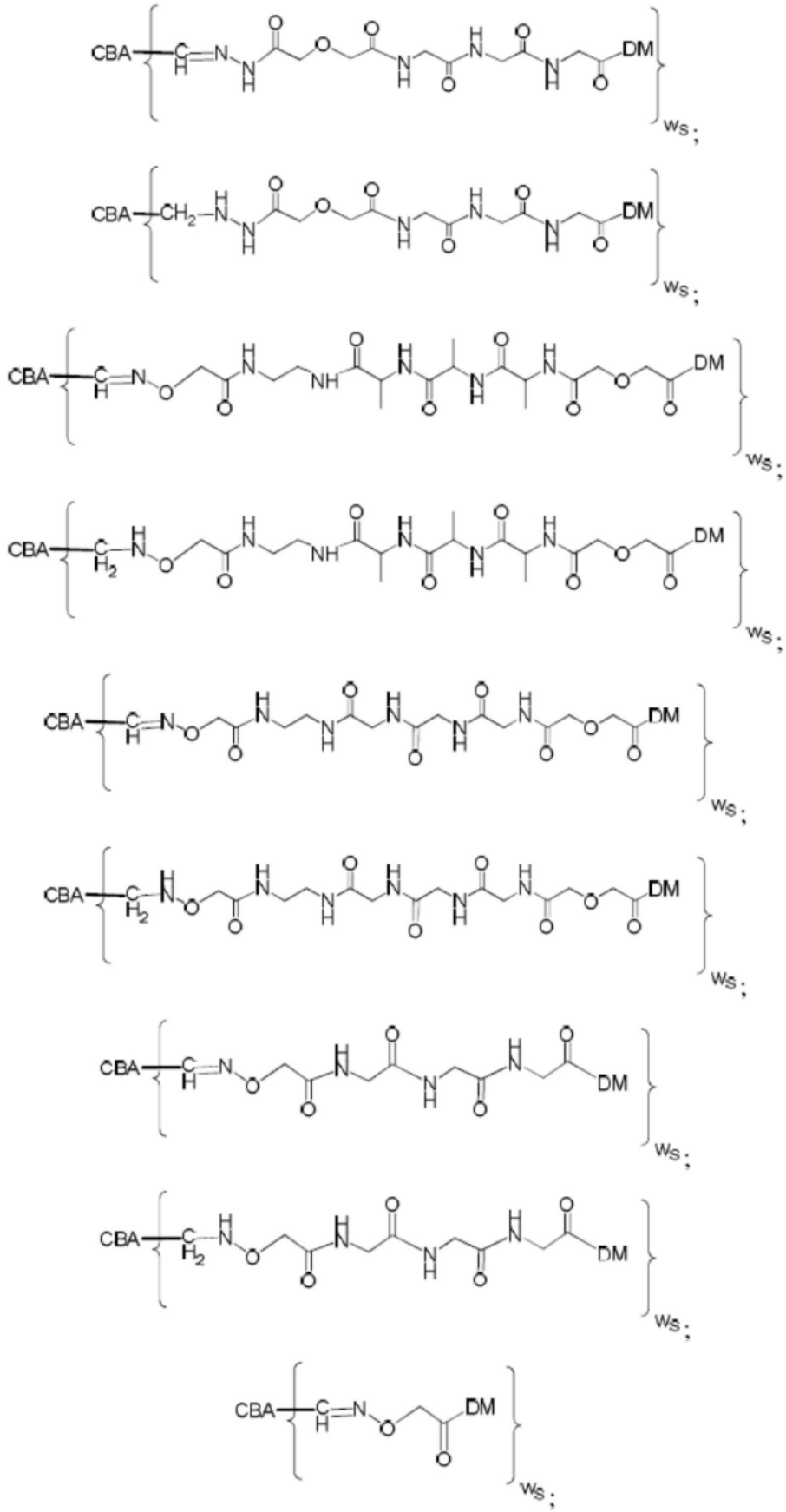
[0272] 在某些实施方案中,免疫缀合物由以下各式表示:

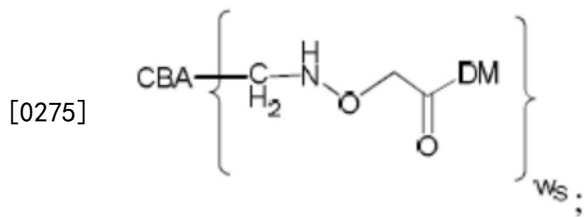


[0273]

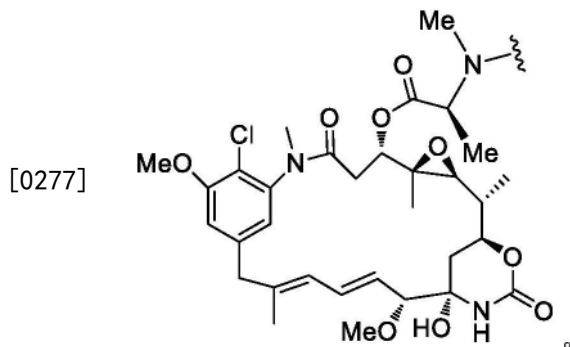


[0274]

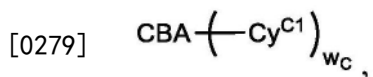




[0276] 或其药学上可接受的盐,其中DM由以下结构式表示:



[0278] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其由下式表示:

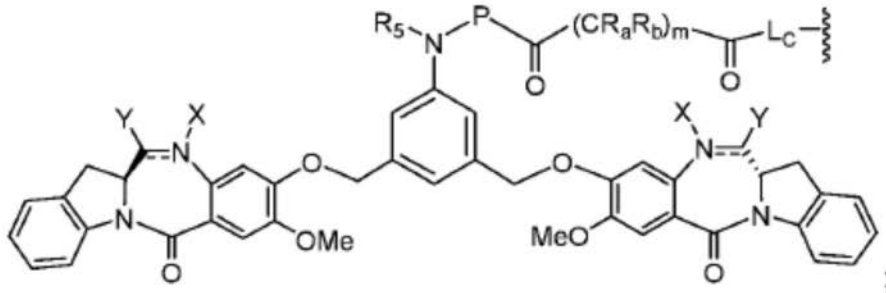
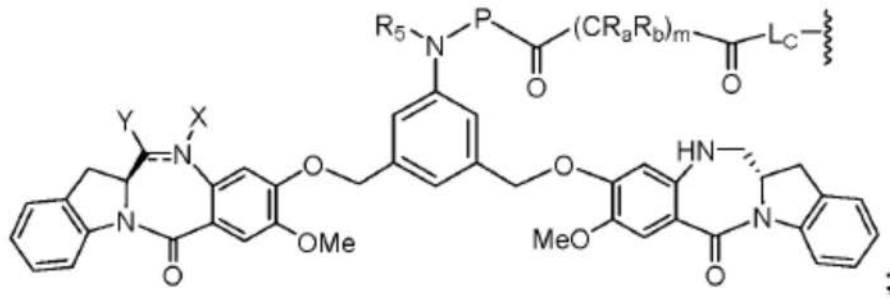


[0280] 其中:

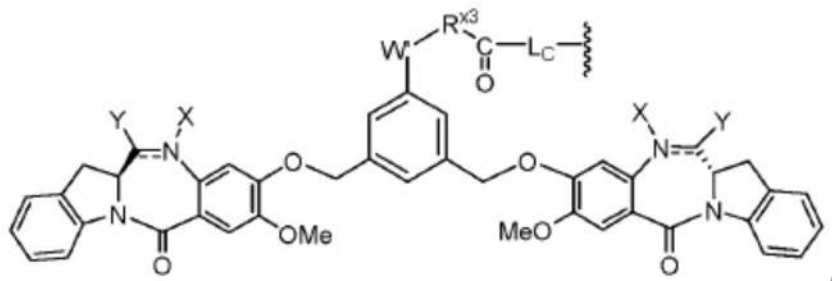
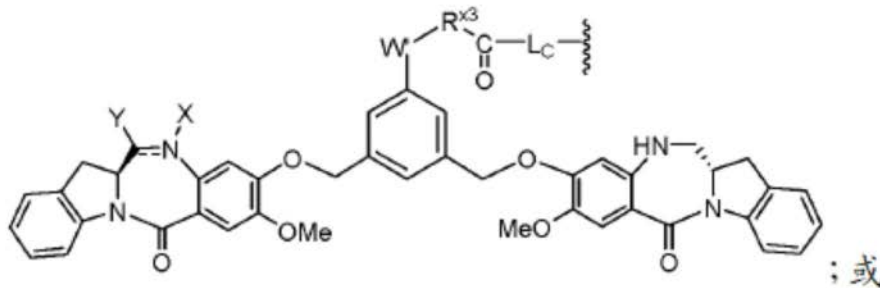
[0281] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至 Cy^{C1} ;

[0282] w_c 是1或2;

[0283] Cy^{C1} 由以下各式表示:



[0284]



[0285] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0286] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[0287] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0288] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[0289] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

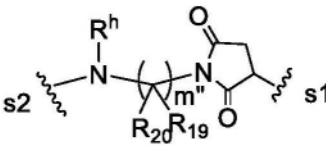
[0290] W'是-NR^{e'};

[0291] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0292] n是2至6的整数;

[0293] R^k 是-H或-Me;

[0294] R^{x3} 是(C₁-C₆)烷基;并且

[0295] L_C 由  表示, s1是与CBA共价连接的位点, 且s2是与Cy^{C1}上的-

C(=O)-基团共价连接的位点;其中:

[0296] R_{19} 和 R_{20} 在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0297] m'' 是介于1与10之间的整数;并且

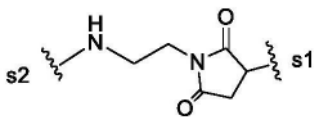
[0298] R^h 是-H或(C₁-C₃)烷基。

[0299] 在某些实施方案中, R_a 和 R_b 两者均是H;并且 R_5 是H或Me。

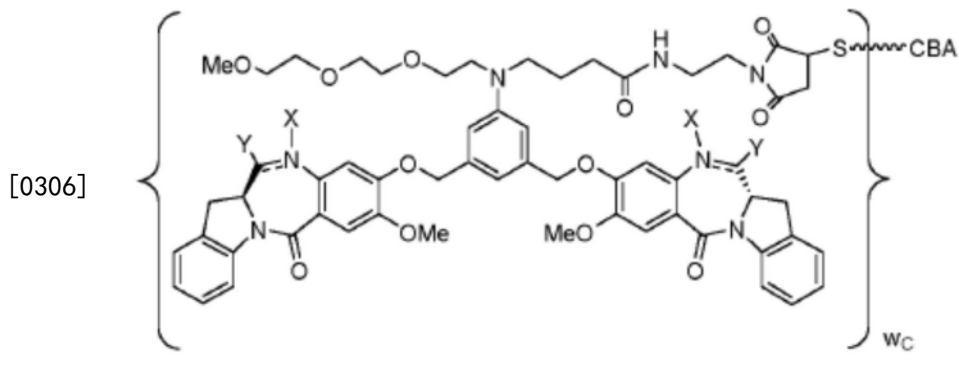
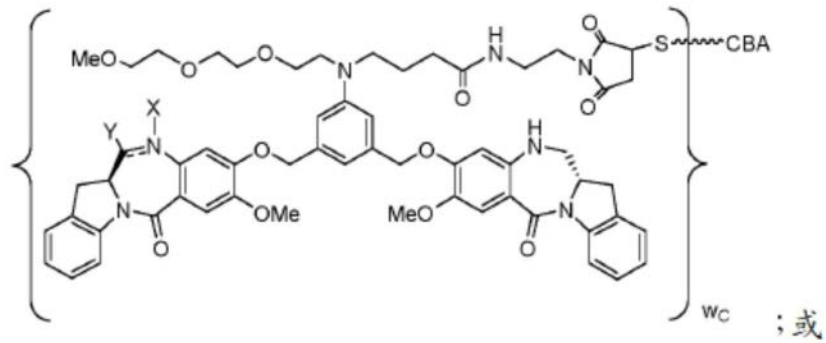
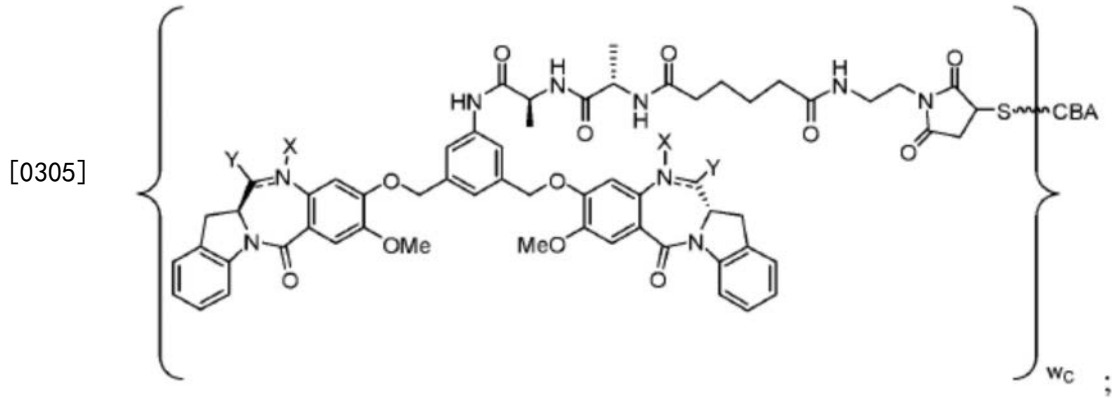
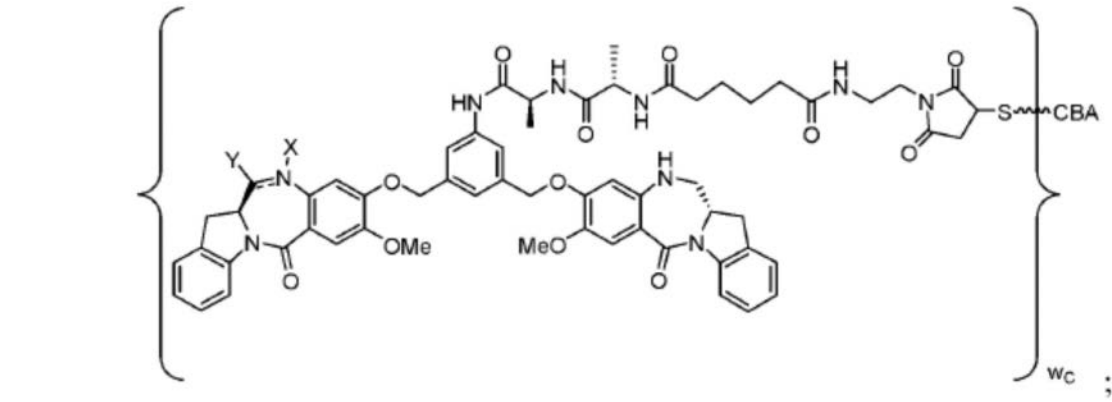
[0300] 在某些实施方案中, P是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如, P可选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中, P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。在某些实施方案中, Q是-SO₃M。

[0301] 在某些实施方案中, R_{19} 和 R_{20} 两者均是H;并且 m'' 是1至6的整数。

[0302] 在某些实施方案中, $-L_C-$ 由下式表示:

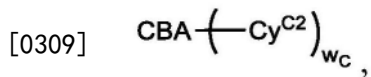
[0303] 

[0304] 在某些实施方案中, 所述免疫缀合物由以下各式表示:



[0307] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0308] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其由下式表示:

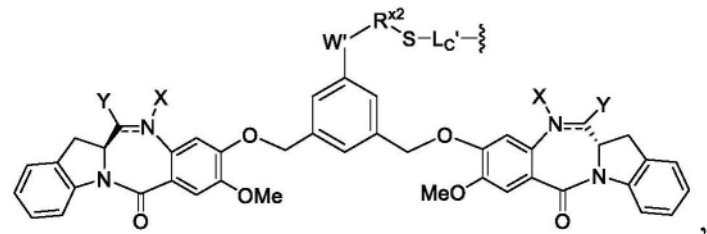
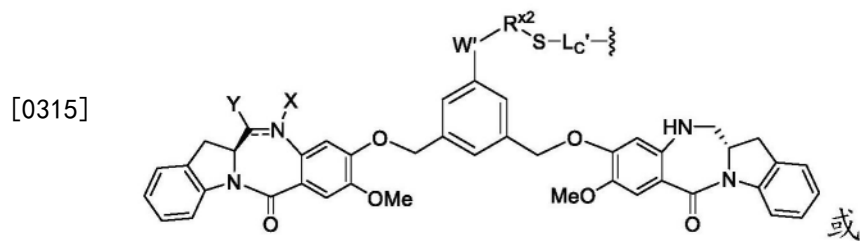
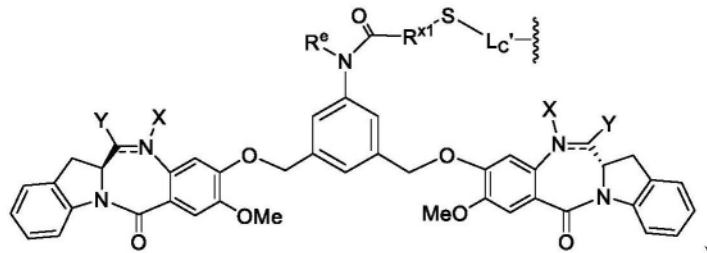
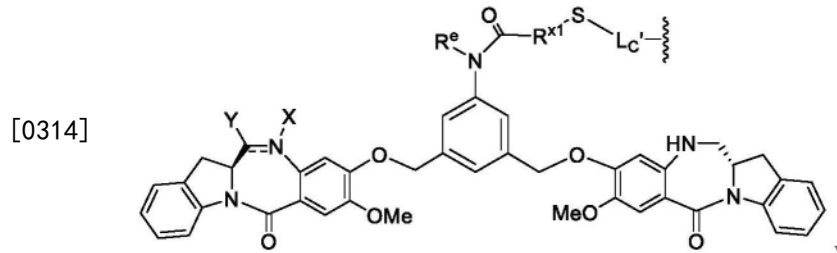


[0310] 其中:

[0311] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至 Cy^{C2} ;

[0312] W_c 是1或2;

[0313] Cy^{C2} 由以下各式表示:



[0316] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0317] 介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或 $-SO_3M$,且M是 H^+ 或阳离子;

[0318] R^{x1} 是 (C_1-C_6) 烷基;

[0319] R^e 是-H或 (C_1-C_6) 烷基;

[0320] W' 是 $-NR^{e'}$;

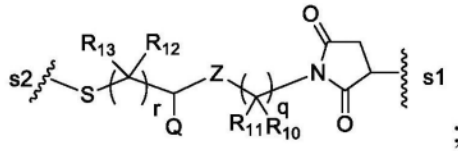
[0321] $R^{e'}$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

[0322] n是2至6的整数;

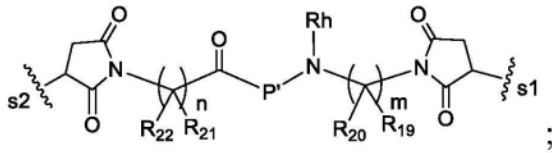
[0323] R^k 是-H或-Me;

[0324] R^{x2} 是 (C_1-C_6) 烷基;

[0325] L_C' 由以下各式表示:



[0326]



[0327] 其中:

[0328] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C2}上的-S-基团共价连接的位点;

[0329] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[0330] Q是-H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0331] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0332] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

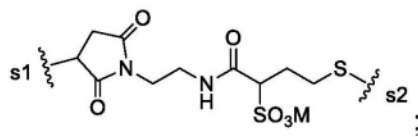
[0333] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

[0334] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

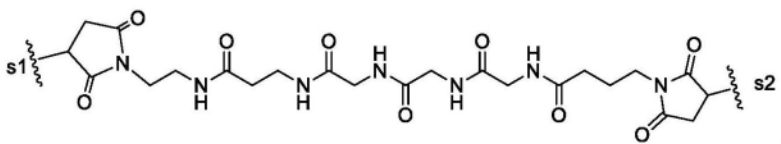
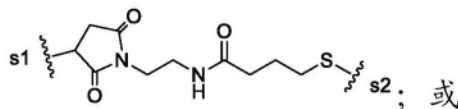
[0335] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

[0336] 在某些实施方案中,P'是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如,P'可选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中,P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0337] 在某些实施方案中,在所述免疫缀合物中,-L_{C'}'-由以下各式表示:

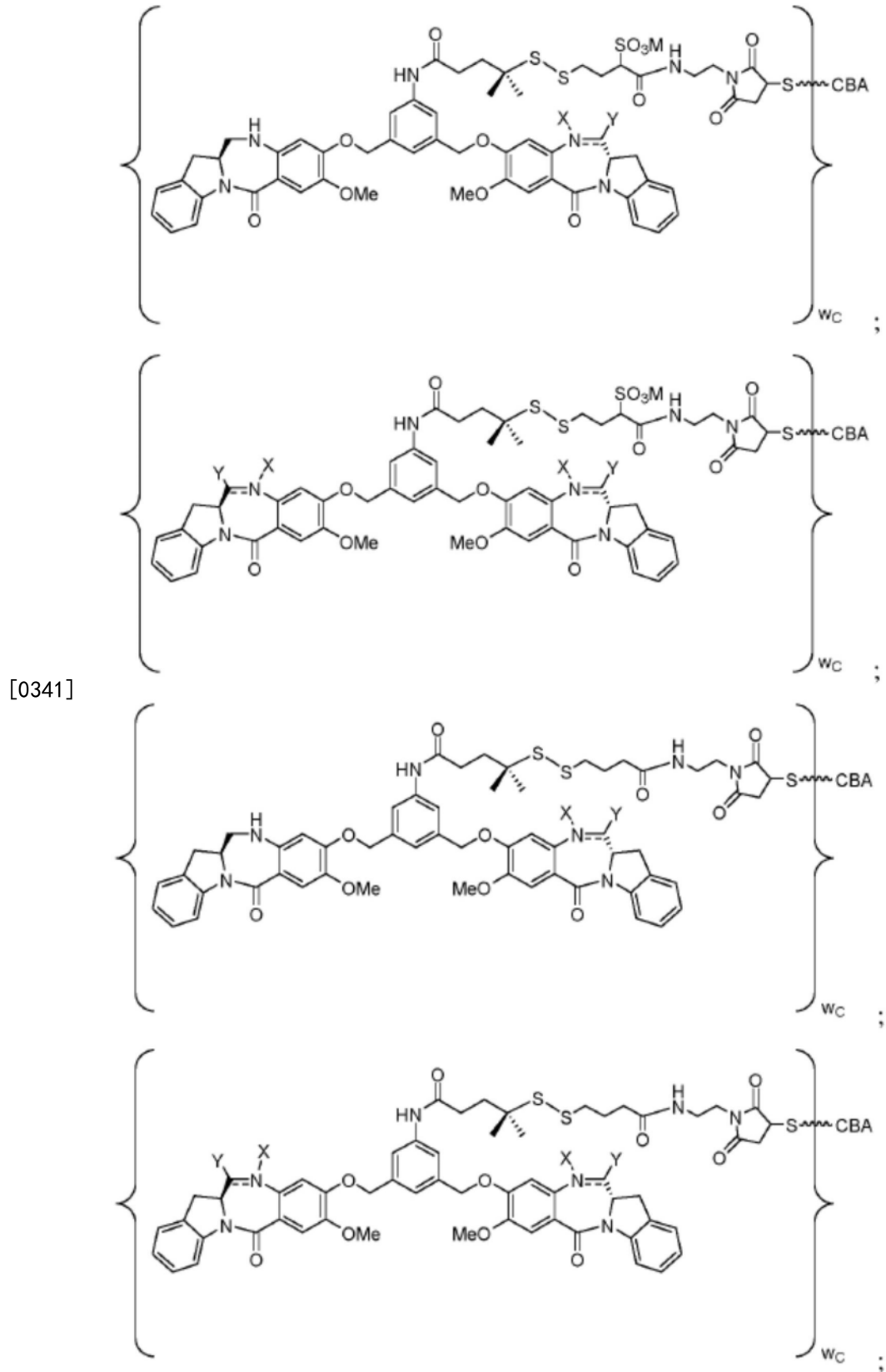


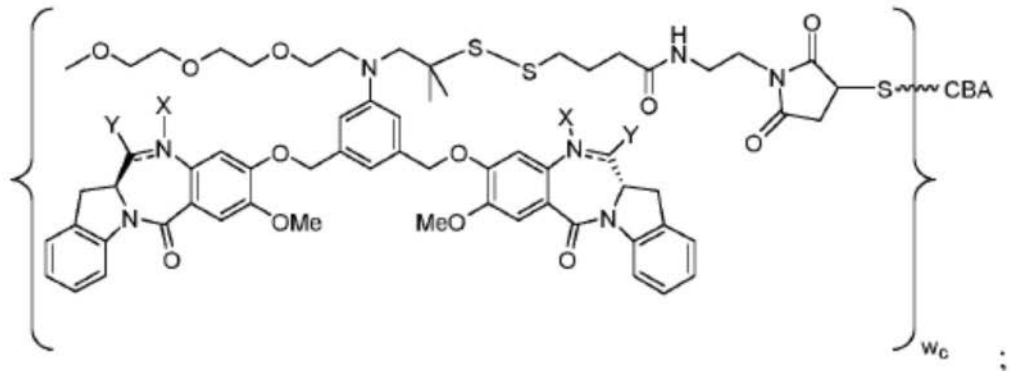
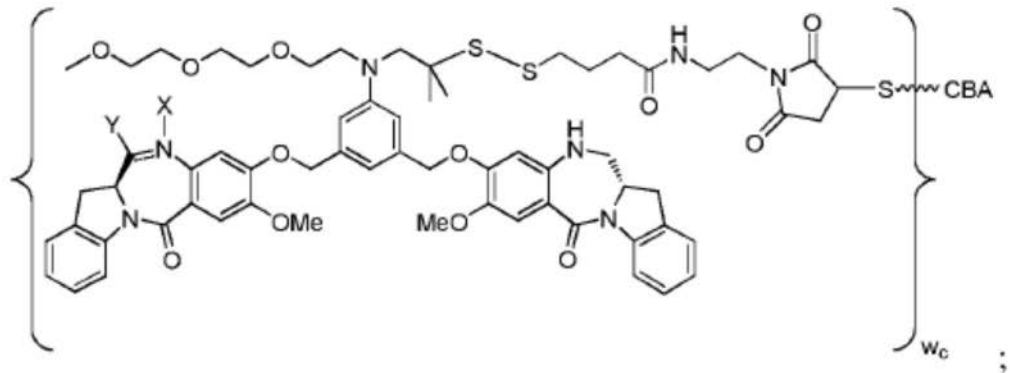
[0338]



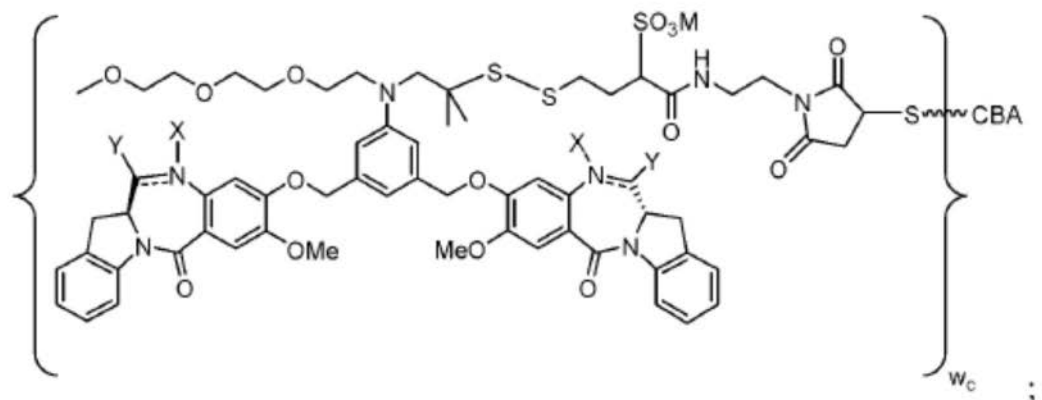
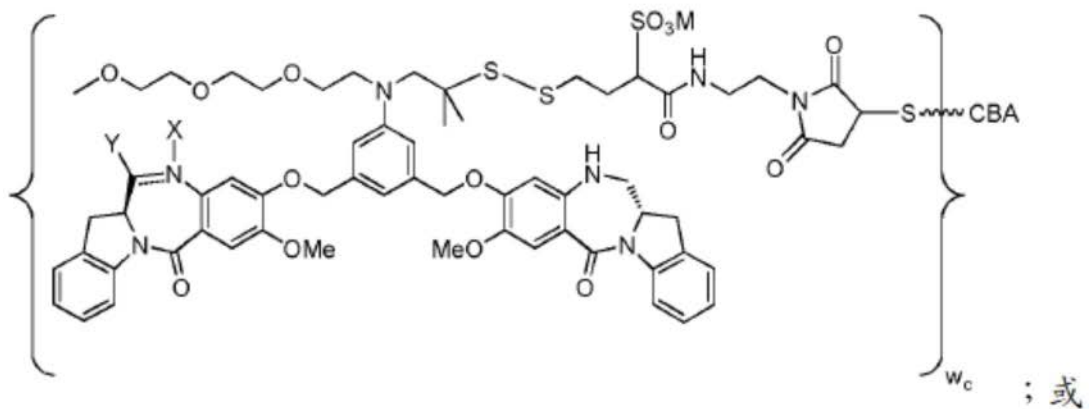
[0339] 在某些实施方案中, R^e 是 H 或 Me; R^{x1} 是 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, 且 R^{x2} 是 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, 其中 R^f 和 R^g 各自独立地是 -H 或 (C_1-C_4) 烷基; 并且 p 是 0、1、2 或 3。在某些实施方案中, R^f 与 R^g 相同或不同且选自 -H 和 -Me。

[0340] 在某些实施方案中, 所述免疫缀合物由以下各式表示:





[0342]

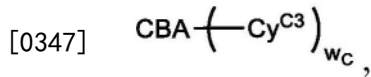


[0343] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0344] 在某些实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。

[0345] 在某些实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。在某些实施方案中,M是H⁺、Na⁺或K⁺。

[0346] 本发明的另一方面提供一种免疫缀合物,其具有下式:

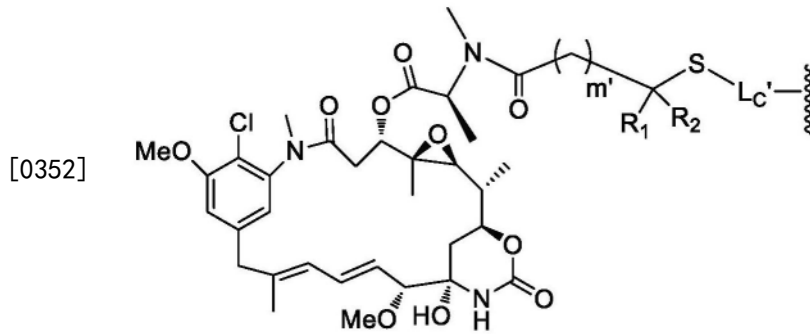


[0348] 其中:

[0349] CBA是本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至 $\text{Cy}^{\text{C}3}$;

[0350] w_c 是1或2;

[0351] $\text{Cy}^{\text{C}3}$ 由下式表示:

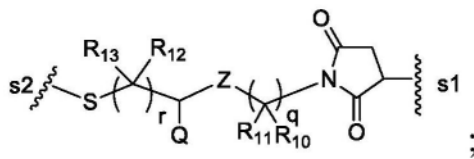


[0353] 其中:

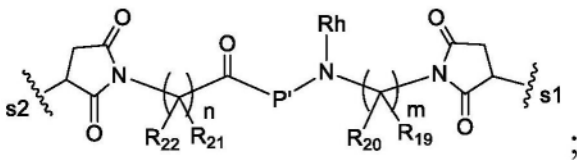
[0354] m' 是1或2;

[0355] R_1 和 R_2 各自独立地是-H或 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基;

[0356] L_c' 由以下各式表示:



[0357]



[0358] 其中:

[0359] s_1 是与所述CBA共价连接的位点且 s_2 是与 $\text{Cy}^{\text{C}3}$ 上的-S-基团共价连接的位点;

[0360] Z是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 或 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$;

[0361] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0362] R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地是-H或 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基;

[0363] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[0364] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

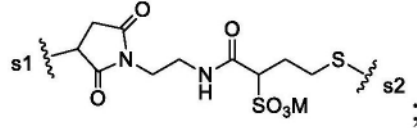
[0365] R^h 是-H或 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基;并且

[0366] P' 是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

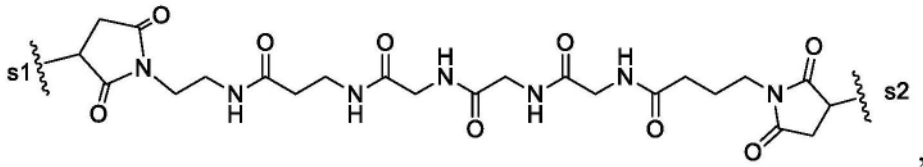
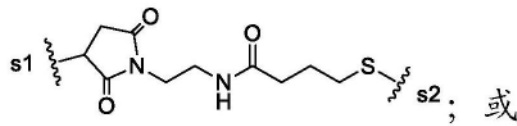
[0367] 在某些实施方案中, P' 是含有2至5个氨基酸残基的肽。例如, P' 选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-

Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在某些实施方案中，P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0368] 在某些实施方案中，-L_C'-由以下各式表示：



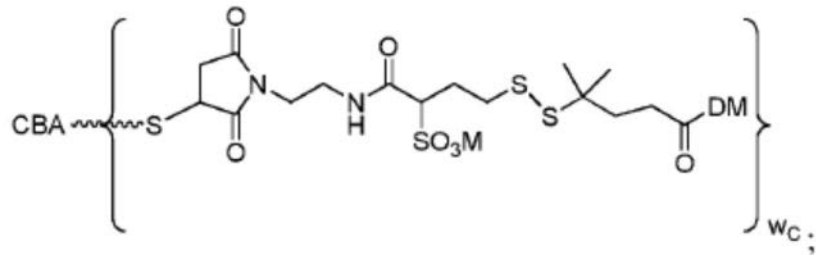
[0369]



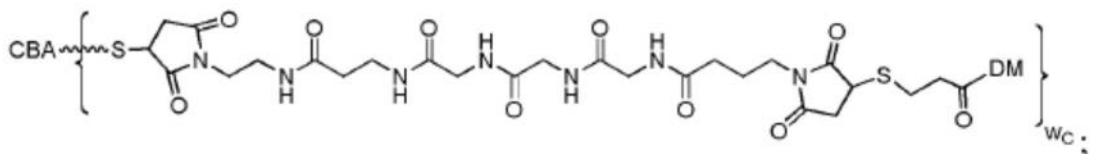
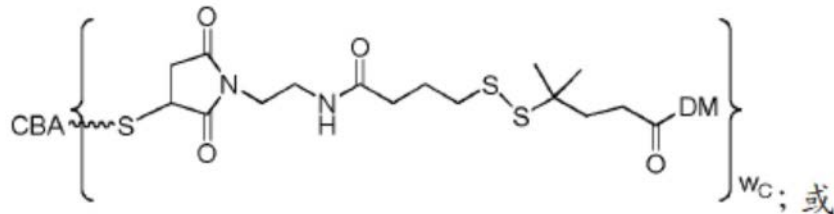
[0370] 其中M是H⁺或阳离子。

[0371] 在某些实施方案中，m'是1，且R₁和R₂两者均是H。在某些实施方案中，m'使2，且R₁和R₂两者均是Me。

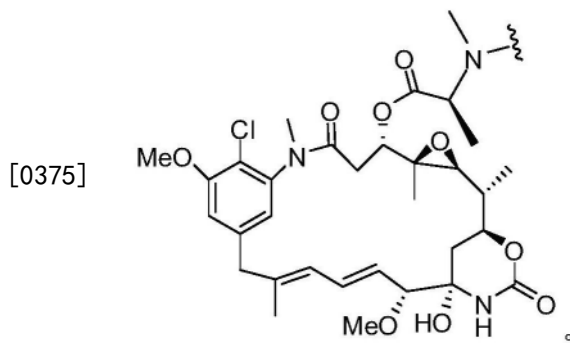
[0372] 在某些实施方案中，所述免疫缀合物由以下各式表示：



[0373]



[0374] 或其药学上可接受的盐，其中DM是由下式表示的药物部分：



[0376] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多肽,或本发明的免疫缀合物,和药学上可接受的载体。

[0377] 本发明的另一方面提供一种用于抑制表达CD123的细胞生长的方法,所述方法包括使所述细胞与本发明的抗体或其抗原结合片段、或本发明的多肽、或本发明的免疫缀合物、或本发明的药物组合物接触。

[0378] 在某些实施方案中,所述细胞是肿瘤细胞。在某些实施方案中,所述细胞是白血病细胞或淋巴瘤细胞。

[0379] 本发明的另一方面提供一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述癌症的细胞表达CD123,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、或本发明的多肽、或本发明的免疫缀合物、或本发明的药物组合物。

[0380] 在某些实施方案中,所述癌症或细胞增殖病症是白血病或淋巴瘤。在某些实施方案中,所述癌症或细胞增殖性病症选自由以下各项组成的组:急性骨髓性白血病(AML);慢性骨髓性白血病(CML);急性成淋巴细胞性白血病(ALL),包括B细胞谱系急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);毛细胞白血病(HCL);骨髓发育不良综合征;母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病;非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞淋巴瘤;和霍奇金氏白血病(HL)。在某些实施方案中,所述癌症是急性骨髓性白血病(AML)。在某些实施方案中,所述癌症是B细胞急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL)。

[0381] 本发明的另一方面提供一种用于治疗受试者的细胞增殖性病症的方法,其中所述细胞增殖性病症的细胞表达CD123,所述方法包括以足以治疗所述细胞增殖性病症的量向所述受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、或本发明的多肽、或本发明的免疫缀合物、或本发明的药物组合物。

[0382] 预期除非明确否认或不适用,否则本文所描述的任一实施方案,包括仅在本发明中的一个方面中描述(而在其他方面中未描述或未重复)的那些实施方案以及仅在实施例中描述的那些实施方案,均可与本发明的任何一个或多个其他实施方案组合。

[0383] 本发明还涉及以下项目:

[0384] 1.一种抗体或其抗原结合片段,其:

[0385] (a) 结合人CD123/IL3-R α 抗原的氨基酸101至346内的表位,以及

[0386] (b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖。

[0387] 2.如项目1所述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结合人CD123抗原的氨基酸101至204内的表位。

[0388] 3.如项目1所述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结合

人CD123抗原的氨基酸205至346内的表位。

[0389] 4. 一种抗体或其抗原结合片段, 其:

[0390] (a) 结合人CD123抗原的氨基酸1至100内的表位, 以及

[0391] (b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖, 其中 IC_{50} 值为0.1nM或更小(例如, 0.08nM、0.05nM、0.03nM)。

[0392] 5. 如项目1-4中任一项所述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抑制白血病干细胞或白血病母细胞的增殖而不抑制造血干细胞的增殖。

[0393] 6. 如项目1-5中任一项所述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在0.3nM或更低的解离常数(K_d)下结合至人CD123抗原阳性细胞。

[0394] 7. 如项目6所述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在介于0.01nM与0.3nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。

[0395] 8. 如项目7所述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在介于0.01nM与0.2nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。

[0396] 9. 如项目8所述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在介于0.01nM与0.1nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。

[0397] 10. 如项目1-9中任一项所述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结合至食蟹猴CD123。

[0398] 11. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.3nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。

[0399] 12. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.2nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。

[0400] 13. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。

[0401] 14. 如项目1-13中任一项所述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在实质上类似的结合亲和力下结合人和食蟹猴CD123两者。

[0402] 15. 如项目14所述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在介于0.05与0.3nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。

[0403] 16. 如项目14所述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在介于0.05与0.2nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。

[0404] 17. 如项目14所述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在介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。

[0405] 18. 如项目6-17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中 K_d 通过流式细胞术、表面等离子体共振或放射免疫测定进行测量。

[0406] 19. 如项目1-18中任一项所述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在0.5nM或更低的浓度下抑制抗原阳性TF-1细胞中至少50%的IL3依赖性增殖。

[0407] 20. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

[0408] a) 至少一个重链可变区或其片段, 其包含三个顺序互补决定区(CDR), 分别为CDR1、CDR2和CDR3, 其中, 除了1、2或3个保守氨基酸取代以外, CDR1选自由以下各项组成的组: SEQ ID NO:1、5和12; CDR2选自由以下各项组成的组: SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14; 并

且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11和15;以及

[0409] b) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20和23;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;并且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。

[0410] 21. 如项目20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述保守氨基酸取代包括通过Arg取代CDR中的至少一个Lys。

[0411] 22. 如项目20或21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是包含小鼠CDR区的CDR移植人源化抗体,并且其中所述抗体的一个或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)个重链和/或轻链框架区维尔区残基具有小鼠起源。

[0412] 23. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0413] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;以及

[0414] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0415] 24. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0416] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;以及

[0417] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。

[0418] 25. 如项目24所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:34的N末端起的第二个残基Xaa是Phe。

[0419] 26. 如项目24所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:34的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Val。

[0420] 27. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0421] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser;以及

[0422] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0423] 28. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0424] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;以及

[0425] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。

[0426] 29. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0427] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser,且除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;以及

[0428] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[0429] 30. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0430] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的所述第5个至所述最后一个残基的所述残基是Cys;以及

[0431] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。

- [0432] 31. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0433] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:38中所阐述的氨基酸序列;以及
- [0434] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [0435] 32. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0436] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;以及
- [0437] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。
- [0438] 33. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0439] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列;以及
- [0440] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [0441] 34. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0442] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;以及
- [0443] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。
- [0444] 35. 如项目31-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:38、34、56和54的N末端起第二个残基Xaa是Phe。
- [0445] 36. 如项目31-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:38、34、56和54的N末端起第二个残基Xaa是Val。
- [0446] 37. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0447] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;以及
- [0448] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。
- [0449] 38. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0450] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;以及
- [0451] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [0452] 39. 如项目38、33或34所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:54或56的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Phe。
- [0453] 40. 如项目38、33或34所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:54或56的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Val。
- [0454] 41. 如项目1-3和5-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0455] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:1中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:2或3中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:4中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及
- [0456] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列的CDR3。
- [0457] 42. 如项目1-3和5-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [0458] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:6、7、8、9或10中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及
- [0459] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:19或20中所阐述的氨基酸序列

的CDR1、具有SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0460] 43. 如项目4-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0461] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:13或14中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及

[0462] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:23中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:24中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:25中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0463] 44. 如项目1-43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0464] a) V_H 序列,其与选自以下各项组成的组的参考 V_H 序列至少95%相同:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或

[0465] b) V_L 序列,其与选自以下各项组成的组的参考 V_L 序列至少95%相同:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。

[0466] 45. 如项目44所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述 V_H 序列与SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38)中的一个至少99%相同,和/或其中所述 V_L 序列与SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)中的一个至少99%相同。

[0467] 46. 如项目45所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0468] a) V_H 序列,其选自以下各项组成的组:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或

[0469] b) V_L 序列,其选自以下各项组成的组:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。

[0470] 47. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:26的 V_H 序列和SEQ ID NO:27的 V_L 序列。

[0471] 48. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:28的 V_H 序列和SEQ ID NO:29的 V_L 序列。

[0472] 49. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:30的 V_H 序列和SEQ ID NO:31的 V_L 序列。

[0473] 50. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:34的 V_H 序列和SEQ ID NO:35的 V_L 序列。

[0474] 51. 如项目1-49中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是鼠类抗体、非人哺乳动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0475] 52. 如项目51所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体是CDR移植抗体或表面重构的抗体。

[0476] 53. 如项目1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是全长抗体。

[0477] 54. 如项目1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段是Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、 F_d 、单链Fv或scFv、二硫键连接的 F_v 、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH₂、微型抗体、 $F(ab')_3$ 、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、

Fcab、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。

[0478] 55. 一种多肽,其包含如项目1-54中任一项所述的V_H序列和V_L序列。

[0479] 56. 如项目55所述的多肽,其是与并非假单胞菌毒素的蛋白质的融合体。

[0480] 57. 一种细胞,其产生如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽。

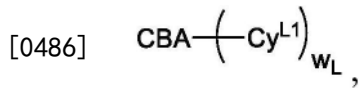
[0481] 58. 一种产生如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的多肽的方法,所述方法包括:

[0482] (a) 培养如项目57所述的细胞;以及,

[0483] (b) 自所述培养的细胞分离所述抗体、其抗原结合片段或多肽。

[0484] 59. 如项目58所述的方法,其中所述细胞是真核细胞。

[0485] 60. 一种免疫缀合物,其具有下式:

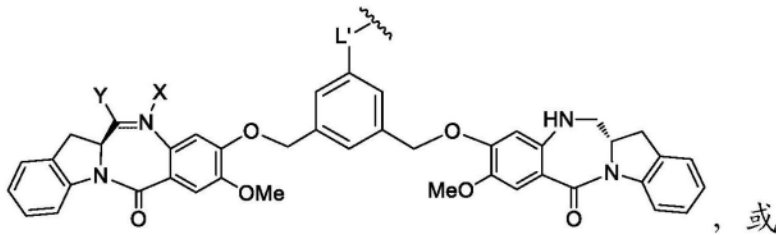


[0487] 其中:

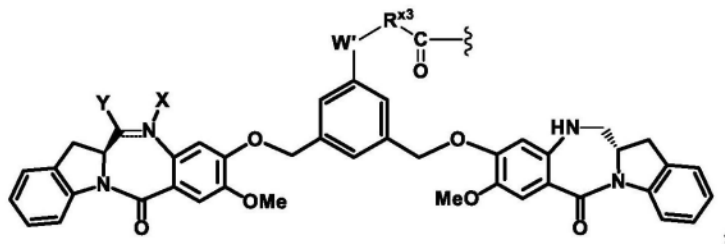
[0488] CBA是如项目23-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至Cy^{L1};

[0489] W_L是1至20的整数;并且

[0490] Cy^{L1}由以下各式表示:



[0491]



[0492] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0493] 介于N与C之间的双线=表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

[0494] W'是-NR^{e'};

[0495] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0496] n是2至6的整数;

[0497] R^k是-H或-Me;

[0498] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

[0499] L'由以下各式表示:

[0500] $-\text{NR}_5-\text{P}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-\text{C}(=\text{O})-(\text{B1}')$; 或

[0501] $-\text{NR}_5-\text{P}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-\text{S}-\text{Z}^{\text{S1}}-(\text{B3}')$;

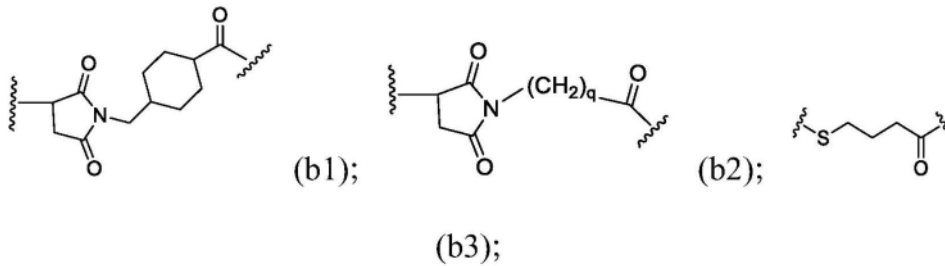
[0502] R_5 是 $-\text{H}$ 或 (C_1-C_3) 烷基;

[0503] P 是氨基酸残基或含有介于 2 至 20 个之间的氨基酸残基的肽;

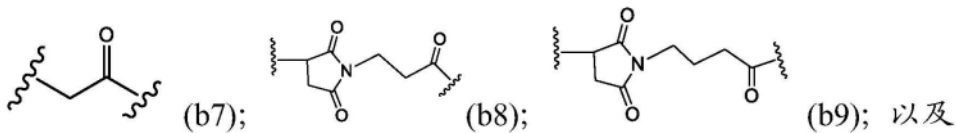
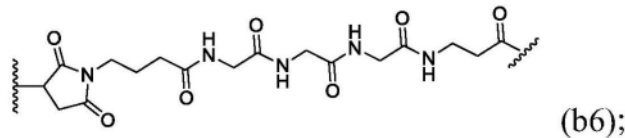
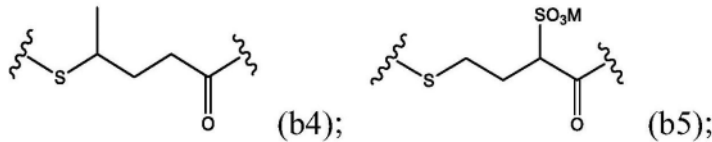
[0504] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地是 $-\text{H}$ 、 (C_1-C_3) 烷基或带电荷的取代基或可离子化基团 Q ;

[0505] m 是 1 至 6 的整数; 并且

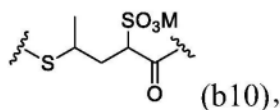
[0506] Z^{S1} 选自以下各式中的任一者:



[0507]



[0508]



[0509] 其中:

[0510] q 是 1 至 5 的整数; 并且

[0511] M 是 H^+ 或阳离子。

[0512] 61. 如项目 60 所述的免疫缀合物, 其中 R_a 和 R_b 两者均是 H ; 并且 R_5 是 H 或 Me 。

[0513] 62. 如项目 60 或 61 所述的免疫缀合物, 其中 P 是含有 2 至 5 个氨基酸残基的肽。

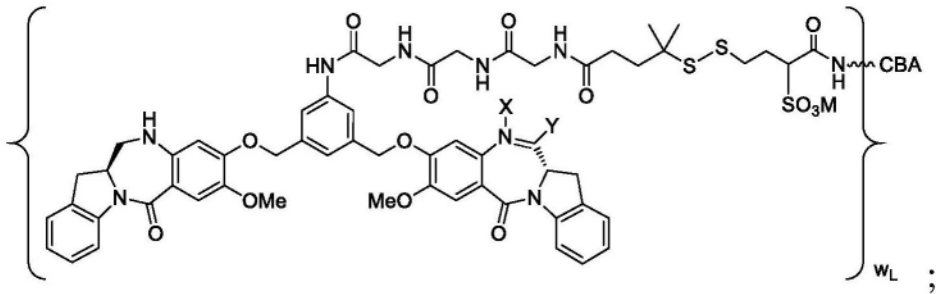
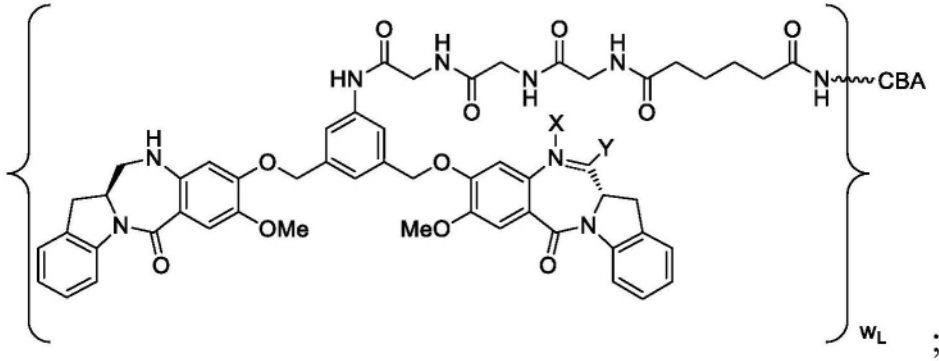
[0514] 63. 如项目 60-62 中任一项所述的免疫缀合物, 其中 P 选自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、

D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

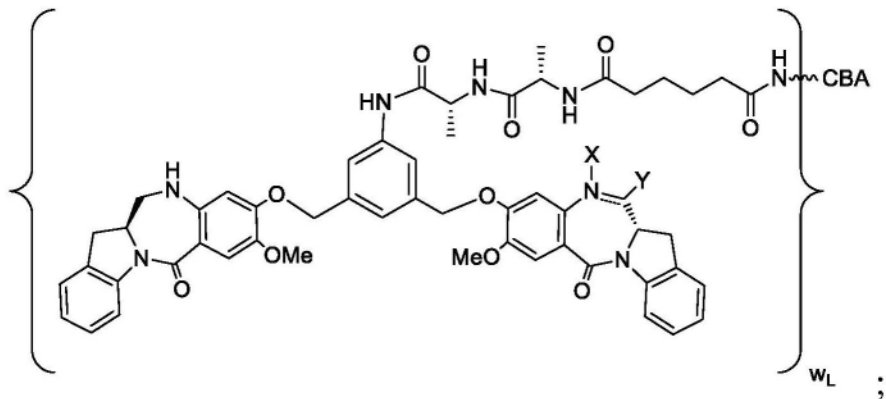
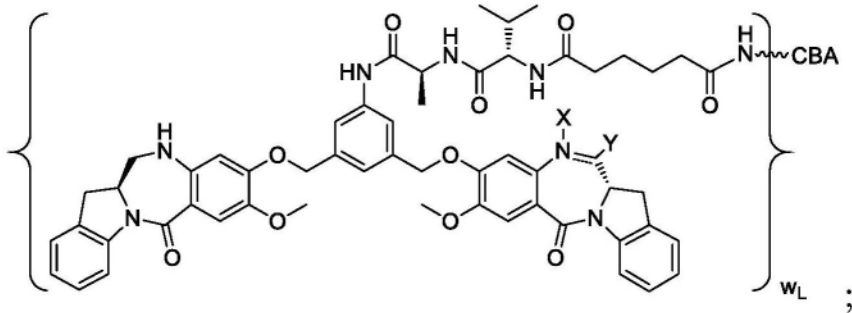
[0515] 64. 如项目63所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

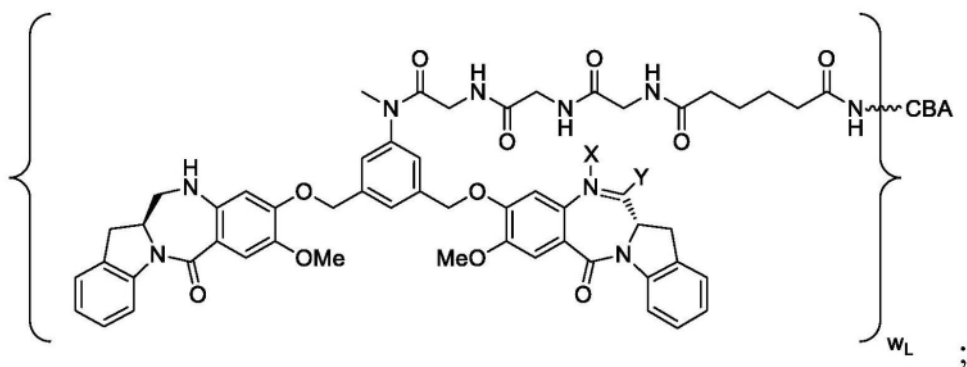
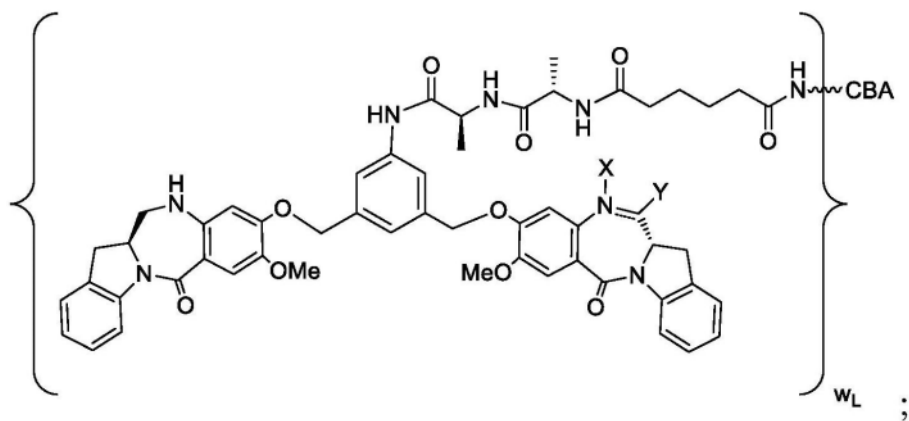
[0516] 65. 如项目60-64中任一项所述的免疫缀合物,其中Q是 $-SO_3M$ 。

[0517] 66. 如项目60所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

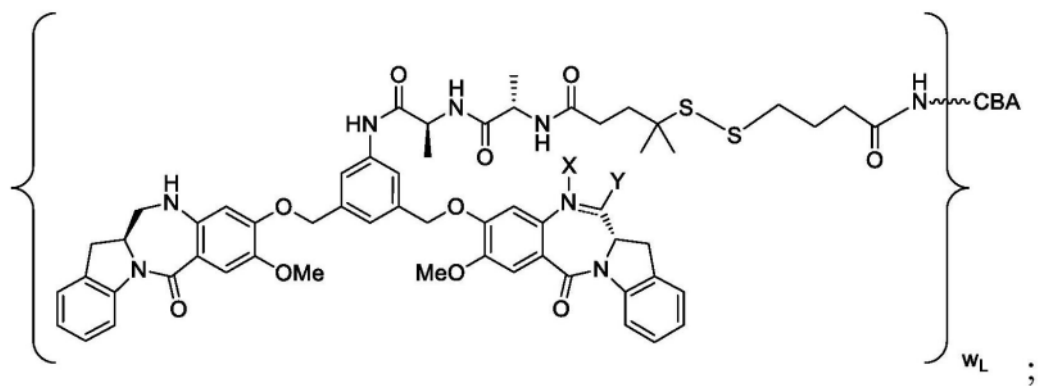
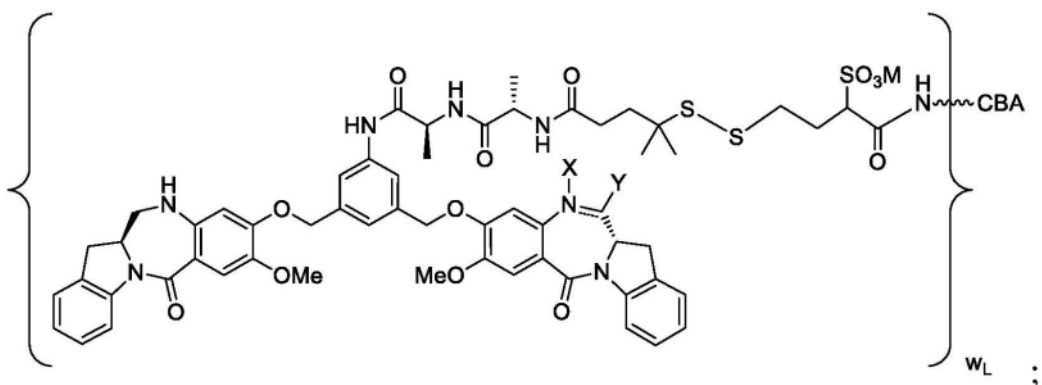


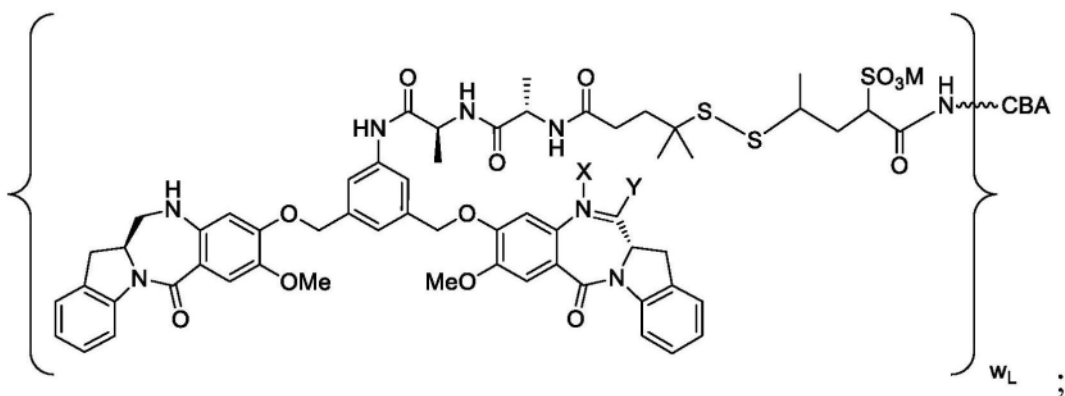
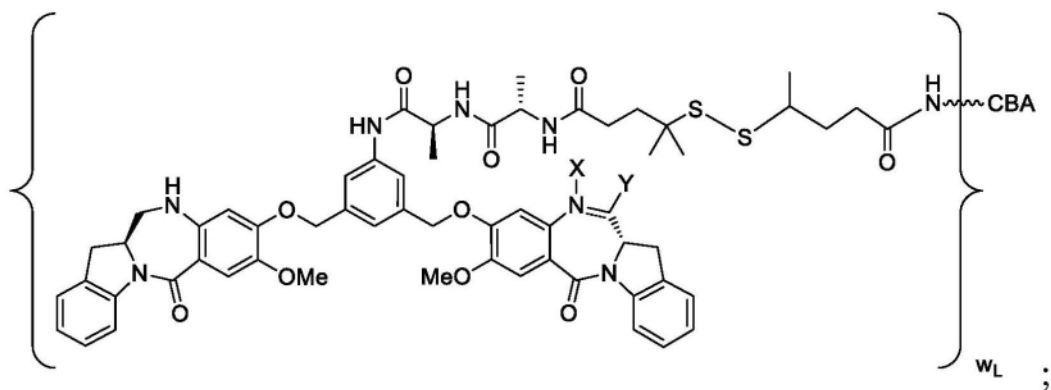
[0518]



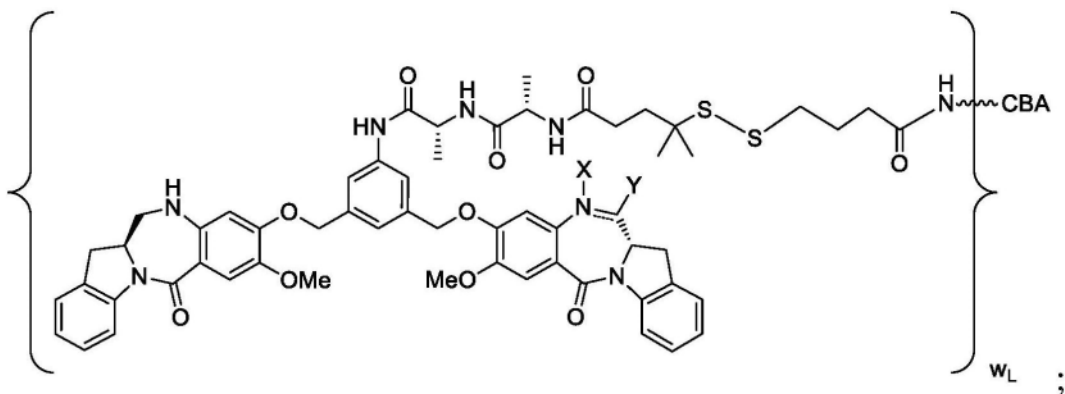
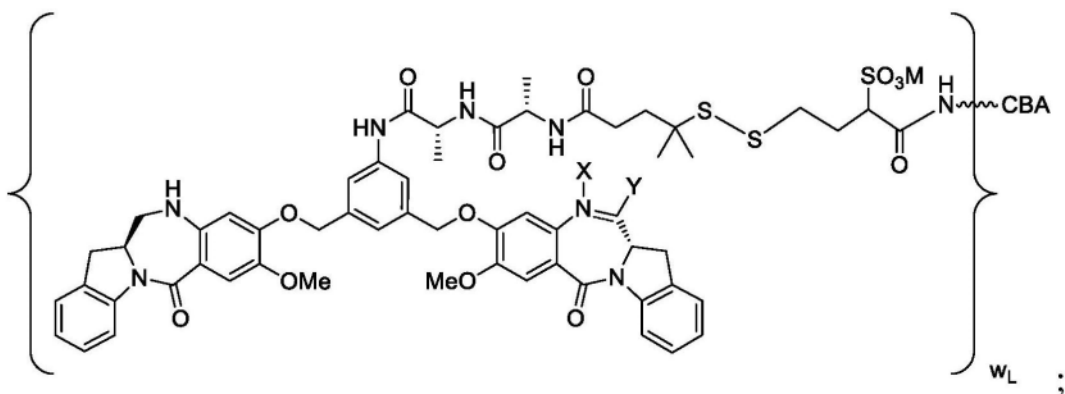


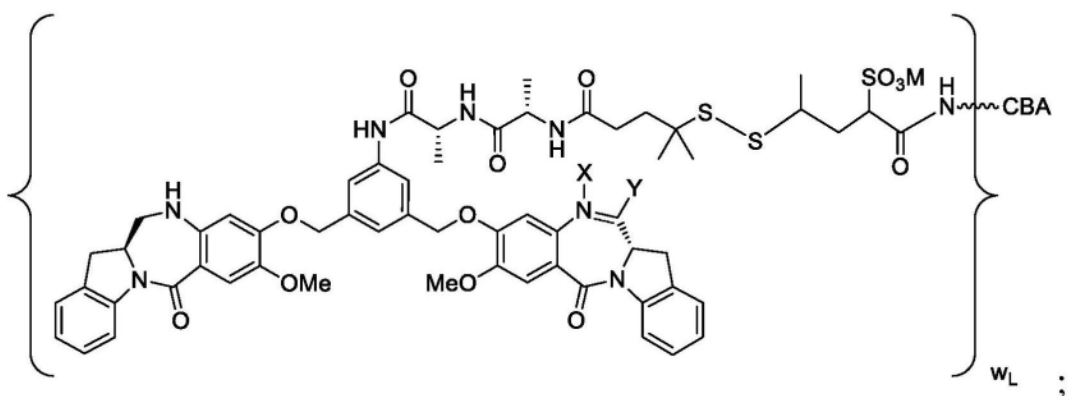
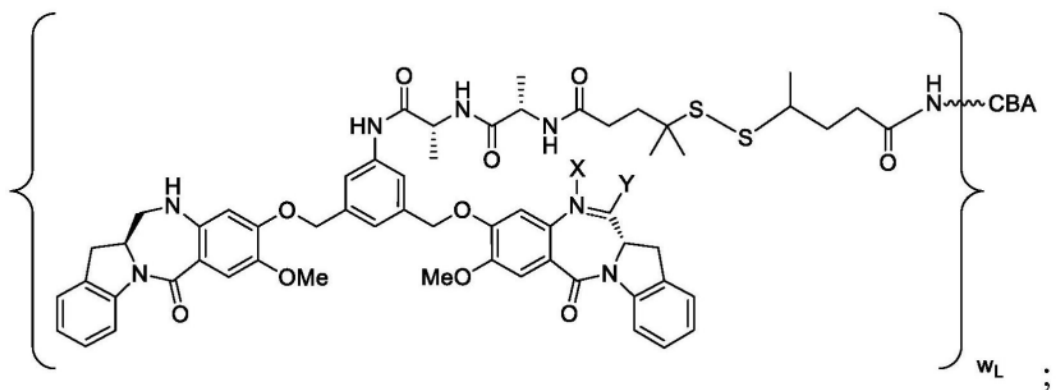
[0519]



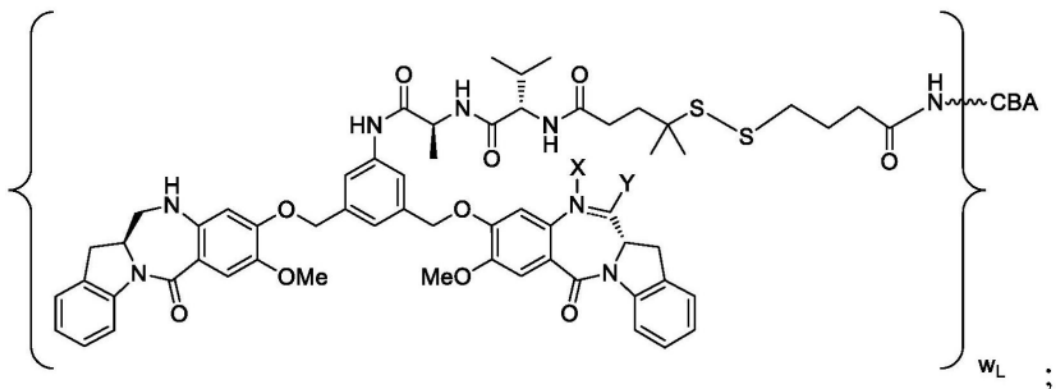
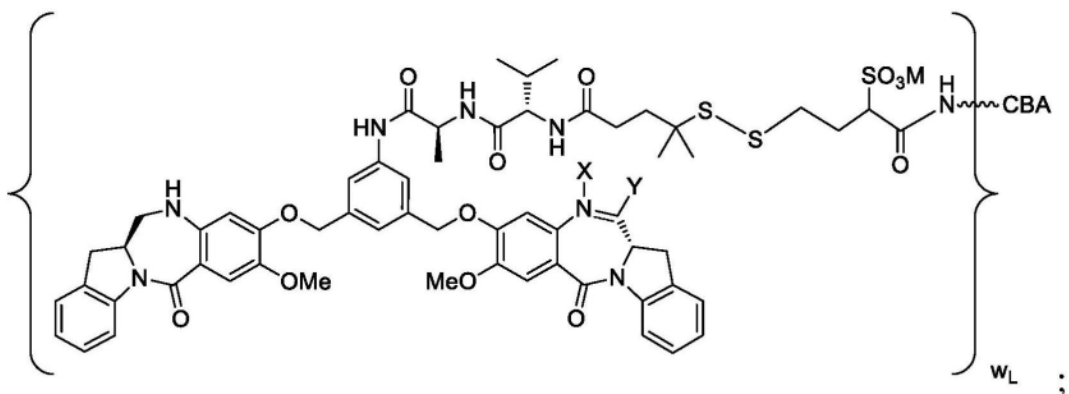


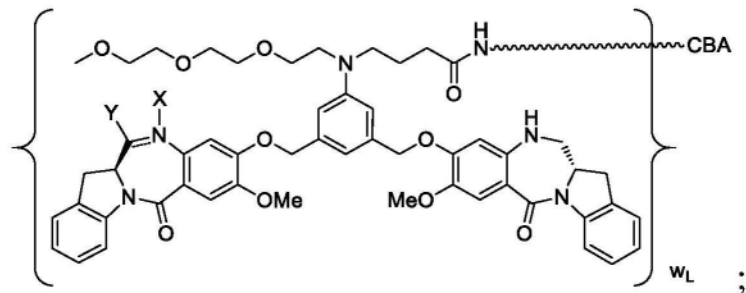
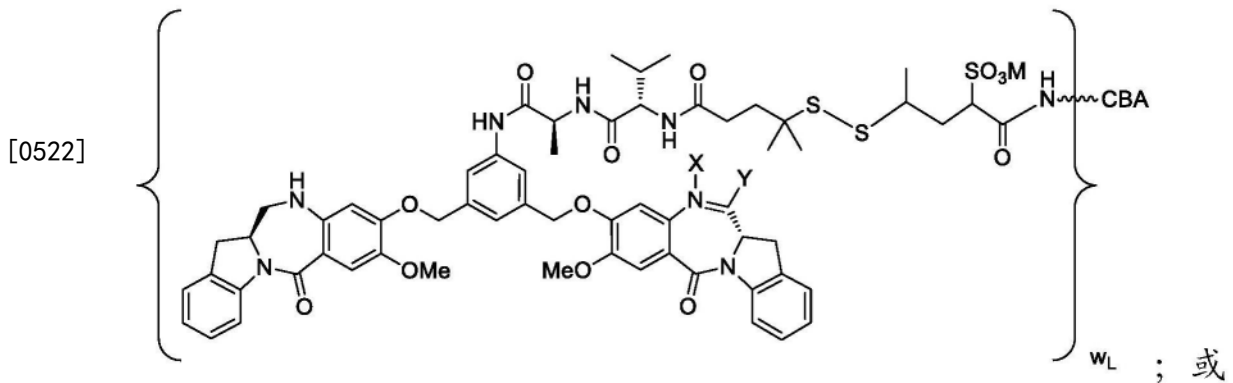
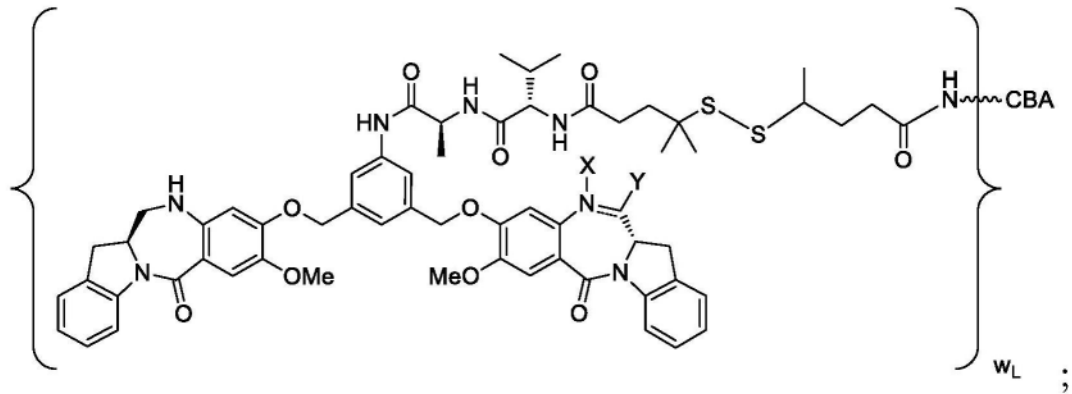
[0520]





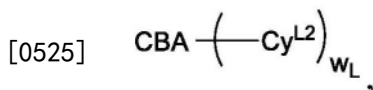
[0521]





[0523] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数;所述介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0524] 67. 一种免疫缀合物,其具有下式:

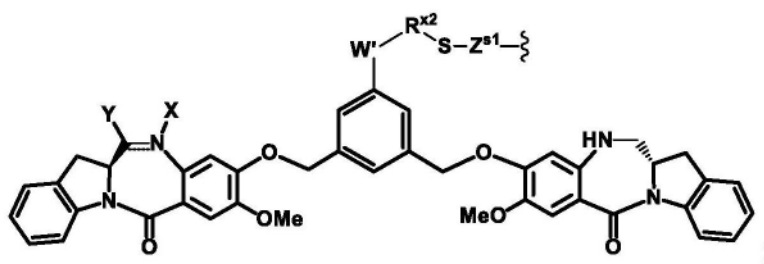
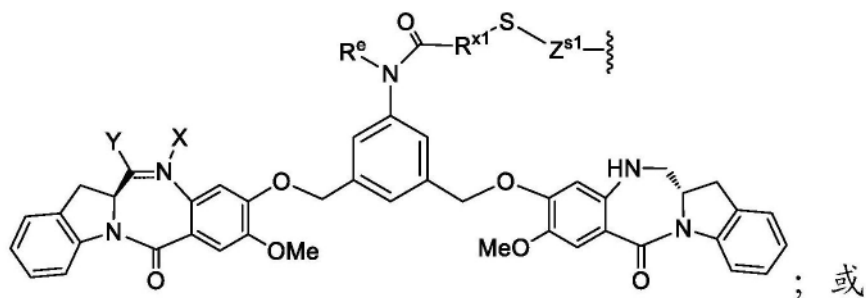


[0526] 其中:

[0527] CBA是如项目23-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至 Cy^{L2} ;

[0528] w_L 是1至20的整数;并且

[0529] Cy^{L2} 由以下各式表示:



[0531] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0532] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

[0533] R^{x1}和R^{x2}独立地是(C₁-C₆)烷基;

[0534] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

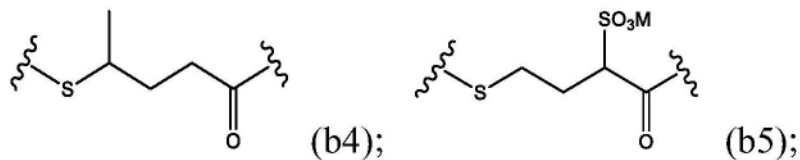
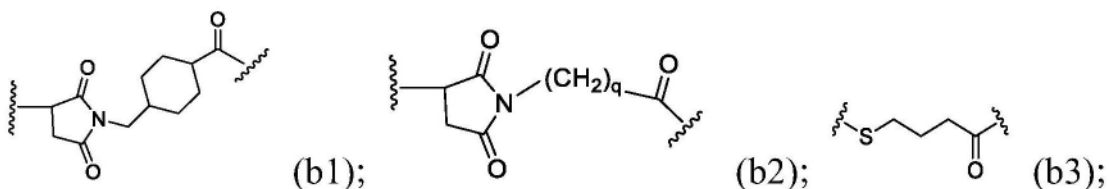
[0535] W'是-NR^{e'};

[0536] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

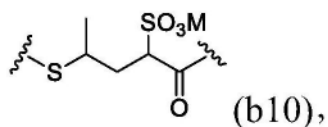
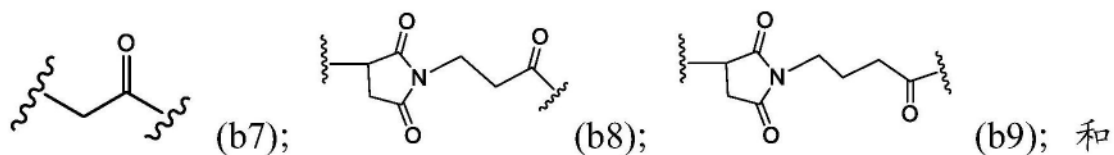
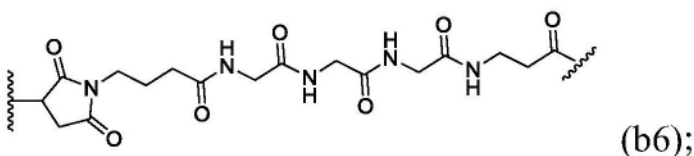
[0537] n是2至6的整数;

[0538] R^k是-H或-Me;

[0539] Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



[0540]

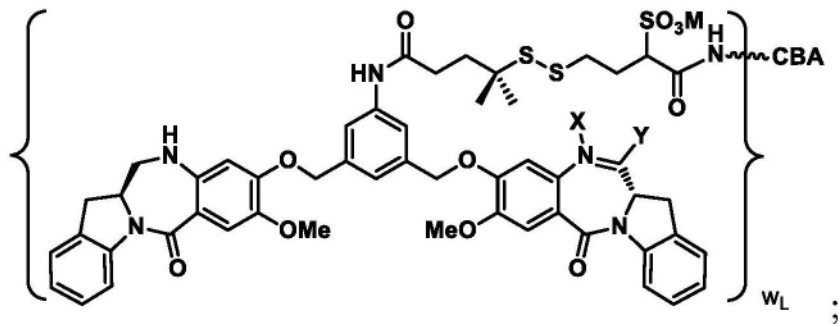
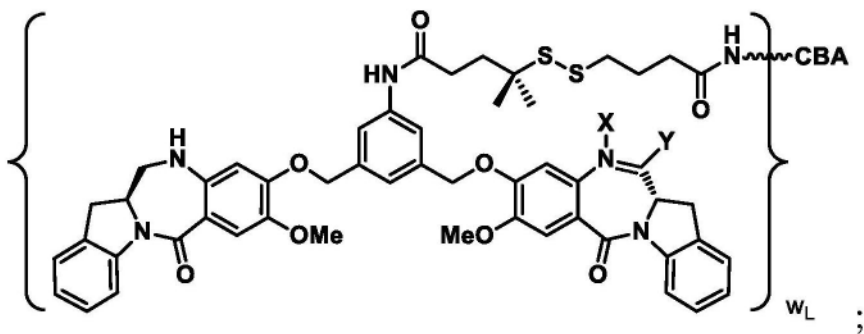


[0541] 其中:

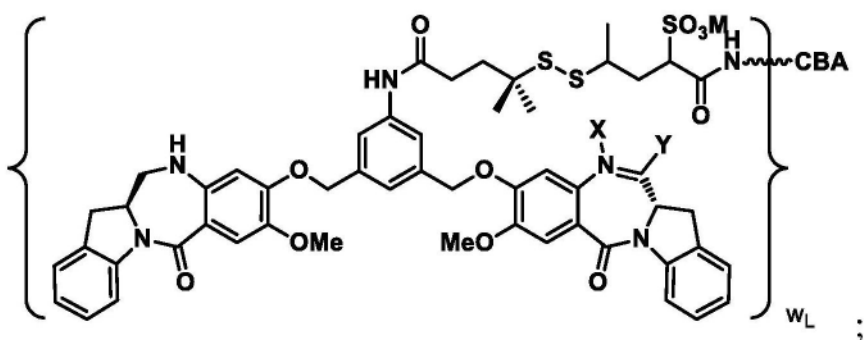
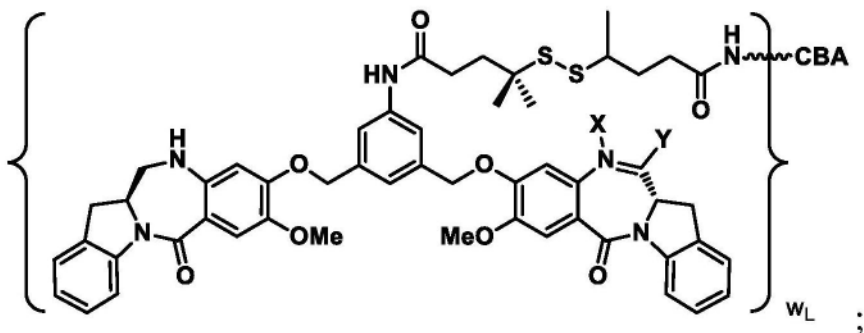
[0542] q是1至5的整数;并且

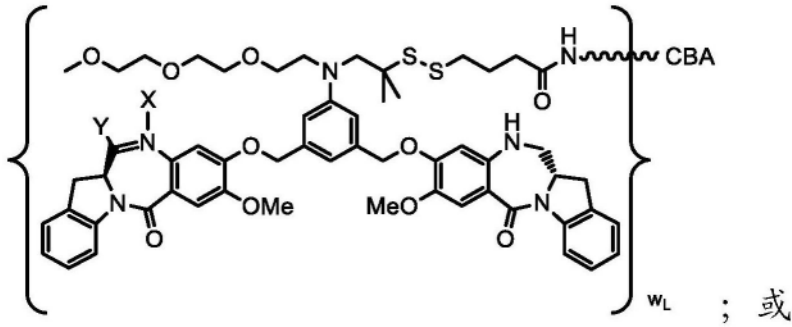
[0543] M是-H⁺或阳离子。[0544] 68. 如项目67所述的免疫缀合物,其中R^e是H或Me;R^{x1}和R^{x2}独立地是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;并且p是0、1、2或3。[0545] 69. 如项目68所述的免疫缀合物,其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[0546] 70. 如项目67所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

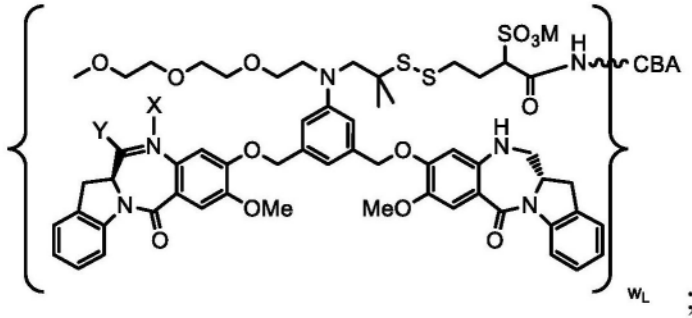


[0547]





[0548]



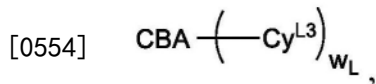
[0549] 或其药学上可接受的盐,其中 W_L 是1至10的整数;所述介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或 $-SO_3M$ 。

[0550] 71.如项目60-70中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线 $=$ 表示双键,X不存在且Y是-H。

[0551] 72.如项目60-70中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键,X是-H且Y是 $-SO_3M$ 。

[0552] 73.如项目72所述的免疫缀合物,其中M是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ 。

[0553] 74.一种免疫缀合物,其具有下式:

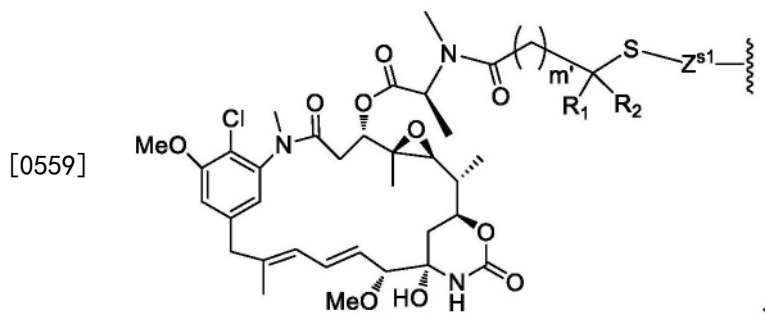


[0555] 其中:

[0556] CBA是如项目23-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,其通过Lys残基共价连接至 Cy^{L3} ;

[0557] W_L 是1至20的整数;

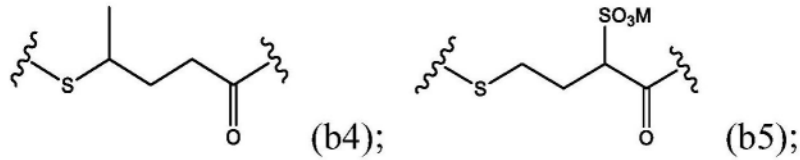
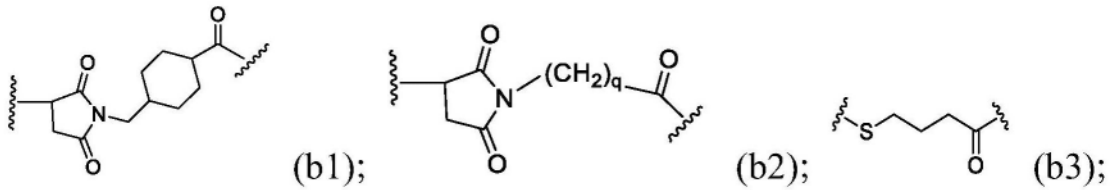
[0558] Cy^{L3} 由下式表示:



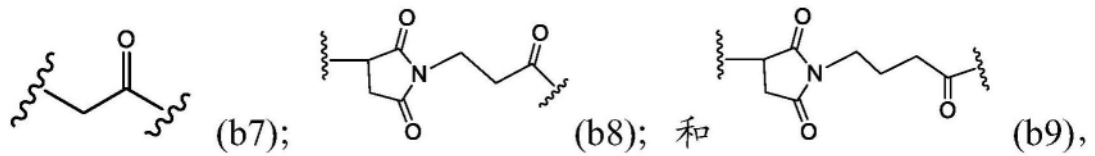
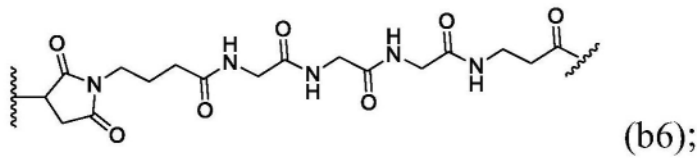
[0560] m' 是1或2;

[0561] R_1 和 R_2 各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0562] Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



[0563]



[0564] 其中:

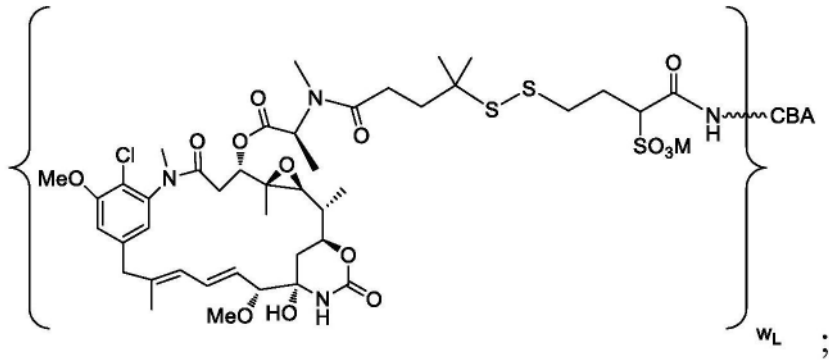
[0565] q 是1至5的整数;并且

[0566] M 是 H^+ 或阳离子。

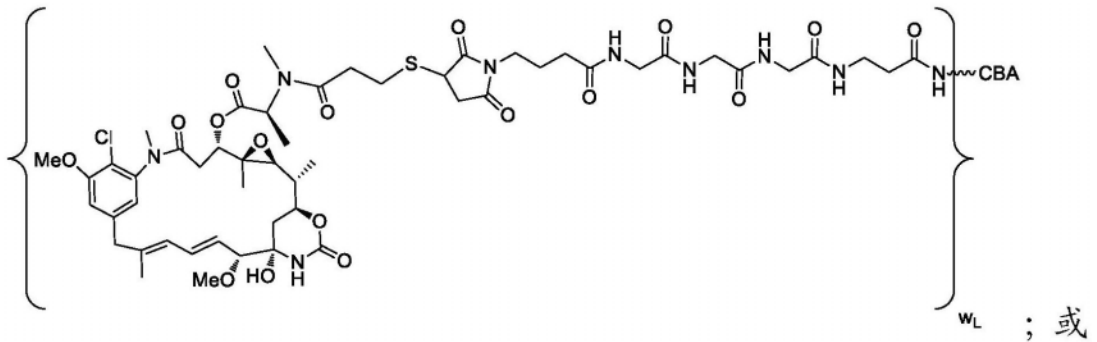
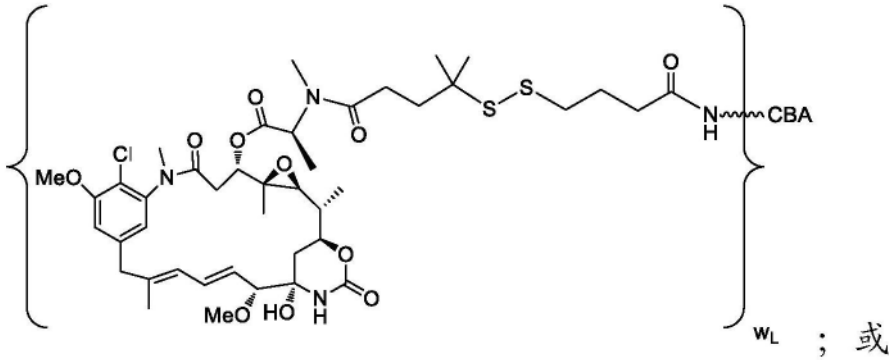
[0567] 75. 如项目74所述的免疫缀合物,其中 m' 是1,并且 R_1 和 R_2 两者均是H。

[0568] 76. 如项目74所述的免疫缀合物,其中 m' 是2,并且 R_1 和 R_2 两者均是Me。

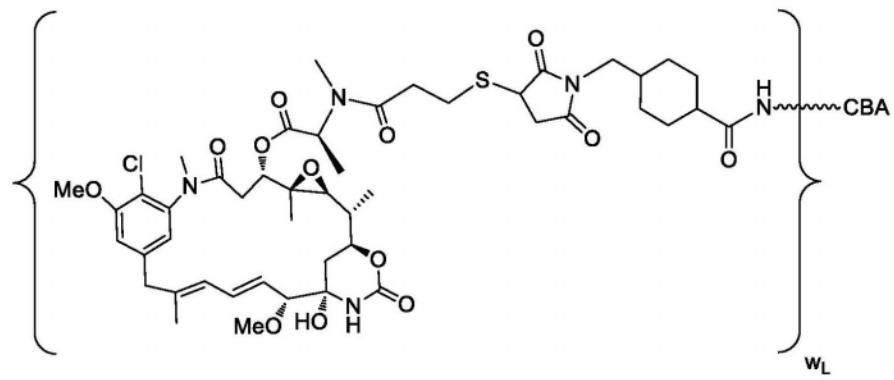
[0569] 77. 如项目74所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:



[0570]



[0571]



[0572] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数。

[0573] 78. 如项目77所述的免疫缀合物,其中M是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ 。

[0574] 79. 一种免疫缀合物,其具有下式:

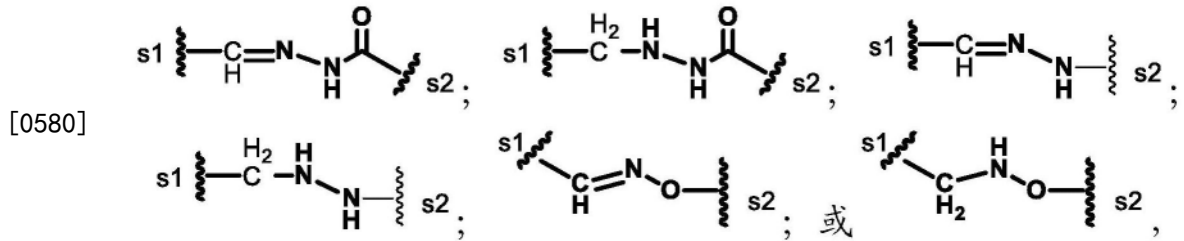


[0576] 其中:

[0577] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其共价连接至 J_{CB} '基团;

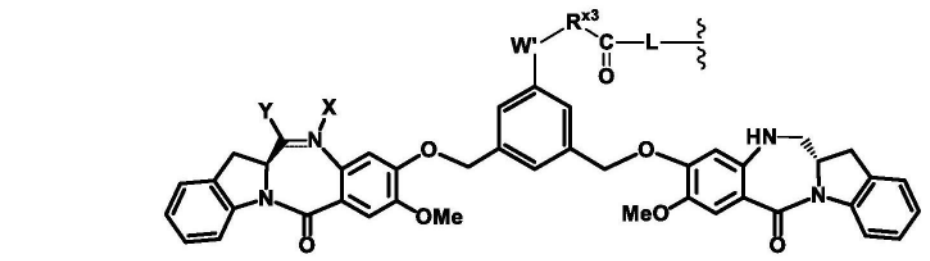
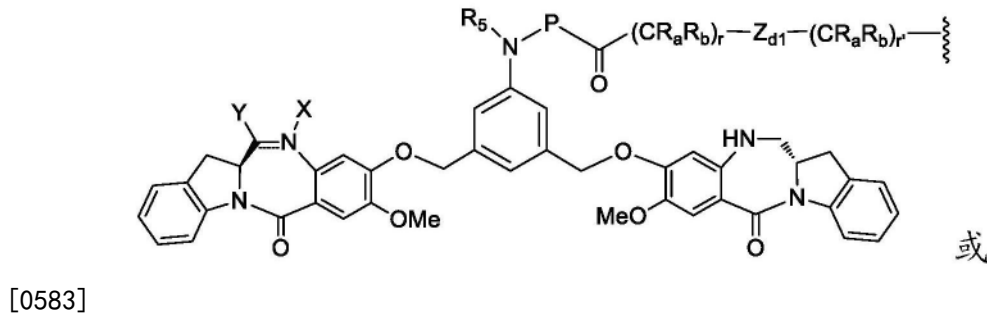
[0578] W_5 是1、2、3或4;

[0579] J_{CB} '是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与 Cy^{s1} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,并且由以下各式表示:



[0581] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与 Cy^{s1} 共价连接的位点;

[0582] Cy^{s1} 由以下各式表示:



[0584] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0585] 介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或 $-SO_3M$,且M是 H^+ 或阳离子;

[0586] R_5 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

[0587] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[0588] Z_{d1} 是不存在、 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;

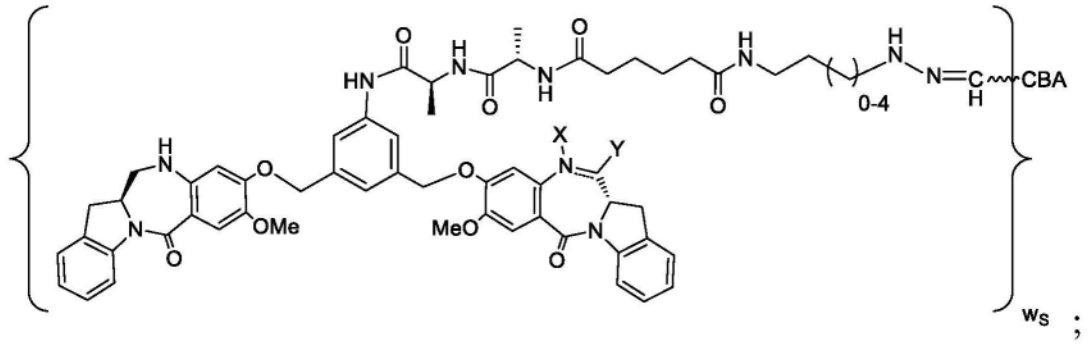
[0589] R_9 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

[0590] R_a 和 R_b 在每次出现时独立地是-H、 (C_1-C_3) 烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

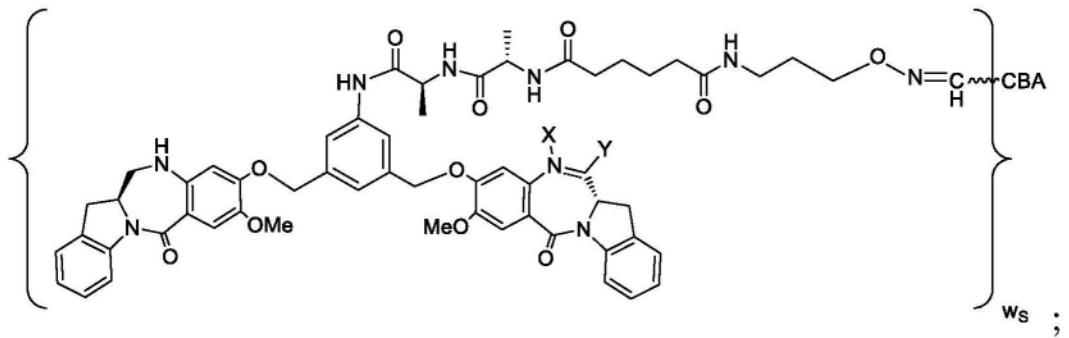
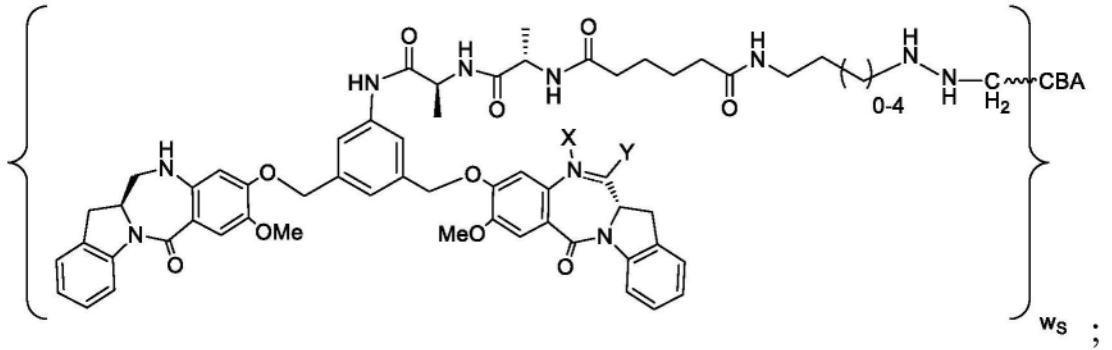
[0591] r和r'独立地是1至6的整数;

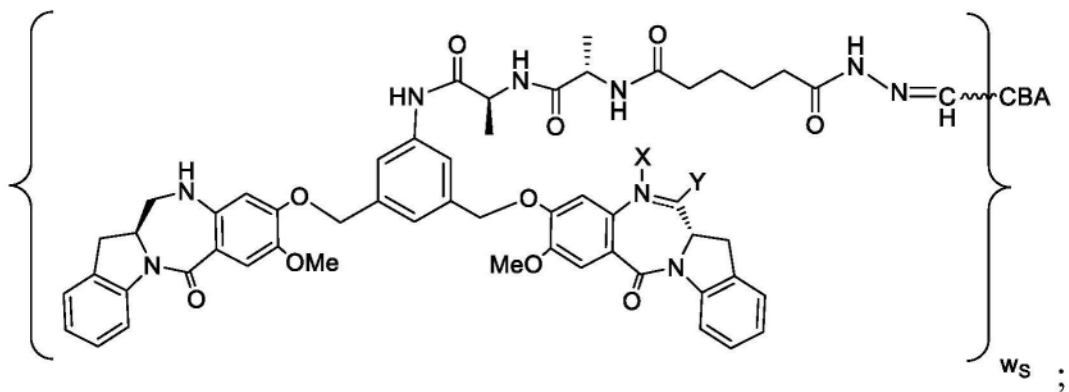
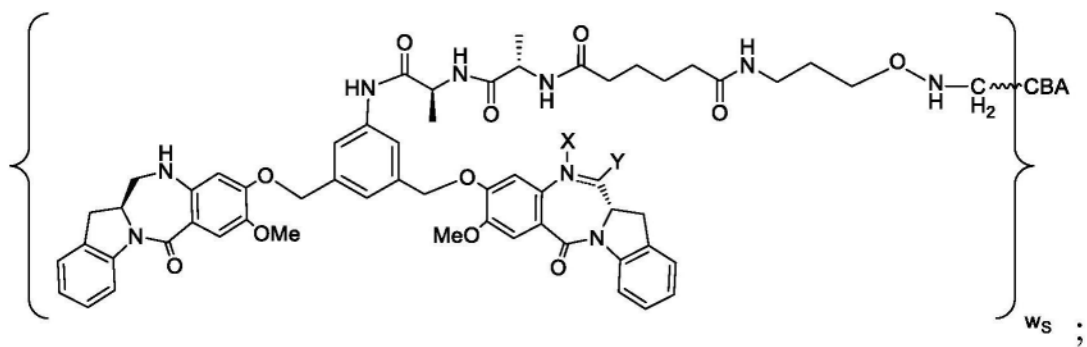
[0592] W'是 $-NR^e$;

- [0593] $R^{e'}$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
- [0594] n 是 2 至 6 的整数;
- [0595] R^k 是 $-H$ 或 $-Me$;
- [0596] R^{x3} 是 (C_1-C_6) 烷基;
- [0597] L 是 $-NR_9-(CR_aR_b)_r$, 或不存在; 并且
- [0598] r 是 0 至 6 的整数。
- [0599] 80. 如项目 79 所述的免疫缀合物, 其中 R_a 和 R_b 两者均是 H , 并且 R_5 和 R_9 两者均是 H 或 Me 。
- [0600] 81. 如项目 79 或 80 所述的免疫缀合物, 其中 P 是含有 2 至 5 个氨基酸残基的肽。
- [0601] 82. 如项目 79-81 中任一项所述的免疫缀合物, 其中 P 选自由以下各项组成的组: Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met 以及 Met-Ala。
- [0602] 83. 如项目 82 所述的免疫缀合物, 其中 P 是 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 或 D-Ala-D-Ala。
- [0603] 84. 如项目 79-83 中任一项所述的免疫缀合物, 其中 Q 是 $-SO_3M$ 。
- [0604] 85. 如项目 80 所述的免疫缀合物, 其由以下各式表示:

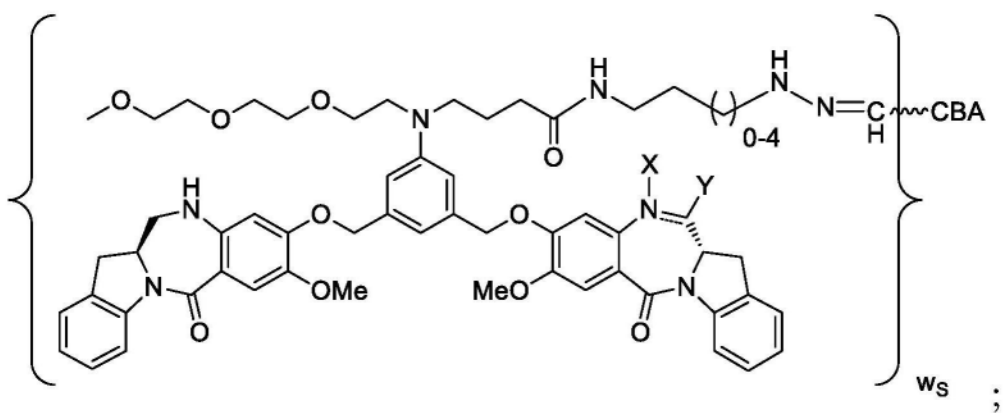
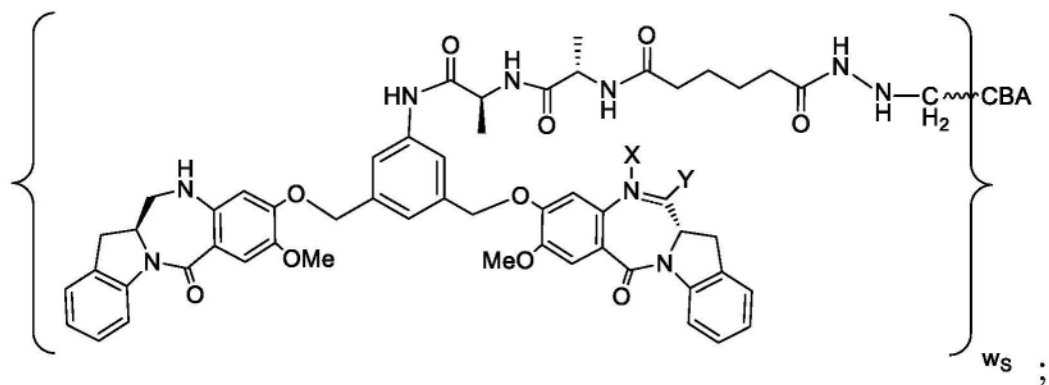


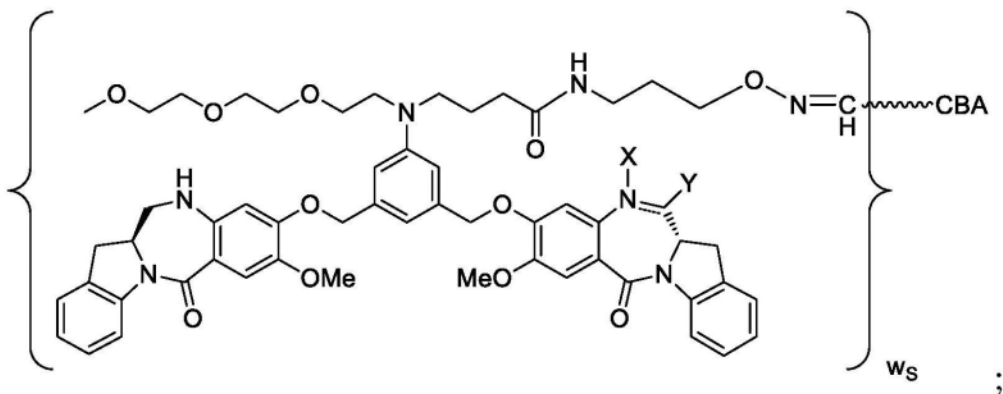
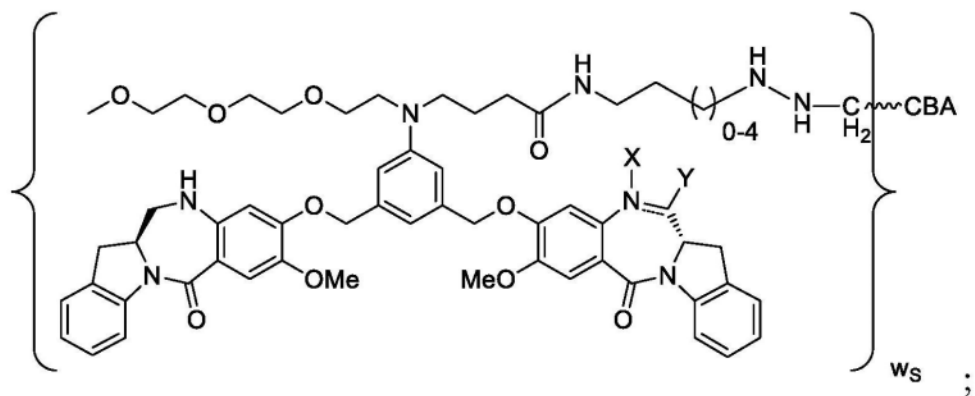
[0605]



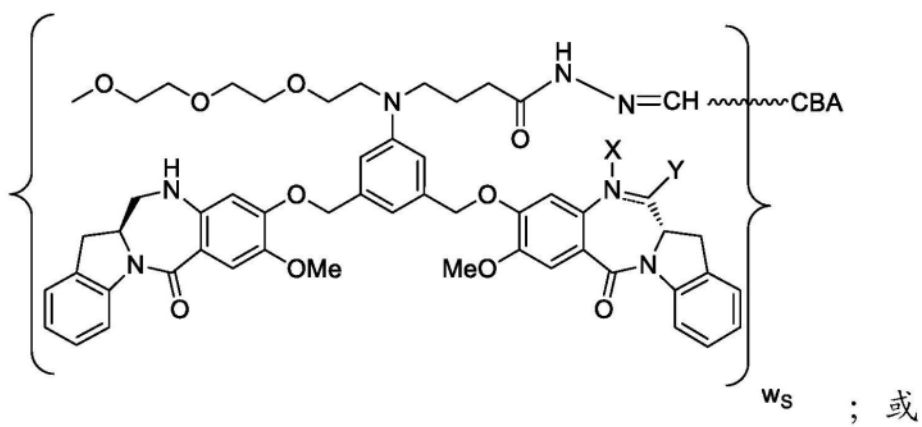
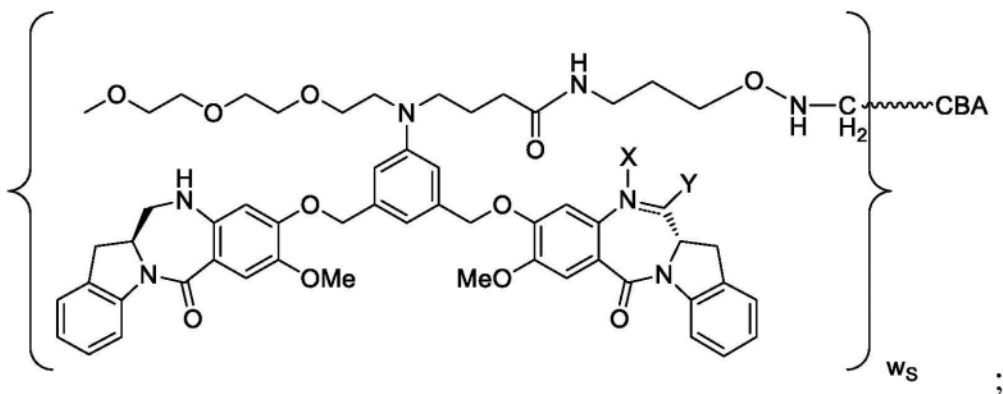


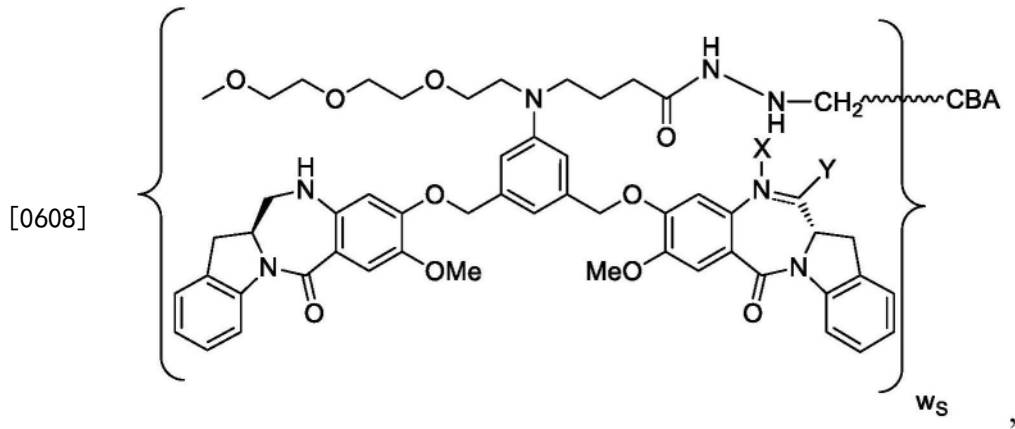
[0606]





[0607]





[0609] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

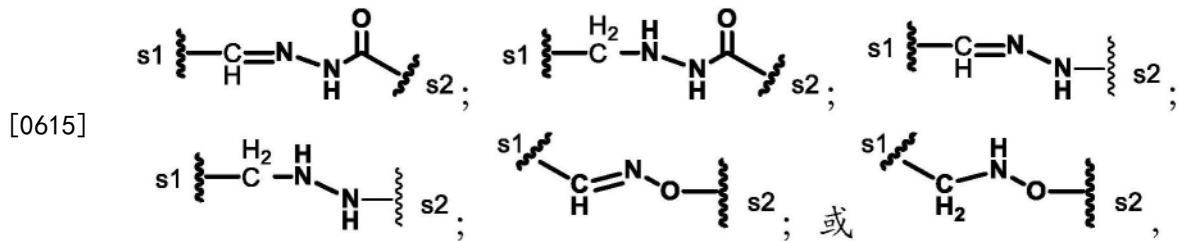
[0610] 86.一种免疫缀合物,其具有下式:



[0612] 其中:

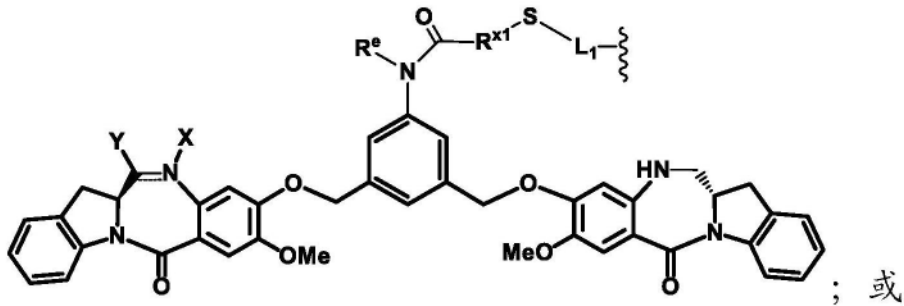
[0613] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56中任一项所述的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

[0614] J_{CB'}是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s2}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

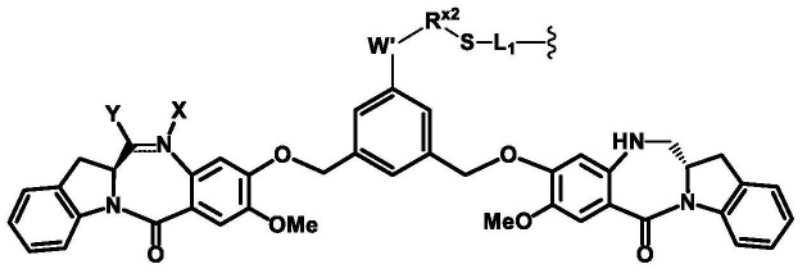


[0616] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s2}共价连接的位点;

[0617] Cy^{s2}由以下各式表示:



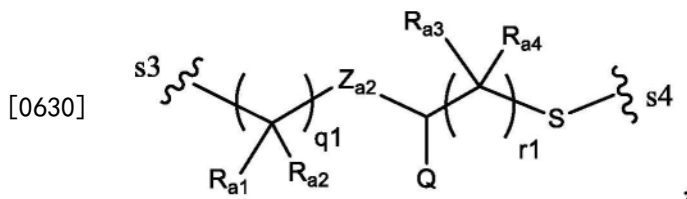
[0618]



[0619] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0620] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;[0621] M是H⁺或阳离子;[0622] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基;[0623] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;[0624] W'是-NR^{e'};[0625] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0626] n是2至6的整数;

[0627] R^k是-H或-Me;[0628] R^{x2}是(C₁-C₆)烷基;[0629] L₁由下式表示:

[0631] 其中:

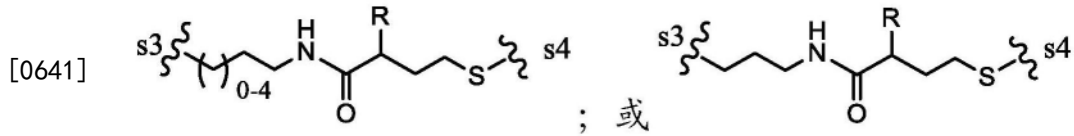
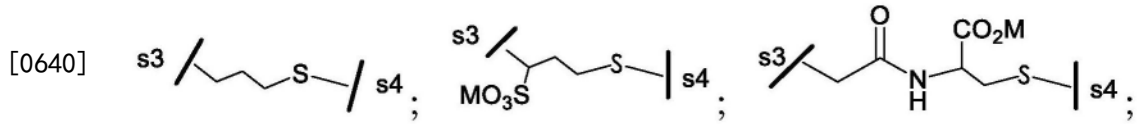
[0632] s3是与所述基团J_{CB}'共价连接的位点;[0633] s4是与Cy^{s2}上的-S-基团共价连接的位点;[0634] Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;[0635] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0636] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0637] R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0638] q1和r1各自独立地是0至10的整数,其限制条件是q1和r1不均是0。

[0639] 87. 如项目86所述的免疫缀合物,其中-L₁-由以下各式表示:

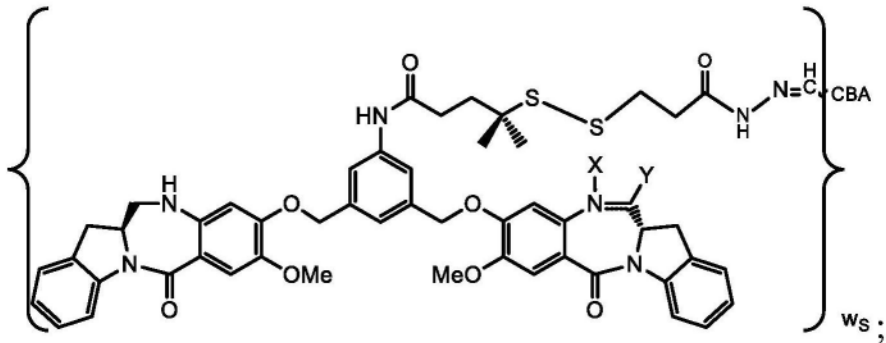


[0642] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M。

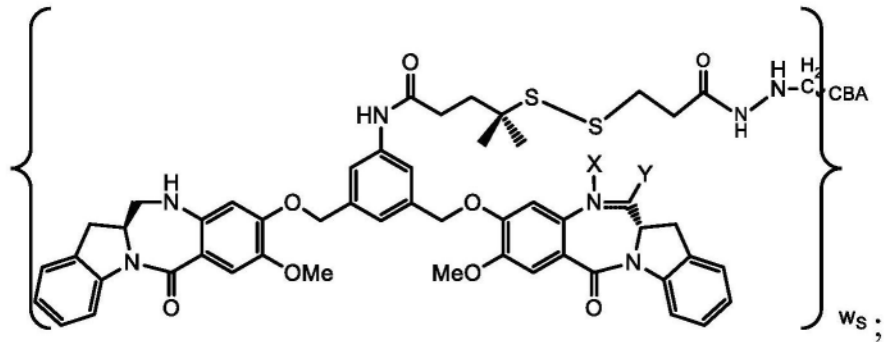
[0643] 88. 如项目86或87所述的免疫缀合物,其中R^e是H或Me;并且R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;并且p是0、1、2或3。

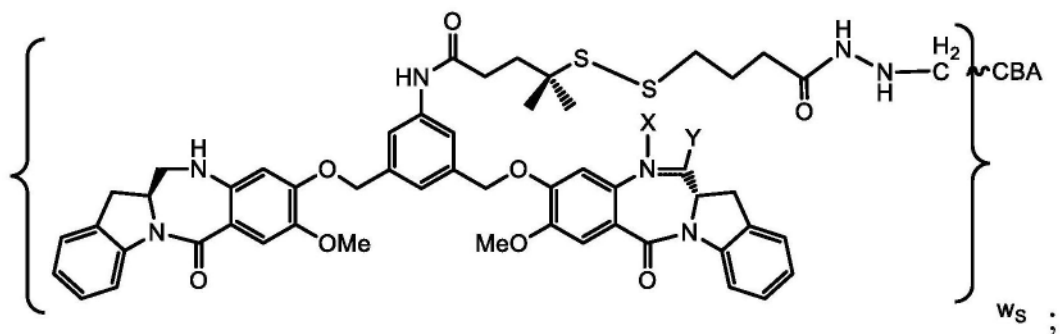
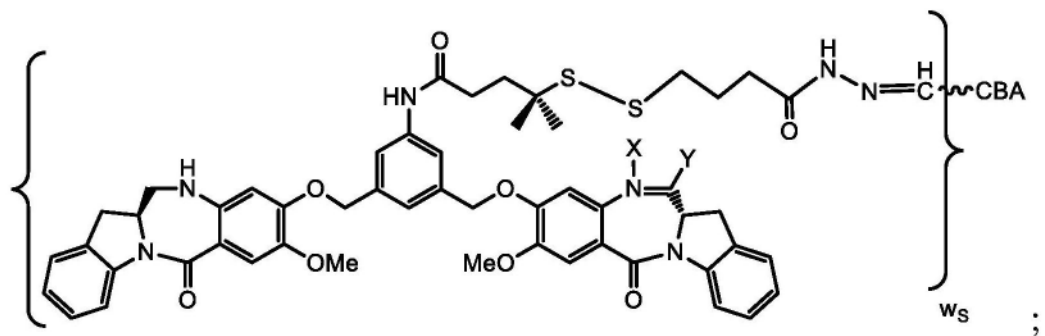
[0644] 89. 如项目88所述的免疫缀合物,其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[0645] 90. 如项目86所述的免疫缀合物,其由以下各式表示:

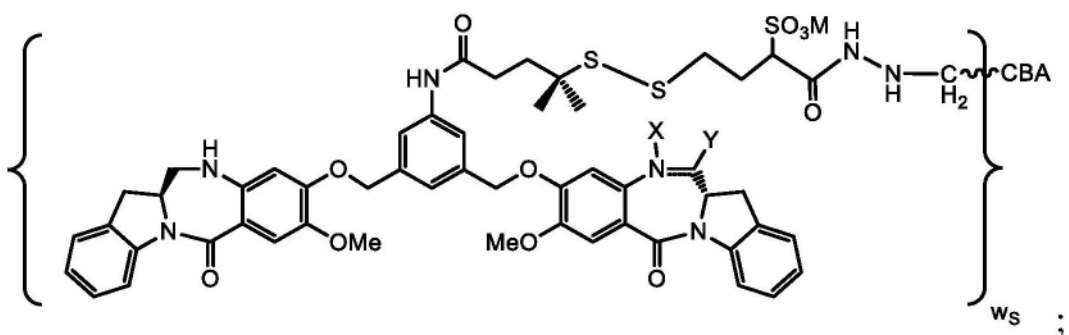
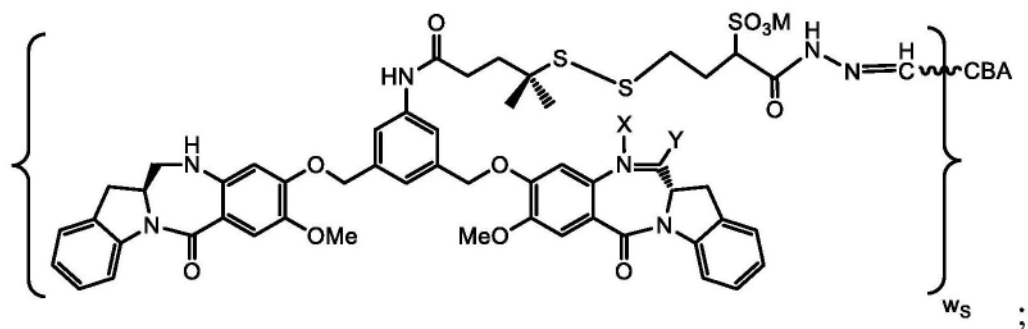


[0646]

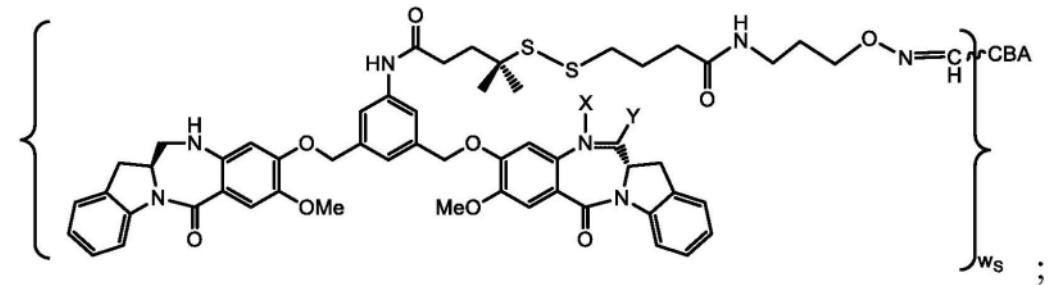
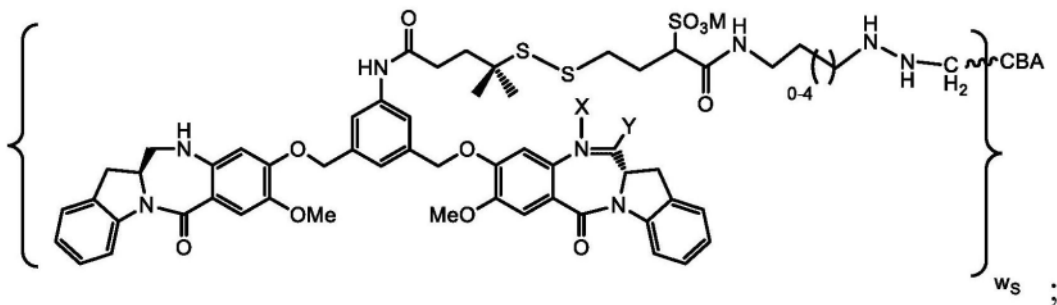
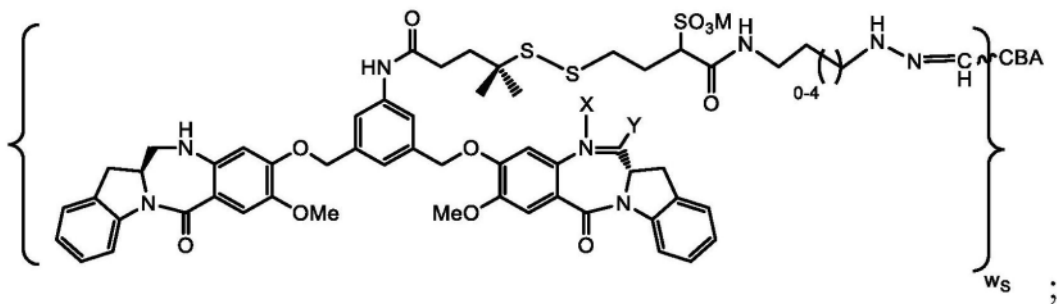
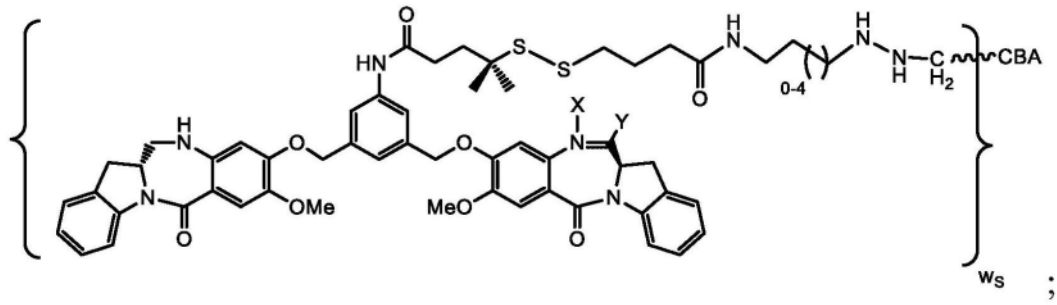
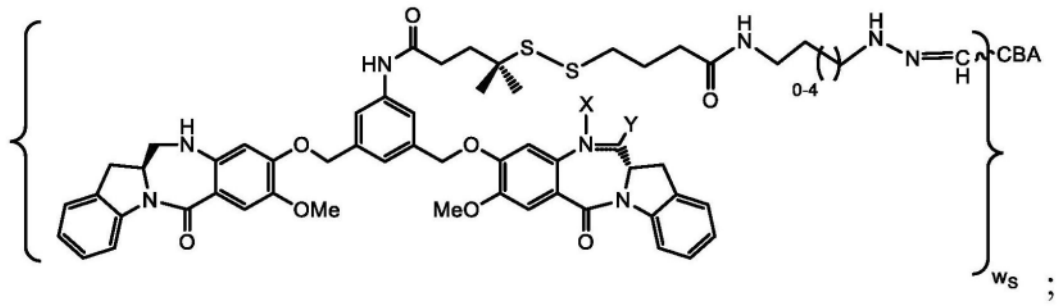


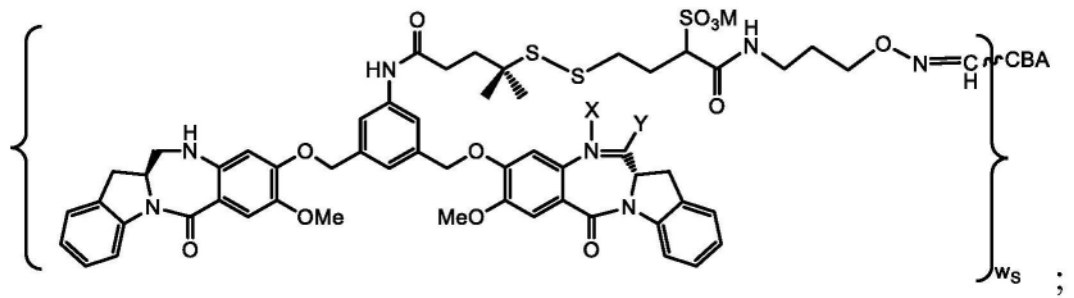
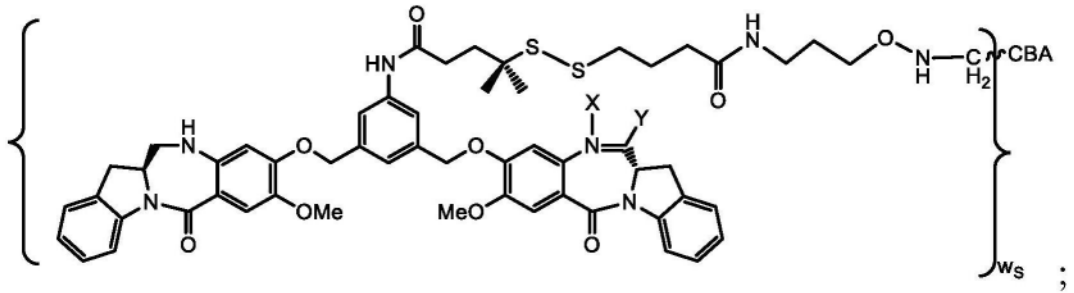


[0647]

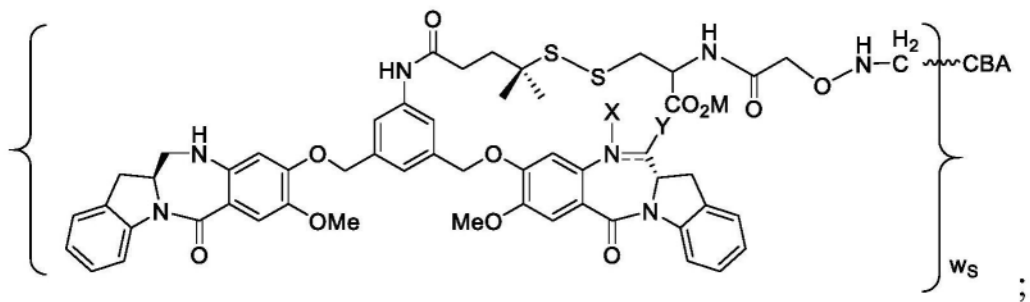
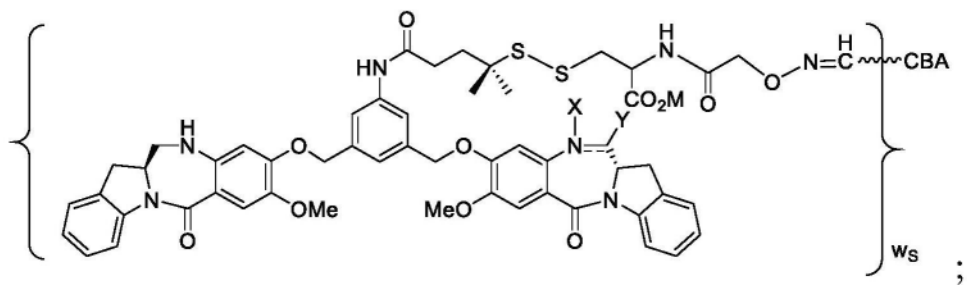
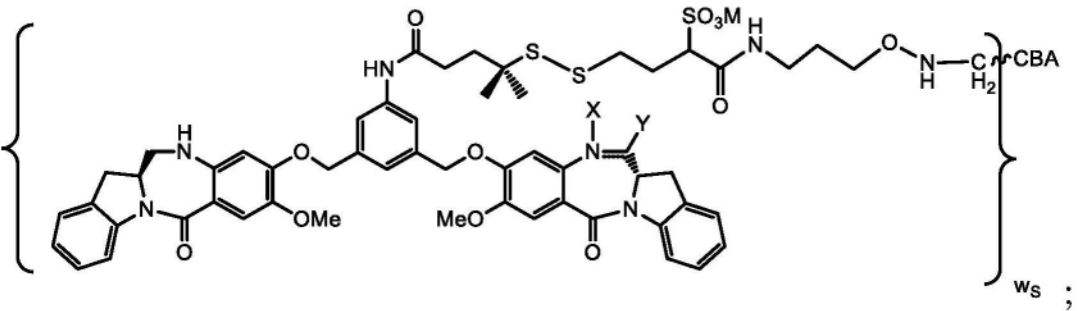


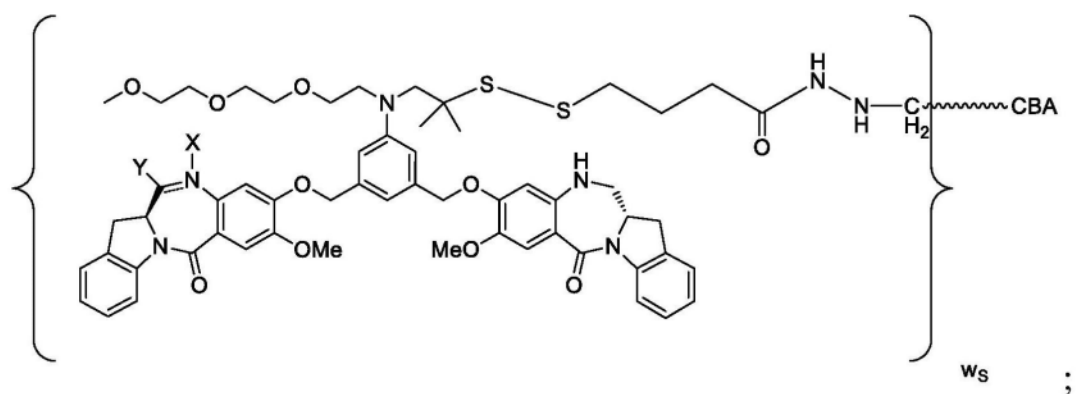
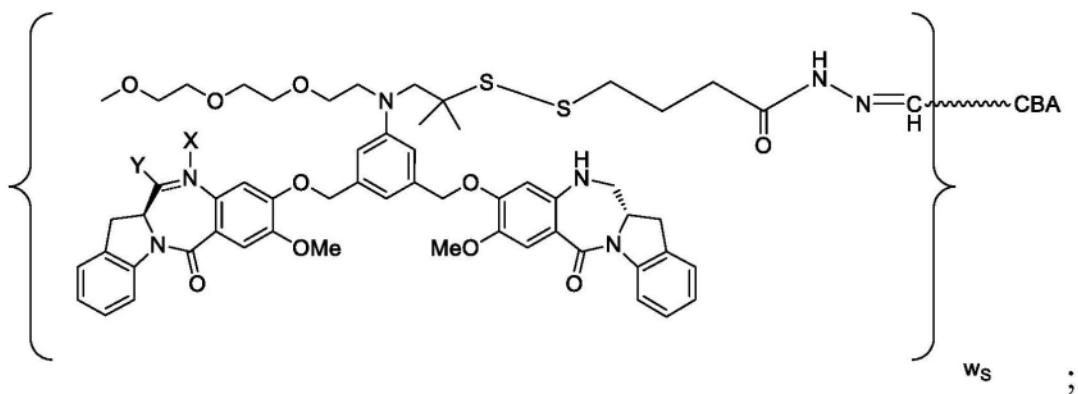
[0648]



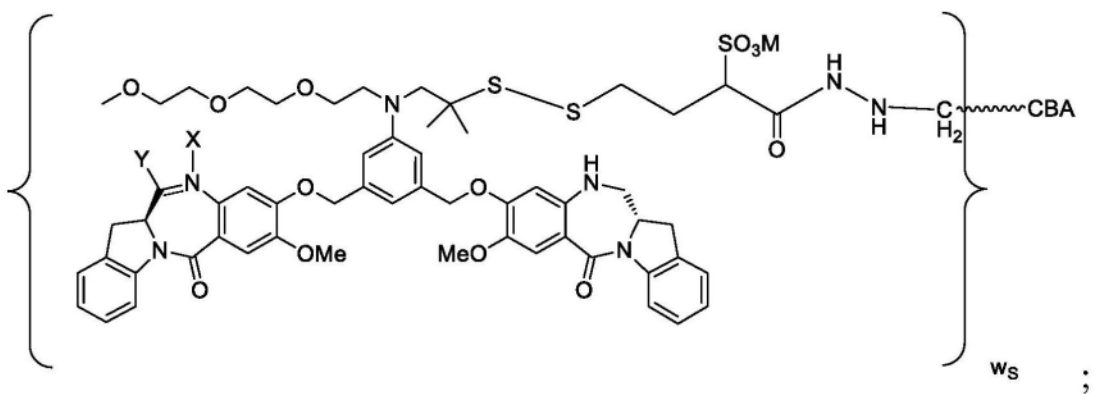
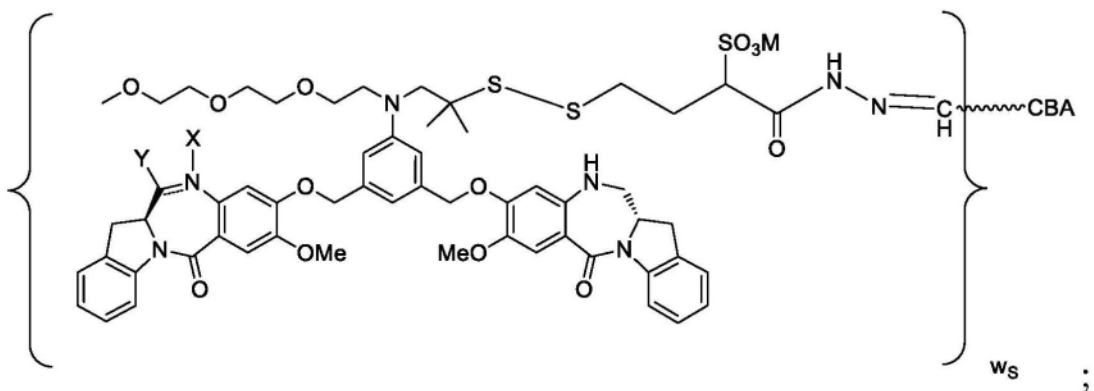


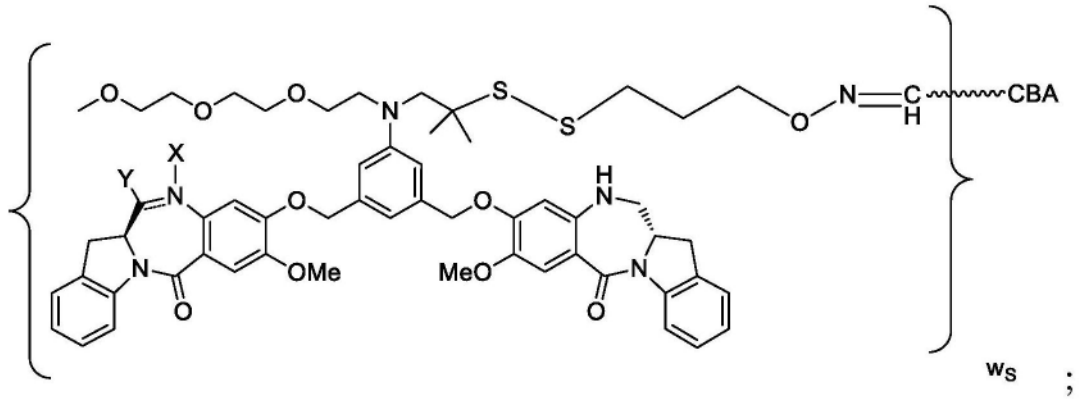
[0649]



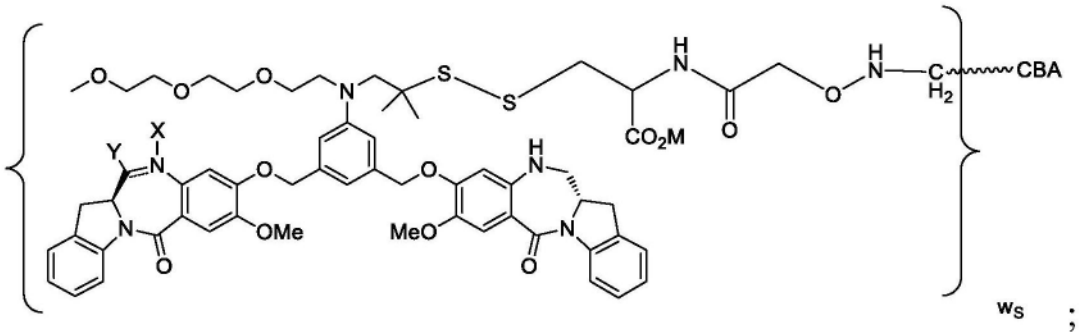
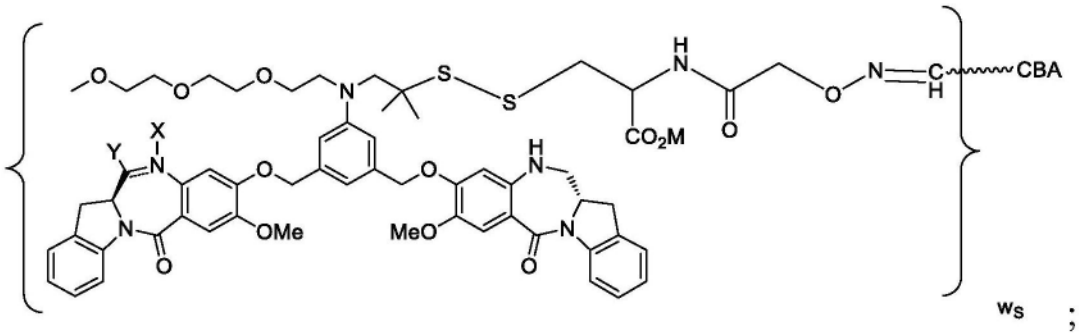
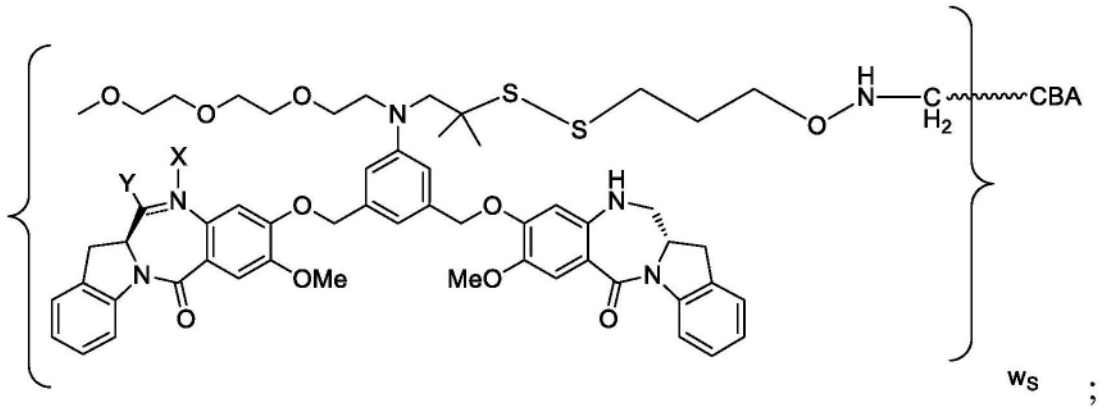


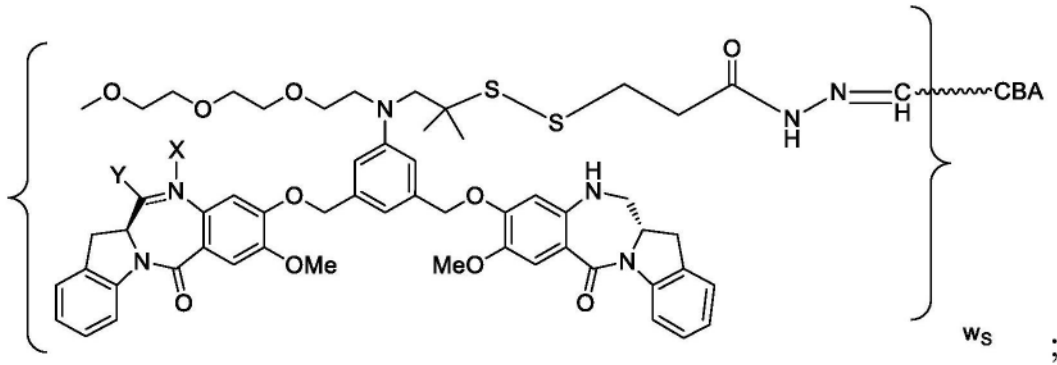
[0650]



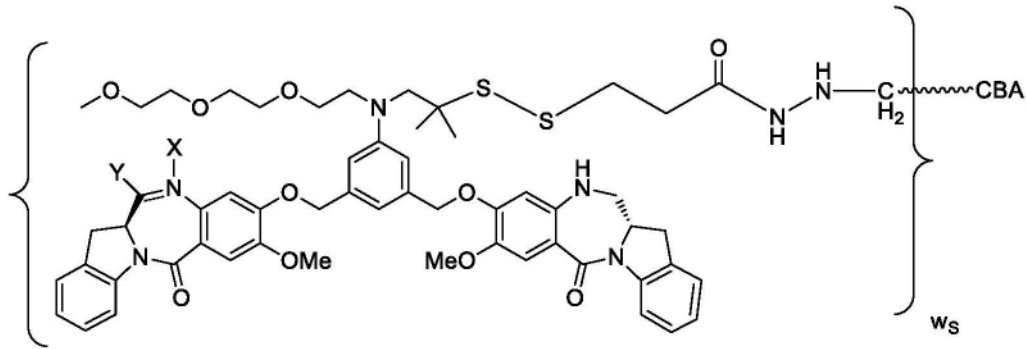


[0651]





[0652]



[0653] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H;并且Y是-OH或-SO₃M。

[0654] 91.如项目70-90中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线==表示双键,X不存在且Y是-H。

[0655] 92.如项目79-90中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[0656] 93.如项目92所述的免疫缀合物,其中M是H⁺、Na⁺或K⁺。

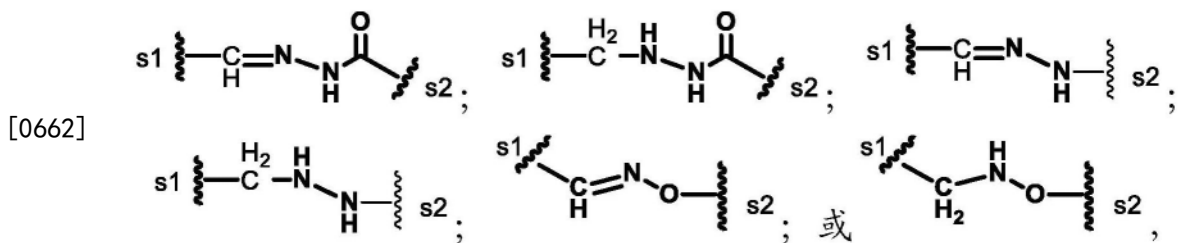
[0657] 94.一种免疫缀合物,其具有下式:



[0659] 其中:

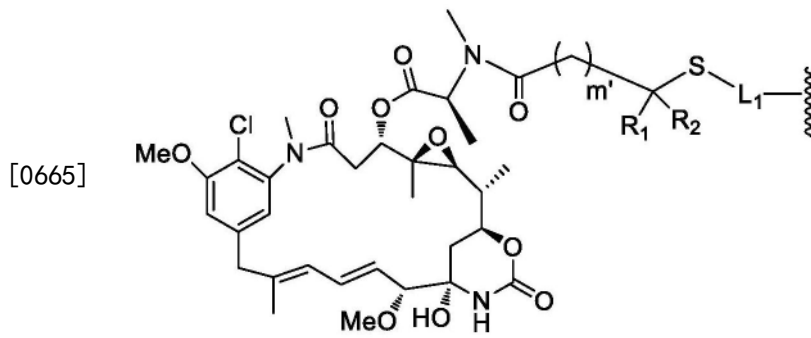
[0660] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽,其共价连接至J_{CB'}基团;

[0661] J_{CB'}是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s3}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:



[0663] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s3}共价连接的位点;

[0664] Cy^{s3}由下式表示:

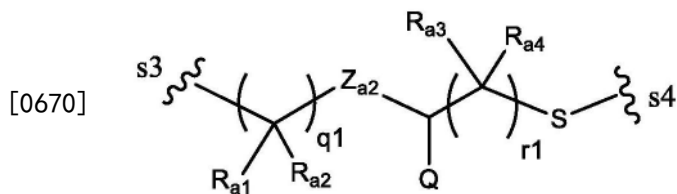


[0666] 其中:

[0667] m'是1或2;

[0668] R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;

[0669] L₁由下式表示:



[0671] 其中:

[0672] s3是与所述基团J_{CB}'共价连接的位点;

[0673] s4是与Cy^{s3}上的-S-基团共价连接的位点;

[0674] Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[0675] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0676] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

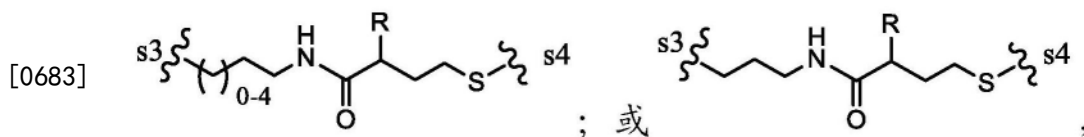
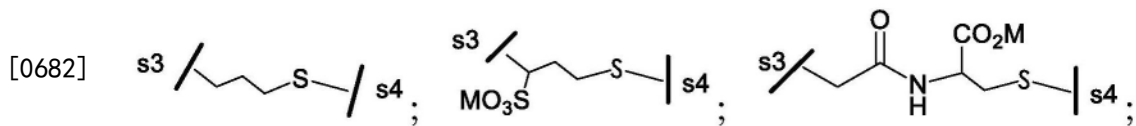
[0677] R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0678] q1和r1各自独立地是0至10的整数,其限制条件是q1和r1不均是0。

[0679] 95.如项目94所述的免疫缀合物,其中m'是1,且R₁和R₂两者均是H。

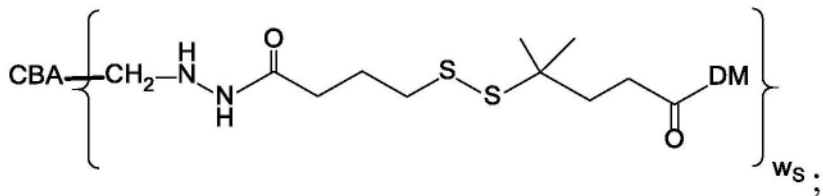
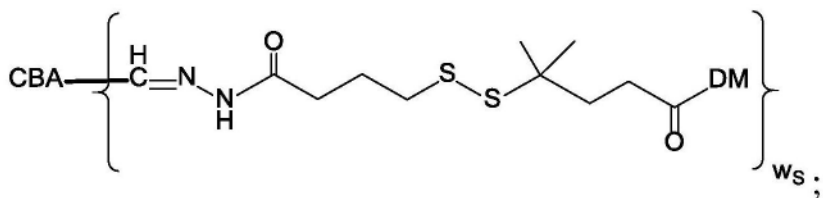
[0680] 96.如项目94所述的免疫缀合物,其中m'是2,且R₁和R₂两者均是Me。

[0681] 97.如项目94-96中任一项所述的免疫缀合物,其中-L₁-由以下各式表示:

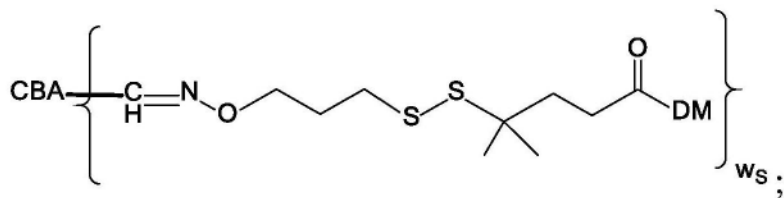
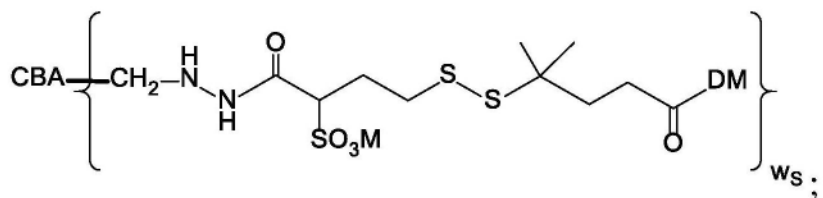
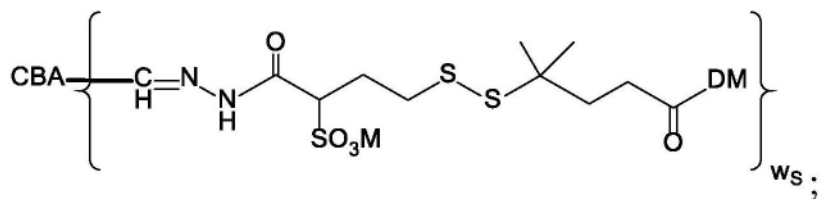


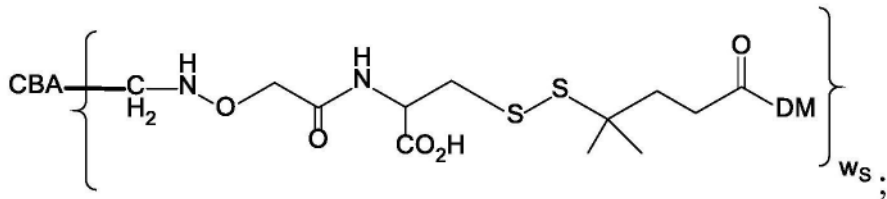
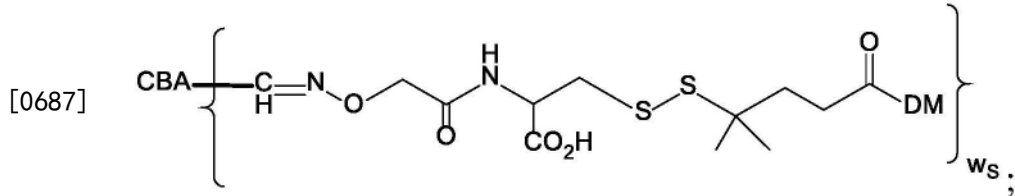
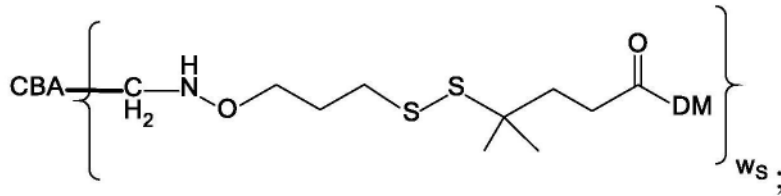
[0684] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M且M是H⁺或阳离子。

[0685] 98.如项目94所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

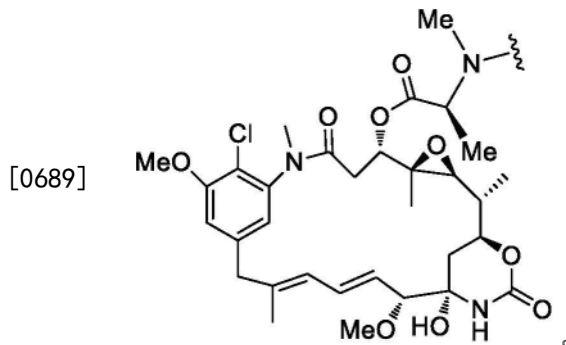


[0686]





[0688] 或其药学上可接受的盐;其中DM由下式表示:



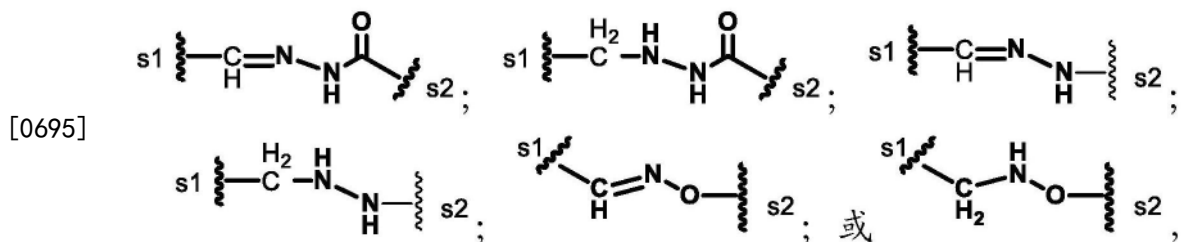
[0690] 99. 一种免疫缀合物,其具有下式:



[0692] 其中:

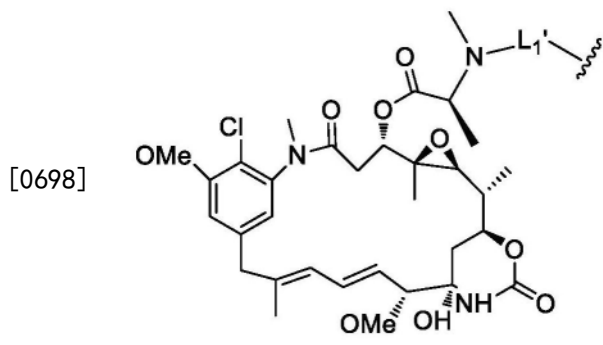
[0693] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目66或56中任一项所述的其多肽,其共价连接至J_{CB}'基团;

[0694] J_{CB}'是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s4}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

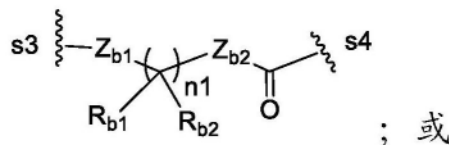


[0696] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s4}共价连接的位点;

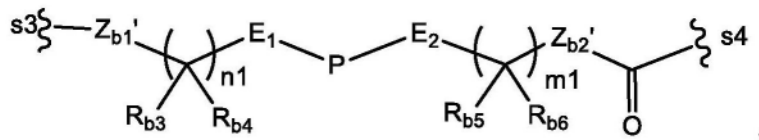
[0697] Cy^{s4}由以下各式表示:



[0699] L₁'由以下各式表示:



[0700]



[0701] 其中:

[0702] s3是与所述基团J_{CB}'基团共价连接的位点;

[0703] s4是与Cy^{s4}上的-NMe-基团共价连接的位点;

[0704] Z_{b1}和Z_{b2}两者均不存在,或Z_{b1}和Z_{b2}中的一者不存在且另一者是-CH₂-O-或-O-CH₂-;

[0705] Z_{b1}'和Z_{b2}'各自独立地是不存在、-CH₂-O-、-O-CH₂-、-NR₉-C(=O)-CH₂-或-CH₂-C(=O)-NR₉-;

[0706] R₉是H或(C₁-C₃)烷基;

[0707] n1和m1各自独立地是1至6的整数;

[0708] E₁和E₂中的一者是-C(=O)-且另一者是-NR₉-;或E₁和E₂中的一者是-C(=O)-或-NR₉-且另一者不存在;

[0709] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;并且

[0710] R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}在每次出现时各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基。

[0711] 100.如项目99所述的免疫缀合物,其中R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}都是H。

[0712] 101.如项目100所述的免疫缀合物,其中R₉是H。

[0713] 102.如项目99-101中任一项所述的免疫缀合物,其中Z_{b1}'和Z_{b2}'两者均不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-O-;并且Z_{b2}'不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-C(=O)-NR₉-;并且Z_{b2}'是-O-CH₂-或不存在。

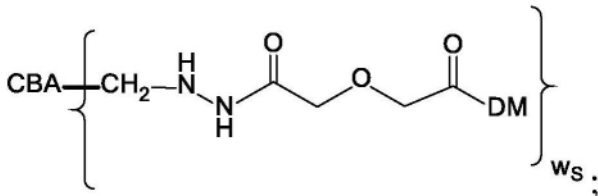
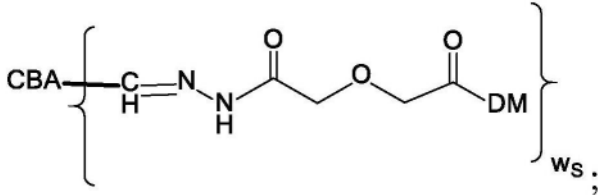
[0714] 103.如项目99-102中任一项所述的免疫缀合物,其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

[0715] 104.如项目99-103中任一项所述的免疫缀合物,其中P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-

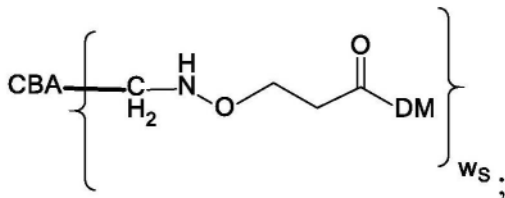
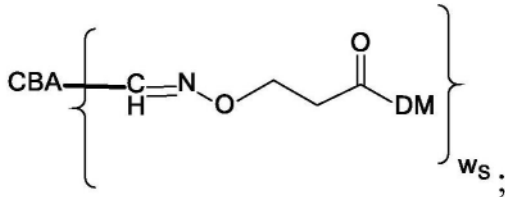
Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

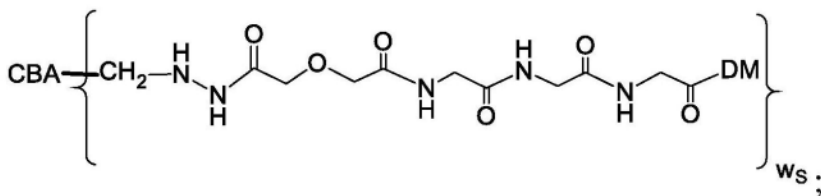
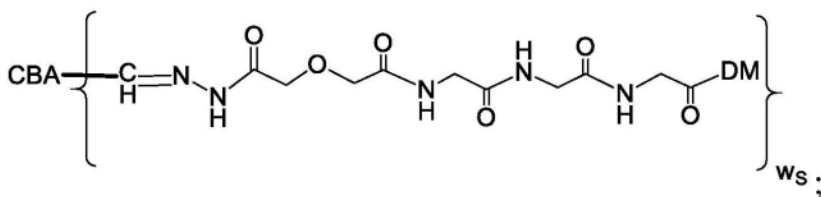
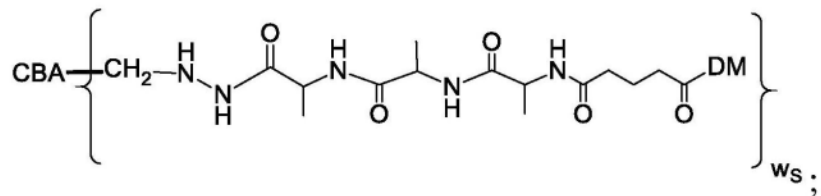
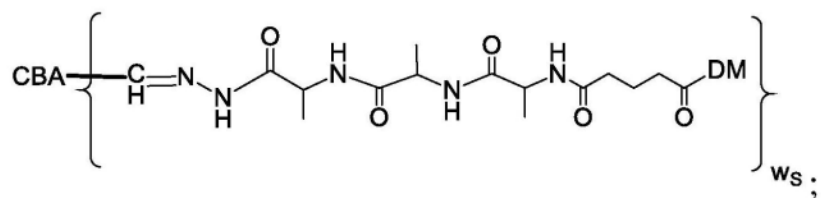
[0716] 105. 如项目104所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala和D-Ala-D-Ala。

[0717] 106. 如项目99所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

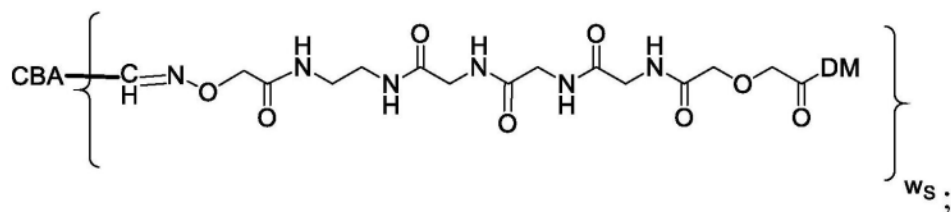
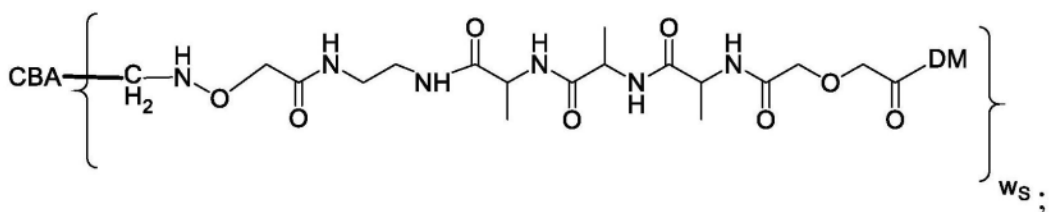
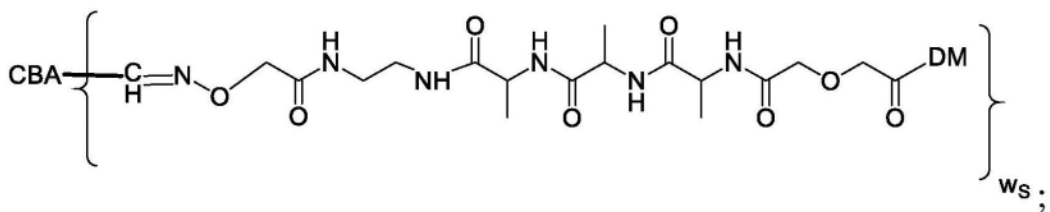


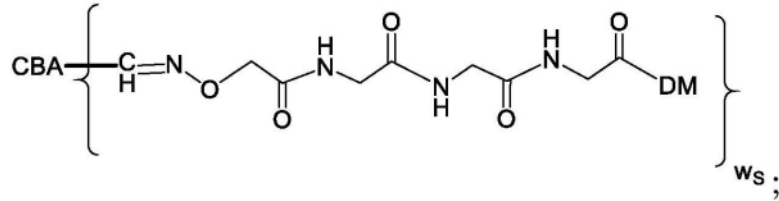
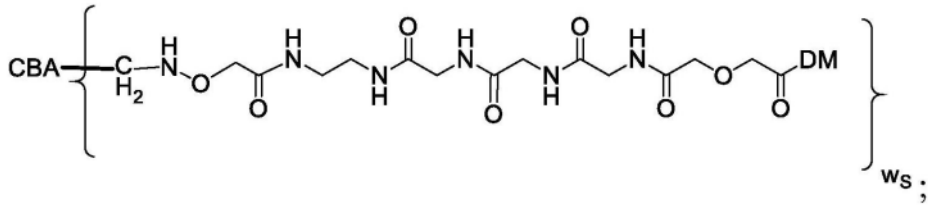
[0718]



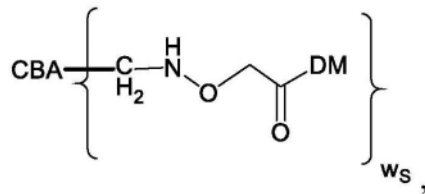
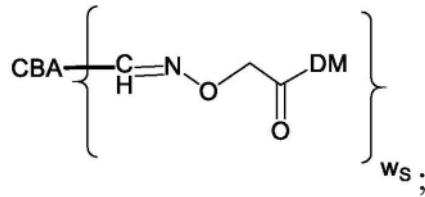
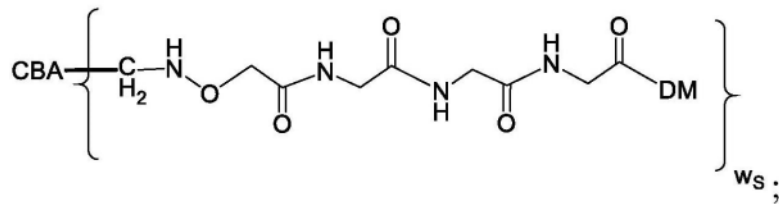


[0719]



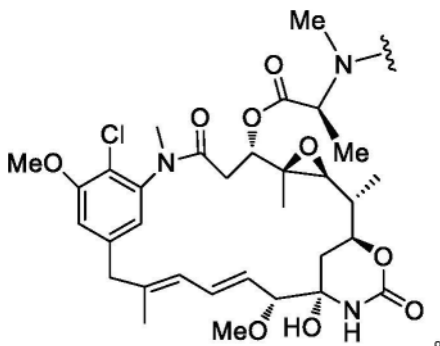


[0720]

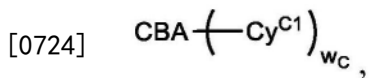


[0721] 或其药学上可接受的盐,其中DM由以下结构式表示:

[0722]



[0723] 107. 一种免疫缀合物,其由下式表示:

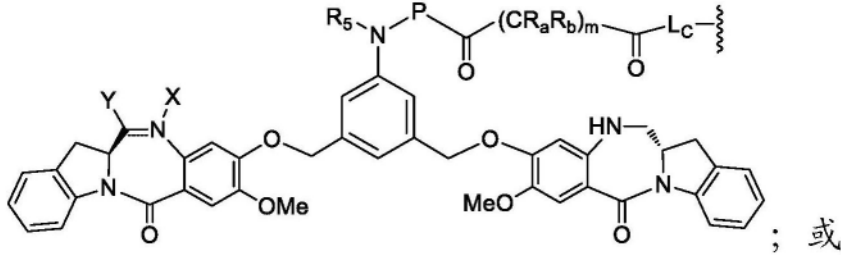


[0725] 其中:

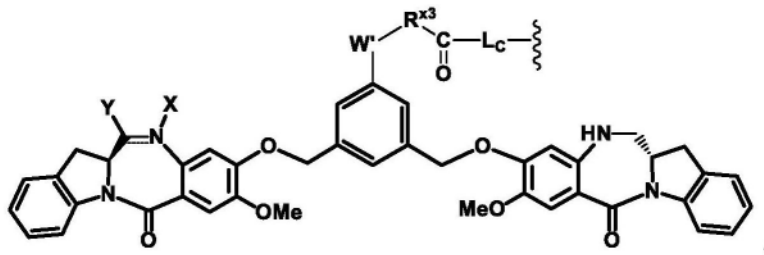
[0726] CBA是如项目37、29、30、38、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C1};

[0727] W_C是1或2;

[0728] Cy^{C1}由以下各式表示:



[0729]



[0730] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0731] 介于N与C之间的双线=C表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[0732] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0733] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[0734] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

[0735] W'是-NR^{e'};

[0736] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0737] n是2至6的整数;

[0738] R^k是-H或-Me;

[0739] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;并且

[0740] L_C由 表示,s1是与CBA共价连接的位点,且s2是与Cy^{C1}

上的-C(=O)-基团共价连接的位点;其中:

[0741] R₁₉和R₂₀在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0742] m''是介于1与10之间的整数;并且

[0743] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基。

[0744] 108. 如项目107所述的免疫缀合物,其中 R_a 和 R_b 两者均是H;并且 R_5 是H或Me。

[0745] 109. 如项目107或108所述的免疫缀合物,其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

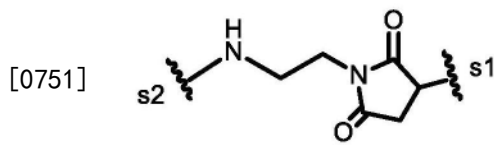
[0746] 110. 如项目107-109中任一项所述的免疫缀合物,其中P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met以及Met-Ala。

[0747] 111. 如项目110所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

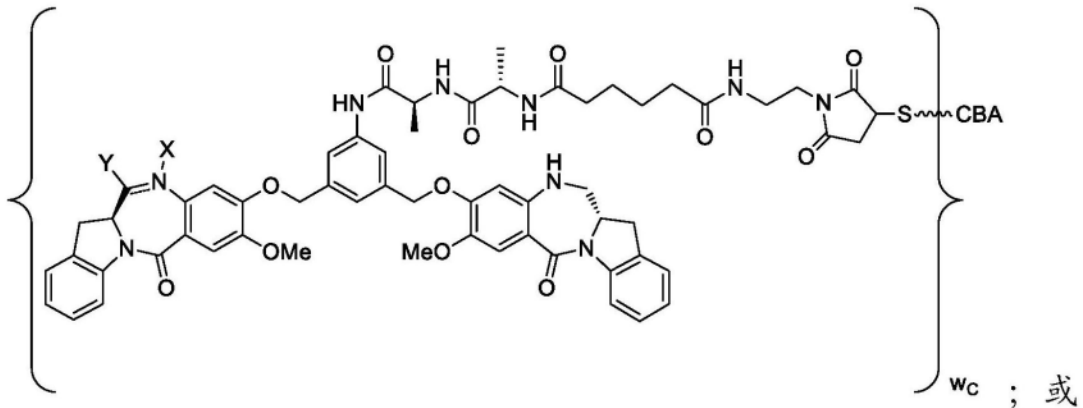
[0748] 112. 如项目107-111中任一项所述的免疫缀合物,其中Q是 $-SO_3M$ 。

[0749] 113. 如项目107-112中任一项所述的免疫缀合物,其中 R_{19} 和 R_{20} 两者均是H;并且 m'' 是1至6的整数。

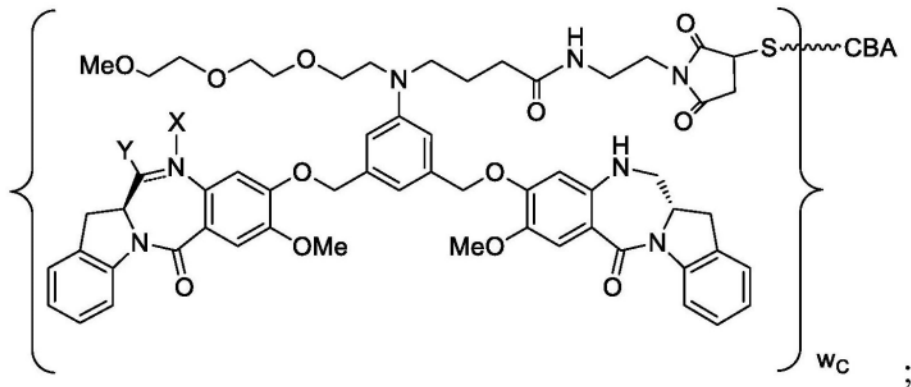
[0750] 114. 如项目113所述的免疫缀合物,其中 $-L_c$ -由下式表示:



[0752] 115. 如项目107所述的免疫缀合物,其由以下各式表示:

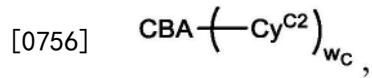


[0753]



[0754] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0755] 116.一种免疫缀合物,其由下式表示:

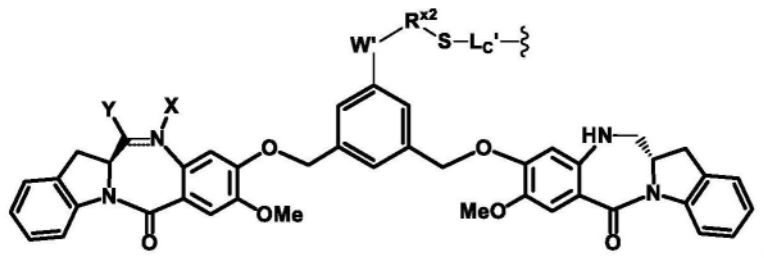
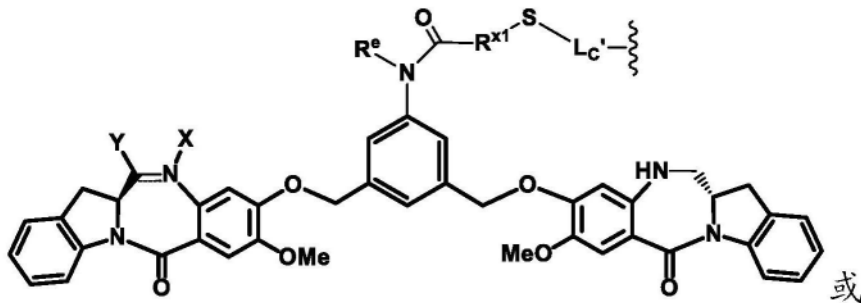


[0757] 其中:

[0758] CBA是如项目37、29、30、38、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C2};

[0759] W_c是1或2;

[0760] Cy^{C2}由以下各式表示:



[0762] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0763] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[0764] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基;

[0765] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

[0766] W'是-NR^{e'};

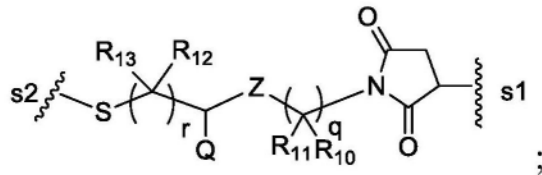
[0767] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[0768] n是2至6的整数;

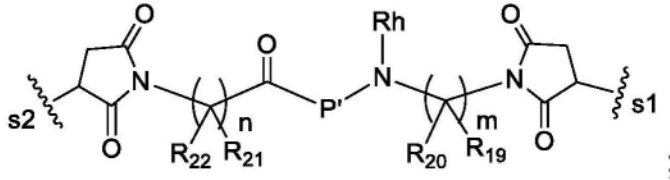
[0769] R^k是-H或-Me;

[0770] R^{x2}是(C₁-C₆)烷基;

[0771] L_{c'}由以下各式表示:



[0772]



[0773] 其中:

[0774] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C2}上的-S-基团共价连接的位点;[0775] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[0776] Q是-H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0777] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0778] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[0779] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

[0780] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

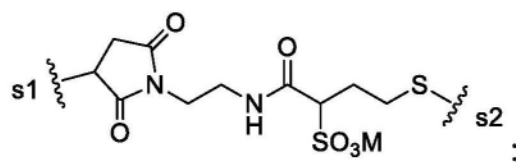
[0781] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

[0782] 117.如项目116所述的免疫缀合物,其中P'是含有2至5个氨基酸残基的肽。

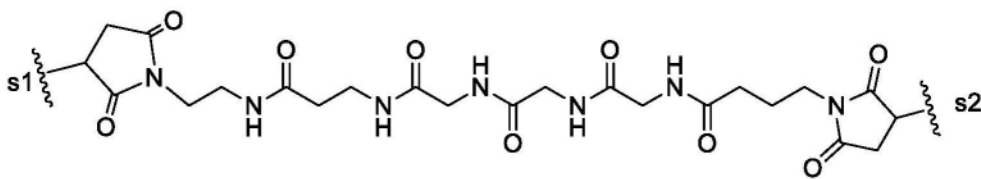
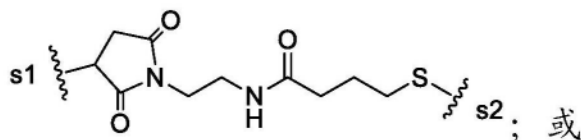
[0783] 118.如项目116或117所述的免疫缀合物,其中P'选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

[0784] 119.如项目118所述的免疫缀合物,其中P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0785] 120.如项目116所述的免疫缀合物,其中-L_C'-由以下各式表示:



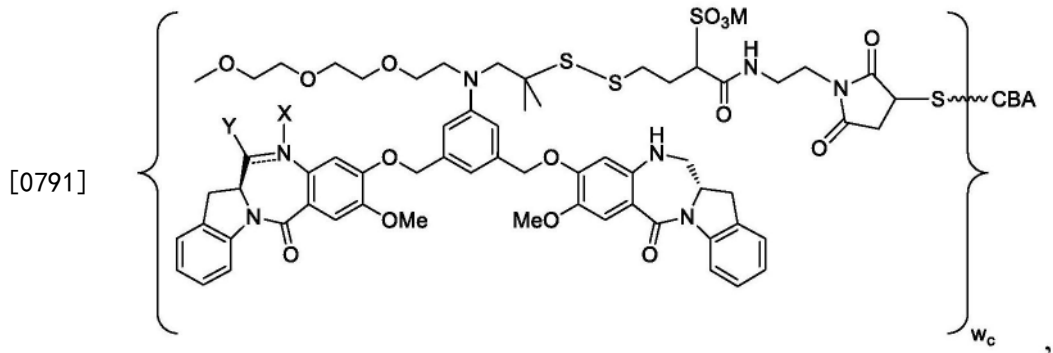
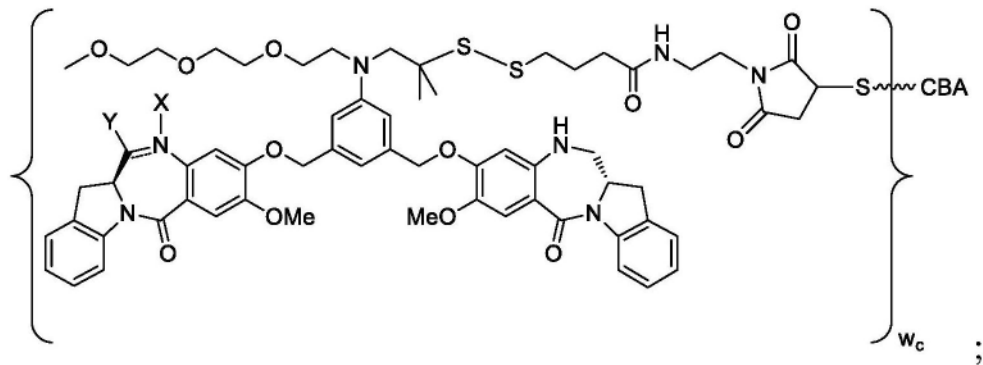
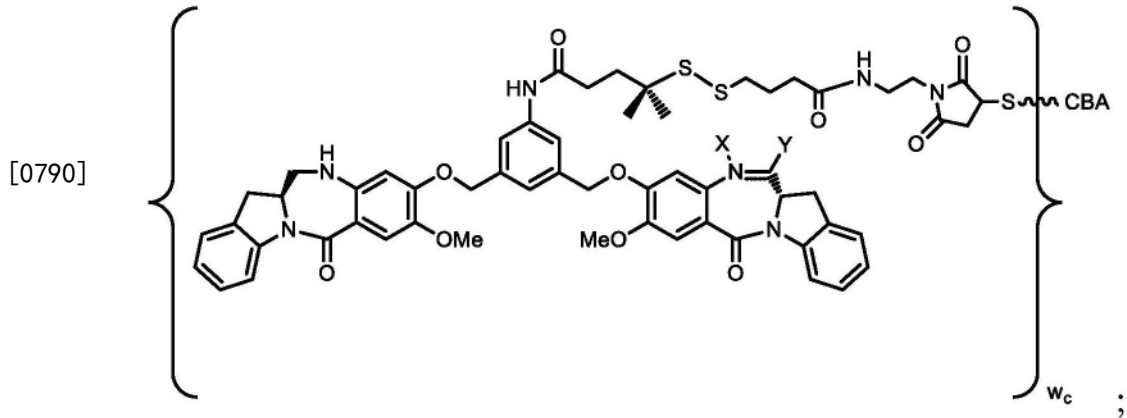
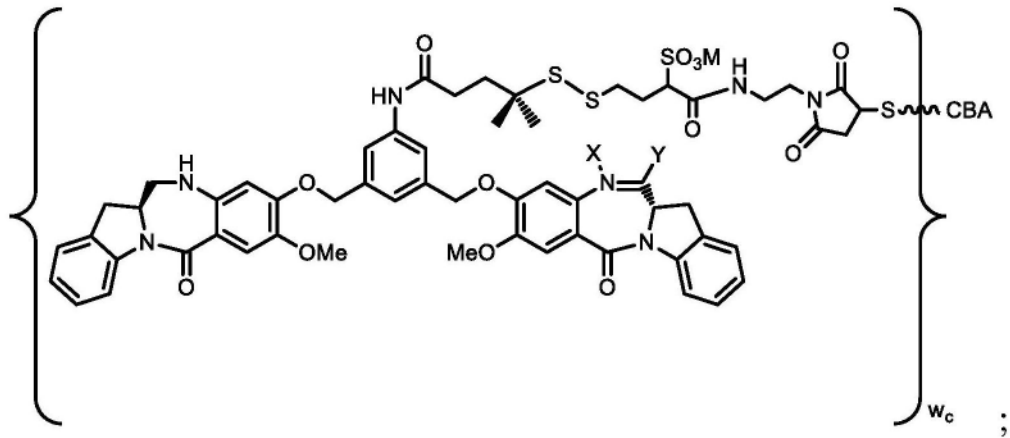
[0786]



[0787] 121. 如项目116-120中任一项所述的免疫缀合物, R^e是H或Me; R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, 且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, 其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基; 并且p是0、1、2或3。

[0788] 122. 如项目121所述的免疫缀合物, 其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[0789] 123. 如项目116所述的免疫缀合物, 其由以下各式表示:



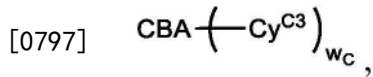
[0792] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[0793] 124. 如项目116-123中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双键 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。

[0794] 125. 如项目116-123中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双键 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[0795] 126. 如项目125所述的免疫缀合物,其中M是H⁺、Na⁺或K⁺。

[0796] 127. 一种免疫缀合物,其具有下式:

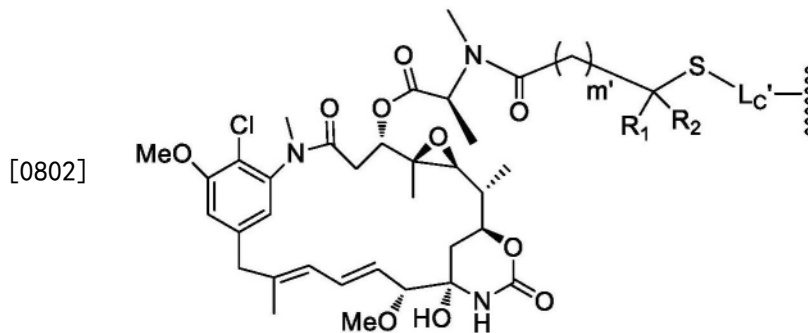


[0798] 其中:

[0799] CBA是如项目37、29、30、38、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C3};

[0800] w_c是1或2;

[0801] Cy^{C3}由下式表示:

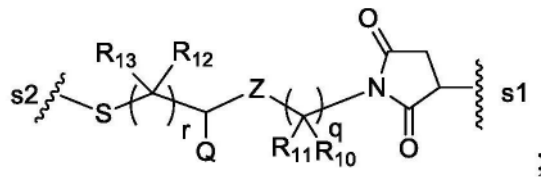


[0803] 其中:

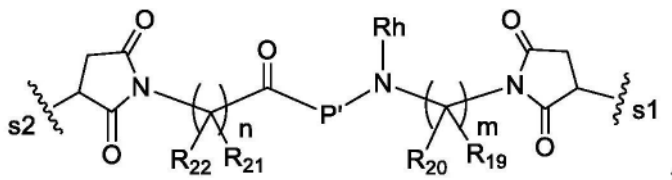
[0804] m'是1或2;

[0805] R₁和R₂各自独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0806] Lc'由以下各式表示:



[0807]



[0808] 其中:

[0809] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C3}上的-S-基团共价连接的位点;

[0810] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[0811] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[0812] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[0813] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数；

[0814] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数；

[0815] R^h 是-H或(C₁-C₃)烷基；并且

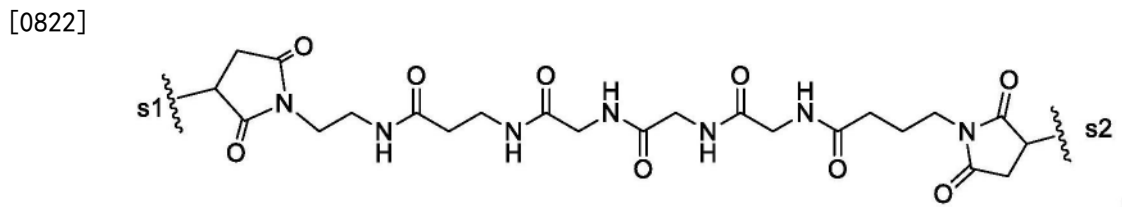
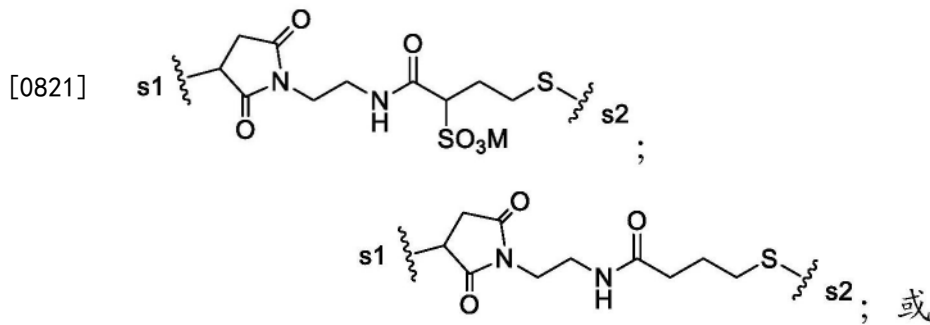
[0816] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

[0817] 128.如项目127所述的免疫缀合物,其中P'是含有2至5个氨基酸残基的肽。

[0818] 129.如项目127或128所述的免疫缀合物,其中P'选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

[0819] 130.如项目129所述的免疫缀合物,其中P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0820] 131.如项目127所述的免疫缀合物,其中-L_C'-由以下各式表示:

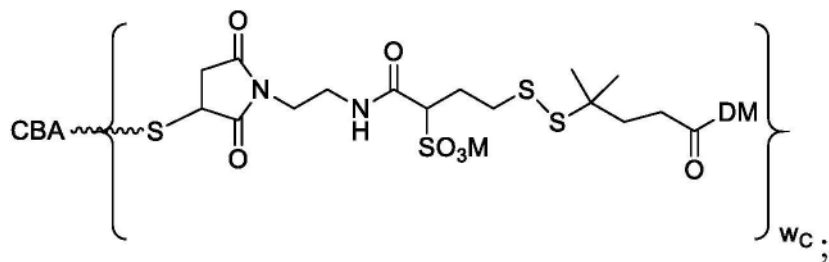


[0823] 其中M是H⁺或阳离子。

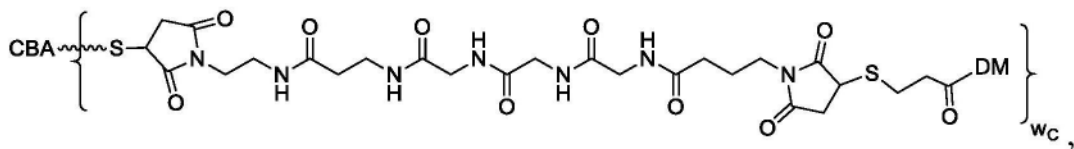
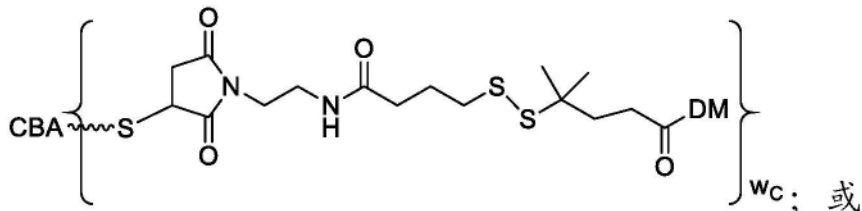
[0824] 132.如项目127-131中任一项所述的免疫缀合物,其中m'是1,且R₁和R₂两者均是H。

[0825] 133.如项目127-131中任一项所述的免疫缀合物,其中m'是2,且R₁和R₂两者均是Me。

[0826] 134.如项目127所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

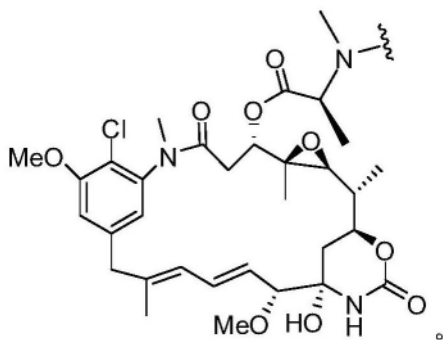


[0827]



[0828] 或其药学上可接受的盐,其中DM是由下式表示的药物部分:

[0829]



[0830] 135. 一种药物组合物,其包含如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,和药学上可接受的载体。

[0831] 136. 一种用于抑制表达CD123的细胞的生长的方法,所述方法包括使所述细胞与如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物接触。

[0832] 137. 如项目136所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。

[0833] 138. 如项目137所述的方法,其中所述细胞是白血病细胞或淋巴瘤细胞。

[0834] 139. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述癌症的细胞表达CD123,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物。

[0835] 140. 如项目139所述的方法,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

[0836] 141. 如项目139所述的方法,其中所述癌症选自由以下各项组成的组:急性骨髓性

白血病 (AML)、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL) 和慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)。

[0837] 142. 如项目141所述的方法,其中所述癌症是急性骨髓性白血病 (AML)。

[0838] 143. 如项目141所述的方法,其中所述癌症是B细胞急性成淋巴细胞性白血病 (B-ALL)。

[0839] 144. 一种用于治疗受试者的细胞增殖性病症的方法,其中所述细胞增殖性病症的细胞表达CD123,所述方法包括以足以治疗所述细胞增殖性病症的量向所述受试者施用治疗有效量的如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物。

[0840] 145. 如项目144所述的方法,其中所述细胞增殖性病症选自以下各项组成的组:急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病 (CML)、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、B细胞谱系急性成淋巴细胞性白血病 (B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (HCL)、骨髓发育不良综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤 (BPDCN) 白血病、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、套细胞淋巴瘤以及霍奇金氏白血病 (HL)。

附图简述

[0842] 图1示出嵌合CD123-6抗体 (chCD123-6) 和其CDR移植huCD123-6抗体 (huCD123-6Gv4.6和huCD123-6Gv4.7) 对TF-1细胞的IL-3依赖性增殖的抑制。

[0843] 图2A和2B示出三种鼠类抗CD123抗体 (muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14) 抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖,程度至少与7G3同样高。图2A示出各种抗CD123抗体,包括结合CD123的对照抗体7G3、6H6和9F5对在IL-3 (1ng/mL) 存在下培养的TF-1细胞的抑制。图2B示出相同抗CD123抗体对在GM-CSF (2ng/mL) 存在下培养的TF-1细胞的抑制。

[0844] 图3示出鼠类抗CD123抗体muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14以剂量依赖性方式抑制TF-1细胞的IL-3 (1ng/mL) 依赖性增殖且程度高于7G3抗体。muCD123-16是结合CD123但不抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖的阴性对照抗CD123抗体。

[0845] 图4A和图4B示出在表达CD123的TF-1 (图4A) 和HNT-34 (图4B) 细胞中鼠类muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14抗体与7G3抗体相比对CD123阳性AML细胞具有较高结合亲和力。

[0846] 图5A和图5B示出嵌合抗CD-123抗体chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14保留其鼠类对应物的高结合亲和力,使用HNT-34细胞 (图5A) 或CD123阳性急性骨髓性白血病 (AML) 细胞系MOLM-13 (图5B)。不结合CD123的嵌合抗体chKTI作为阴性对照包括在内。

[0847] 图6示出嵌合chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14抗CD-123抗体保留其鼠类对应物的功能活性,如通过其抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖的能力所证明。结合CD123但不抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖的非功能嵌合抗CD123抗体 (chCD123-18) 作为阴性对照包括在内。

[0848] 图7A示出鼠类 (muCD123-6)、嵌合 (chCD123-6) 和CDR移植huCD123-6抗体 (huCD123-6Gv4.7S2和huCD123-6Gv4.7S3) 与7G3相比均对表达CD123的HNT-34细胞具有较高亲和力。不结合CD123的嵌合抗体chKTI作为阴性对照包括在内。图7B和图7C示出huCD123-6Gv4.7S3或-Gv4.7抗体通过Lys、Ser或Cys键联与D1或D2化合物缀合仅适中地影响这些ADC缀合物的结合亲和力,即,Ser连接的huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-sD1 (参见图17中的结构) 和huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8,以及图7B中的Lys连接的huCD123-6Gv4.7S3-

sSPDB-D1和huCD123-6Gv4.7S3-D2;以及图7C中的Cys连接的huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4和huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5。在图7C中,未缀合的huCD123-6Gv4.7抗体具有SEQ ID NO:54的重链序列,其中Xaa是Val。具有“S3-SeriMab”的缀合物具有通过轻链上的氧化N末端Ser而实现的细胞毒素(在这种情况下,吡啶并苯并二氮杂卓或下文中的“IGN”化合物)键联。具有“CysMab”的缀合物具有通过重链中工程化的Cys(即,对应于SEQ ID NO:54中第5个至最后一个Cys的Cys)而实现的细胞毒素(在这种情况下,IGN化合物)键联。

[0849] 图8A示出嵌合(chCD123-6)和CDR移植(huCD123-6Gv4.7S2和huCD123-6Gv4.7S3) huCD123-6抗体抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖,程度好于7G3抗体。所述抑制是IL-3依赖性的,因为当在GM-CSF存在下使细胞生长时这些抗体不具有抑制作用(图8B)。

[0850] 图9A示出IL-3R α (CD123)细胞外结构域的表达构建体以及包含IL-3R α (灰色)和GMR α 结构域(白色)的嵌合受体蛋白。图9B示出CD123-6抗体主要结合至IL-3R α 的CRM结构域(残基101-306)。图9C示出CD123-3抗体主要结合至IL-3R α 的CRM结构域(残基101-306)。图9D示出CD123-14抗体排他性地结合至IL-3R α 的N末端结构域(残基1-100)。图9E示出7G3抗体排他性地结合至IL-3R α 的N末端结构域(残基1-100)。图9F示出6H6抗体排他性地结合至IL-3R α 的N末端结构域(残基1-100)。图9G示出9F5抗体排他性地结合至IL-3R α 的N末端结构域(残基1-100)。

[0851] 图10证明表面重构的huCD123-6Rv1.1抗体的类美登素DM1缀合物huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1对与生长因子无关的表达CD123的AML细胞系OCI-AML4展现剂量依赖性细胞毒性。所述细胞毒性是CD123依赖性的,如通过过量未缀合的huCD123-6抗体(500nM)阻断所述细胞毒性的能力所证明。

[0852] 图11A示出各种表面重构的赖氨酸连接的huCD123-6Rv1.1-IGN缀合物对不同来源的多种CD123阳性恶性细胞系的体外细胞毒性。

[0853] 图11B示出各种赖氨酸或半胱氨酸连接的huCD123-6-IGN缀合物对多种CD123阳性B-ALL细胞系的体外细胞毒性。基于未结合KTI抗体的缀合物作为阴性对照包括在内。

[0854] 图11C示出各种Lys或Cys连接的IGN化合物对P-gp(P-糖蛋白)阳性AML细胞系Kasumi-3和MOLM-1具有高活性。在过量未缀合的匹配huCD123抗体存在下产生具有空心数据点的对照曲线。

[0855] 图11D示出本发明的各种Lys或Cys连接的CD123-IGN缀合物几乎均可在nM或亚nM浓度下杀死90%的来自9名AML患者样品的AML祖细胞。

[0856] 图11E示出Cys连接的huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物在比杀死AML祖细胞所需的浓度高>100倍的浓度下杀死正常血细胞。相比之下,Mylotarg未展现这种优先杀死作用。

[0857] 图12A和12B示出各种赖氨酸连接的huCD123-6Rv1.1-IGN缀合物对来自AML患者的原代细胞的体外细胞毒性。来自对一名原发性患者样品进行典型CFU测定的结果提供于图12A中。图12B示出用所述缀合物处理的所有AML患者样品的IC₉₀值。

[0858] 图13A-13C示出huCD123-6的CysMab的IGN缀合物(huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5,实心黑色圆圈)与相同抗体的赖氨酸连接的缀合物(huCD123-6Gv4.6-D2,实心黑色正方形)对AML细胞系EOL-1(图13A)、B-ALL细胞系KOPN-8(图13B)和CML细胞系MOLM-1(图13C)的活性至少相同。连接各图中的空心数据点的点曲线表示相应缀合物(即,空心圆圈用于huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5,且空心正方形用于huCD123-6Gv4.6-D2)在阻断浓度(500nM)的未缀合

chCD123-6抗体存在下的活性。

[0859] 图14A-14C示出huCD123-6的SeriMab (huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8, 实心黑色圆圈) 与相同抗体的赖氨酸连接的缀合物 (huCD123-6Rv1.1-D2, 实心黑色倒三角形) 在AML细胞系SHI-1 (图14A) 和HNT-34 (图14B) 以及CML细胞系MOLM-1 (图14C) 中的活性至少相同。连接各图中的空心数据点的点曲线表示对应缀合物 (即, 空心圆圈用于huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8, 且空心倒三角形用于huCD123-6Rv1.1-D2) 在阻断浓度 (500nM) 的未缀合huCD123-6抗体存在下的活性。

[0860] 图15示出示意图, 所述图显示可用于合成本发明的Ser键联缀合物的一般步骤。

[0861] 图16示出示意图, 所述图显示可用于合成本发明的Ser键联缀合物的一般步骤。

[0862] 图17示出示意图, 所述图显示可用于合成本发明的Ser键联缀合物的一般步骤。

[0863] 图18示出Cys连接的huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物与吉妥珠单抗奥佐米星 (GO) (还称为Mylotarg) 相比在未选择的AML患者样品中具有较高活性。

[0864] 图19示出Cys连接的huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物在比杀死AML祖细胞所需的浓度高>100倍的浓度下杀死正常祖细胞。相比之下, Mylotarg和huCD123-6G4.7-CysMab-D5' (DNA交联剂D5'的ADC) 不展现这种优先杀死作用。

[0865] 图20示出CD123-IGN缀合物在MV4-11 AML皮下小鼠模型中的体内功效。

[0866] 图21示出Cys连接的huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物对具有不良预后因素的各种CD123阳性AML细胞系具有高活性。

[0867] 图22示出用huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物处理的小鼠与用媒介物处理的小鼠和对照相比在第26天的体内生物发光成像。用缀合物处理显著降低小鼠中的肿瘤负担。

[0868] 图23示出用huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物处理与用媒介物处理的小鼠和对照相比在6/6小鼠中延长存活。

[0869] 图24示出MV4-11细胞与huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5缀合物一起孵育导致DNA损伤、停滞在细胞周期的S期和细胞凋亡介导的细胞死亡。

[0870] 图25示出CD123-IGN缀合物在Molm-13 AML播散性模型中的体内功效。

[0871] 图26示出CD123-IGN缀合物在EOL-1皮下模型中的体内功效。

[0872] 图27示出huCD123-CysMab-D5缀合物在各种剂量下在EOL-1皮下模型中的体内功效。

[0873] 图28示出huCD123-CysMab-D5缀合物与有效负载的相应游离药物形式 (FGN849或D5)、裸抗体、对照、阿糖胞苷和阿扎胞苷相比在EOL-1皮下模型中的体内功效。

[0874] 图29示出CD123-IGN缀合物在MV4-11 AML播散性模型中的体内功效。

[0875] 图30示出CD123-IGN缀合物在MV4-11 AML皮下模型中的体内功效。

[0876] 图31示出用huCD123-CysMab-D5缀合物处理与用媒介物处理的小鼠和对照相比在小鼠中延长存活。

[0877] 图32示出huCD123-CysMab-D5和huCD123-SeriMab-sD1缀合物在小鼠中的体内耐受性。

[0878] 图33示出huCD123-赖氨酸连接的-D2缀合物在小鼠中的体内耐受性。

发明详述

[0880] 1. 定义

[0881] 为了促进理解本发明,以下定义许多术语和短语。

[0882] 除非另外指示,否则如本文中可互换使用的术语“(人) IL-3R α ”、“白细胞介素-3受体 α ”或“CD123”是指任何天然(人) IL-3R α 或CD123。CD123蛋白是异源二聚细胞因子受体(IL-3受体,或IL-3R)的白细胞介素3特异性亚基。IL-3R由配体特异性 α 亚基和由白细胞介素3(IL3)、群落刺激因子2(CSF2/GM-CSF)和白细胞介素5(IL5)的受体共有的信号转导共同 β 亚基(还称为CD131)构成。CD123/IL-3R α 与IL3的结合取决于 β 亚基。 β 亚基通过配体结合活化,且对于IL3的生物学活性是所需的。

[0883] 针对CD123的这些以上术语均可指如本文中所指示的蛋白质或核酸序列。术语“CD123/IL-3R α ”涵盖“全长”未加工的CD123/IL-3R α 以及由在细胞内进行加工而获得的CD123/IL-3R α 的任何形式。所述术语还涵盖CD123/IL-3R α 蛋白或核酸的天然存在的变体,例如剪接变体、等位基因变体和同种型。本文所描述的CD123/IL-3R α 多肽和多核苷酸可自各种来源,诸如自多种人组织类型或自另一来源分离,或通过重组或合成方法来制备。CD123/IL-3R α 序列的实例包括但不限于NCBI参考号NP_002174和NM_002183(人CD123变体1的蛋白质和核酸序列)以及NP_001254642和NM_001267713(人CD123变体2的蛋白质和核酸序列)。

[0884] 术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其可通过所述免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别且特异性地结合至靶标,诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或上述的组合。如本文中所用,术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、诸如双特异性抗体的多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白质,和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要所述抗体展现所需生物活性即可。抗体基于其重链恒定结构域(分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ)的同一性可属于五个主要免疫球蛋白类别中的任一个:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同且熟知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸抗体或与诸如毒素、放射性同位素等其他分子缀合。

[0885] 在一些实施方案中,抗体是非天然存在的抗体。在一些实施方案中,抗体自天然组分纯化。在一些实施方案中,抗体是重组产生的。在一些实施方案中,抗体由杂交瘤产生。

[0886] “阻断”抗体或“拮抗性”抗体是抑制或降低其所结合的诸如CD123/IL-3R α 的抗原的生物学活性的抗体。在某一实施方案中,阻断抗体或拮抗性抗体实质上或完全抑制抗原的生物活性。理想地,所述生物活性降低10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0887] 术语“抗CD123抗体”、“抗IL-3R α 抗体”或“(特异性地)结合CD123/IL-3R α 的抗体”是指能够以足够亲和力结合CD123/IL-3R α 的抗体,以使得所述抗体适用作用于靶向CD123/IL-3R α 的诊断和/或治疗剂。除非另外规定,否则抗CD123/IL-3R α 抗体与无关非CD123/IL-3R α 蛋白的结合程度小于所述抗体与CD123/IL-3R α 的结合的约10%,如例如通过放射性免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,结合至CD123/IL-3R α 的抗体具有 $\leq 0.5\text{nM}$ 、 $\leq 0.3\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.05\text{nM}$ 或 $\leq 0.01\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3R

α 抗体不结合共同 β 链CD131。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3R α 抗体不结合至CD123中由诸如7G3(小鼠IgG_{2a})、6H6(小鼠IgG₁)和9F5(小鼠IgG₁)的已知和可商购CD123抗体结合的共同表位(Sun等人,Blood 87(1):83-92,1996)。

[0888] 本发明的抗CD123/IL-3R α 抗体和其抗原结合片段的序列提供于以下表1-6中。以下单独提供用于本发明的各种抗体和免疫缀合物的命名法。

[0889] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和F_v片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。术语抗体的“抗原结合片段”包括抗体中保留特异性地结合至抗原的能力的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的某些片段来执行。术语抗体的“抗原结合片段”内所涵盖的结合片段的实例包括(但不限于): (i) Fab片段,即由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段(例如,由木瓜蛋白酶消化的抗体产生三个片段:两个抗原结合Fab片段和一个不结合抗原的Fc片段); (ii) F(ab')₂片段,即包含在铰链区由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段(例如,由胃蛋白酶消化的抗体产生两个片段:二价抗原结合F(ab')₂片段,以及不结合抗原的pFc'片段和其相关F(ab')单价单元); (iii) 由V_H和C_{H1}结构域组成的F_d片段(即,包括在Fab中的重链部分); (iv) 由抗体的单一臂的V_L和V_H结构域组成的F_v片段,和相关二硫键连接的F_v; (v) dAb(结构域抗体)或sdAb(单结构域抗体)片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989),其由V_H结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。

[0890] “单克隆抗体”是指参与单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的均质抗体群体。此与通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、F_v)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白质和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以许多方式制造的此类抗体,包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0891] 术语“人源化抗体”是指非人(例如鼠类)抗体的形式,其是含有最小非人(例如鼠类)序列的特定免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中来自互补决定区(CDR)的残基被非人物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR中具有所需特异性、亲和力和能力的残基置换(Jones等人,Nature 321:522-525,1986;Riechmann等人,Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536,1988)。

[0892] 在一些情况下,人免疫球蛋白的F_v框架区(FR)残基被来自非人物种的具有所需特异性、亲和力和能力的抗体中的相应残基置换。人源化抗体可通过取代F_v框架区中和/或置换的非人残基内的另外残基来进行进一步修饰,以改进并优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般来说,人源化抗体将包含实质上所有至少一个且通常两个或三个含有所有或实质上所有对应于非人免疫球蛋白的CDR区的可变结构域,而所有或实质上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体还可包含免疫球蛋白恒定区或结构域(F_c),通常人免疫球蛋白的恒定区或结构域的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539和5,639,641;Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(3):969-973,1994;和Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904,1996(全部以引用的方式并入本文)中。在一些实施方案中,“人源化抗体”是表面重构的抗体。在一些实施方案中,“人源化抗

体”是CDR移植抗体。

[0893] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链可变区或抗体重链可变区。重链和轻链的可变区各自由以三个互补决定区(CDR,还称为高变区)连接的四个框架区(FR)组成。FR维持各链中的CDR与来自另一链的CDR紧密邻近在一起,有助于形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种用于测定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.);和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(AI-lazikani等人,J.Molec.Biol.273:927-948,1997)。另外,本领域中有时使用这两种方法的组合来测定CDR。

[0894] 当提及可变结构域(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)中的残基时一般使用Kabat编号系统(例如Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0895] 如Kabat中的氨基酸位置编号是指用于Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)(以引用的方式并入本文中)中的抗体编译的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这种编号系统,实际线性氨基酸序列可含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入的更少或额外氨基酸。例如,重链可变结构域可包括处于H2的残基52之后的单一氨基酸插入(残基52a,根据Kabat)和处于重链FR残基82之后的多个插入残基(例如,残基82a、82b和82c等,根据Kabat)。对于给定抗体,残基的Kabat编号可通过在抗体序列的同源性区域上与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定。而Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。当使用Kabat编号转化进行编号时,Chothia CDR-H1环的末端取决于环长度而在H32与H34之间变化。这是因为Kabat编号方案将插入物置于H35A和H35B处,如果35A或35B均不存在,则环末端在32处;如果仅存在35A,则环末端在33处;如果35A或35B均存在,则环末端在34处。AbM高变区表示Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。

环	Kabat	AbM	Chiothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
[0896] H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat 编号)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia 编号)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H9S-H102	H95-H102	H95-H102

[0897] 术语“人抗体”是指由人产生的抗体或使用本领域中已知的任何技术制造的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。在某些实施方案中,人抗体不具有非人序列。人抗体的这种定义包括完整或全长抗体,或其抗原结合片段。

[0898] 术语“嵌合抗体”是指免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两种或更多种物种的

抗体。通常,轻链和重链两者的可变区对应于来源于一种哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔等)且具有所需特异性、亲和力和能力的抗体的可变区,而恒定区与来源于另一物种(通常人)的抗体中的序列同源,以避免或减少在所述物种(例如人)中引发免疫应答的机会。在某些实施方案中,嵌合抗体可包括包含至少一种人重链和/或轻链多肽的抗体或其抗原结合片段,例如像包含鼠类轻链和人重链多肽的抗体。

[0899] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用且是指抗原中能够由特定抗体识别且特异性地结合的部分。当抗原是多肽时,表位可由连续氨基酸和通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白质变性后得以保留,而由三级折叠形成的表位通常在蛋白质变性后丧失。在独特空间构象中,表位通常包括至少3个且更通常至少5或8-10个氨基酸。

[0900] “结合亲和力”一般是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的总非共价相互作用总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可由解离常数(K_d)或半最大有效浓度(EC_{50})表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法,包括本文所描述的方法来测量。低亲和力抗体一般缓慢结合抗原且倾向于容易地解离,而高亲和力抗体一般更快结合抗原且倾向于保持结合较久。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的,出于本发明的目的可使用其中的任一种。本文中描述特定说明性实施方案。

[0901] “或更好”当在本文中用于指结合亲和力时是指分子与其结合配偶体之间的更强结合。“或更好”当在本文中用于指更强结合时由较小数值 K_d 值表示。例如,对抗原具有“0.3nM或更好”亲和力的抗体是指抗体对抗原的亲和力 $\leq 0.3nM$,例如,0.29nM、0.28nM、0.27nM等,或者等于或小于0.3nM的任何值。在一个实施方案中,如由 K_d 决定的抗体亲和力将介于约 10^{-3} 至约 $10^{-12}M$ 之间、介于约 10^{-6} 至约 $10^{-11}M$ 之间、介于约 10^{-6} 至约 $10^{-10}M$ 之间、介于约 10^{-6} 至约 $10^{-9}M$ 之间、介于约 10^{-6} 至约 $10^{-8}M$ 之间或介于约 10^{-6} 至约 $10^{-7}M$ 之间。

[0902] “特异性结合”一般是指抗体经由其抗原结合结构域结合至表位且所述结合需要抗原结合结构域与表位之间存在一定互补性。根据此定义,与抗体将结合随机无关表位相比,据称当其经由其抗原结合结构域结合表位时,抗体更容易“特异性地结合”所述表位。术语“特异性”在本文中用于考核某一抗体结合至某一表位的相对亲和力。例如,可认为抗体“A”与抗体“B”相比对给定表位具有较高特异性,或可称抗体“A”以比其对相关表位“D”所具有的特异性高的特异性结合表位“C”。

[0903] 在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段“特异性地结合”至CD123抗原,因为其对CD123抗原(来自任何物种)比对非CD123抗原具有更高结合特异性。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段“特异性地结合”至人CD123抗原,因为其对CD123抗原比对非人CD123抗原(例如小鼠或大鼠CD123)具有更高结合特异性。

[0904] “优先结合”是指抗体特异性地结合至表位比其结合至相关相似同源或类似表位更容易。因此,与相关表位相比,“优先结合”至给定表位的抗体将更可能结合至所述表位,即使这种抗体可与所述相关表位交叉反应。例如,在某些实施方案中,相对于小鼠CD123,本发明的抗体或抗原结合片段“优先结合”人CD123抗原。

[0905] 如果抗体优先结合至给定表位达到其可在某种程度上阻断参考抗体与所述表位

结合的程度,则称其“竞争性地抑制”参考抗体与所述表位的结合。竞争性抑制可通过本领域中已知的任何方法来测定,例如竞争ELISA测定。可称抗体竞争性地抑制参考抗体与给定表位的结合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0906] 如本文所用的短语“实质上相似”或“实质上相同”表示两个数值(一般来说,一个与本发明的抗体相关且另一个与参考/比较抗体相关)之间的相似性程度足够高以使得本领域的技术人员将认为所述两个值之间的差异在通过所述值(例如, K_d 值)测量的生物学特征背景下具有极小或不具有生物学和/或统计显著性。随参考/比较抗体的值变化,所述两个值之间的差异小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0907] 经分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈自然界中未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已纯化至其不再呈在自然界中发现其时的形式的程度的那些多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。在一些实施方案中,经分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是实质上纯的。

[0908] 如本文所用,“实质上纯”是指至少50%纯(即,无污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的物质。

[0909] 如本文所用的术语“免疫缀合物”、“缀合物”或“ADC”是指连接至细胞结合剂(即,抗CD123/IL-3R α 抗体或其片段)的化合物或其衍生物且由以下通式定义:A-L-C,其中C=细胞毒素,L=接头,且A=细胞结合剂(CBA),诸如抗CD123/IL-3R α 抗体或抗体片段。免疫缀合物还可由所述通式的倒序形式定义:C-L-A。

[0910] “接头”是能够以稳定共价方式将诸如本文所描述的细胞毒性剂的化合物(通常为药物)(例如类美登素或IGN(吡啶并苯并二氮杂卓)化合物)连接至诸如抗CD123/IL-3R α 抗体或其片段的细胞结合剂的任何化学部分。接头可在化合物或抗体保持活性的条件下对酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解和二硫键裂解敏感或具有实质性抗性。适合的接头是本领域中熟知的且包括例如二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。接头还包括如本文所描述且如本领域中已知的带电荷的接头和其亲水性形式。

[0911] 术语“升高的”CD123/IL-3R α 、CD123/IL-3R α 的“增加的表达”和CD123/IL-3R α 的“过度表达”是指含有升高水平的CD123表达的样品。CD123与对照值(例如在来自未患癌症的受试者的生物样品、组织或细胞、已知不表达或表达低CD123/IL-3R α 的样品或癌症、正常样品或不具有升高的CD123/IL-3R α 值的癌症中的表达水平)相比可能升高、增加或过度表达。例如,具有增加的表达的样品(例如,来自诸如白血病和淋巴瘤的血液学癌症的样品)可含有相对于对照/正常值增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍或至少50倍。

[0912] “参考样品”可用于关联和比较在本发明方法中获自测试样品的结果。参考样品可以是细胞(例如细胞系、细胞团块)或组织。“参考样品”中的CD123/IL-3R α 水平可以是CD123/IL-3R α 的绝对或相对量、量的范围、最小和/或最大量、平均量和/或中值量。“参考样品”还可充当与测试样品相比较的CD123/IL-3R α 表达的基线。“参考样品”可包括来自相同患者的先前样品或基线样品、具有已知CD123/IL-3R α 表达水平的正常参考或来自相关患者群体的具有已知CD123/IL-3R α 表达水平的参考。CD123/IL-3R α 水平还可表述为标准曲线中

的值。标准曲线是用于确定样品中CD123/IL-3R α 浓度的绘图测定数据的定量方法。在一个实施方案中,参考样品是包含纯化的CD123/IL-3R α 的抗原标准物。本发明的诊断方法可涉及测试样品中的CD123/IL-3R α 表达水平与“参考值”之间的比较。在一些实施方案中,参考值是参考样品中的CD123/IL-3R α 的表达水平。参考值可以是预定值且还可由与测试样品并行测试的参考样品(例如,对照生物样品或参考样品)测定。参考值可以是单一截止值,诸如中值或平均值或值范围,诸如置信区间。可确定不同的受试者亚组的参考值。

[0913] 术语“一级抗体”在本文中是指特异性地结合至样品中的靶蛋白抗原的抗体。一级抗体一般是ELISA测定或IHC程序中所使用的第一抗体。在一个实施方案中,一级抗体是IHC程序中所使用的唯一抗体。

[0914] 术语“二级抗体”在本文中是指特异性地结合至一级抗体,从而在一级抗体与后续试剂(如果存在)之间形成桥接或连接的抗体。二级抗体一般是免疫组织化学程序中所使用的二级抗体。

[0915] 本发明的“样品”或“生物样品”具有生物学来源,在具体实施方案中,诸如来自真核生物。在一些实施方案中,所述样品是人样品,但还可使用动物样品。用于本发明的样品的非限制性来源包括例如实体组织、活组织检查吸出物、腹水、流体提取物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤、呼吸系统、肠和泌尿生殖道的外部切片、泪液、唾液、乳汁、肿瘤、器官、细胞培养物和/或细胞培养物组分。“癌样品”是含有癌细胞的样品。所述方法可用于检查CD123/IL-3R α 的表达方面或样品状态,包括但不限于比较不同类型的细胞或组织、比较不同的发育阶段和检测或测定疾病或异常的存在和/或类型。

[0916] 如本文所用,术语“捕获试剂”是指能够结合并捕获样品中的靶分子,以使得在合适的条件下可使捕获试剂-靶分子复合物与样品的其余部分分离的试剂。在一个实施方案中,所述捕获试剂被固定。在一个实施方案中,夹心免疫测定中的捕获试剂是针对靶抗原的抗体或不同抗体的混合物。

[0917] 如本文所用,术语“可检测抗体”是指能够通过以检测手段扩增的标记直接地或通过例如经标记的另一抗体间接地进行检测的抗体。对于直接标记,通常使抗体与可通过一些手段检测的部分缀合。在一个实施方案中,所述可检测抗体是生物素化抗体。

[0918] 如本文所用,术语“检测手段”是指用于检测可检测抗体的存在的部分或技术,且包括可扩增固定标记(诸如捕获至微量滴定板上的标记)的检测剂。在一个实施方案中,检测手段是荧光检测剂,诸如亲和素或链霉亲和素。

[0919] 通常,“夹心ELISA”使用以下步骤:(1)用捕获抗体涂覆微量滴定板;(2)添加样品,且所存在的任何抗原结合至捕获抗体;(3)添加检测抗体且结合至抗原;(4)添加酶联二级抗体且结合至检测抗体;以及(5)添加底物且通过酶转化至可检测形式。

[0920] 词语“标记”当在本文中使用时是指直接地或间接地与抗体缀合以便产生“标记的”抗体的可检测化合物或组合物。标记可以是自身可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或在酶标记的情况下可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0921] “关联”是指以任何方式比较第一分析的性能和/或结果与第二分析的性能和/或结果。例如,可使用第一分析的结果来进行第二分析,和/或可使用第一分析的结果来确定是否应进行第二分析,和/或可比较第一分析的结果与第二分析的结果。在一个实施方案中,将CD123/IL-3R α 的表达增加与CD123/IL-3R α 靶向疗法的有效性的可能性增加相关联。

[0922] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中的生理状况,其中细胞群体以不受调控的细胞生长为特征。“肿瘤”和“赘瘤”是指由过度细胞生长或增殖引起且为良性(非癌性)或恶性(癌性)中的一个或多个细胞,包括癌前病变。

[0923] 癌症的实例包括淋巴瘤和白血病。可通过所述方法和试剂(例如抗CD123抗体、其抗原结合片段或其免疫缀合物)治疗和/或预防的癌症或肿瘤生成疾病的实例包括AML、CML、ALL(例如,B-ALL)、CLL、骨髓发育不良综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病、B细胞淋巴瘤包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、前体B细胞成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤和成熟B细胞赘瘤,诸如B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)包括低级、中级和高级FL、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(MALT型、结节和脾型)、毛细胞白血病(HCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯特基氏淋巴瘤、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、移植后淋巴组织增生性疾病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)和霍奇金氏白血病(HL)。

[0924] 癌症还涵盖含有具有升高的CD123/IL-3R α 表达水平的细胞的癌症。此类CD123/IL-3R α 升高的癌症包括但不限于AML、CML、ALL(例如B-ALL)和CLL。

[0925] 术语“癌细胞”、“肿瘤细胞”和语法等效物是指来源于肿瘤或癌前病变的细胞的总群体,包括构成肿瘤细胞群体的大部分的非肿瘤生成细胞和肿瘤生成干细胞(癌症干细胞)。如本文所用,当仅提及缺乏更新和分化能力的那些肿瘤细胞时,术语“肿瘤细胞”将由术语“非肿瘤生成”进行修饰,以区分来自癌症干细胞的那些肿瘤细胞。

[0926] 术语“受试者”是指任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿动物等,其将是特定治疗的受体。通常,术语“受试者”和“患者”在本文中在提及人受试者时可互换使用。

[0927] 与一个或多种其他治疗剂“组合”施用包括同时(并行)和以任何顺序连续施用。

[0928] 术语“药物制剂”是指呈允许活性成分的生物活性有效且不含对将施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外组分的形式的制剂。这种制剂可以是无菌的。

[0929] 如本文中所公开的抗体或免疫缀合物的“有效量”是足以进行特定陈述目的量。“有效量”可相对于所陈述的目的凭经验且以常规方式确定。

[0930] 术语“治疗有效量”是指可在受试者或哺乳动物中有效“治疗”疾病或病症的抗体或其他药物的量。在癌症的情况下,药物的治疗有效量可减少癌细胞数目;减小肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减缓且在某一实施方案中终止)癌细胞浸润至周围器官中;抑制(即,在一定程度上减缓且在某一实施方案中终止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状;和/或产生良好反应,诸如增加的无进展存活(PFS)、无疾病存活(DFS)或总体存活(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR)或在一些情况下稳定疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减轻、减少的进展时间(TTP)或其任何组合。参见“治疗”在本文中的定义。在药物可预防现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,其可以是细胞抑制性和/或细胞毒性的。

[0931] “预防有效量”是指在了为了实现所需预防结果而必需的剂量和时段下有效的量。通常但非必要地,因为预防剂量在疾病早期阶段之前或疾病早期阶段时用于受试者,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0932] 术语“良好应答”一般是指在受试者中引起有益状态。关于癌症治疗,所述术语是指对受试者提供治疗作用。在癌症中的积极治疗作用可以多种方式进行测量(参见W.A.Weber, J.Nucl.Med. 50:1S-10S (2009))。例如,肿瘤生长抑制、分子标志物表达、血清标志物表达和分子成像技术均可用于评估抗癌治疗剂的治疗功效。关于肿瘤生长抑制,根据NCI标准, T/C<42%是抗肿瘤活性的最低水平。T/C<10%被视为高抗肿瘤活性水平,其中T/C (%) = 处理组的中值肿瘤体积/对照组的中值肿瘤体积×100。可例如通过增加的无进展存活(PFS)、无疾病存活(DFS)或总体存活(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR)或在一些情况下稳定疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减轻、减少的进展时间(TTP)或其任何组合来评估良好应答。

[0933] PFS、DFS和OS可通过国家癌症研究所和美国食品与药品管理局针对批准新药物所设定的标准进行测量。参见Johnson等人, (2003) J.Clin.Oncol. 21(7):1404-1411。

[0934] “无进展存活”(PFS)是指自登记至疾病进展或死亡的时间。PFS一般使用卡普兰迈耶法和实体肿瘤反应评估准则(RECIST) 1.1标准来测量。一般来说,无进展存活是指患者在癌症不恶化的情况下保持活着的情形。

[0935] “完全应答”或“完全缓解”或“CR”指示肿瘤或癌症的所有病征均响应于治疗而消失。此并非始终是指癌症已被治愈。

[0936] “部分应答”或“PR”是指一个或多个肿瘤或病变的尺寸或体积或者体内癌症程度响应于治疗而减小。

[0937] “稳定疾病”是指无进展或复发的疾病。在稳定疾病中,既无足以具有部分应答的资格的肿瘤收缩,又无足以取得作为进行性疾病的资格的肿瘤增加。

[0938] “进行性疾病”是指再一个新病变的出现或肿瘤和/或现有非靶病变的明确进展。进行性疾病还可指自治疗开始起由于肿瘤质量或扩散增加所致的肿瘤生长超过20%。

[0939] “无疾病存活”(DFS)是指在治疗期间和之后患者保持无疾病的时间长度。

[0940] “总体存活”(OS)是指自患者登记至死亡或设限在知悉活着的最后日期的时间。OS包括寿命预期相较于天然或未处理的个体或患者的延长。总体存活是指患者在诸如例如距诊断或治疗的时间一年、五年等限定时段内保持活着的情形。

[0941] “化学治疗剂”是适用于治疗癌症的化学化合物,不考虑作用机制。诸如“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”或“缓解(alleviating)”或“缓解(to alleviate)”的术语是指所诊断的病理学病状或病症的治愈、减缓、减轻症状和/或停止进展的治疗测量。因此,需要治疗的那些包括已诊断患有所述病症的那些,且还可包括具有最轻残余疾病或抗性疾病或复发疾病的那些。在某些实施方案中,如果患者显示以下各项中的一项或多项,则所述受试者根据本发明的方法成功地“治疗”癌症:癌细胞数目减少或完全不存在;肿瘤尺寸减小;抑制或不存在癌细胞浸润至周围器官中,包括例如癌症扩散至软组织和骨骼中;抑制或不存在肿瘤转移;抑制或不存在肿瘤生长;减轻与特定癌症相关的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;生活质量的改善;肿瘤的肿瘤生成性、肿瘤生成频率或肿瘤生成能力降低;肿瘤中的癌症干细胞的数目或频率减少;肿瘤生成细胞分化至非肿瘤生成状态;增加的无进展存活(PFS)、无疾病存活(DFS)或总体存活(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR)、稳定疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减轻、减少的进展时间(TTP)或其任何组合。

[0942] 防治性或预防性措施是指可预防和/或减缓靶病理学病状或病症的发展的措施。因此,需要防治性或预防性措施的那些包括倾向于患有所述病症的那些和待预防所述病症的那些。

[0943] 防治性或预防性措施是指可预防和/或减缓靶病理学病状或病症的发展的治疗性措施。因此,需要防治性或预防性措施的那些包括倾向于患有所述病症的那些和待预防所述病症的那些。

[0944] 如本文所用,术语“医疗保健提供者”是指直接与活受试者(例如,人患者)相互作用且向其施用的受试者或机构。医疗保健提供者的非限制性实例包括医生、护士、技师、治疗学家、药剂师、顾问、替代医学从业者、医疗机构、医生办公室、医院、急诊室、诊所、紧急护理中心、替代医学诊所/机构以及任何其他提供以下服务的实体:一般和/或特殊治疗、评估、维护、治疗、药物治疗和/或涉及所有或任何部分的患者健康状态的建议,包括但不限于一般医学、特殊医学、手术和/或任何其他类型的治疗、评估、维护、治疗、药物治疗和/或建议。

[0945] 在一些方面中,医疗保健提供者可施用或指导另一医疗保健提供者以便施用疗法以治疗癌症。如本文所用,“施用”疗法包括对受试者开具疗法以及向受试者递送、应用或给与疗法。医疗保健提供者可实施或指导另一医疗保健提供者或患者进行以下活动:获得样品;处理样品;递交样品;接收样品;转移样品;分析或测量样品;定量样品;提供分析/测量/定量样品后所获得的结果;接收分析/测量/定量样品后所获得的结果;对分析/测量/定量一个或多个样品后所获得的结果进行比较/评分;提供来自一个或多个样品的比较/得分;获得来自一个或多个样品的比较/得分;施用疗法或治疗剂(例如,CD123/IL-3R α 结合剂);开始施用疗法;停止施用疗法;继续施用疗法;暂时中断施用疗法;增加所施用的治疗剂的量;减少所施用的治疗剂的量;继续施用一定量的治疗剂;增加施用治疗剂的频率;减少施用治疗剂的频率;维持治疗剂的相同给药频率;将一种疗法或治疗剂替换为至少另一疗法或治疗剂;将一种疗法或治疗剂与至少另一疗法或另一种治疗剂组合。这些活动可由医疗保健提供者使用电脑实施的方法(例如经由网路服务或独立式电脑系统)自动进行。

[0946] 如本文中可互换使用的“多肽”或“核酸”是指任何长度核苷酸的聚合物且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可由DNA或RNA聚合酶并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包括修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸和其类似物。如果存在,则可在组装聚合物之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可被非核苷酸组分间断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,诸如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如“加帽”;用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸;核苷酸间修饰,例如像具有不带电荷的键联的那些(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键联的那些(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等);含有悬垂部分的那些,例如像蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)、具有嵌入剂的那些(例如吡啶、补骨脂素等)、含有螯合剂的那些(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)、含有烷基化剂的那些、具有修饰的键联的那些(例如 α 端基异构核酸等)以及多核苷酸的未修饰形式。此外,一般存在于糖中的任何羟基可例如被磷酸酯基、磷酸酯基、通过标准保护基进行保护、或活化以制备与额外核苷酸的额外键联、或可与固体支持体缀合。5'和3'末端OH可被磷酸化或被1至20个碳原子的胺或有机加帽基团部分取代。其他羟基还可衍

生化至标准保护基团。多核苷酸还可含有本领域中一般已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如2'-0-甲基-、2'-0-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环状糖类类似物、 α -端基异构糖、诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物,诸如甲基核糖核苷。一个或多个磷酸二酯键联可被替代连接基团置换。这些替代连接基团包括但不限于其中磷酸酯被P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代磷酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR*、CO或CH₂(“甲乙缩醛”)的实施方案,其中各R或R独立地是H或者任选地含有醚(-O-)键联、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)的取代的或未取代的烷基(1-20C)。并非多核苷酸中的所有键联均需要相同。先前描述适用于本文中所提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0947] 术语“载体”是指构建体,其能够在宿主细胞中递送并表达一个或多个相关基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封于脂质体中的DNA或RNA表达载体和某些真核细胞,诸如生产细胞。

[0948] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换用于指任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是直链或支链的,其可包含修饰的氨基酸,且其可被非氨基酸间断。所述术语还涵盖天然或通过插入进行修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。所述定义内还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域中已知的其他修饰的多肽。应理解,由于本发明的多肽是基于抗体,所以在某些实施方案中,所述多肽可呈单链或缔合链形式存在。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是非天然存在的。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是自其他天然存在的组分纯化的。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白质是重组产生的。

[0949] 术语“相同”或“同一性”百分比在两种或更多种核酸或多肽的背景下是指当比较并比对(必要时引入空位)最大对应性时相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,从而任何保守氨基酸取代均不被视为序列同一性中的一部分。同一性百分比可使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量。本领域中已知各种算法和软件可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对。序列比对算法中的一个这种非限制性实例是Karlin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.87:2264-2268,1990中所描述、如Karlin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.90:5873-5877,1993中所改进且并入NBLAST和XBLAST程序中(Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1991)的算法。在某些实施方案中,可使用如Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997中所描述的空位BLAST;BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul等人,Methods in Enzymology 266:460-480,1996)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是可用于比对序列的另外可公开利用的软件程序。在某些实施方案中,使用GCG软件中的GAP程序测定两个核苷酸序列之间的同一性百分比(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵以及40、50、60、70或90的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重)。在某些替代实施方案中,并入Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453,1970)的算法的GCG软件包中的GAP程序可用于测定两个氨基酸序列之间的同一性百分比(例如,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5的长度权重)。或者,在某些实施方案

中,使用Myers和Miller (CABIOS, 4:11-17, 1989) 的算法测定核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。例如,可使用ALIGN程序 (2.0版) 且使用具有残基表的PAM120、空位长度罚分12和空位罚分4来测定同一性百分比。适用于通过特定比对软件进行最大比对的参数可由本领域的技术人员确定。在某些实施方案中,使用比对软件的默认参数。在某些实施方案中,第一氨基酸序列与第二序列氨基酸的同一性百分比“X”计算为 $100 \times (Y/Z)$,其中Y是在第一序列与第二序列的比对(如通过目视检查或特测序列比对程序所比对)中评分为相同匹配的氨基酸残基数且Z是第二序列中的残基总数目。如果第一序列的长度比第二序列长,则第一序列与第二序列的同一性百分比将大于第二序列与第一序列的同一性百分比。

[0950] 作为非限制性实例,在某些实施方案中,任何特定多核苷酸是否与参考序列具有某一百分比序列同一性(例如,至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同和在一些实施方案中至少95%、96%、97%、98%或99%相同)可使用Bestfit程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package,用于Unix的版本8,Genetics Computer Group,University Research Park,575Science Drive,Madison,WI 53711) 来测定。Bestfit使用Smith和Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489,1981的局部同源性算法来发现两个序列之间的最佳同源性区段。当根据本发明使用Bestfit或任何其他序列比对程序以确定特测序列是否例如与参考序列95%相同时,设定参数以便在参考核苷酸序列的全长上计算同一性百分比且允许占参考序列中核苷酸总数目的至多5%的同源性空位。

[0951] 在一些实施方案中,当比较并比对最大对应性时,如使用序列比较算法或通过目视检查所测量,本发明的两种核酸或多肽实质上相同,是指其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%和在一些实施方案中至少95%、96%、97%、98%、99%核苷酸或氨基酸残基同一性。在某些实施方案中,在至少约10、约20、约40-60个残基长度或介于其之间的任何整数值的序列区域上或在比60-80个残基长、至少约90-100个残基的区域上存在同一性,或序列在所比较的序列的全长上实质上相同,例如,诸如核苷酸序列的编码区。

[0952] “保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一氨基酸残基置换的取代。本领域中已限定具有类似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分枝侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。在某些实施方案中,本发明的多肽和抗体序列中的保守取代不消除含有所述氨基酸序列的多肽或抗体与抗原的结合,即,所述多肽或抗体所结合的CD123/IL-3R α 。鉴别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域中熟知的(参见例如Brummell等人, *Biochem.* 32:1180-1187,1993;Kobayashi等人, *Protein Eng.* 12(10):879-884,1999;和Burks等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:412-417,1997)。

[0953] 如本文所用,“P-糖蛋白1”,还称为“渗透性糖蛋白”、“P-gp或Pgp”、“多药物抗性蛋白1(MDR1)”、“ATP结合盒亚家族B成员1(ABCB1)”或“分化簇243(CD243)”是可转运多种底物跨过细胞外和细胞内膜的MDR/TAP亚家族的ABC转运蛋白。其是具有广泛底物特异性的ATP依赖性射流泵。P-gp广泛分布且表达在以下各项中:肠上皮,其中其将异型生物质(诸如毒素或药物)泵吸回肠腔中;肝细胞,其中其将其泵吸回胆管中;肾近端小管细胞,其中其将其

泵吸至尿液传导导管中;和构成血脑屏障和血睪屏障的毛细血管内皮细胞,其中其将其泵吸回毛细血管中。一些癌细胞还表达大量P-gp,由此致使这些癌症具有多药物抗性。

[0954] 如本文所用的“烷基”是指具有一至二十个碳原子的饱和直链或支链单价烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。优选地,烷基具有一至十个碳原子。更优选地,烷基具有一至四个碳原子。

[0955] 基团中的碳原子数目在本文中可通过前缀“C_{x-xx}”指定,其中x和xx是整数。例如,“C₁₋₄烷基”是具有1至4个碳原子的烷基。

[0956] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物”可互换使用。其意图包括其结构或式或任何衍生物已公开于本发明中或其结构或式或任何衍生物已以引用的方式并入的化合物。所述术语还包括本发明中所公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢物和盐(例如药学上可接受的盐)。所述术语还包括上述任一者的任何溶剂化物、水合物和多晶型物。本申请中所描述的本发明的某些方面中的“立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂化物”、“代谢物”、“盐”、“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂化物”、“水合物”或“多晶型物”的特定叙述不应解释为在本发明的其他方面中在未叙述这些其他形式使用术语“化合物”的情况下意图省略这些形式。

[0957] 术语“手性”是指具有镜像配偶体的非重叠性性质的分子,而术语“非手性”是指可叠加于其镜像配偶体上的分子。

[0958] 术语“立体异构体”是指具有相同化学组成和连接性但其原子在空间中的取向不同,从而不能通过绕单一键旋转来相互转化的化合物。

[0959] “非对映异构体”是指具有两个或更多个手性中心且其分子彼此不为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理性质,例如熔点、沸点、光谱性质和反应性。非对映异构体的混合物可在诸如结晶、电泳和色谱法的高解析度分析程序下分离。

[0960] “对映异构体”是指彼此为不可叠加的镜像的两种化合物立体异构体。

[0961] 本文中所使用的立体化学定义和惯例大体上遵循S.P.Parker编,McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 以及 Eliel, E. 和 Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本发明的化合物可含有不对称或手性中心,且因此以不同的立体异构形式存在。意图本发明化合物的所有立体异构形式(包括但不限于非对映异构体、对映异构体和阻转异构体及其混合物,诸如外消旋混合物)形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在,即其能够使平面偏振光的平面旋转。在描述光学活性化合物时,前缀D和L或R和S用于表示分子关于其手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于指定由化合物所致的平面偏振光旋转标识,其中(-)或l是指所述化合物为左旋。以(+)或d为前缀的化合物为右旋。对于指定化学结构,这些立体异构体是相同的,除了其彼此为镜像。特定立体异构体还可称为对映异构体,且此类异构体的混合物通常被称为对映异构混合物。对映异构体的50:50混合物被称为外消旋混合物或外消旋物,其可在化学反应或过程中无立体选择或立体特异性的情况下存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指缺乏光学活性的两种

对映异构种类的等摩尔混合物。

[0962] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指具有不同能量的结构异构体,其可经由低能量屏障相互转化。例如,质子互变异构体(还称为质子移变互变异构体)包括经由质子迁移而相互转化,诸如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。原子价互变异构体包括通过一些键合电子的重组而相互转化。

[0963] 术语“亚胺反应性试剂”是指能够与亚胺基团反应的试剂。亚胺反应性试剂的实例包括但不限于亚硫酸盐(H_2SO_3 、 H_2SO_2 或者 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 或 HSO_2^- 与阳离子形成的盐)、偏亚硫酸氢盐($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 与阳离子形成的盐)、单硫代磷酸盐、二硫代磷酸盐、三硫代磷酸盐和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 POS_3H_3 、 PS_4H_3 或者 PO_3S^{3-} 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 POS_3^{3-} 或 PS_4^{3-} 与阳离子形成的盐)、硫代磷酸酯($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 R^iSH 、 R^iSOH 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$)、各种胺(羟基胺(例如 NH_2OH)、肼(例如 NH_2NH_2)、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ 、 $\text{R}^i-\text{NH}-\text{R}^i$ 、 NH_2-R^i)、 $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ 、硫代硫酸盐($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与阳离子形成的盐)、二亚硫酸盐($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 与阳离子形成的盐)、二硫代磷酸盐($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ 或其与阳离子形成的盐)、异羟肟酸($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ 或与阳离子形成的盐)、酰肼($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$)、甲醛次硫酸盐($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ 或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 与阳离子形成的盐,诸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$)、糖基化核苷酸(诸如GDP-甘露糖)、氟达拉滨或其混合物,其中 R^i 和 $\text{R}^{i'}$ 各自独立地是具有1至10个碳原子的直链或支链烷基且被至少一个选自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{PO}_3\text{H}$ 的取代基取代; R^i 和 $\text{R}^{i'}$ 可进一步任选地被本文所描述的针对烷基的取代基取代; R^j 是具有1至6个碳原子的直链或支链烷基;且 R^k 是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂环基或杂芳基(优选地, R^k 是具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;更优选地, R^k 是甲基、乙基或丙基)。优选地,阳离子是单价阳离子,诸如 Na^+ 或 K^+ 。优选地,亚胺反应性试剂选自亚硫酸盐、羟基胺、脒和肼。更优选地,所述亚胺反应性试剂是 NaHSO_3 或 KHSO_3 。

[0964] 如本文所用的短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟碱酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、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、葡萄糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、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、碱金属(例如钠和钾)盐、碱土金属(例如镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子,诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐可在其结构中具有多于一个带电荷的原子。多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情形可具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个带电荷的原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0965] 如果本发明的化合物是碱,则所需药学上可接受的盐可通过本领域中可利用的任何适合的方法来制备,例如用以下各项处理游离碱:无机酸,诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等;或有机酸,诸如乙酸、马来酸、琥珀酸、杏仁酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖基酸(诸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α -羟基酸(诸如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸(诸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(诸如对甲苯

磺酸或乙磺酸)等。

[0966] 如果本发明的化合物是酸,则所需药学上可接受的盐可通过任何适合的方法来制备,例如用以下各项处理游离酸:无机或有机碱,诸如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等。适合盐的说明性实例包括但不限于来源于诸如甘氨酸和精氨酸的氨基酸、氨、伯胺、仲胺和叔胺以及诸如哌啶、吗啉和哌嗪的环胺的有机盐,和来源于钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0967] 如本文所用,术语“溶剂化物”是指进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计算量或非化学计算量的诸如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等的溶剂的化合物的化合物。通过向化合物中添加至少一摩尔当量的诸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水的羟基溶剂以溶解或水合所述亚胺部分而容易地制备化合物的溶剂化物或水合物。

[0968] “代谢物”或“分解代谢物”是通过在体内代谢或分解代谢指定化合物、其衍生物或其缀合物或其盐而产生的产物。可使用本领域中已知的常规技术来鉴别化合物、其衍生物或其缀合物的代谢物且使用诸如本文所描述的那些测试来测定其活性。此类产物可例如由所施用化合物的氧化、羟基化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱酯化、酶促裂解等产生。因此,本发明包括本发明的化合物、其衍生物或其缀合物的代谢物,包括由包括使本发明的化合物、其衍生物或其缀合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的时间段的方法产生的化合物、其衍生物或其缀合物。

[0969] 短语“药学上可接受”指示物质或组合物必须在化学上和/或在毒理学上与构成制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物相容。

[0970] 术语“保护基团”或“保护部分”是指常用于封闭或保护特定官能度,而同时使所述化合物、其衍生物或其缀合物上的其他官能团反应的取代基。例如,“胺保护基团”或“氨基保护部分”是与氨基附接的封闭或保护化合物中的氨基官能度的取代基。此类基团是本领域中熟知的(参见例如P. Wuts和T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第7章, J. Wiley&Sons, NJ)且例示为氨基甲酸酯,诸如氨基甲酸甲酯和氨基甲酸乙酯、Fmoc、取代的氨基甲酸乙酯、通过1,6-β-消除(还称为“自牺牲”)而裂解的氨基甲酸酯、脲、酰胺、肽、烷基和芳基衍生物。适合的氨基保护基团包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基(CBZ)和9-苄基亚甲氧基羰基(Fmoc)。关于保护基团及其用途的一般描述,参见P. G. M. Wuts&T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley&Sons, New York, 2007。

[0971] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,氨基酸由 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{OH}$ 表示,其中 R^{aa} 和 $\text{R}^{\text{aa}'}$ 各自独立地是H、具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基或杂环基,或 R^{aa} 与N末端氮原子可共同形成杂环状环(例如,如在脯氨酸中)。术语“氨基酸残基”是指当自氨基酸的胺和/或羧基端移除一个氢原子时的相应残基,诸如 $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{O-}$ 。

[0972] 术语“阳离子”是指具有正电荷的离子。阳离子可以是单价(例如 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 等)、二价(例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)或多价(例如 Al^{3+} 等)。优选地,阳离子是单价。

[0973] 术语“反应性酯基”是指可容易地与氨基反应以形成酰胺键的酯基。示例性反应性酯基包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基酞酰亚胺酯、N-羟基-磺基-琥珀酰亚胺酯、

对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物,其中所述衍生物促进酰胺键形成。在某些实施方案中,反应性酯基是N-羟基琥珀酰亚胺酯或N-羟基-磺基-琥珀酰亚胺酯。

[0974] 术语“胺反应性基团”是指可与氨基反应以形成共价键的基团。示例性胺反应性基团包括但不限于反应性酯基、酰基卤化物、磺酰基卤化物、酰亚胺酯或反应性硫酯基。在某些实施方案中,胺反应性基团是反应性酯基。在一个实施方案中,胺反应性基团是N-羟基琥珀酰亚胺酯或N-羟基-磺基-琥珀酰亚胺酯。

[0975] 术语“硫醇反应性基团”是指可与硫醇(-SH)基团反应以形成共价键的基团。示例性硫醇反应性基团包括但不限于马来酰亚胺、卤代乙酰基、卤代乙酰胺、乙烯砜、乙烯基磺酰胺或乙烯基吡啶。在一个实施方案中,硫醇反应性基团是马来酰亚胺。

[0976] 除非上下文另外清楚指示,否则如本公开和权利要求中所使用,单数形式“一(个)”、“一(种)”和“所述”包括复数形式。

[0977] 应理解,在本文中措辞“包含”描述实施方案的情况下,还提供以“由...组成”和/或“基本上由...组成”加以描述的在其他方面类似的实施方案。

[0978] 如本文中在诸如“A和/或B”的短语中所使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”和“B”。同样,如本文中在诸如“A、B和/或C”的短语中所使用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0979] 抗体、化合物和免疫缀合物命名法

[0980] 如本文所用,用于抗CD123抗体、细胞毒性化合物及其免疫缀合物的命名法一般采用以下含义。

[0981] CD123-3、CD123-6和CD123-14(或CD123 Mu-3、CD123 Mu-6和CD123 Mu-14;或muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14)是三种鼠类抗CD123单克隆抗体。重链和轻链的CDR1-3序列(VH-CDR1-3和VL-CDR1-3)与相关SEQ ID NO:1-25一起提供于表1和表2中。重链可变区(HCVR)序列与相关SEQ ID NO:26、28和30一起提供于表3A中。其轻链可变区(LCVR)序列与相关SEQ ID NO:27、29和31一起提供于表4A中。鼠类抗体的全长重链(HC)序列提供于表5中(SEQ ID NO:42、44和46),且鼠类抗体的全长轻链(LC)序列提供于表6中(SEQ ID NO:43、45和47)。

[0982] chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14是具有鼠类重链和轻链可变区以及人恒定区序列的相应鼠类-人嵌合抗体。例如,嵌合抗体chCD123-6由分别具有SEQ ID NO:28和29的小鼠HCVR和LCVR连同分别用于重链和轻链的人IgG1和κ恒定序列构成。参见实施例3。

[0983] huCD123-3、huCD123-6和huCD123-14是相应人源化抗体。当通过6个相应鼠类CDR区(HC和LC CDR1-3)的CDR移植来进行人源化时,字母“G”紧随克隆名称之后,其后进而是指定人轻链和重链可变区序列的起点的型式编号。因此,huCD123-6Gv4.6是指基于将来自相应muCDR123-6抗体的6个CDR区移植(“G”)至人轻链可变区Gv4和重链可变区Gv6上的人源化CD123抗体。类似地,-Gv4.7包含人轻链可变区Gv4和重链可变区Gv7;且-Gv1.1包含人轻链可变区Gv1和重链可变区Gv1。

[0984] 三个HCVR序列huCD123-6Gv1、huCD123-Gv6和huCD123-Gv7提供于表3A中(SEQ ID NO:32和34,其中SEQ ID NO:34表示huCD123-Gv6和huCD123-Gv7,因为其仅在第2个残基Xaa上有所不同),且其DNA编码序列提供于表3B中(SEQ ID NO:62、64和66)。三个全长HC序列

huCD123-6Gv1、huCD123-Gv6和huCD123-Gv7提供于表5中 (SEQ ID NO:48和50,其中SEQ ID NO:50表示全长huCD123-Gv6和huCD123-Gv7,因为其仅在第2个残基Xaa上有所不同)。

[0985] 两个LCVR序列huCD123-6Gv1和huCD123-Gv4提供于表4A中 (SEQ ID NO:33和35), 且其DNA编码序列提供于表4B中 (SEQ ID NO:63和65)。两个全长LC序列huCD123-6Gv1和huCD123-Gv4提供于表6中 (SEQ ID NO:49和51)。

[0986] 当通过表面重构进行人源化时,表面重构的重链序列被命名为“rh”紧随鼠类CD123抗体克隆编号之后,且进一步命名为表面重构序列的两个型式v1.0或v1.1中的一个。因此,huCD123-6rhv1.0和huCD123-rhv1.1是具有对应于muCD123-6抗体的CDR区的表面重构的重链序列,其中型式名称分别为1.0和1.1。参见表3A中的HCVR SEQ ID NO:39和40和表3B中的SEQ ID NO:68和69。还参见表5中的全长HC SEQ ID NO:59和60。

[0987] 同样,表面重构的轻链序列的唯一型式huCD123-6r1v1.0具有表4A中的LCVR SEQ ID NO:41和表6中的全长LC SEQ ID NO:61。

[0988] 具有huCD123-6rhv1.0和huCD123-6r1v1.0的表面重构抗体是huCD123-6Rv1.0;且具有huCD123-6rhv1.1和huCD123-6r1v1.0的表面重构抗体是huCD123-6Rv1.1。

[0989] NTS2或简称“S2”是指在重链N末端处具有工程化Ser的抗体。huCD123-6Gv6/7的S2变体具有表3A中的HCVR序列SEQ ID NO:38和表5中的全长HC蛋白序列SEQ ID NO:53。

[0990] 同样,NTS3或简称“S3”是指在轻链N末端处具有工程化Ser的抗体。huCD123-6Gv4的S3变体具有表4A中的LCVR序列SEQ ID NO:37和表6中的全长LC蛋白序列SEQ ID NO:58。

[0991] 包含工程化N末端Ser的抗体 (S2或S3) 可经由氧化的N末端Ser或经由“常规”Lys键联与细胞毒性药物/剂缀合。如果药物键联是经由氧化的N末端Ser,则缀合物名称含有“SeriMab”名称。如果药物键联是经由Lys,则缀合物名称不含有SeriMab(但存在S2或S3名称以指示N末端处存在工程化的Ser)。基于细胞毒素反应性基团,特定键联类型还将是显而易见的。例如,huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8是指D8与人源化CD123抗体huCD123-6Gv4.7S3之间通过轻链上的氧化N末端Ser而形成的缀合物。人源化CD123抗体具有移植鼠类CD123-6 CDR区、人LC Gv4和重链Gv7,且轻链的N末端具有工程化的Ser (S3)。相比之下,huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1是指D1与相同人源化CD123抗体huCD123-6Gv4.7S3之间通过Lys键联经由磺化SPDB接头而形成的缀合物。

[0992] 在某些实施方案中,如果轻链和重链N末端均含有工程化的Ser,则“S2S3”或“S2S3-SeriMab”可出现在抗体名称中。

[0993] 本发明的某些抗体在重链CH3结构域中在对应于SEQ ID NO:54中第5个至最后一个Cys的相同Kabat位置处具有工程化的Cys。此类HC或包含此类HC的抗体含有名称CysMab。因此huCD123-6Gv4.6-CysMab是人源化CD123抗体,其具有移植的muCD123-6 CDR区,基于人轻链Gv4和重链Gv6序列,其中工程化的Cys位于HC CH3区中对应于SEQ ID NO:54中第5个至最后一个Cys的位置处。类似地,其重链序列是huCD123-6Gv6-CysMab。另外,huCD123-6Gv4.6S2-CysMab否则将是相同的,但在重链的N末端具有工程化的Ser,且其重链序列是huCD123-6Gv6S2-CysMab。

[0994] 以上所描述的表面重构的抗体可进一步工程化以在轻链(表面重构的抗体的S3变体)或重链(表面重构的抗体的S2变体)或两者处含有N末端Ser(参见下文)。或者或另外,表面重构的抗体可在重链CH3结构域中在对应于SEQ ID NO:54中第5个至最后一个Cys的相同

Kabat位置处具有工程化的Cys(表面重构的抗体的CysMab型式)。表面重构的抗体可具有工程化的Cys和N末端Ser两者。

[0995] 然而,在这种CysMab与细胞毒素之间所形成的缀合物中,至少在理论上,细胞毒素可通过Cys或通过常规Lys连接至CysMab。然而,如本文所用而不存在特定指示,具有CysMab名称的缀合物是指CysMab与细胞毒素之间通过Cys键联(而非Lys键联)形成的缀合物。基于细胞毒素反应性基团,特定键联类型还将是显而易见的。

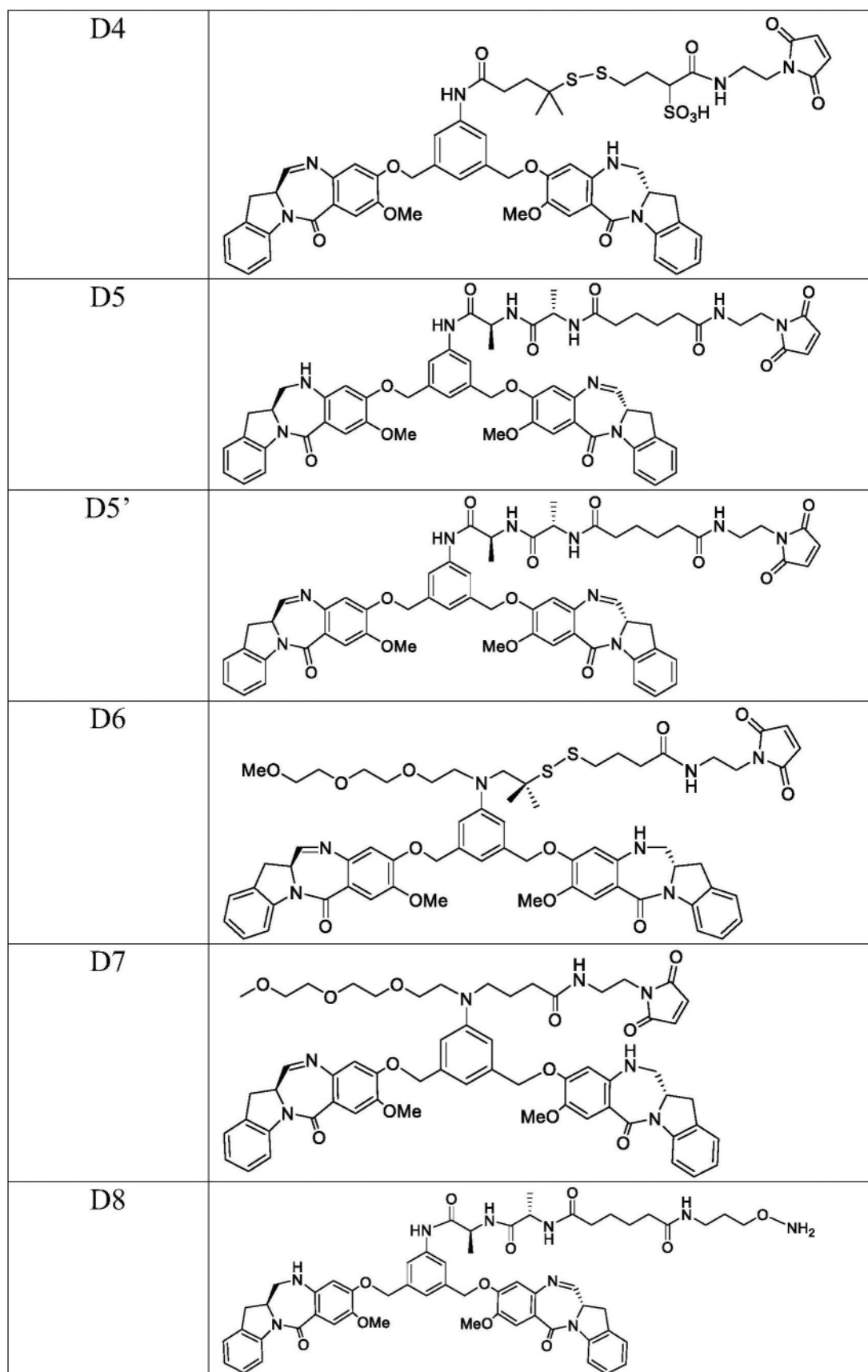
[0996] 还涵盖以上一般命名法的其他变化形式或组合且对本领域的技术人员将容易显而易见。例如,huCD123-6Rv1.1-CysMab是huCD123-6的表面重构的型式(v1.1),其具有位于HC CH3区域中对应于SEQ ID NO:54中第5个至最后一个Cys的位置处的工程化的Cys。

[0997] 本发明的抗体或其抗原结合片段可通过具有Lys侧链氨基、Cys侧链硫醇基或氧化N末端Ser/Thr的键联与某些细胞毒性剂缀合。以下出于说明的目的列出本说明书(包括实施例)中所描述的某些代表性(非限制性)细胞毒性剂。注意:在某些实施例中,大部分化合物,诸如D1、D2、D4、DGN462、D3、D6等,可在吲哚啉并苯并二氮杂卓单体中的一个处磺化(此处未显示,但参见图17化合物sD1、图15化合物sDGN462和图16化合物sD8)。对于化合物D5',两个吲哚啉并苯并二氮杂卓单体均可磺化。

[0998]

化合物编号	结构
D1	
D2	
DGN462	
D3	

[0999]




```

1   GTCAGGTTCA TGGTTACGAA GCTGCTGACC CCAGGATCCC AGCCCCGTGGG AGAGAAGGGG
61  GTCTCTGACA GCCCCCACCC CTCCCCACTG CCAGATCCTT ATGGGGTCTG AGTTTCAGGG
121 GTGGGGCCCC AGCTGGAGGT TATAAAACAG CTCAATCGGG GAGTACAACC TTCGGTTTCT
181 CTTGGGGGAA AGCTGCTTTC AGCGCACACG GGAAGATATC AGAAACATCC TAGGATCAGG
241 ACACCCCGA TCTTCTCAAC TGGAAACCAG AAGGCTGTTT CTTCACACA GTACTTTGAT
301 CTCCATTTAA GCAGGCACCT CTGTCCTGCG TTCCGGAGCT GCGTCCCCGA TGGTCTCTCT
361 TTGGCTCAG CTGCTCCTGA TCGCCCTGCC CTGTCTCCTG CAAACGAAGG AAGATCCAAA
421 CCCACCAATC ACGAACCTAA GGATGAAAGC AAAGGCTCAG CAGTTGACCT GGGACCTTAA
481 CAGAAATGTG ACCGATATCG AGTGTGTTAA AGACGCCGAC TATTCTATGC CGGCAGTGAA
541 CAATAGCTAT TGCCAGTTTG GAGCAATTTT CTTATGTGAA GTGACCAACT ACACCGTCCG
601 AGTGGCCAAC CCACCATTCT CCACGTGGAT CCTCTTCCCT GAGAACAGTG GGAAGCCTTG
661 GGCAGGTGCG GAGAATCTGA CCTGCTGGAT TCATGACGTG GATTTCTTGA GCTGCAGCTG
721 GCGGGTAGGC CCGGGGGCCC CCGCGGACGT CCAGTACGAC CTGTACTTGA ACGTTGCCAA
781 CAGGCGTCAA CAGTACGAGT GTCTTACTA CAAAACGGAT GCTCAGGGAA CACGTATCGG
841 GTGTCGTTTC GATGACATCT CTCGACTCTC CAGCGGTTCT CAAAGTCCC ACATCCTGGT
[1011] 901 GCGGGGCAGG AGCGCAGCCT TCGGTATCCC CTGCACAGAT AAGTTTGTG TCTTTTACA
961 GATTGAGATA TTAACCTCCAC CCAACATGAC TGCAAAGTGT AATAAGACAC ATTCCTTTAT
1021 GCATGGAAA ATGAGAAGTC ATTTCAATCG CAAATTTGCG TATGAGCTTC AGATACAAAA
1081 GAGAATGCAG CCTGTAATCA CAGAACAGGT CAGAGACAGA ACCTCTTCC AGTCACTCAA
1141 TCCTGGAACG TACACAGTAC AAATAAGAGC CCGGGAAAGA GTGTATGAAT TCTTGAGCGC
1201 CTGGAGCACC CCCCAGCGCT TCGAGTGCGA CCAGGAGGAG GGCGCAAACA CACGTGCCTG
1261 GCGGACGTCG CTGCTGATCG CGCTGGGGAC GCTGCTGGCC CTGGTCTGTG TCTTCGTGAT
1321 CTGCAGAAGG TATCTGGTGA TGCAGAGACT CTTTCCCCGC ATCCCTACA TGAAAGACCC
1381 CATCGGTGAC AGCTTCCAAA ACGACAAGCT GGTGGTCTGG GAGCGGGCA AAGCCGGCCT

1441 GGAGGAGTGT CTGGTACTG AAGTACAGGT CGTGCAGAAA ACTTGAGACT GGGGTTTCAGG
1501 GCTTGTGGGG GTCTGCCTCA ATCTCCCTGG CCGGGCCAGG CGCCTGCACA GACTGGCTGC
1561 TGGACCTGCG CACGCAGCCC AGGAATGGAC ATTCTAACG GGTGGTGGGC ATGGGAGATG
1621 CCTGTGTAAT TTCGTCCGAA GCTGCCAGGA AGAAGAACAG AACTTTGTGT GTTTATTTCA
1681 TGATAAAGTG ATTTTTTTTT TTTTAACCCA AAA (SEQ ID NO: 52)

```

[1012] 来自其他非人物种的CD123/IL-3 α 的蛋白质和核酸序列可使用本领域中已知的序列搜索工具(诸如NCBI BLASTp或BLASTn)且分别使用以上蛋白质和核酸序列作为查询序列而自诸如GenBank的公共数据库中容易地检索。

[1013] 可使用许多本领域认可的序列对比工具,诸如本文中和以上所描述的那些中的任一种对来自非人物种的此类序列与人序列进行比对,以使得可容易地获得“对应于”任何指定人序列或序列区域的任何氨基酸残基或核苷酸。

[1014] 因此,本发明的一个方面提供一种抗体或其抗原结合片段,其:(a)结合人CD123抗原的氨基酸101至346内的表位;且(b)在抗原阳性TF-1细胞中抑制IL3依赖性增殖。

[1015] 在一些实施方案中,抗CD123/IL-3 α 抗体或其抗原结合片段可特异性地结合SEQ ID NO:36的表位。在某些实施方案中,所述表位在对应于人CD123/IL-3 α 的残基101-346的区域内。在某些实施方案中,所述表位在对应于SEQ ID NO:36的残基101-204的区域内。在某些其他实施方案中,所述表位在对应于SEQ ID NO:36的残基205-346的区域内。在某些实施方案中,所述表位不在对应于人CD123/IL-3 α 的残基1-100的区域内。

[1016] 在某些实施方案中,CD123/IL-3 α 结合剂(例如抗体)抑制IL3依赖性信号传导,诸如CD123阳性TF-1细胞的IL3依赖性增殖。尽管不希望受任何特定理论束缚,但本发明的CD123/IL-3 α 结合剂(例如抗体)结合CD123,诸如在对应于人CD123/IL-3 α 的残基101-346(例如残基101-204或205-346)的CD123区域内,且防止、减少、削弱或以其他方式抑制CD123与IL-3配体之间的生产性结合和/或CD123与共同 β 链CD131之间的生产性结合,从而减少或消除IL-3依赖性信号传导。

[1017] 在相关方面中,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段,其:(a)结合人CD123抗原

的氨基酸1至100内的表位,且(b)抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖,其中 IC_{50} 值为0.1nM或更小(例如,0.08nM、0.05nM、0.03nM)。

[1018] 在某些实施方案中,由本发明的CD123/IL-3R α 结合剂(例如抗体)结合可抑制(例如优先抑制)白血病干细胞(LSC)、白血病祖细胞(LP)或白血病母细胞的增殖,但实质上不抑制正常造血干细胞(HSC)的增殖。

[1019] 抑制细胞增殖可使用本领域中已知的任何标准测定来进行,包括但不限于流式细胞术。例如,可使用流式细胞术基于细胞表面标志物的表达来分离正常HSC、LSC、LP和白血病母细胞,且在与测试剂一起孵育之后,可定量测量存活或剩余细胞的相对数目并比较。

[1020] 还可使用体外效力测定在原代癌细胞,诸如原代AML细胞上测定与正常HSC相比对LSC、LP或白血病原始细胞的细胞增殖的抑制。例如,可将AML细胞(或含有正常HSC的正常人骨髓样品)暴露于不同浓度的主题抗CD123抗体、其抗原结合片段、其免疫缀合物或包含所述抗体或抗原结合片段的多肽,持续24小时。非靶向(同型匹配)抗体或免疫缀合物(ADC)对照也可用于所述测定中。可将样品分至短期液体培养(STLC)测定以测量对LSC、LP或白血病原始细胞的细胞毒性;和长期液体培养(LTLC)测定以测量对LSC和正常HSC的作用。STLC可用于在细胞中测量群落形成单位,例如,在接种于半固体MethoCult H4230培养基(Stemcell technologies)中后10至14天。可在添加生长因子以便长期培养5至7周的情况下类似地进行LTLC测定。在两种测定中,可对群落进行计数以测定群落形成单位/最初接种的细胞数。可使用PCR或FISH或两者进一步分析LTLC群落中癌症(例如AML)分子标志物的存在。

[1021] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在0.3nM或更低的解离常数(K_d)下结合人CD123抗原阳性细胞。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在介于0.05与0.3nM之间、介于0.05与0.2nM之间或介于0.05与0.1nM之间、或介于0.01nM与0.3nM之间、或介于0.01nM与0.2nM之间、或介于0.01nM与0.1nM之间的 K_d 下结合人CD123。

[1022] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合食蟹猴CD123。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在介于0.05与0.3nM之间、或介于0.05与0.2nM之间或介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合食蟹猴CD123。

[1023] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在基本上类似的结合亲和力下结合人和食蟹猴CD123。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在介于0.05与0.3nM之间、或介于0.05与0.2nM之间或介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合人和食蟹猴CD123。

[1024] 在某些实施方案中,所述 K_d 值是基于基于细胞的结合测定。在某些实施方案中,所述 K_d 值通过流式细胞术进行测量。在某些实施方案中,所述 K_d 值通过表面等离子体共振(诸如通过使用BIOCORE™表面等离子体共振系统)进行测量。在某些实施方案中,所述 K_d 值通过放射免疫测定(RIA)进行测量。在某些实施方案中,所述 K_d 通过任何其他本领域认可的方法进行测量。

[1025] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在0.5nM或更低的浓度下抑制抗原阳性TF-1细胞中至少50%的IL3依赖性增殖。

[1026] 在某些实施方案中,所述CD123/IL-3R α 结合剂是CD123/IL-3R α 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),各可变区包含三个CDR区(例如,HCVR的CDR1-CDR3和LCVR的CDR1-CDR3),其中HCVR和LCVR的复合CDR是以下表1和表2中所提供的

序列中的任一者。

[1027] 表1重链可变区CDR氨基酸序列

抗体	Alt 名称	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
CD123-3	CD123Mu-3	SYVMH (SEQ ID NO:1)	YIKPYKDGTK (SEQ ID NO:2)	EGENGYDDA MDY (SEQ ID NO:4)
			YIKPYKDGTKYNEK FKG (Kabat) (SEQ ID NO:3)	
CD123-6	CD123Mu-6	SSIMH (SEQ ID NO:5)	YIKPYNDGTK 鼠类+移植 (SEQ ID NO:6)	EGGNDYYDT MDY (SEQ ID NO:11)
			YIRPYNDGTR (表面重构的型式 1.0) (SEQ ID NO:7)	
			YIKPYNDGTKYNEK FKG (Kabat 鼠类+移植) (SEQ ID NO:8)	
[1029]			YIRPYNDGTRYNQK FQG (Kabat -表面重构的 v1.0) (SEQ ID NO:9)	
			YIKPYNDGTKYNQK FQG (Kabat -表面重构的 v1.1) (SEQ ID NO:10)	
CD123-14	CD123Mu-14	NYAMS (SEQ ID NO:12)	TINSGGSFTY (SEQ ID NO:13)	QSEAYYGVD KRT (SEQ ID NO:15) QSEAYYGVD KRTWFAY (SEQ ID NO:70)
			TINSGGSFTYYPDSV KG (Kabat) (SEQ ID NO:14)	

[1030] 表2轻链可变区CDR氨基酸序列

	抗体	Alt 名称	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
[1031]	CD123-3	CD123Mu-3	KASQDINKYI A (SEQ ID NO:16)	YTSTLQP (SEQ ID NO:17)	LQYDNLLYT (SEQ ID NO:18)
	CD123-6	CD123Mu-6	KASQDINSYLS (SEQ ID NO:19)	RVNRLVD (SEQ ID NO:21)	LQYDAFPYT (SEQ ID NO:22)
[1032]			RASQDINSYLS 人源化 (SEQ ID NO:20) RASQDINSYL A (SEQ ID NO:72)	RVNRLVS (SEQ ID NO:71)	
	CD123-14	CD123Mu-1 4	RASQSVGTSIH (SEQ ID NO:23)	YASESIS (SEQ ID NO:24)	QQSKSWPLT (SEQ ID NO:25)

[1033] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2-3、6-10和13-14,且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11、15和70;和b)至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19-20、23和72;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21、24和71;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。

[1034] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2-3、6-10和13-14,且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11和15;和b)至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19-20和23;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;且任选地,CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。

[1035] 在某些实施方案中,保守氨基酸取代包括由Arg取代CDR中的Lys(诸如SEQ ID NO:6和7、8和9以及19和20中的Lys对Arg取代)。在某些实施方案中,所述抗体是包含小鼠CDR区的CDR移植人源化抗体,且其中所述抗体的一个或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)个重链和/或轻链框架区维尔尼区残基具有小鼠起源。

[1036] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:1中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:2或3中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:4中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和2)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列的

CDR1、具有SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:2。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:3。

[1037] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:6、7、8、9或10中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和2) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:19或20中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:6,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:7,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:8,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:9,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:10,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:6,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:20。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:7,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:20。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:8,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:20。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:9,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:20。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:10,且轻链可变区的CDR1是SEQ ID NO:20。对于以上重链可变区CDR2与轻链可变区CDR1的各成对组合,重链可变区CDR1和CDR3分别是SEQ ID NO:5和11,且轻链可变区CDR2和CDR3分别是SEQ ID NO:21和22。

[1038] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:13或14中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列的CDR3;和2) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:23中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:24中所阐述的氨基酸序列的CDR2,和任选地,具有SEQ ID NO:25中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:13。在某些实施方案中,重链可变区的CDR2是SEQ ID NO:14。

[1039] 在某些实施方案中,来自一种抗体的轻链和重链的CDR1序列(诸如SEQ ID NO:5和19)可与来自另一种抗体的轻链和重链的CDR2序列(诸如SEQ ID NO:2和17)组合,且任选地可与来自所述抗体(例如,SEQ ID NO:4和18,或11和22)或另一种抗体(例如SEQ ID NO:15和25)的轻链和重链的CDR3序列组合。本文中涵盖基于表1中的SEQ ID NO:1-25的所有可能组合,尤其是关于相同抗体编号(例如所有六个轻链和重链CDR来自CD123-3或来自CD123-6或来自CD123-14)的那些组合,而不排他性地枚举所有特定组合。

[1040] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段在以上任何一个或多个CDR序列中的1、2或3个连续残基上具有保守氨基酸取代。即,在一些实施方案中,主题抗体及其抗原结合片段可在SEQ ID NO:1-25中的任何一个或多个中的1、2或3个连续残基上具有保守氨基酸取代。

[1041] 在某些实施方案中,所述CD123/IL-3R α 结合剂是CD123/IL-3R α 抗体或其抗原结合

片段,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR和LCVR是以下表3A和表4A中所提供的序列中的任一者。编码HCVR和LCVR的所选相应核酸序列在表3B和表4B中。

[1042] 表3A重链可变区氨基酸序列

抗体	Alt 名称	VH 氨基酸序列(SEQ ID NO)
CD123-3	CD123Mu-3	EFQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSY VMHWMKQKPGQGLEWIGYIKPYKDGTKYNE KFKGKATLISDKPSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC AREGENGYDAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:26)
CD123-6	CD123Mu-6	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTSSI MHWMKQKPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKF K GKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCA REGGNDYYDTMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:28)
CD123-14	CD123Mu-14	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYA MSWVRQNSEKRLEWVATINSGGSFTYYPDSVK GRFTISRDNAKDSLQMSLNSLSEDTAMYYCA RQSEAYYGDKRTWFAYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:30)
huCD123-6 Gv1		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYGFTSS IMHWVRQAPGQGLEWMGYIKPYNDGTYNE KFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:32)
huCD123-6 Gv6/7		QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSSI MHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKF KGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA REGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:34)
huCD123-6 Gv6/7-NTS2		SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSSI MHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKF KGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA REGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:38)
huCD123-6r hv1.0		QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSS IMHWMKQKPGQGLEWIGYIRPYNDGTRYNQK FQGKATLTSDRSSSTANMELNSLTSEDSAVYYC AREGGNDYYDTMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:39)
huCD123-6r hv1.1		QFQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSI MHWMKQKPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNQK FQGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYC AREGGNDYYDTMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:40)

[1045] *在以上所有序列中,其中从N末端的第2个残基是X(或Xaa),例如SEQ ID NO:34和38,对于Gv6序列,X是F;而对于Gv7序列,X是V。

[1046] 表3B所选重链可变区核酸序列

[1047]

抗体	VH DNA 序列 (SEQ ID NO)
huCD123-6 V _H Gv1	AAGCTTGCCACCATGGGATGGTCCTGCATTATCCTGTT CCTTGTAGCAACTGCAACAGGAGTCCACAGCCAGGTC CAACTGGTGCAGTCCGGGGCCGAGGTGAAGAAACCA GGCGCATCCGTGAAGGTGAGCTGTAAAGCCAGCGGCT ATGGTTTTACCAGCTCAATCATGCACTGGGTCAGGCAA GCCCCAGGACAGGGTCTCGAATGGATGGGATACATTA AGCCTTACAATGATGGTACAAAATATAATGAAAAATT AAGGGTCGTGTTACCATGACAAGGGATACATCAACTA GCACTGTCTATATGGAAGTGTGAGCTCTCTCAGGTCCGAG GATACTGCAGTATATTACTGCGCCCGGGAGGGAGGCAA CGACTATTACGACACCATGGACTATTGGGGGCAGGGC ACACTGGTTACTGTATCCAGCGCCTCTACTAAGGGCCC (SEQ ID NO:62)
huCD123-6 V _H Gv6	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTGTT CCTCGTTGCAACAGCAACTGGCGTGCACAGCCAGTTC CAGCTTGTGCAGAGTGGCGCCGAAGTCAAGAAACCA GGCGCTAGTGTCAAGGTGTCCTGTAAAGGCATCAGGCT ACATCTTTACCAGCTCCATCATGCATTGGGTCAGACAG GCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTATATCAA

[1048]

	GCCATACAATGATGGGACAAAATACAATGAAAAGTTTA AAGGGCGAGCCACTCTGACATCTGATCGGAGTACAAG CACTGCCTACATGGAATTGAGCTCACTGCGGTCCGAA GACTGCTGTGTATTATTGCGCTCGGGAGGGAGGGA ACGACTACTACGATAACCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTTACCGTCAGCAGCGCTTCCACTAAGGGC CC (SEQ ID NO:64)
huCD123-6 V _H Gv7	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTGTT CCTCGTTGCAACAGCAACTGGCGTGCACAGCCAGGTC CAACTTGTGCAGAGTGGCGCCGAAGTCAAGAAACCA GGCGTAGTGTCAAGGTGTCCTGTAAGGCATCAGGCT ACATCTTACCAGCTCCATCATGCATTGGGTCAGACAG GCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTATATCAA GCCATACAATGATGGGACAAAATACAATGAAAAGTTTA AAGGGCGAGCCACTCTGACATCTGATCGGAGTACAAG CACTGCCTACATGGAATTGAGCTCACTGCGGTCCGAA GACTGCTGTGTATTATTGCGCTCGGGAGGGAGGGA ACGACTACTACGATAACCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTTACCGTCAGCAGCGCTTCCACTAAGGGC CC (SEQ ID NO:66)
huCD123-6 V _H rhv1.0	AAGCTTGCCACCATGGGGTGGAGCTGCATTATTCTGTT CTTGGTCGCCACCGCAACTGGCGTCCACTCTCAGGTC CAGCTCGTCCAGTCTGGGGCAGAAGTGGTCAAGCCCG GTGCATCTGTGAAAATGTCCTGCAAAGCTAGCGGGTAT ACATTCACATCTAGTATCATGCATTGGATGAAACAGAA GCCTGGCCAGGGTCTGGAGTGGATAGGATATATCAGGC CTTACAACGATGGCACTCGATAACAACAAAAGTTCCA GGGTAAAGCTACACTGACCTCAGACCGCTCAAGCAGT ACAGCAAACATGGAAGTGAACAGTCTTACCTCTGAGG ACAGTGCCGTTTACTATTGCGCCAGGGAGGGTGGCAA TGACTACTATGATACTATGGACTACTGGGGACAGGGTA CCTCTGTAACAGTTTCAAGCGCCAGCACTAAGGGCCC (SEQ ID NO:68)
huCD123-6 V _H rhv1.1	AAGCTTGCCACCATGGGCTGGTCTTGTATTATTCTGTTT CTGGTGGCCACCGCAACAGGCGTTCACAGTCAATTCC AGCTGGTCCAGTCCGGCGCCGAGGTTGTCAAACCTGG TGCCAGCGTAAAGATGTCTTGCAAAGCTAGCGGCTATA CTTCACTTCTTCAATTATGCACTGGATGAAGCAAAAG CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATTAAC CTTATAACGACGGCACAAAGTACAATCAGAAGTTCCA AGGAAAGGCAACCCTGACCTCAGACAAGTCTTCATCC ACTGCCAACATGGAAGTAAATAGTCTTACCTCTGAGGA TTCCGCTGTCTATTATTGCGCTCGGGAGGGGGGGAACG ACTATTACGACACCATGGACTACTGGGGACAGGGCAC CAGTGTTACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC (SEQ ID NO:69)

[1049] *粗体碱基标记成熟可变区氨基酸序列的第一个密码子

[1050] 表4A轻链可变区氨基酸序列

抗体	Alt 名称	VL 氨基酸序列(SEQ ID NO)
CD123-3		DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIA WYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSG RDYSFISISNLEPEDIATYYCLQYDNLlyTFGGGT KLELKR(SEQ ID NO:27)
CD123-6		DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLS WFQQKPGKSPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSG QDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDAFPYTFGGGT KLEIKR(SEQ ID NO:29)
CD123-14		DILLTQSPAILSVPSPGTRVFSFCRASQSVGTSIHWY QQRPNGFPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF LNINSVESEDIADYYCQQSKSWPLTFGAGTKLEL KR(SEQ ID NO:31)
[1051] huCD123-6 Gv1		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLA WFQQKPGKAPKSLIYRVNRLVSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGTK VEIKR (SEQ ID NO:33)
huCD123-6 Gv4		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLS WFQQKPGKAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGS GNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQG TKVEIKR (SEQ ID NO:35)
huCD123-6 Gv4-NTS3		SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSW FQQKPGKAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGN DYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGTK VEIKR (SEQ ID NO:37)
huCD123-6 rlv1.0		DIQMTQSPSSMSASVGERVTITCRASQDINSYLS WFQQKPGKSPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSG QDYSLTISSLEPEDMGIYYCLQYDAFPYTFGQGT KLEIKR (SEQ ID NO:41)

[1052] 表4B所选轻链可变区核酸序列

抗体	Alt 名称	VL DNA 序列(SEQ ID NO)
[1053] huCD123-6 V _L Gv1		GAATTCGCCACCATGGGTTGGTCTTGTATAAT CCTGTTCTGGTCGCTACCGCAACAGGGGTT CACTCAGACATCCAGATGACCCAGAGTCCC TCTTCTCTGAGCGCTTCTGTTGGGGACCGGG TGACCATCACCTGTCGGGCATCCCAGGACAT CAATTCTTACCTGGCTTGGTTCCAGCAGAAG CCCGGAAAAGCCCCTAAATCTCTCATTTACC GGGTAAACCGTTTGGTCTCCGGAGTGCCTTC AAGGTTTAGTGGATCTGGATCAGGTACAGAC TTCACCTCACCATTAAGCAGCCTGCAACCAG AGGATTCGCAACTTACTACTGCTTGCAGTA TGACGCCTTCCCTTACACTTTCGGGCAGGGG ACCAAAGTGGAATAAAGCGTACG (SEQ ID

[1054]	huCD123-6 V _L Gv4	NO:63) GAATTCGCCACCATGGGTTGGTCCTGTATCA TCCTCTTTCTGGTGGCAACTGCAACCGGCGT CCATAGCGACATTCAGATGACACAGTCTCC TTCTTCCCTGAGCGCCAGCGTCGGGGACCG CGTGACTATCACATGTCGGGCCTCCCAGGA CATTAACTCTTACCTCTCCTGGTTCCAGCAG AAGCCTGGGAAAGCCCCAAAGACACTGATA TACAGGGTAAATCGTTTGGTTGACGGTGTA CCATCACGATTTTCCGGTAGTGGGTCTGGA AACGATTACACTCTCACAATTAGCAGCCTG CAACCAGAGGACTTTGCAACATACTATTGC CTGCAGTACGATGCTTTTCCTTATACCTTCG GTCAGGGTACCAAGGTGGAAATTAACGTA CG (SEQ ID NO:65)
	huCD123-6V _L (表面重构的)	GAATTCGCCACCATGGGCTGGTCATGTATTAT CCTGTTTCTGGTTGCAACCGCAACAGGAGT ACACTCTGATATCCAGATGACTCAGTCTCCC TCTTCTATGTCTGCTTCTGTGGGAGAGAGAG TCACCATCACCTGTCGCGCTTCCAAGATATT AATAGCTATCTGTCTTGGTTCCAACAGAAAC CTGGCAAATCACCCAAGACTCTGATTTATCG GGTTAACCGCCTGGTGGACGGTGTGCCTTC ACGCTTCTCCGGCAGCGGTAGTGGACAAGA CTATAGCCTGACAATTTCTTCTTGAACCCG AGGACATGGGAATCTACTATTGCTTGCAGTA TGACGCTTTTCCTTATACATTCGGCCAGGGC ACAAAGCTGGAAATCAAACGTACG (SEQ ID NO:67)

[1055] *粗体碱基标记成熟可变区氨基酸序列的第一个密码子。

[1056] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列至少95%相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列至少95%相同。

[1057] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列至少96%相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列至少96%相同。

[1058] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列至少97%相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列至少97%相同。

[1059] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列至少98%相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列至少98%相同。

[1060] 在某些实施方案中,所述抗CD123抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列至少99%相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列至少99%相同。

[1061] 在某些实施方案中,与SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)和/或27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)具有某一百分比的序列同一性的CD123/IL-3R α 抗体/其抗原结合片段与SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)和/或27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)的不同之处仅在于保守氨基酸取代,诸如1、2或3个保守氨基酸取代。在某些实施方案中,所述保守氨基酸取代是重链和/或轻链的一个或多个CDR区中的1、2或3个连续氨基酸的取代。

[1062] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:(a) V_H序列,其与选自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(或SEQ ID NO:26、28、30、32、34和38)表示的氨基酸序列的组的参考V_H序列相同;和/或(b) V_L序列,其与选自具有由SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(或SEQ ID NO:27、29、31、35和37)表示的氨基酸序列的组的参考V_L序列相同。

[1063] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:26中所阐述的V_H序列和/或如SEQ ID NO:27中所阐述的V_L序列。

[1064] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:28中所阐述的V_H序列和/或如SEQ ID NO:29中所阐述的V_L序列。

[1065] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:30中所阐述的V_H序列和/或如SEQ ID NO:31中所阐述的V_L序列。

[1066] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:34中所阐述的V_H序列和/或如SEQ ID NO:35中所阐述的V_L序列。

[1067] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含具有选自由以下各项组成的组的SEQ ID NO.的组合的V_H序列和V_L序列:32/33、34/33、38/33、39/33、40/33、32/35、34/35、38/35、39/35、40/35、32/37、34/37、38/37、39/37、40/37、39/33、39/35、39/37、39/41、40/33、40/35、40/37和40/41。

[1068] 例如,在一个实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;和b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述V_H序列阐述于SEQ ID NO:39中且所述V_L序列阐述于SEQ ID NO:41中。在某些实施方案中,所述V_H序列阐述于SEQ ID NO:40中且所述V_L序列阐述于SEQ ID NO:41中。

[1069] 在相关实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:34中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:34中的Xaa是Val(V)。

[1070] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列,除了第一残基被Ser(S)置换;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[1071] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了第一残基被Ser(S)置换。

[1072] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser,且除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[1073] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。

[1074] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:38中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:38中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:38中的Xaa是Val(V)。

[1075] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:34中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:34中的Xaa是Val(V)。

[1076] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:56中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:56中的Xaa是Val(V)。

[1077] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Val(V)。

[1078] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。

[1079] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球

蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Val(V)。

[1080] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:56中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:56中的Xaa是Val(V)。

[1081] 在另一实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段包含:a)免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;和b)免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Phe(F)。在某些实施方案中,SEQ ID NO:54中的Xaa是Val(V)。

[1082] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段特异性地结合CD123/IL-3R α 。在某些实施方案中,所述CD123/IL-3R α 抗体或其抗原结合片段是特异性地结合CD123/IL-3R α 的鼠类、嵌合、人源化或人抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,所述人源化抗体或其抗原结合片段是CDR移植或表面重构的抗体或其抗原结合片段。

[1083] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体是全长抗体。所述全长抗体可包含以上由1-4个CDR(例如,重链的CDR1和CDR2;重链和轻链的CDR1和CDR2)、1-6个CDR序列(例如,重链的CDR1-CDR3;重链和轻链的CDR1-CDR3)所定义的抗体中的任一者,或以上由LCVR和/或HCVR所定义的抗体中的任一者,或具有表5中的重链序列的全长抗体中的任一者,或具有表6中的轻链序列的全长抗体中的任一者,或具有表5中的重链序列和表6中的轻链序列的全长抗体中的任一者。

[1084] 表5全长重链氨基酸序列

[1085]

抗体	全长重链氨基酸序列(SEQ ID NO)
CD123-3	EFQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWMKQK PGQGLEWIGYIKPYKDGTKYNEKFKGKATLISDKPSSSTAYME LSSLTSEDSAVYYCAREGENGYDAMDYWGQGTSVTVSSAK TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPVLES DLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPA SSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNS TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFT CSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:42)
CD123-6	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTSSIMHWMKQKPG QGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTANMELN SLTSEDSAVYYCAREGGNDYDTMDYWGQGTSVTVSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFPVLES DLYTLSSSVTVPSSMRPSETVTCNVAHPASS TKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPK VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTF RSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCS VLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:44)
CD123-14	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAAASGFTFSNYAMSWVRQNSE KRLEWVATINSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNKDSLYLQMSS LNSEDTAMYYCARQSEAYYGDKRTWFAYWGQGLTVTVSS AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGSLSSGVHTFPVLES DLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVA HPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI LTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQ FNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK TKGRP KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW QWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:46)

[1086]

<p>huCD123-6Gv1</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYGFTSSIMHWVRQAP GQGLEWMGYIKPYNDGTTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDVAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:48)</p>
<p>huCD123-6Gv6/7</p>	<p>QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAP GQGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:50)</p>
<p>huCD123-6 Gv6/7-NT S2 (或“S2”)</p>	<p>SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPG QGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:53)</p>
<p>huCD123-6 Gv6/7-Cys Mab</p>	<p>QXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAP GQGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:54)</p>
<p>huCD123-6 Gv6/7S2-Cys Mab</p>	<p>SXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPG QGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS</p>

	NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO:56)
[1087] huCD123-6rhv1.0	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQK PGQGLEWIGYIRPYNDGTRYNQKFQGKATLTSRSDSSSTANME LNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:59)
huCD123-6rhv1.1	QFQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQKP GQGLEWIGYIKPYNDGTYNQKFQGKATLTSKSSSTANMEL NSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:60)

[1088] *在以上所有序列中,其中从N末端的第2个残基是X(或Xaa),例如SEQ ID NO:50、53、54和56,对于Gv6序列,X是F;而对于Gv7序列,X是V。在一些实施方案中,SEQ ID NO:44中的Met(粗体)是Pro。

[1089] 表6全长轻链氨基酸序列

抗体	全长轻链氨基酸序列(SEQ ID NO)
[1090] CD123-3	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKG PRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGGRDYSFISISNLEPEDIATYYCL QYDNLLYTFGGGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:43)
CD123-6	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPGKS PKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTSSLEYEDMGIYY

	CLQYDAFPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:45)
CD123-14	DILLTQSPAILSVPSPGTRVSFSCRASQSVGTSHHWYQQRPNFGP RLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLNINSVESEDIADYYCQ QSKSWPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:47)
huCD123-6Gv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLAWFQKPGKA PKSLIYRVNRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC LQYDAFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:49)
[1091] huCD123-6Gv4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFQKPGKA PKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISLQPEDFATYY CLQYDAFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:51)
huCD123-6Gv4-NTS3 (或“S3”)	SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFQKPGKA PKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISLQPEDFATYY CLQYDAFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:58)
huCD123-6rlv1.0	DIQMTQSPSSMSASVGERVTITCRASQDINSYLSWFQKPGKS PKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLQPEDMGIYY CLQYDAFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:61)

[1092] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体是全长抗体,其包含:(a)重链,其与以上全长重链序列中的任一者,诸如表5中的全长重链序列中的任一者具有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性;和/或(b)轻链,其与以上全长轻链序列中的任一者,诸如表6中的全长轻链序列中的任一者具有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体是包含选自以下各项组成的组的全长重链序列与全长轻链序列组合的全长抗体:SEQ ID NO:42/43、44/45、46/47、48/49、50/49、53/49、54/49、56/49、59/49、60/49、48/51、50/51、53/51、54/51、56/51、59/51、60/51、48/58、50/58、53/58、54/58、56/58、59/58、60/58、59/49、59/51、59/58、59/61、60/49、60/51、60/58和60/61,或与其全长重链序列和/或轻链序列中的任一者具有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的抗体。

[1093] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体是包含选自以下各项组成的组的全长重链序列与全长轻链序列组合的全长抗体:SEQ ID NO:59/61和60/61,或与其全长重

链序列和/或轻链序列中的任一者具有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的抗体。此类抗体可进一步在轻链、重链或两者中包含工程化的N末端Ser/Thr。此类抗体可进一步在重链CH3结构域中在对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个Cys的位置中包含工程化的Cys。

[1094] 在某些实施方案中,所述抗CD123/IL-3R α 抗体是特异性地结合CD123/IL-3R α 的鼠类、嵌合、人源化或人抗体。在某些实施方案中,与全长SEQ ID NO中的任一者具有某一百分比的序列同一性的抗CD123/IL-3R α 抗体与此类SEQ ID NO的不同之处仅在于保守氨基酸取代,例如,仅1、2、3、4或5个连续保守氨基酸取代。在某些实施方案中,所述保守氨基酸取代在CDR之外。

[1095] 在某些实施方案中,所述其抗原结合片段是或包含以上抗体中的任一者的Fab、Fd、Fab'、F(ab')₂、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH2、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)₂或scFv-Fc。

[1096] 在相关方面中,本发明还提供一种多肽,其包含所述抗体或其抗原结合片段中的任一者、以上V_H和/或V_L序列中的任一者、以上HCVR和/或LCVR中的任一者、或以上HCVR和/或LCVR的CDR序列中的任一者。所述多肽可以是例如与非抗体蛋白质或结构域的融合体。在某些实施方案中,所述融合蛋白质并非与假单胞菌毒素的融合体。

[1097] 抗体对抗原的亲合力或亲合力可使用本领域中所熟知的任何适合方法以实验方式测定,例如,流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)或动力学(例如BIACORE™分析)。可容易地使用直接结合测定以及竞争性结合测定形式。参见例如Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions”,Fundamental Immunology,Paul, W.E.编,Raven Press:New York,N.Y. (1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y. (1992);和其中所描述的方法。

[1098] 如果在不同条件(例如,盐浓度、pH值、温度)下测量,则特定抗体-抗原相互作用的测量亲合力可变化。因此,亲合力和其他抗原结合参数(例如,K_D或K_d、k_{on}、k_{off})的测量是用抗体和抗原的标准化溶液和如本领域中已知且诸如本文所描述的缓冲液的标准化缓冲液来进行。

[1099] 在一个方面中,可使用流式细胞术对表面上表达CD123/IL-3R α 抗原的细胞进行结合测定。例如,可使用1×10⁵个细胞/样品在100 μ L FACS缓冲液(例如,补充有2%正常山羊血清的RPMI-1640培养基)中将CD123/IL-3R α 阳性细胞与不同浓度的抗CD123/IL-3R α 抗体一起孵育。随后,可使细胞团块化,洗涤,且与100 μ L FITC缀合的山羊抗小鼠或山羊抗人IgG抗体(诸如可获自例如Jackson Laboratory,6 μ g/mL,处于FACS缓冲液中)一起孵育1小时。随后再次将细胞团块化,用FACS缓冲液洗涤且再悬浮于含有1%甲醛的200 μ L PBS中。样品可例如使用具有HTS多孔取样器的FACSCalibur流式细胞仪获取,且使用CellQuest Pro进行分析(均来自BD Biosciences, San Diego, US)。对于各样品,可输出FL1的平均荧光强度(MFI)且针对抗体浓度绘于半对数图中以产生结合曲线。将蛇形剂量反应曲线针对结合曲线进行拟合,且使用诸如GraphPad Prism v4的程序在默认参数下计算EC₅₀值(GraphPad软件, San Diego, CA)。EC₅₀值可用作各抗体的表观解离常数“K_d”或“K_D”的测量。

[1100] 可使用杂交瘤方法制备单克隆抗体,诸如由Kohler和Milstein(1975) Nature

256:495所描述的那些方法。使用杂交瘤方法,使小鼠、仓鼠或其他适当宿主动物免疫以引发淋巴细胞产生将特异性地结合免疫抗原的抗体。还可在体外使淋巴细胞免疫。在免疫后,分离淋巴细胞且使用例如聚乙二醇与适合的骨髓瘤细胞系融合,以形成杂交瘤细胞,随后可自未融合淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选出。如通过免疫沉淀、免疫印迹或通过体外结合测定(例如,放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA))所测定,产生特异性地针对所选抗原的单克隆抗体的杂交瘤可随后在体外培养基中使用标准方法(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986)或在体内作为动物中的腹水肿瘤而增殖。随后可如针对多克隆抗体所描述而自培养基或腹水液中纯化出单克隆抗体。

[1101] 或者,还可如美国专利4,816,567中所描述使用重组DNA方法来制造单克隆抗体。自成熟B细胞或杂交瘤细胞分离编码单克隆抗体的多核苷酸,诸如通过使用可特异性地扩增编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物的RT-PCR,且使用常规程序测定其序列。随后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆至适合的表达载体中,当将其转染至诸如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞的否则不会产生免疫球蛋白的宿主细胞中时,由宿主细胞产生单克隆抗体。此外,可如所描述自表达所需物种的CDR的噬菌体呈现库中分离所需物种的重组单克隆抗体或其片段(McCafferty等人, *Nature* 348:552-554, 1990; Clackson等人, *Nature*, 352:624-628, 1991; 和Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991)。

[1102] 编码单克隆抗体的多核苷酸可使用重组DNA技术以许多不同的方式进行进一步修饰,以产生替代抗体。在一些实施方案中,例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可针对以下各项被取代1) 例如人抗体的那些区域,以产生嵌合抗体,或2) 非免疫球蛋白多肽,以产生融合抗体。在一些实施方案中,将恒定区截短或除去以产生单克隆抗体的所需抗体片段。可变区的定点或高密度诱变可用于优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[1103] 在一些实施方案中,针对人CD123/IL-3R α 的单克隆抗体是人源化抗体。在某些实施方案中,此类抗体在治疗上用于当施用至人受试者时降低抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)反应。

[1104] 用于对非人或人抗体进行工程化、人源化或表面重构的方法还可使用且是本领域中熟知的。人源化、表面重构的或类似工程化抗体可具有一个或多个来自非人来源,例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其他哺乳动物的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通过通常取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域且通常称为“输入”残基的残基置换。

[1105] 此类输入序列可用于降低免疫原性,或者降低、增强或调节结合、亲和力、缔合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或如本领域中已知的任何其他适合的特征。一般来说,CDR残基直接且最实质性地涉及影响CD123/IL-3R α 结合。因此,维持部分或所有非人或人CDR序列,同时可用人或其他氨基酸置换可变区和恒定区的非人序列。

[1106] 抗体还可任选地为工程化而保留对抗原CD123/IL-3R α 的高亲和力和其他有利生物学性质的人源化、表面重构的、工程化或人抗体。为了实现此目标,可任选地通过使用亲本、工程化和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和多种设想人源化和工程化产物的方法来制备人源化(或人)或工程化抗CD123/IL-3R α 抗体和表面重构的抗体。三维免疫球蛋白

模型是常用的且为本领域的技术人员所熟知。可利用电脑程序,其显示且呈现所选候选免疫球蛋白序列的大概三维构象结构。观察这些呈现允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能方面的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原,诸如CD123/IL-3R α 的能力的残基。以此方式,可自相同和输入序列中选择框架(FR)残基并组合,从而实现所需抗体特征,诸如增加对靶抗原的亲合力。

[1107] 本发明抗体的人源化、表面重构或工程化可使用任何已知方法来进行,诸如但不限于以下文献中所描述的那些方法:Winter (Jones等人,Nature 321:522,1986;Riechmann等人,Nature 332:323,1988;Verhoeyen等人,Science 239:1534,1988;Sims等人,J. Immunol. 151:2296,1993;Chothia和Lesk,J. Mol. Biol. 196:901,1987;Carter等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285,1992;Presta等人,J. Immunol. 151:2623,1993;Raguska等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(3):969-973,1994;美国专利号5,639,641、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567;PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246、7,557,189、7,538,195和7,342,110,所述文献各自以引用的方式整体并入本文,包括其中所引用的参考文献。

[1108] 在某些替代实施方案中,针对CD123/IL-3R α 的抗体是人抗体。人抗体可使用本领域中已知的各种技术直接制备。可产生体外免疫或自免疫个体分离的产生针对靶抗原的抗体的永生化人B淋巴细胞(参见例如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页(1985);Boemer等人,1991,J. Immunol, 147(1):86-95;和美国专利5,750,373)。此外,人抗体可选自噬菌体库,其中所述噬菌体库表达人抗体,如例如以下文献中所描述:Vaughan等人,Nat. Biotech. 14:309-314,1996;Sheets等人,Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162,1998;Hoogenboom和Winter,J. Mol. Biol. 227:381,1991;和Marks等人,J. Mol. Biol. 222:581,1991)。用于产生和使用抗体噬菌体库的技术还描述于以下文献中:美国专利号5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915、6,593,081、6,300,064、6,653,068、6,706,484和7,264,963;和Rothe等人,J. Mol. Bio. doi:10.1016/j. jmb.2007.12.018,2007(所述文献各自以引用的方式整体并入)。亲和力成熟策略和链改组策略(Marks等人,Bio/Technology 10:779-783,1992,以引用的方式整体并入)在本领域中是已知的且可用于产生高亲和力人抗体。

[1109] 还可在含有免疫后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生全谱系人抗体的人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制造人源化抗体。这种方法描述于以下美国专利中:5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016。

[1110] 在某些实施方案中提供抗体片段以例如增加肿瘤渗透。已知用于产生抗体片段的多种技术。传统地,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化而得到(例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117,1993;Brennan等人,Science 229:81,1985)。在某些实施方案中,重组产生抗体片段。Fab、Fv和scFv抗体片段均可表达于且自大肠杆菌或其他宿主细胞中分泌,由此允许产生大量这些片段。还可自抗体噬菌体库中分离此类抗体片段。抗体片段还可以是如例如美国专利5,641,870中所描述的

线性抗体,且可以是单特异性或双特异性。用于产生抗体片段的其他技术对本领域的技术人员将显而易见。

[1111] 出于本发明的目的,应了解,修饰的抗体可包含任何类型的可变区,由此提供抗体与人CD123/IL-3R α 的多肽的缔合。在此方面,可变区可包含或来源于任何类型的可被诱导以建立体液反应且产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的哺乳动物。因而,修饰的抗体的可变区可具有例如人、鼠类、非人灵长类(例如食蟹猴、猕猴等)或狼起源。在一些实施方案中,修饰的免疫球蛋白的可变区和恒定区是人的。在其他实施方案中,相容抗体(通常来源于非人来源)的可变区可工程化或特异性地定制以改进结合性质或降低所述分子的免疫原性。在此方面,适用于本发明的可变区可通过包括输入氨基酸序列而进行人源化或以其他方式改变。

[1112] 在某些实施方案中,通过至少部分置换一个或多个CDR且在必要时通过部分框架区置换和序列变化来改变重链和轻链中的可变结构域。尽管CDR可来源于与得到框架区的抗体相同类别或甚至亚类的抗体,但设想CDR将来源于不同类别的抗体且在某些实施方案中来自不同物种的抗体。可能未必用来自供体可变区的完整CDR置换所有CDR以便将一个可变结构域的抗原结合容量转移至另一个。相反,可能仅需要转移维持抗原结合位点的活性所必需的那些残基。鉴于美国专利号5,585,089、5,693,761和5,693,762中所阐述的说明,进行常规实验或通过试误测试以获得具有较低免疫原性的功能抗体完全在本领域的技术人员的能力范围内。

[1113] 尽管可改变可变区,但本领域的技术人员应了解,本发明的修饰的抗体将包含恒定区结构域中一个或多个的至少一部分已缺失或以其他方式改变以提供所需生物化学特征,诸如当与具有大致相同的免疫原性且包含天然或未改变恒定区的抗体相比时肿瘤定位有所增加或血清半衰期有所减少的抗体(例如全长抗体或其免疫活性片段)。在一些实施方案中,修饰的抗体的恒定区将包含人恒定区。与本发明相容的对恒定区的修饰包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文中公开的修饰的抗体可包含对三个重链恒定结构域中的一个或多个(CH1、CH2或CH3)和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一些实施方案中,涵盖一个或多个结构域部分或完全缺失的修饰恒定区。在一些实施方案中,修饰的抗体将包含结构域缺失构建体或变体,其中整个CH2结构域已除去(ACH2构建体)。在一些实施方案中,省略的恒定区结构域将由短氨基酸间隔基(例如10个残基)置换,从而提供通常由不存在的恒定区赋予的一定程度的分子可挠性。

[1114] 应注意,在某些实施方案中,可对修饰的抗体进行工程化以使CH3结构域直接与个别修饰的抗体的铰链区融合。在其他构建体中,可能需要在铰链区与修饰的CH2和/或CH3结构域之间提供肽间隔基。例如,可表达相容性构建体,其中CH2结构域已缺失,且剩余的CH3结构域(修饰的或未修饰的)与具有5-20个氨基酸间隔基的铰链区接合。可添加这种间隔基,例如,以确保恒定结构域的调控元件保持自由且可及,或确保铰链区保持可挠性。然而,应注意,在一些情况下,可证明氨基酸间隔基具有免疫原性,且引发针对构建体的不想要的免疫应答。因此,在某些实施方案中,添加至构建体的任何间隔基将是相对非免疫原性的,或甚至可一起省略,以便维持修饰的抗体的所需生物化学品质。

[1115] 除了缺失整个恒定区结构域之外,应了解,可通过数个或甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来提供本发明的抗体。例如,CH2结构域的所选区域中单个氨基酸的突变可能足

以实质性地减少Fc结合且从而增加肿瘤定位。类似地,可能需要简单地缺失一个或多个控制待调节的效应因子功能(例如补体C1q结合)的恒定区结构域的一部分。恒定区的此类部分缺失可改进抗体的所选特征(血清半衰期),同时使与主题恒定区结构域有关的其他所需功能保持完整。此外,如以上所提及,可对所公开抗体的恒定区进行修饰,例如,通过对一个或多个氨基酸的突变或取代,其可增强所得构建体的轮廓。在此方面,有可能破坏由保守结合位点提供的活性(例如Fc结合),同时实质上维持修饰的抗体的构型和免疫原性轮廓。某些实施方案可包括将一个或多个氨基酸添加至恒定区,以增强所需特征,诸如减少或增加效应因子功能,或提供更多细胞毒素或碳水化合物附接。在此类实施方案中,可能需要插入或复制来源于所选恒定区结构域的特测序列。

[1116] 本发明进一步涵盖与本文中所阐述的嵌合抗体、人源化抗体和人抗体或其抗体片段实质上同源的变体和等效物。这些可含有例如保守取代突变,即,一个或多个氨基酸由类似氨基酸取代。例如,保守取代是指氨基酸被相同一般类别内的另一氨基酸取代,诸如,例如,一个酸性氨基酸被另一酸性氨基酸取代、一个碱性氨基酸被另一碱性氨基酸取代或一个中性氨基酸被另一中性氨基酸取代。保守氨基酸取代的含义是本领域中熟知的,诸如上文所定义的那些。

[1117] 本发明的多肽可以是包含针对人CD123/IL-3R α 的抗体或其片段的重组多肽、天然多肽或合成多肽。本领域中应认可,本发明的一些氨基酸序列可变化而对蛋白质的结构或功能无显著作用。因此,本发明进一步包括多肽的变化形式,其显示实质性活性或包括针对诸如人CD123的CD123抗原的抗体或其片段的区域。此类突变体包括缺失、插入、倒置、重复和类型取代。

[1118] 可进一步修饰多肽和类似物以含有正常情况下并非蛋白质的一部分的额外化学部分。那些衍生化部分可改进蛋白质的溶解度、生物半衰期或吸收。所述部分还可减少或消除蛋白质及其类似物的任何不想要的副作用。关于那些部分的概述可见于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第20版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(2000)中。

[1119] 本文所描述的分离的多肽可通过本领域中已知的任何适合的方法来产生。此类方法在直接蛋白质合成法至构建编码分离的多肽序列的DNA序列且在适合的转化宿主中表达那些序列的范围内。在一些实施方案中,使用重组技术,通过分离或合成编码目标野生型蛋白质的DNA序列来构建DNA序列。任选地,可通过位点特异性诱变对序列进行诱变以提供其功能类似物。参见例如Zoeller等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 81:5662-5066,1984和美国专利号4,588,585。

[1120] 在一些实施方案中,编码目标多肽(例如本发明的抗体、抗原结合片段或多肽)的DNA序列将完全或部分通过化学合成使用寡核苷酸合成器来构建。此类寡核苷酸可基于所需多肽的氨基酸序列且选择将产生目标重组多肽的宿主细胞中所偏好的那些密码子来进行设计。可应用标准方法来合成编码目标分离多肽的分离多核苷酸序列。例如,可使用完整氨基酸序列来构建反翻译基因。此外,可合成含有编码特定分离多肽的核苷酸序列的DNA寡聚物。例如,可合成若干编码所需多肽的部分的小寡核苷酸且随后连接。个别寡核苷酸通常含有5'或3'突出端以用于互补组装。

[1121] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另一方法),就将编码特定分离的目标多肽的多核苷酸序列插入表达载体中并可操作地连接至适合在所需宿主中表达蛋白质的表达控制

序列。可通过核苷酸测序、限制作图和在选择宿主中表达生物活性多肽来证实适当组装。如本领域中众所周知,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,所述基因必须可操作地连接至在所选表达宿主中具有功能的转录和翻译表达控制序列。

[1122] 在某些实施方案中,使用重组表达载体来扩增并表达编码针对人CD123/IL-3R α 的抗体或其片段的DNA。重组表达载体是可复制DNA构建体,其具有编码抗CD123/IL-3R α 抗体或其片段的多肽链且可操作地连接至来源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的适合转录或翻译调控元件的合成或cDNA来源的DNA片段。转录单元一般包含以下各项的组装物:(1)在基因表达中具有调控作用的基因元件,例如,转录启动子或增强子;(2)转录至mRNA且翻译至蛋白质的结构或编码序列;和(3)适当转录和翻译起始和终止序列。此类调控元件可包括用于控制转录的操作子序列。在宿主中复制的能力通常由复制起点赋予,且可另外并入选择基因以促进对转化体的识别。当DNA区域彼此功能上相关时,将其可操作地连接。例如,如果信号肽(分泌前导序列)的DNA表达为参与多肽的分泌的前体,则其可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子控制序列的转录,则其可操作地连接至编码序列;或如果核糖体结合位点被定位以允许翻译,则其可操作地连接至编码序列。意图在酵母表达系统中使用的结构元件包括使宿主细胞能够在细胞外分泌翻译的蛋白质的前导序列。或者,在无前导序列或转运序列的情况下表达重组蛋白质时,其可包括N末端甲硫氨酸残基。此残基可任选地随后自所表达的重组蛋白质中裂解以提供最终产物。

[1123] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可使用多种表达宿主/载体组合。适用于真核宿主的表达载体包括,例如,包含来自SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。适用于细菌宿主的表达载体包括已知细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物,以及更广泛宿主范围质粒,诸如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[1124] 适用于表达CD123/IL-3R α 结合多肽或抗体(或待用作抗原的CD123/IL-3R α 蛋白)的宿主细胞包括原核生物、酵母、昆虫或在适当启动子控制下的高级真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高级真核细胞包括哺乳动物来源的确定细胞系,诸如CHO细胞。还可使用无细胞翻译系统。适用于与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的克隆和表达载体由Pouwels等人(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985)描述,所述文献的相关公开内容特此以引用的方式并入。关于蛋白质产生(包括抗体产生)方法的其他信息可见于例如美国专利公布号2008/0187954、美国专利号6,413,746和6,660,501以及国际专利公布号W0 04009823中,其各自特此以引用的方式整体并入本文中。

[1125] 还有利地使用多种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白质。可在哺乳动物细胞中进行重组蛋白质表达,因为此类蛋白质一般经正确折叠、适当修饰且具有完全功能。适合哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T、由Gluzman (*Cell* 23:175, 1981)所描述的猴肾细胞的COS-7细胞系和其他细胞系,包括例如L细胞、CI 27、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可包含非转录元件,诸如复制起点、与待表达的基因连接的适合启动子和增强子,以及其他5'或3'侧接非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,诸如必需核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白质的杆状病毒系统由Luckow和Smmers, Bio/

Technology 6:47(1988) 回顾。

[1126] 因此,本发明的一方面还提供一种细胞,其产生任一种主题抗体或其抗原结合片段或任一种主题多肽。在某些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,所述细胞是HEK-293或HEK-293T细胞、COS-7细胞、L细胞、CI 27细胞、3T3细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞或BHK细胞。在某些实施方案中,所述细胞是CHO细胞。

[1127] 由转化的宿主产生的蛋白质可根据任何适合的方法进行纯化。此类标准方法包括色谱法(例如离子交换色谱法、亲和色谱法和尺寸化柱色谱法)、离心、差异性溶解或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。诸如六聚组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感病毒被膜序列和谷胱甘肽-S-转移酶的亲和力标签可衔接至蛋白质以允许经由通过适合亲和力柱而容易地纯化。还可使用诸如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体学的技术对分离的蛋白质进行物理表征。

[1128] 例如,可首先使用可商购蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元对来自将重组蛋白质分泌至培养基中的系统的上清液进行浓缩。在浓缩步骤之后,可将浓缩物应用于适合的纯化基质。或者,可使用阴离子交换树脂,例如具有悬垂二乙基氨基乙基(DEAE)基团的基质或底物。所述基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或常用于蛋白质纯化的其他类型。或者,可使用阳离子交换步骤。适合的阳离子交换剂包括包含磺丙基或羧甲基的多种不溶性基质。最后,使用疏水性RP-HPLC介质,例如具有悬垂甲基或其他脂族基团的硅胶中的一种或多种逆相高效液相色谱法(RP-HPLC)步骤可用于进一步纯化CD123/IL-3R α 结合剂。上述纯化步骤一些或全部还可以各种组合使用,以提供均质重组蛋白质。

[1129] 可例如通过自细胞团块中初步提取,随后进行一个或多个浓缩、盐析、水溶液离子交换或尺寸排阻色谱法步骤来分离细菌培养物中的重组蛋白质产物。高效液相色谱法(HPLC)可用于最终纯化步骤。可通过任何常规方法破坏重组蛋白质表达中所使用的微生物细胞,包括冷冻-解冻循环、超声处理、机械破坏或使用细胞溶解剂。

[1130] 本领域中用于纯化抗体和其他蛋白质的已知方法还包括例如美国专利公布号2008/0312425、2008/0177048和2009/0187005中所描述的那些方法,其各自特此以引用的方式并入本文中。

[1131] 在某些实施方案中,本发明的CD123/IL-3R α 结合剂具有N末端丝氨酸,其可用氧化剂氧化以形成具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂。

[1132] 任何适合的氧化剂均可用于以上所描述的方法的步骤(a)中。在某些实施方案中,所述氧化剂是过碘酸盐。更具体地说,所述氧化剂是过碘酸钠。

[1133] 可使用相对于CD123/IL-3R α 结合剂过量摩尔当量的氧化剂。在某些实施方案中,可使用约2-100、5-80、10-50、1-10或5-10摩尔当量的氧化剂。在某些实施方案中,可使用约10或约50当量的氧化剂。当使用大量氧化剂时,使用短反应时间以避免过度氧化。例如,当使用50当量氧化剂时,氧化反应进行约5至约60分钟。或者,当使用10当量氧化剂时,氧化反应进行约30分钟至约24小时。在一个实施方案中,使用5-10摩尔当量氧化剂且氧化反应进行约5至约60分钟(例如约10至约30分钟、约20至约30分钟)。

[1134] 在某些实施方案中,所述氧化反应不导致显著非靶向氧化。例如,在用于产生具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂的N末端丝氨酸的氧化过程期间,无显著程度(例如

小于20%、小于10%、小于5%、小于3%、小于2%或小于1%的甲硫氨酸和/或聚糖被氧化。

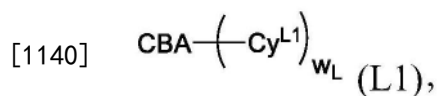
[1135] 在某些实施方案中,本发明的CD123/IL-3R α 结合剂具有重组工程化的Cys残基,诸如对应于例如SEQ ID NO:54或56中的第5个至最后一个Cys的Cys残基(即,EU/OU编号位置442上的Cys残基)。因此,术语“半胱氨酸工程化抗体”包括具有至少一个正常情况下不存在于抗体轻链或重链的指定残基上的Cys的抗体。此类Cys还可称为“工程化Cys”,其可使用任何常规分子生物学或重组DNA技术(例如,通过在靶残基处用Cys的编码序列置换非Cys残基的编码序列)进行工程化。例如,如果原始残基是具有编码序列5'-UCU-3'的Ser,则可使所述编码序列突变(例如,通过定点诱变)至编码Cys的5'-UGU-3'。在某些实施方案中,本发明的Cys工程化抗体在重链中具有工程化Cys。在某些实施方案中,所述工程化Cys在重链的CH3结构域中或附近。在某些实施方案中,所述工程化Cys对应于例如SEQ ID NO:54或56中的第5个至最后一个Cys。工程化抗体重(或轻)链序列可插入适合的重组表达载体中,以产生具有工程化Cys残基替代原始Ser残基的工程化抗体。

[1136] 3. 免疫缀合物

[1137] 在第二方面中,本发明还提供免疫缀合物,其包含本文所描述的CD123/IL-3R α 结合剂,所述CD123/IL-3R α 结合剂共价连接于本文所描述的细胞毒性剂的一个或多个分子。

[1138] 在第一实施方案中,本发明的免疫缀合物包含本文所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(包括抗体、其抗原结合片段,或包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽),其通过位于所述CD123/IL-3R α 结合剂上的一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基共价连接于本文所描述的细胞毒性剂。

[1139] 在第一实施方案的第一具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

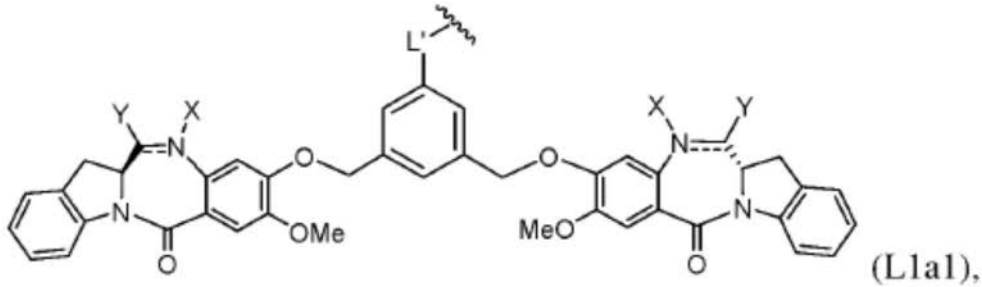
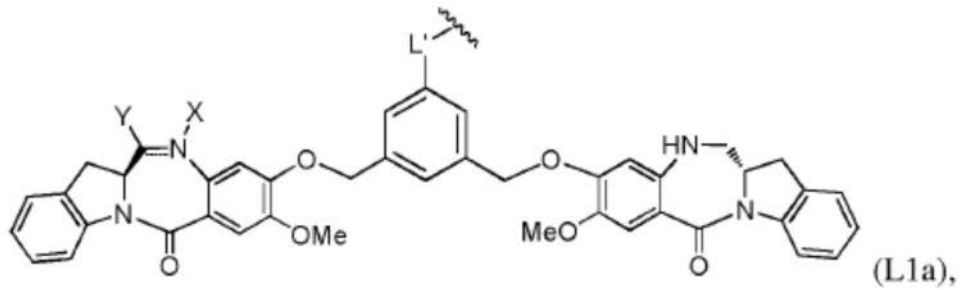


[1141] 其中:

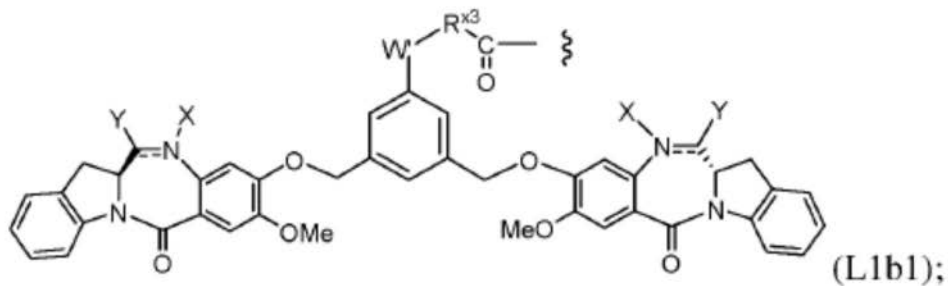
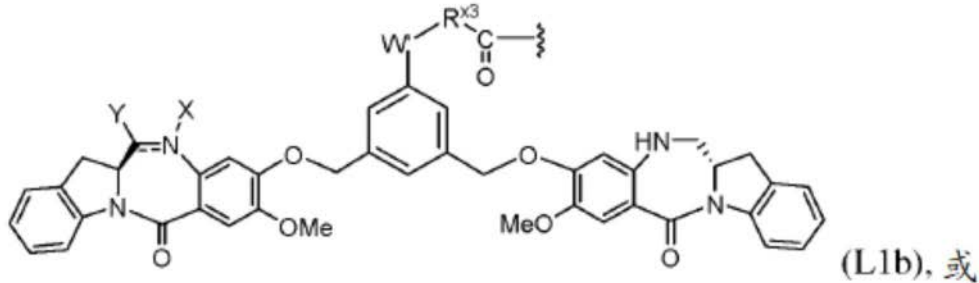
[1142] CBA是CD123/IL-3R α 结合剂(例如,上文中所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或上文所描述的其主题多肽),其通过赖氨酸残基共价连接于Cy^{L1};

[1143] W_L是1至20的整数;并且

[1144] Cy^{L1}是由以下各式表示的细胞毒性化合物:



[1145]



[1146] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1147] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,并且Y是-OH或-SO₃M;[1148] W'是-NR^{e'};[1149] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[1150] n是2至6的整数;

[1151] R^k是-H或-Me;[1152] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

[1153] L'由以下各式表示:

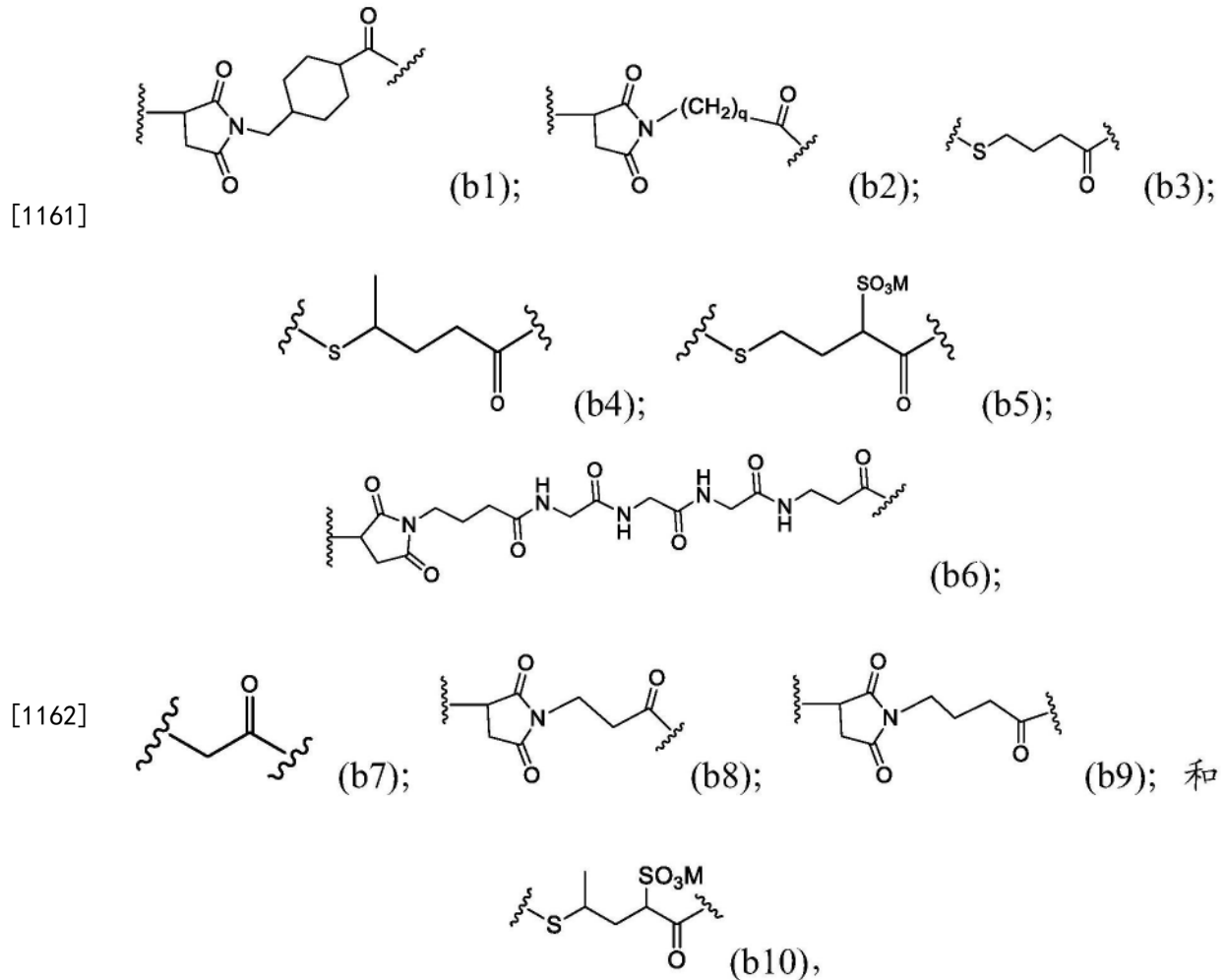
[1154] -NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-(B1');或[1155] -NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-(B2');[1156] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1157] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;

[1158] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地是-H、(C_1 - C_3)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

[1159] m是1至6的整数;并且

[1160] Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



[1163] 其中:

[1164] q是1至5的整数;并且

[1165] M是 H^+ 或阳离子。

[1166] 在第二具体实施方案中,对于式(L1)的缀合物, Cy^{L1} 由式(L1a)或(L1a1)表示;且其余变量如以上在第一具体实施方案中所描述。

[1167] 在第三具体实施方案中,对于式(L1)的缀合物, Cy^{L1} 由式(L1b)或(L1b1)表示;且其余变量如以上在第一具体实施方案中所描述。更具体地说, R^{x3} 是(C_2 - C_4)烷基。

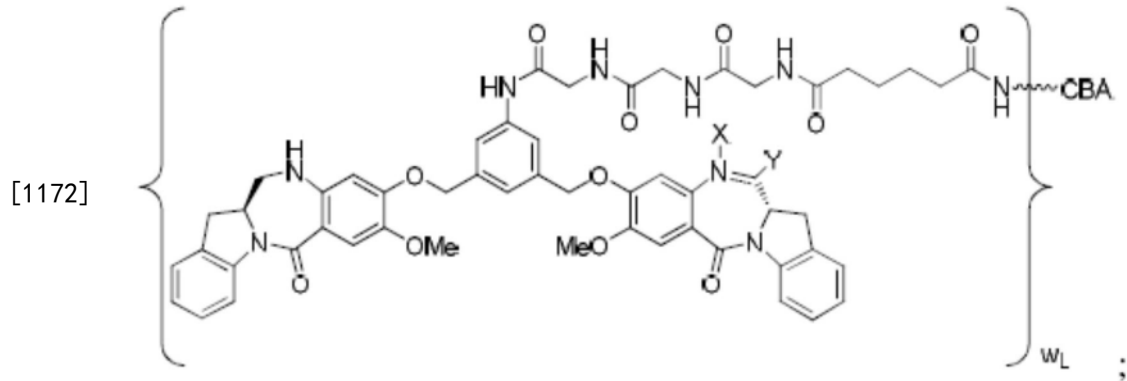
[1168] 在第四具体实施方案中,对于式(L1)的缀合物, Cy^{L1} 由式(L1a)表示; R_a 和 R_b 两者均是H; R_5 是H或Me,且其余变量如以上在第一具体实施方案中所描述。

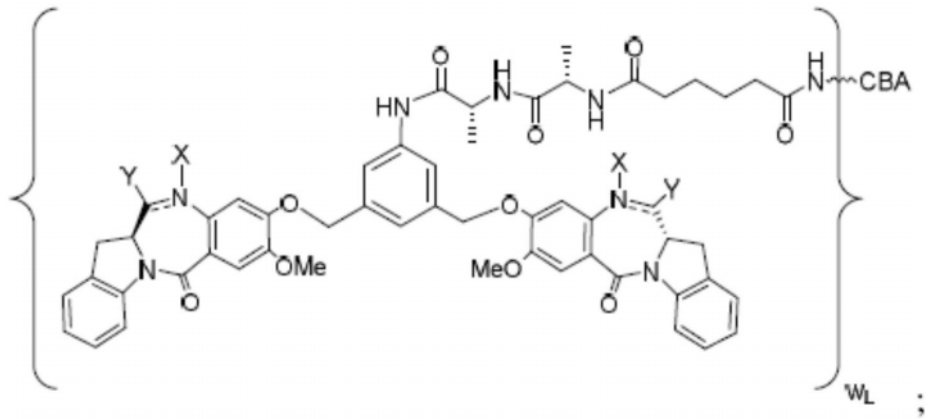
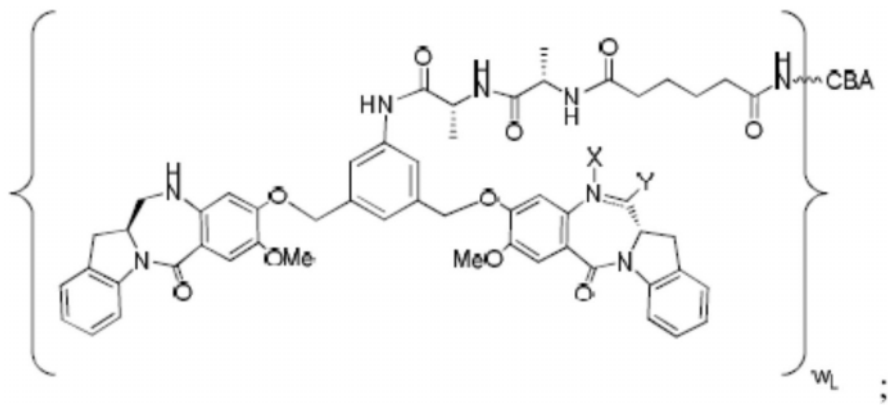
[1169] 在第五具体实施方案中,P是含有2至5个氨基酸残基的肽;且其余变量如以上在第一、第二或第四具体实施方案中所描述。在一个更具体实施方案中,P选自由以下各项组成的组:Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-

Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。更具体地说,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

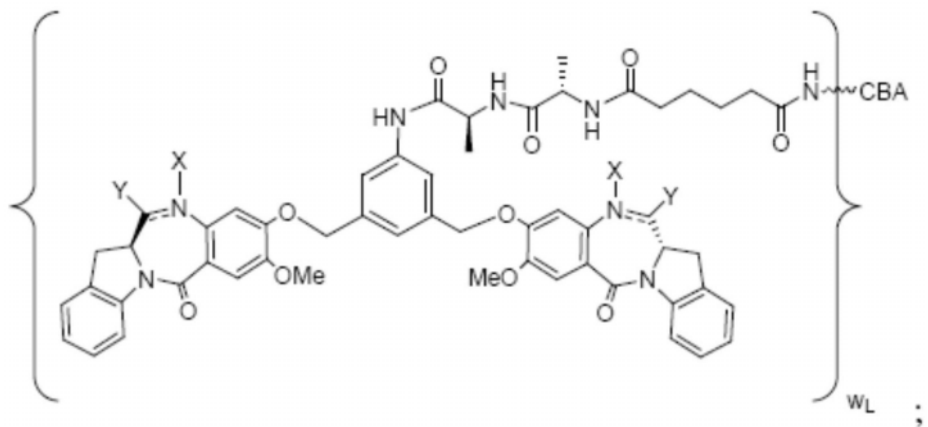
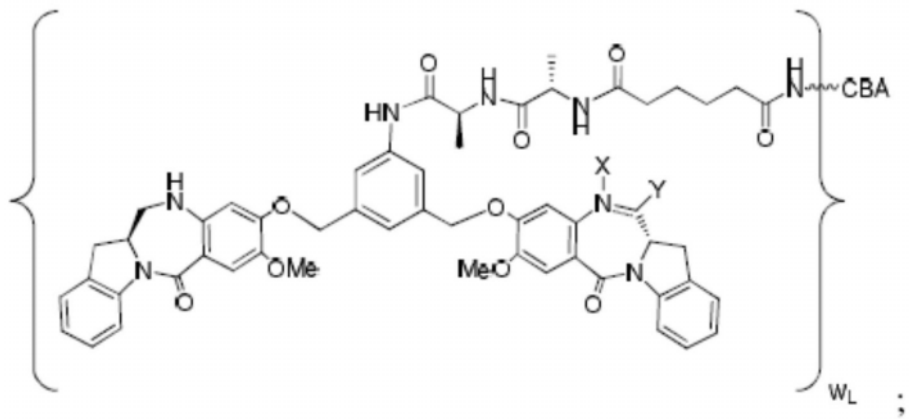
[1170] 在第六具体实施方案中,Q是-SO₃M;且其余变量如以上在第一、第二、第四或第五具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1171] 在第七具体实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:

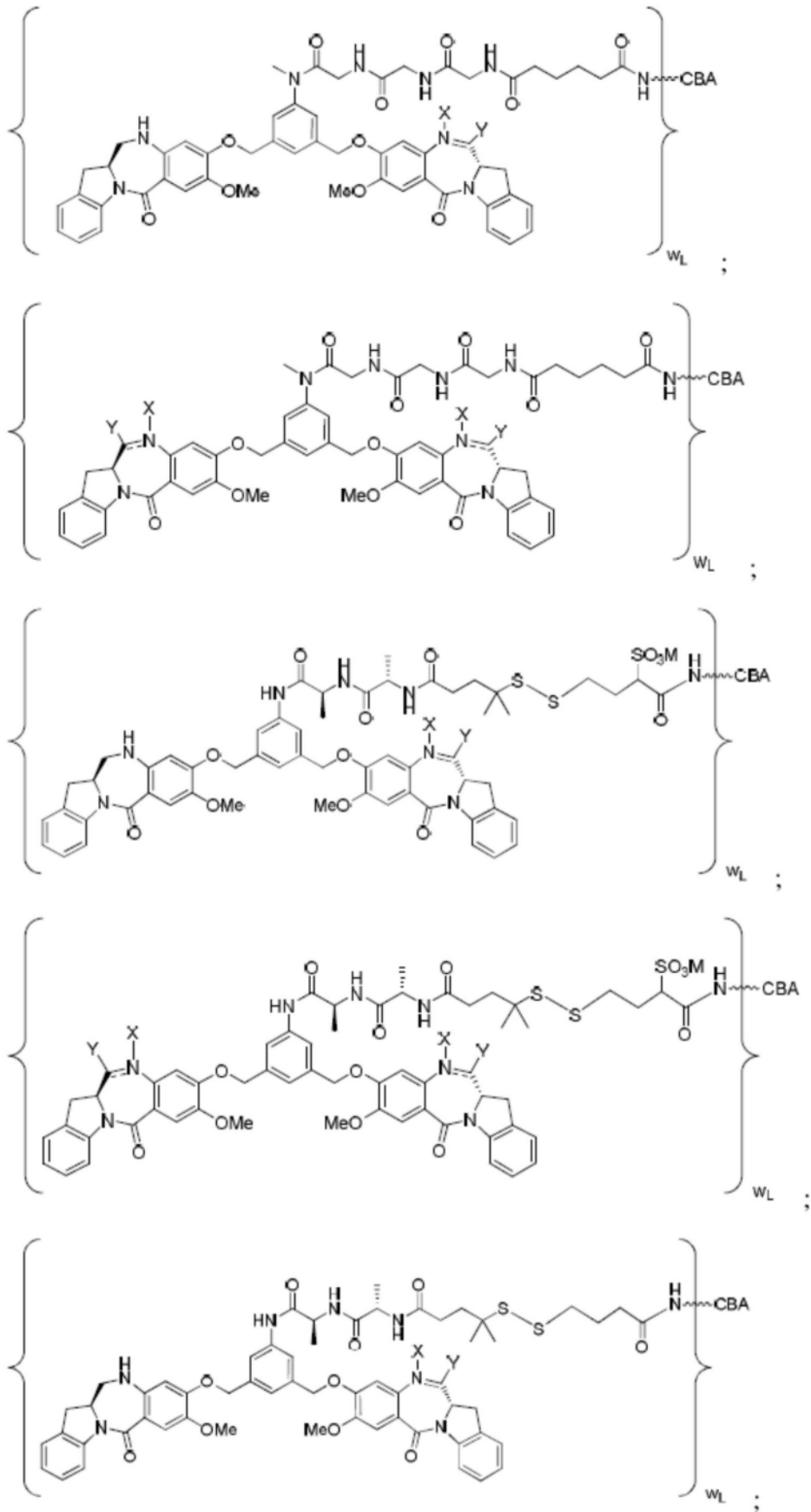


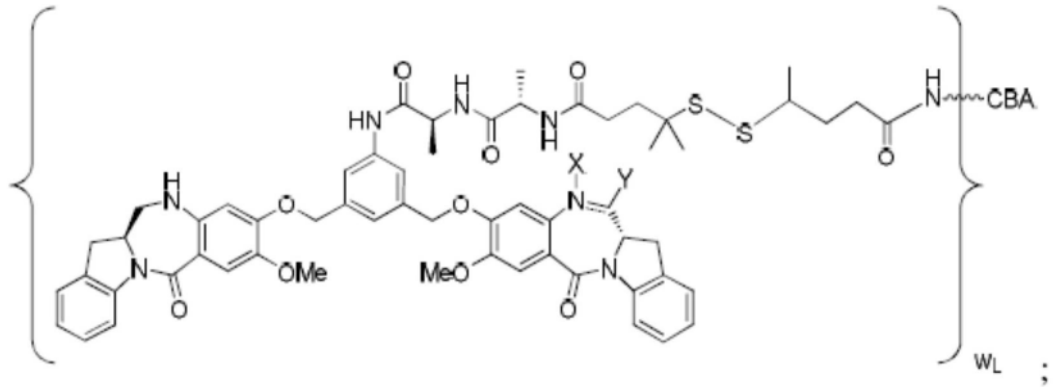
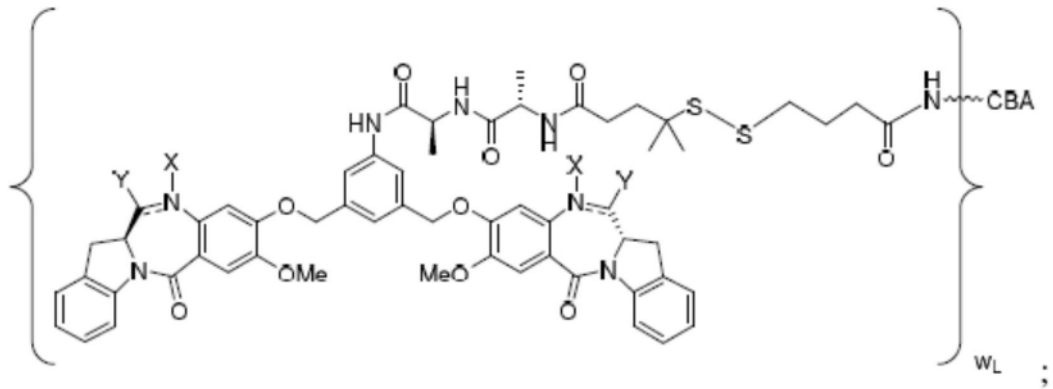


[1174]

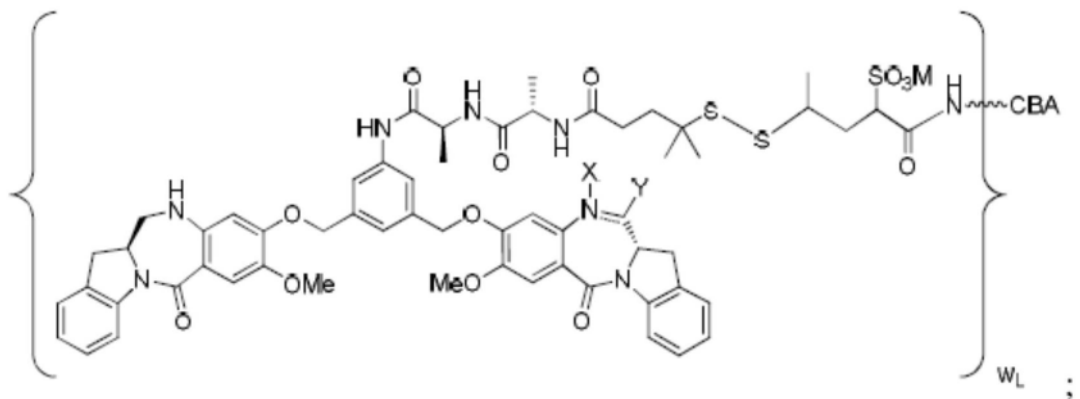
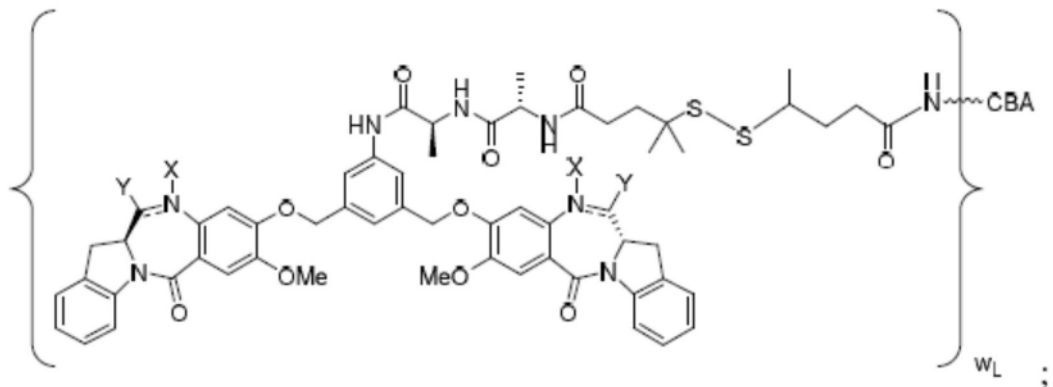


[1175]

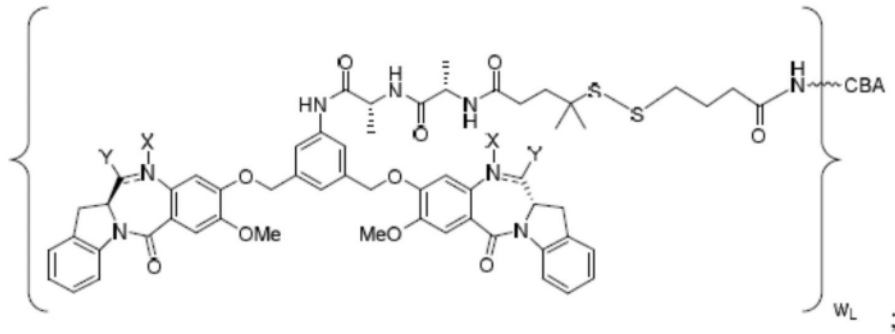
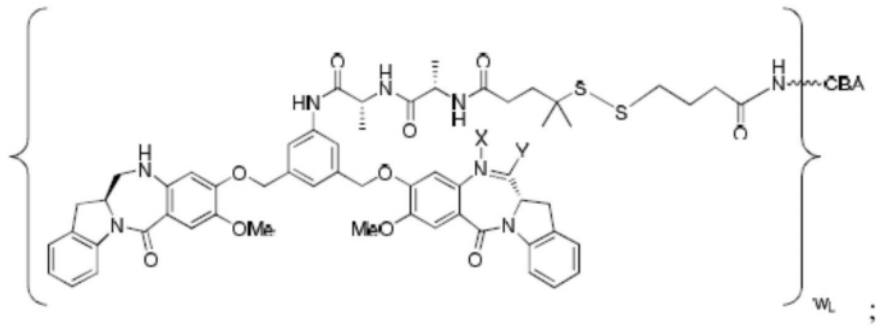
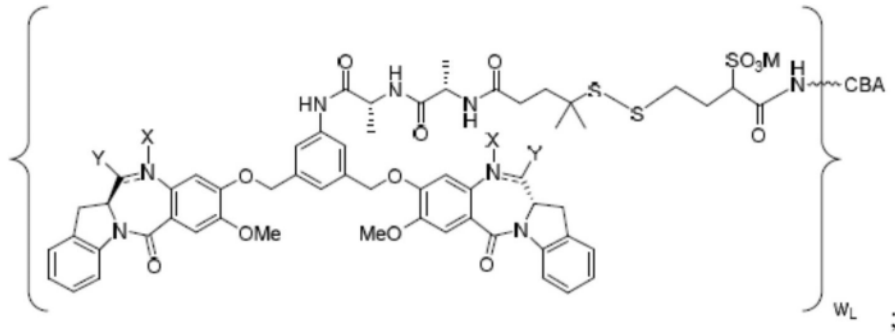
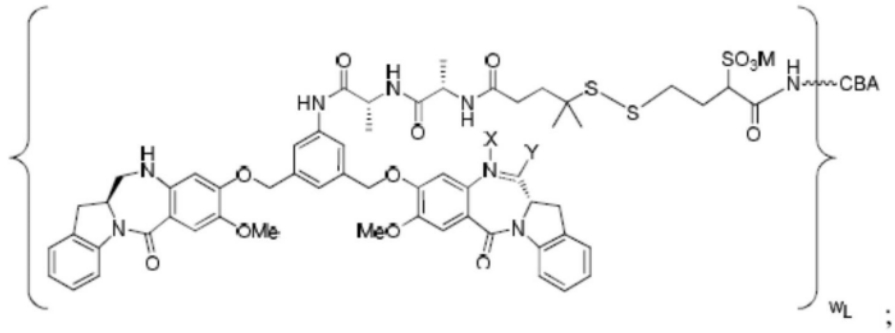
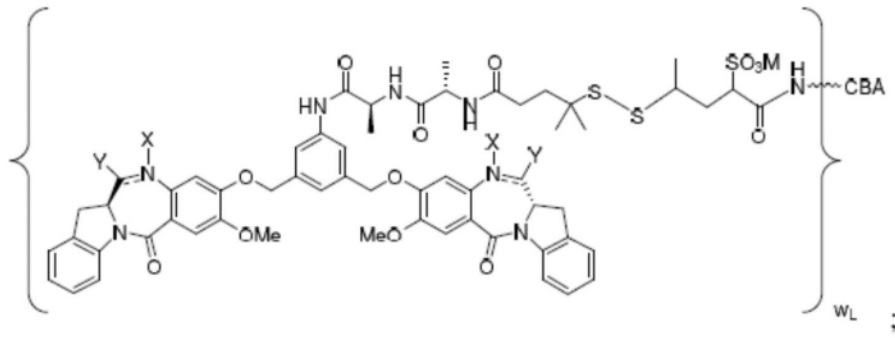


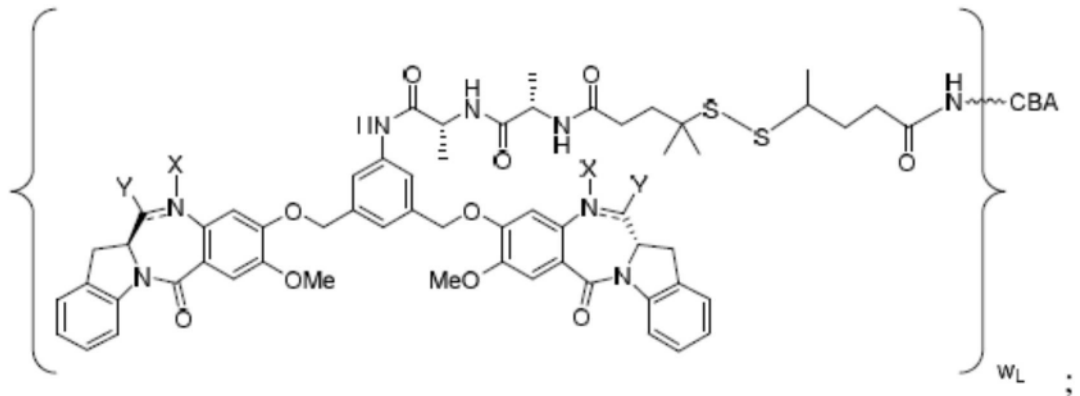
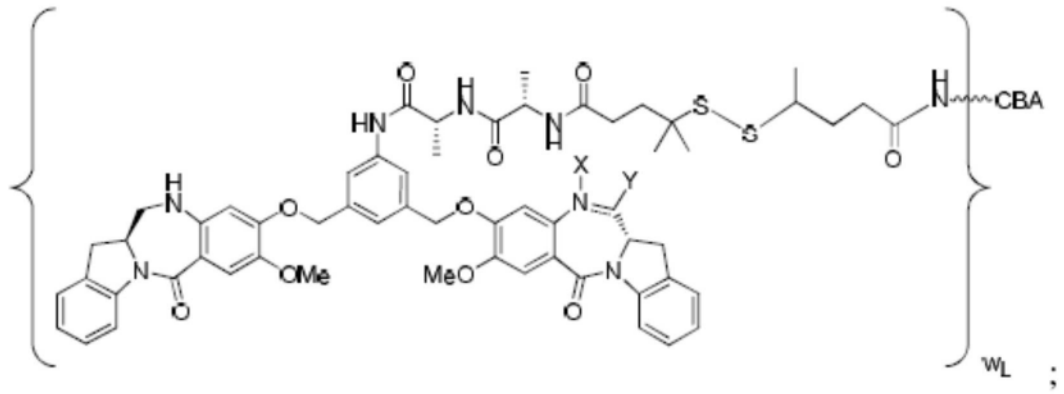


[1176]

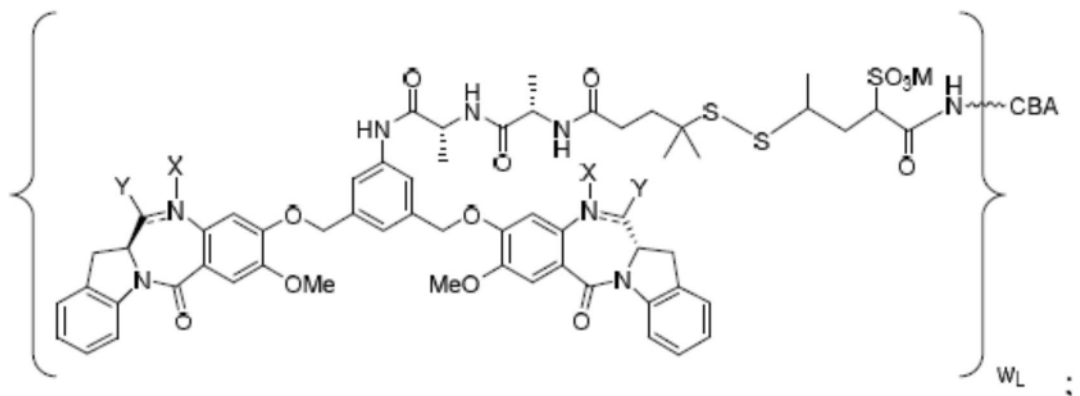
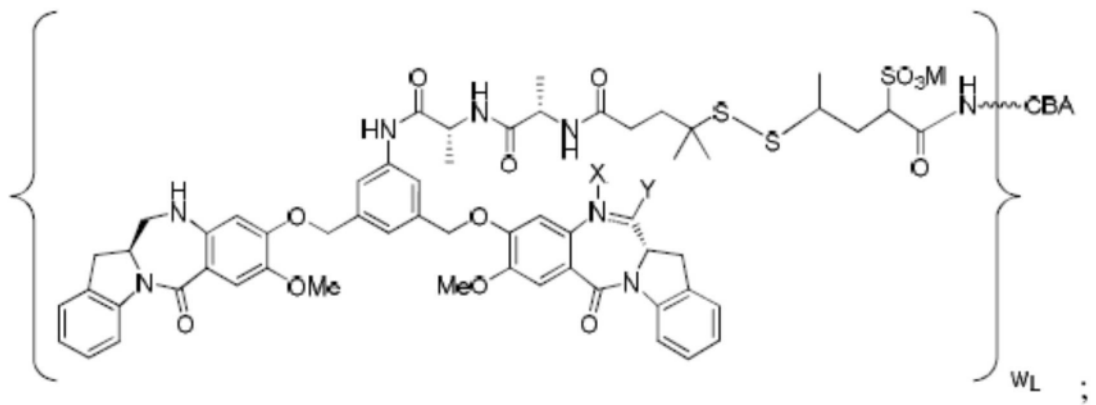


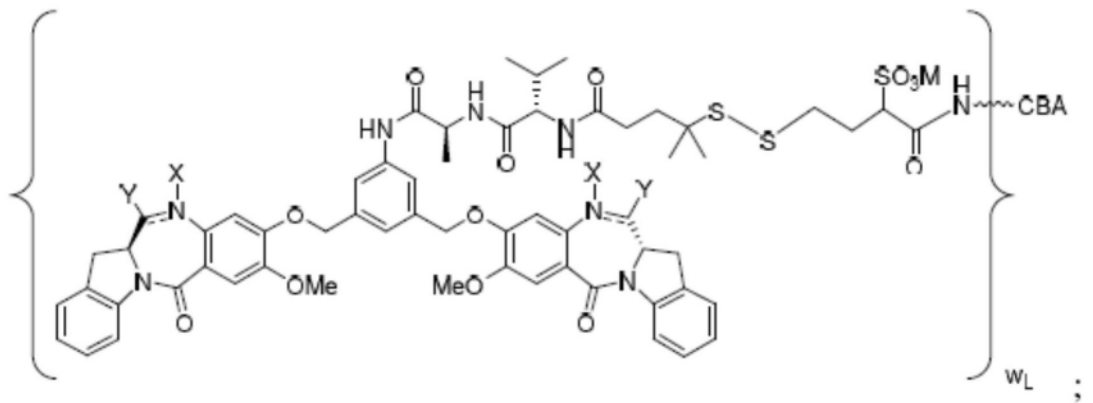
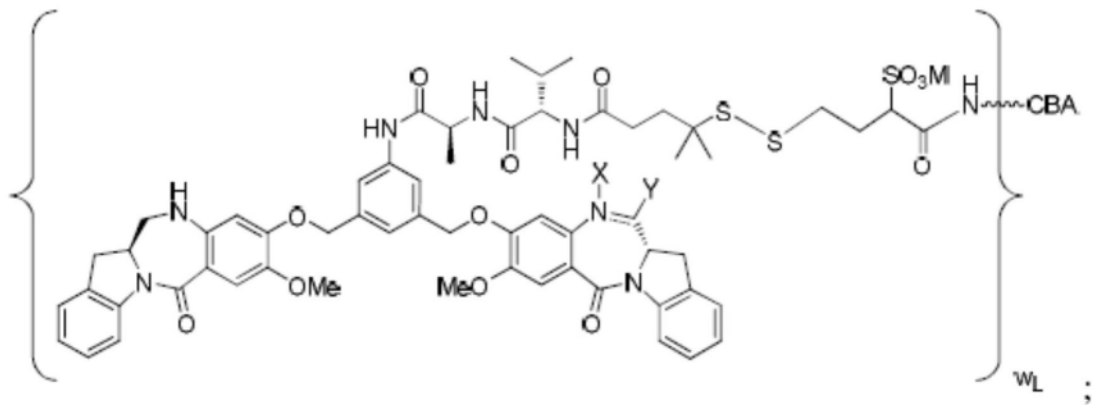
[1177]



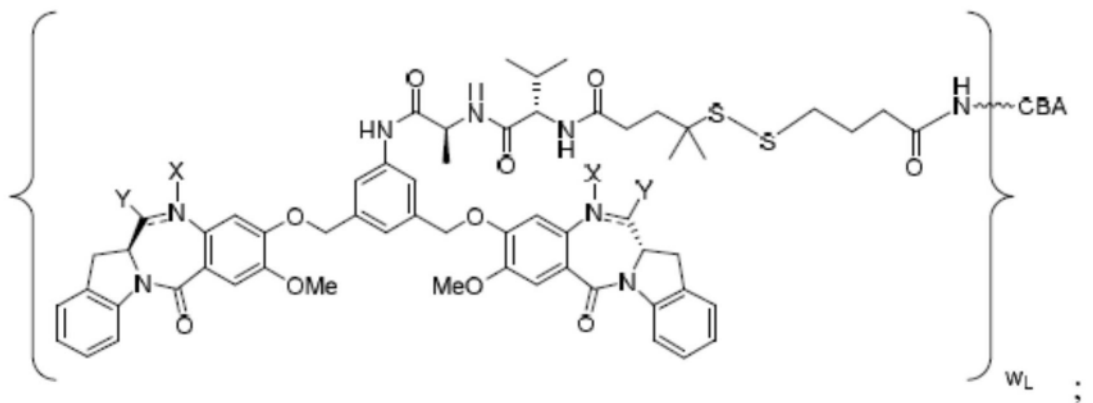
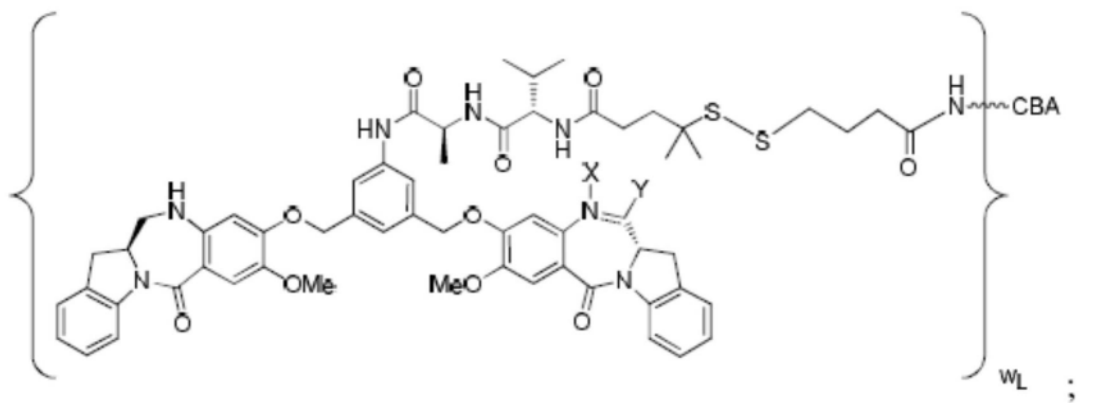


[1178]

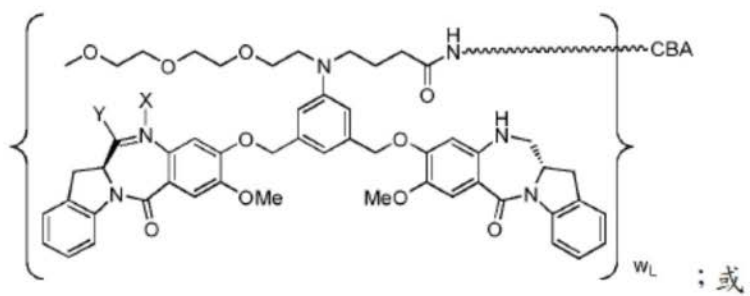
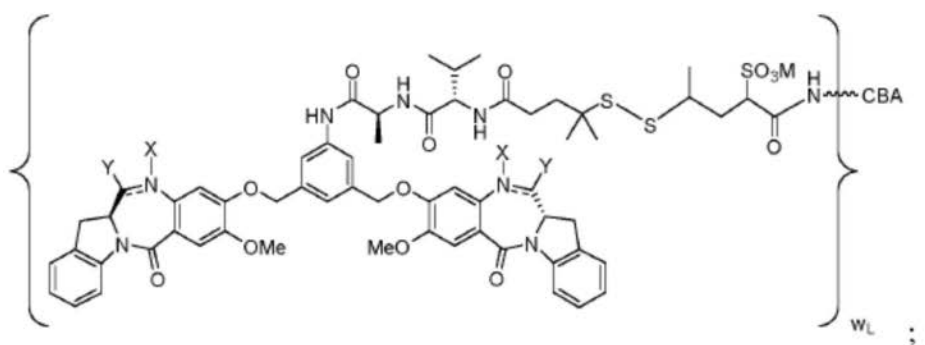
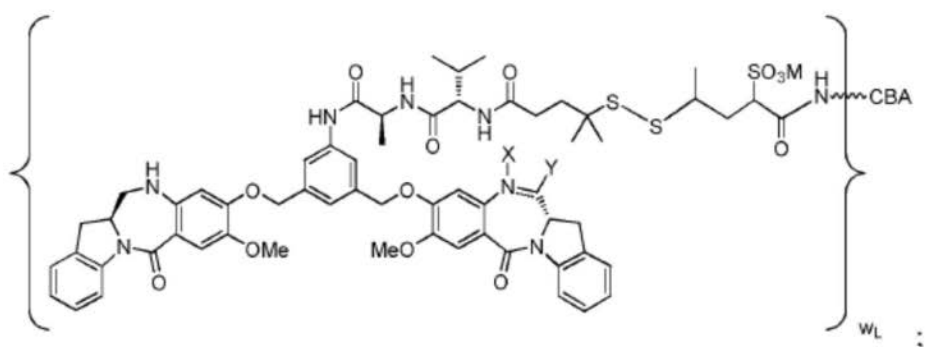
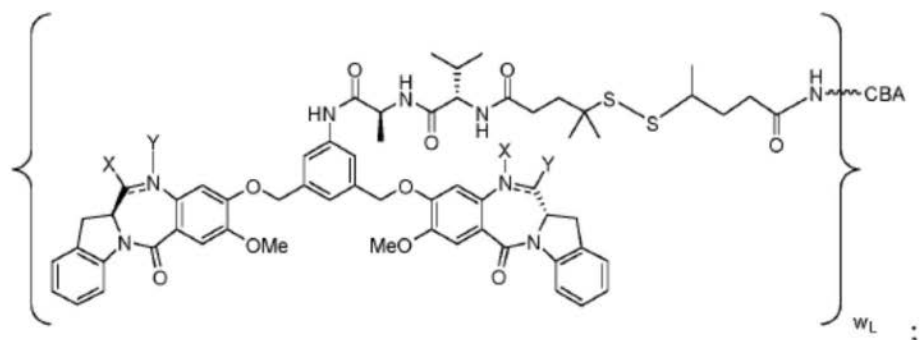
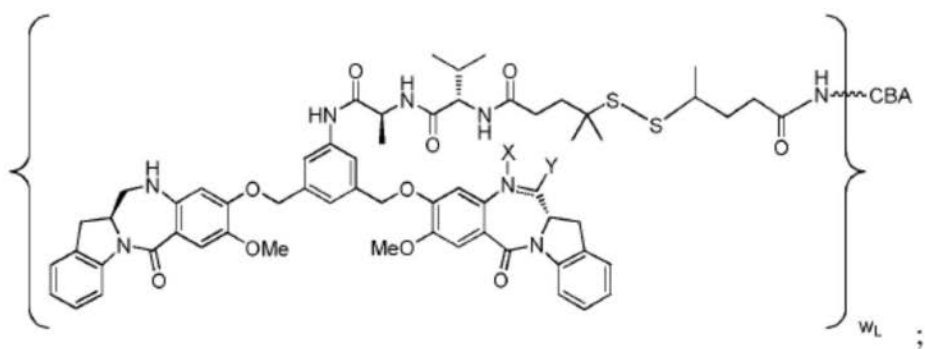


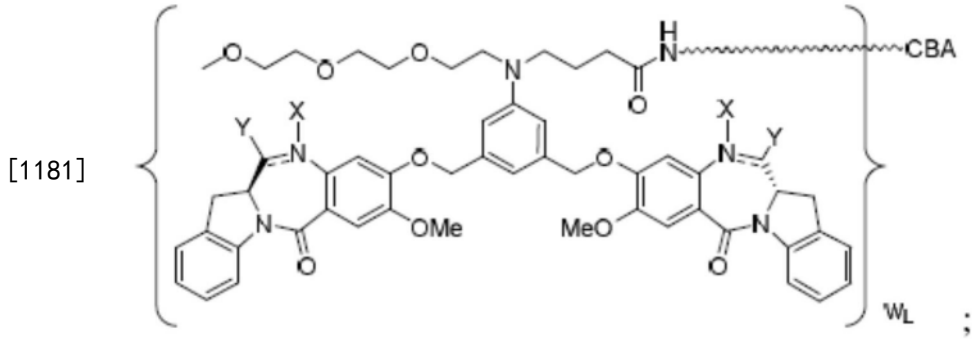


[1179]



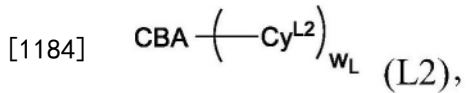
[1180]





[1182] 或其药学上可接受的盐,其中 W_L 是1至10的整数;介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。在一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 $=$ 表示双键,X不存在且Y是-H。在另一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[1183] 在第八具体实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物由下式表示:

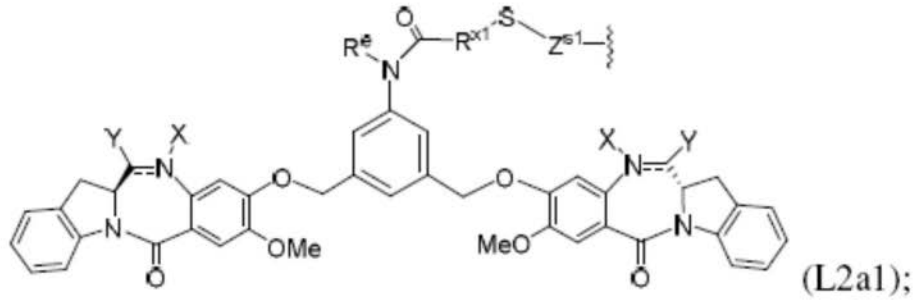
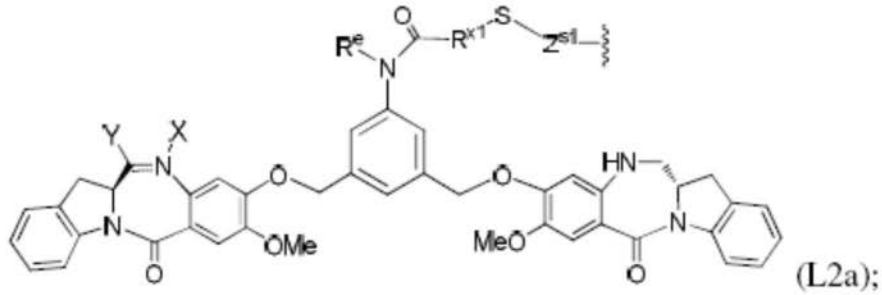


[1185] 其中:

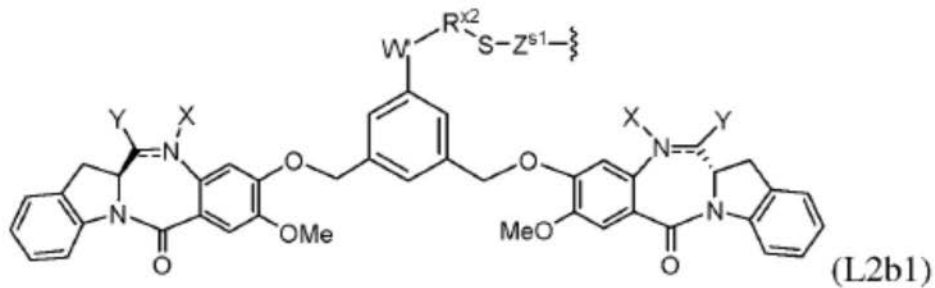
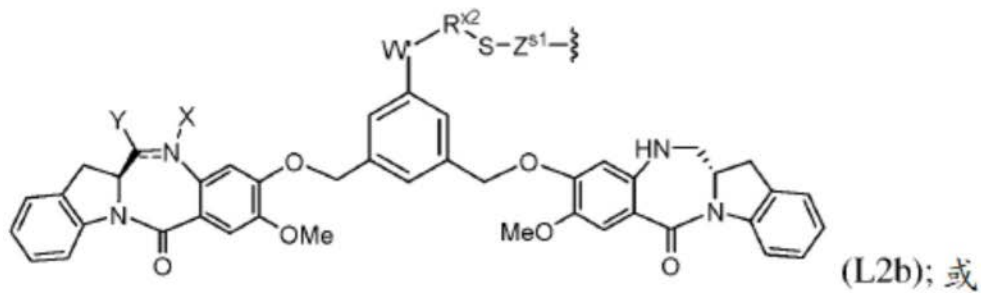
[1186] CBA是本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文中所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或上文所描述的其主题多肽),其通过赖氨酸残基共价连接于Cy^{L2};

[1187] W_L 是1至20的整数;并且

[1188] Cy^{L2}是由以下各式表示的细胞毒性化合物:



[1189]

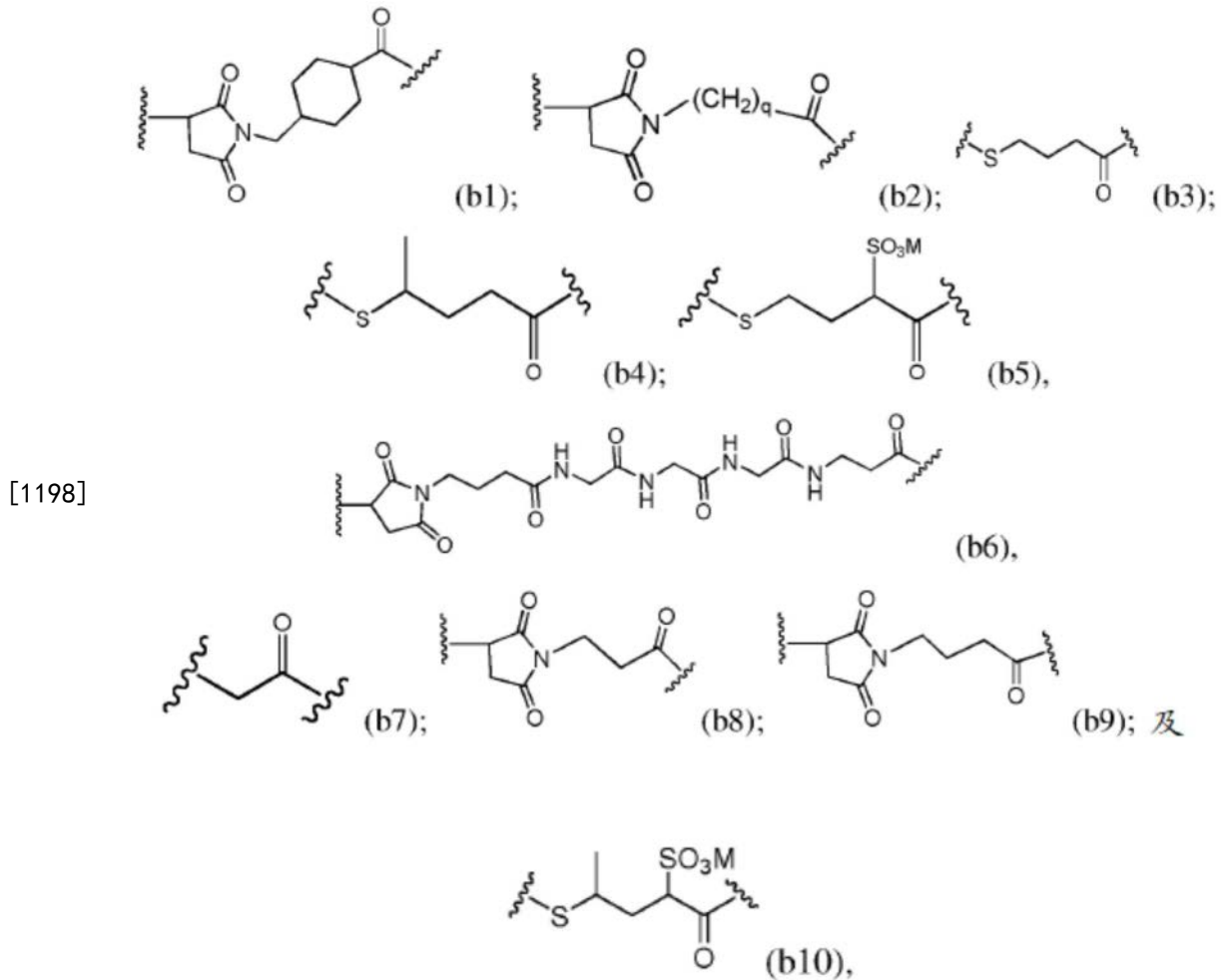


[1190] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1191] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;[1192] R^{x1}和R^{x2}独立地是(C₁-C₆)烷基;R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;[1193] W'是-NR^{e'};[1194] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[1195] n是2至6的整数;

[1196] R^k是-H或-Me;[1197] Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



[1199] 其中:

[1200] q 是1至5的整数;并且

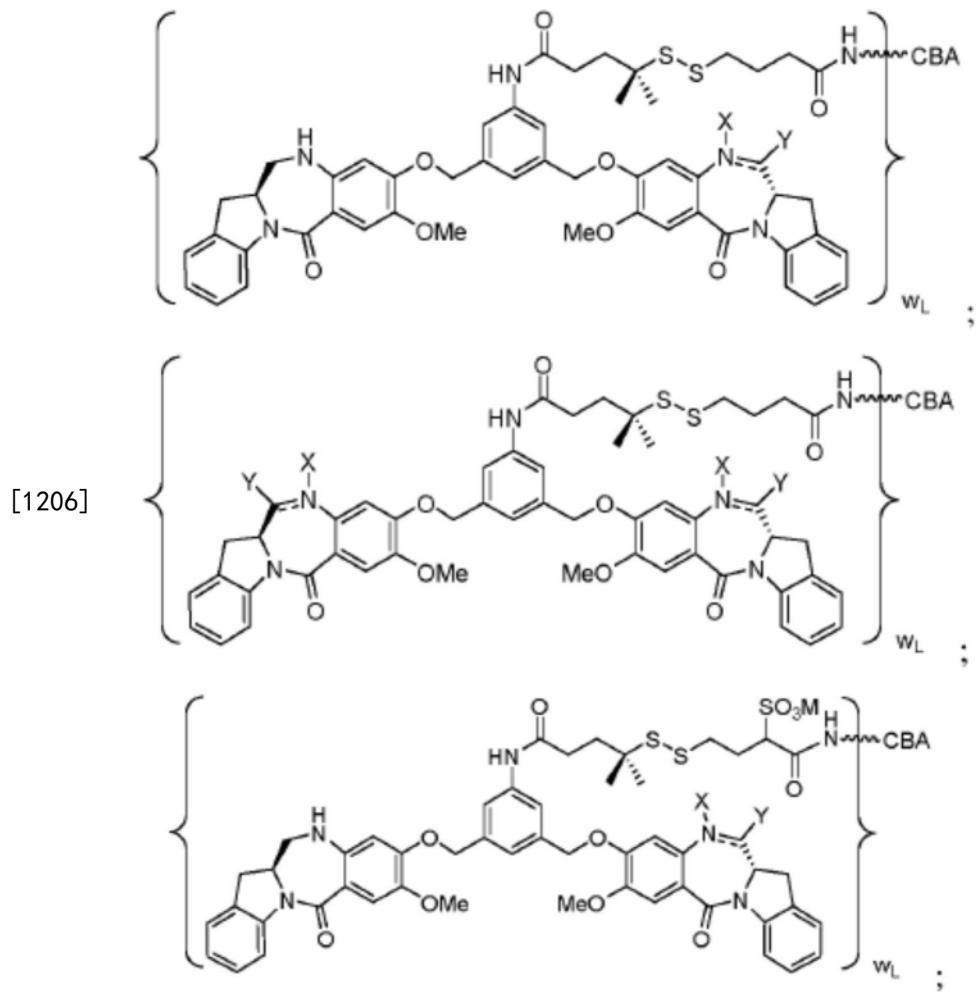
[1201] M 是 H^+ 或阳离子。

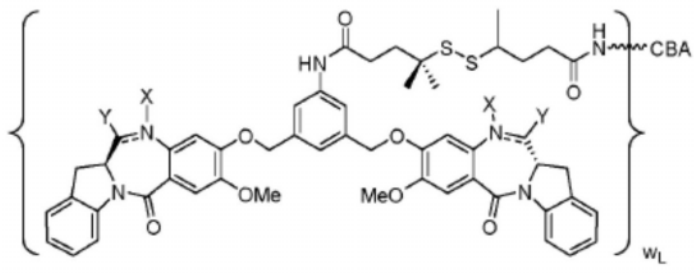
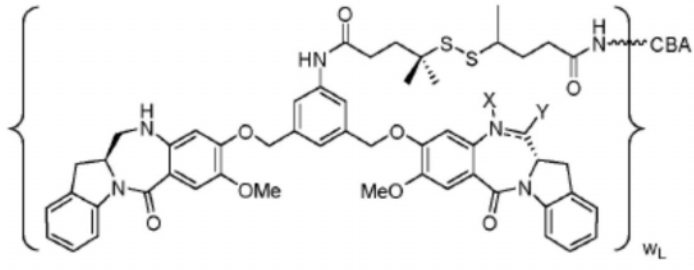
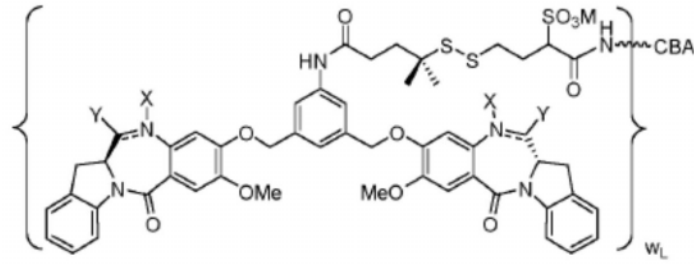
[1202] 在第九具体实施方案中,对于式(L2)的免疫缀合物, Cy^{L2} 由式(L2a)或(L2a1)表示;且其余变量如以上在第八具体实施方案中所描述。

[1203] 在第十具体实施方案中,对于式(L2)的免疫缀合物, Cy^{L2} 由式(L2b)或(L2b1)表示;且其余变量如以上在第八具体实施方案中所描述。

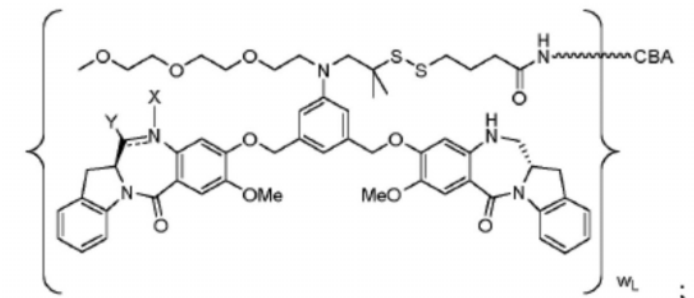
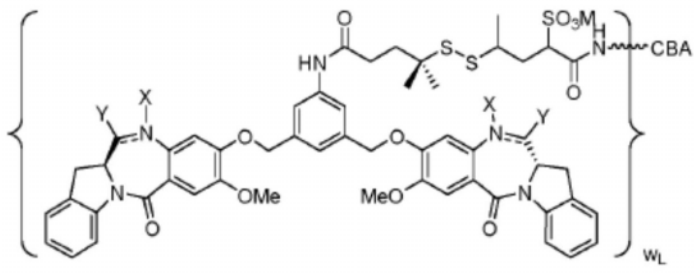
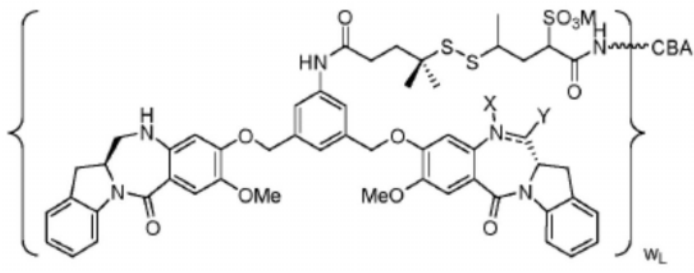
[1204] 在第十一具体实施方案中,对于式(L2)的免疫缀合物, R^e 是H或Me; R^{x1} 和 R^{x2} 独立地是 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$,其中 R^f 和 R^g 各自独立地是-H或 (C_1-C_4) 烷基;且 p 是0、1、2或3;并且其余变量如以上在第八、第九或第十具体实施方案中所描述。更具体地说, R^f 与 R^g 相同或不同且选自-H和-Me。

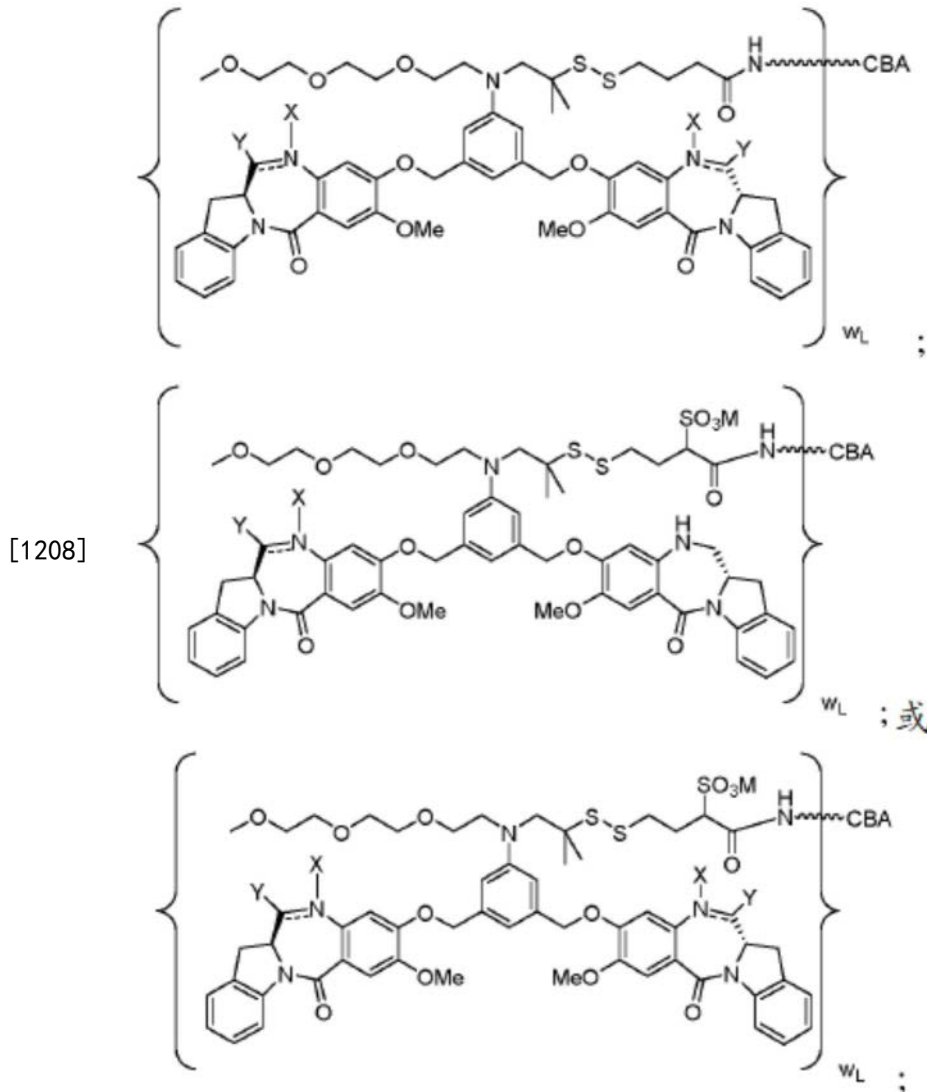
[1205] 在第十二具体实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:





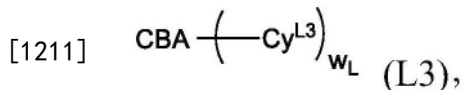
[1207]





[1209] 或其药学上可接受的盐,其中 W_L 是1至10的整数;介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。在一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键。在另一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[1210] 在第十三具体实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物由下式表示:

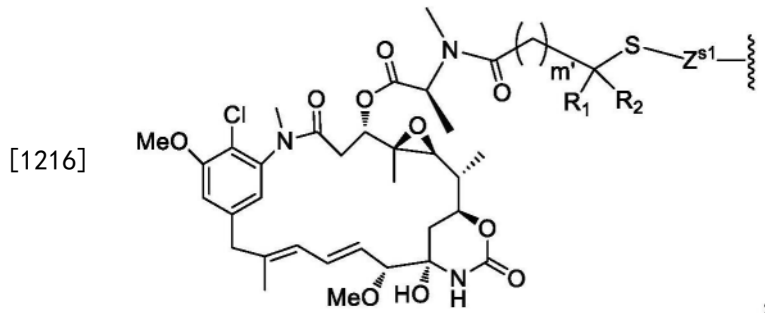


[1212] 其中:

[1213] CBA是本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文中所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或上文所描述的其主题多肽),其通过Lys残基共价连接于 Cy^{L3} ;

[1214] W_L 是1至20的整数;

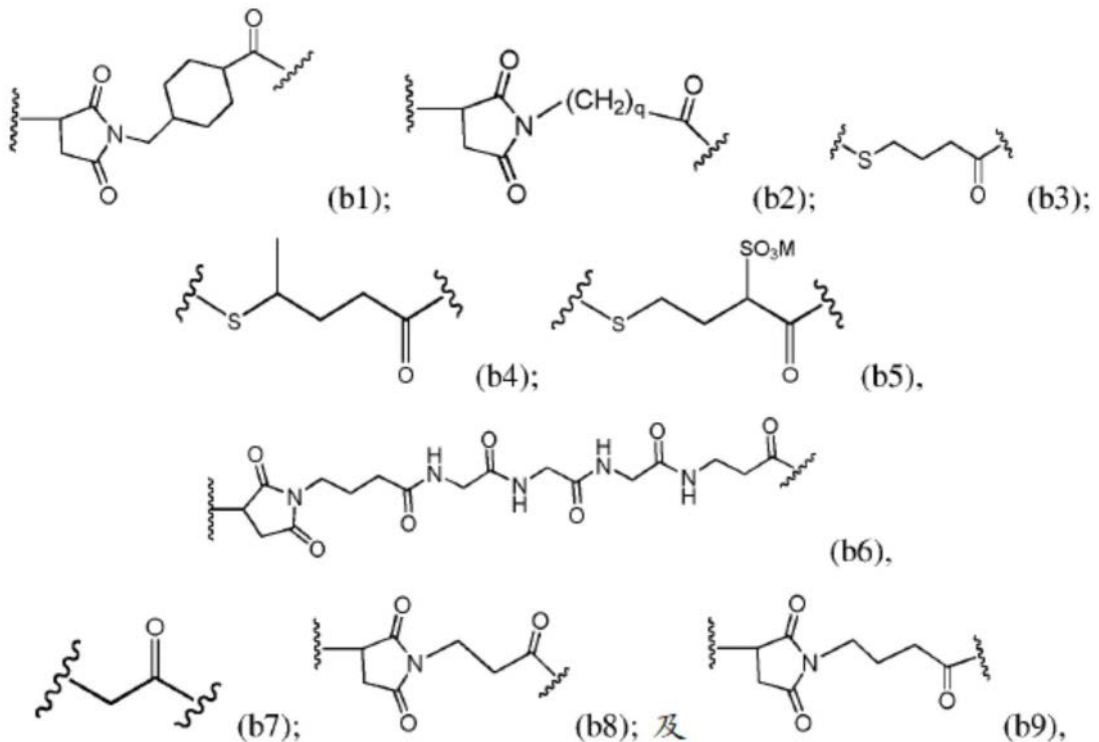
[1215] Cy^{L3} 由下式表示:



[1217] m' 是1或2;

[1218] R_1 和 R_2 各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[1219] Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



[1221] 其中:

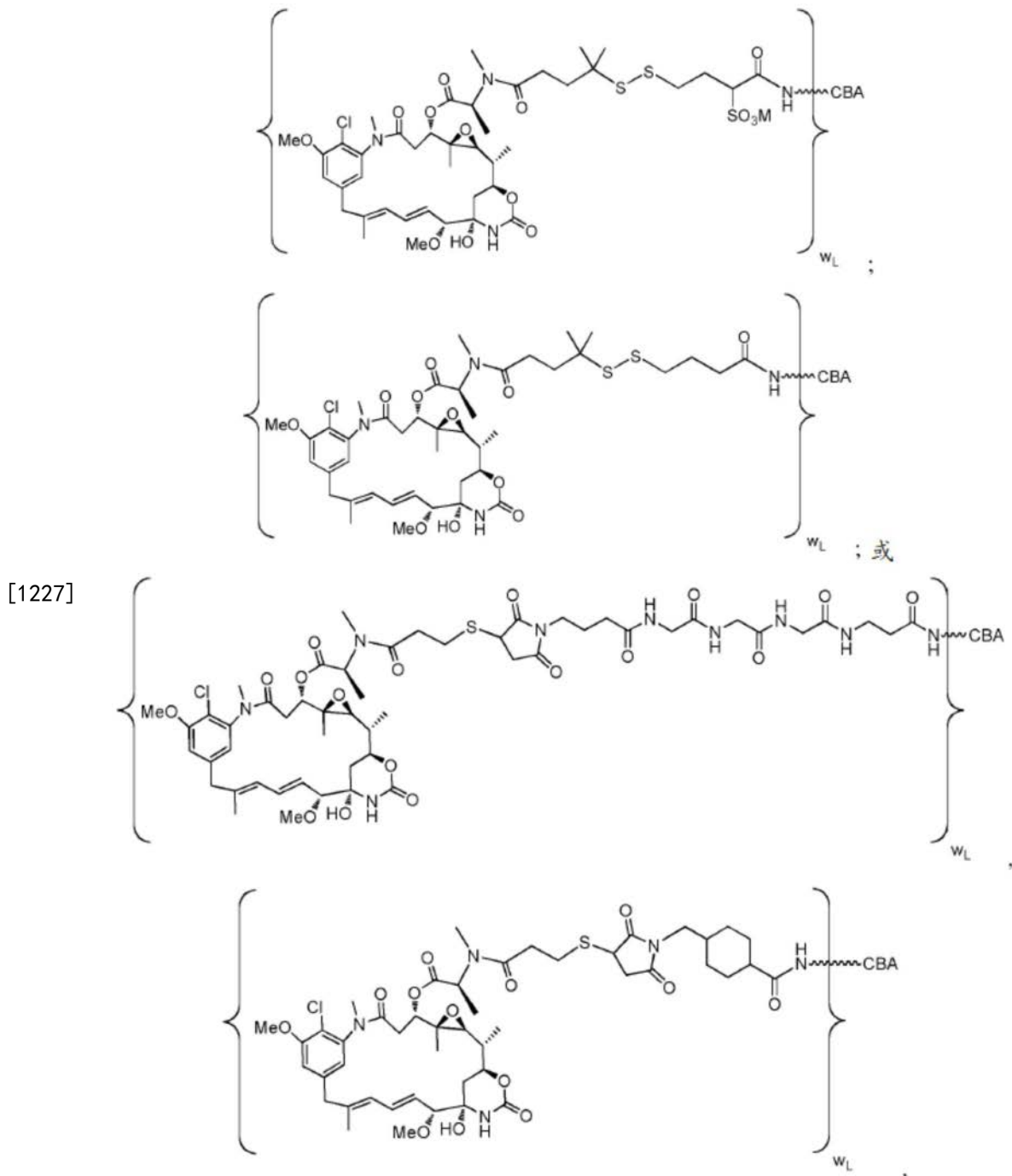
[1222] q 是1至5的整数;并且

[1223] M 是 H^+ 或阳离子。

[1224] 在第十四具体实施方案中,对于式(L3)的免疫缀合物, m' 是1,且 R_1 和 R_2 均是H;且其余变量如以上在第十三具体实施方案中所描述。

[1225] 在第十五具体实施方案中,对于式(L3)的免疫缀合物, m' 是2,且 R_1 和 R_2 均是Me;且其余变量如以上在第十三具体实施方案中所描述。

[1226] 在第十六具体实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:



[1228] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数。

[1229] 在第十七具体实施方案中,对于第一实施方案的免疫缀合物, M 是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ ;且其余变量如以上在第一至第十六具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1230] 在以上第一至第十七具体实施方案中的任一者中,主题抗体或其抗原结合片段可允许六个轻链和重链CDR区中任一者中的一个或多个(例如实质上所有或100%)Lys残基由Arg取代。主题抗体或其抗原结合片段可包含具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区(HCVR);和具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(LCVR)。主题抗体或其抗原结合片段还可包含具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列的Ig HCVR;和具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。主题抗

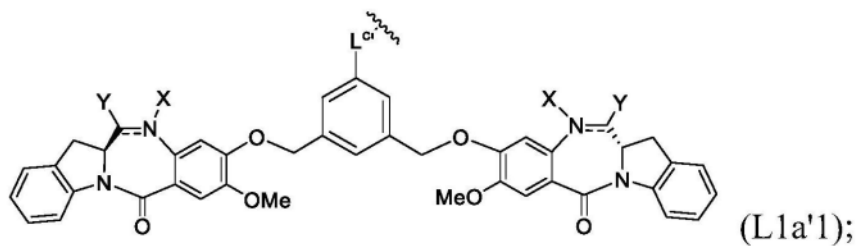
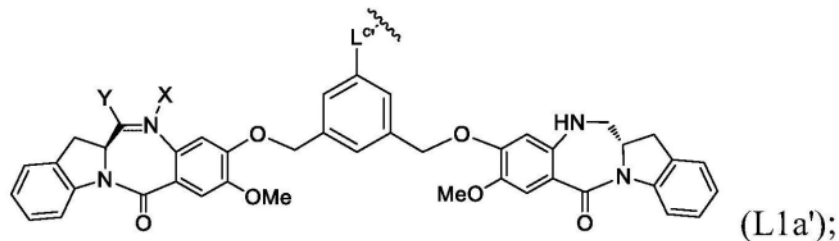
体或其抗原结合片段可进一步包含具有SEQ ID NO:32、34、38、39或40中所阐述的氨基酸序列的Ig HCVR;和具有SEQ ID NO:33、35、37或41中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:34的N末端的第二个残基是Phe,而在某些其他实施方案中,来自SEQ ID NO:34的N末端的第二个残基是Val。

[1231] 第一实施方案或其中所描述的任何具体实施方案所描述的免疫缀合物可根据本领域中已知的任何方法来制备,参见例如WO 2012/128868和W02012/112687,其以引用的方式并入本文中。

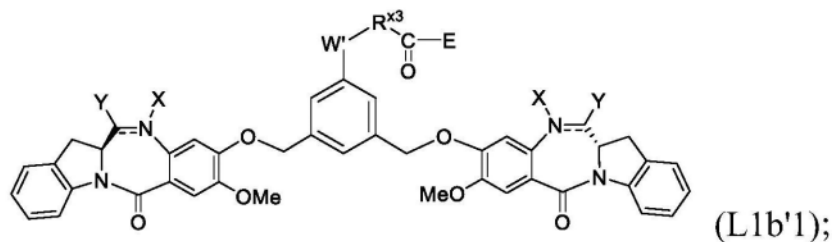
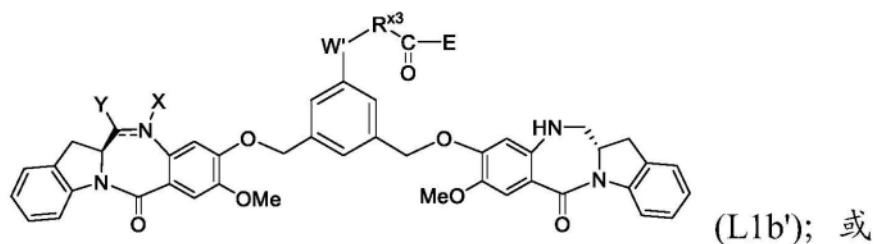
[1232] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第一种方法来制备,所述方法包括使CBA与具有胺反应性基团的细胞毒性剂反应的步骤。

[1233] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第一种方法,所述反应是在诸如NaHSO₃的亚胺反应性试剂存在下进行。

[1234] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第一种方法,具有胺反应性试剂的细胞毒性剂由以下各式表示:



[1235]



[1236] 或其药学上可接受的盐,其中:

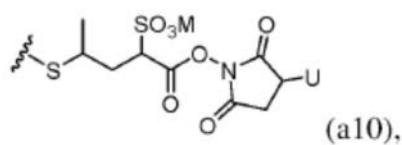
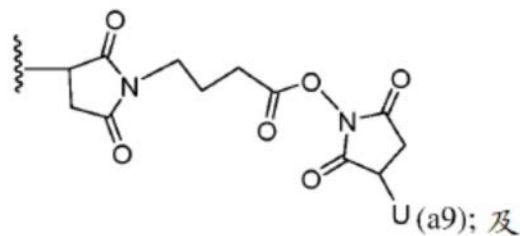
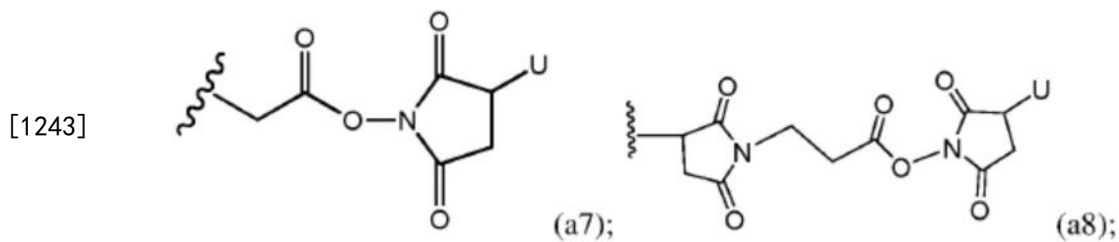
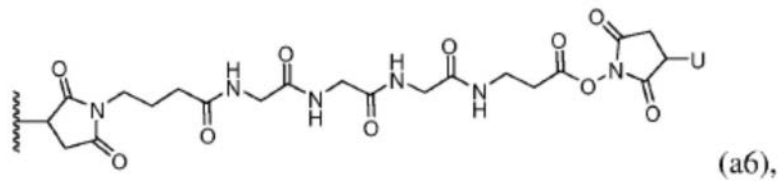
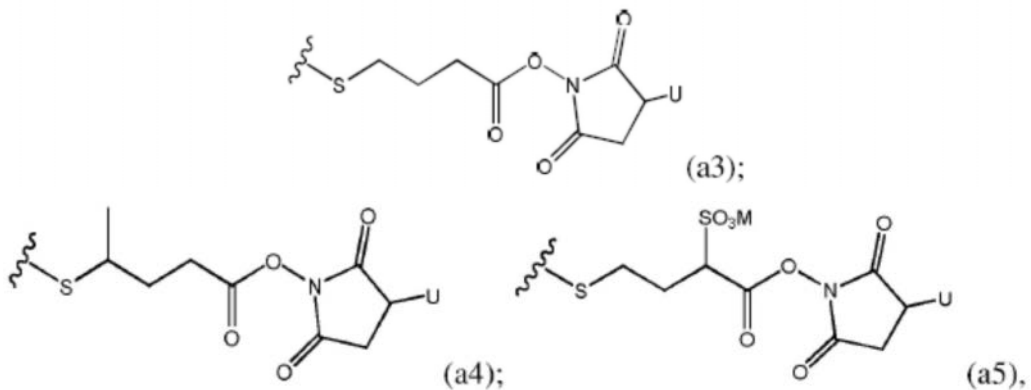
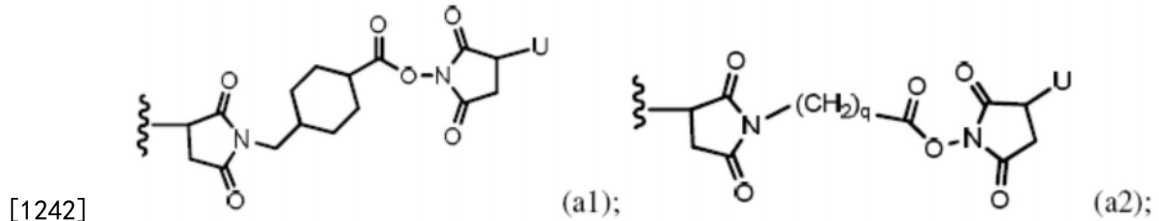
[1237] L^C 由以下各式表示:

[1238] $-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)E(B1)$; 或

[1239] $-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^S(B2)$

[1240] $C(=O)E$ 是反应性酯基, 诸如 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯、*N*-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基 (例如 2-硝基苯基或 4-硝基苯基) 酯、二硝基苯基 (例如, 2,4-二硝基苯基) 酯、磺基四氟苯基 (例如, 4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基) 酯或五氟苯基酯, 优选 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯;

[1241] Z^S 由以下各式表示:



[1244] 其中:

[1245] q是1至5的整数;并且

[1246] U是-H或SO₃M;并且

[1247] 其余变量如第一至第七和第十七具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1248] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第二种方法来制备,所述方法包括以下步骤:

[1249] (a) 使细胞毒性剂与具有胺反应性基团和硫醇反应性基团的接头化合物反应,以形成具有与其结合的胺反应性基团的细胞毒性剂-接头化合物;以及

[1250] (b) 使CBA与细胞毒性剂-接头化合物反应。

[1251] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第二种方法,步骤(a)中的反应是在亚胺反应性试剂存在下进行。

[1252] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第二种方法,在未进行纯化的情况下使细胞毒性剂-接头化合物与CBA反应。或者,在与CBA反应之前首先对细胞毒性剂-接头化合物进行纯化。

[1253] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第三种方法来制备,所述方法包括以下步骤:

[1254] (a) 使CBA与具有胺反应性基团和硫醇反应性基团的接头化合物反应,以形成具有与其结合的硫醇反应性基团的修饰的CBA;和

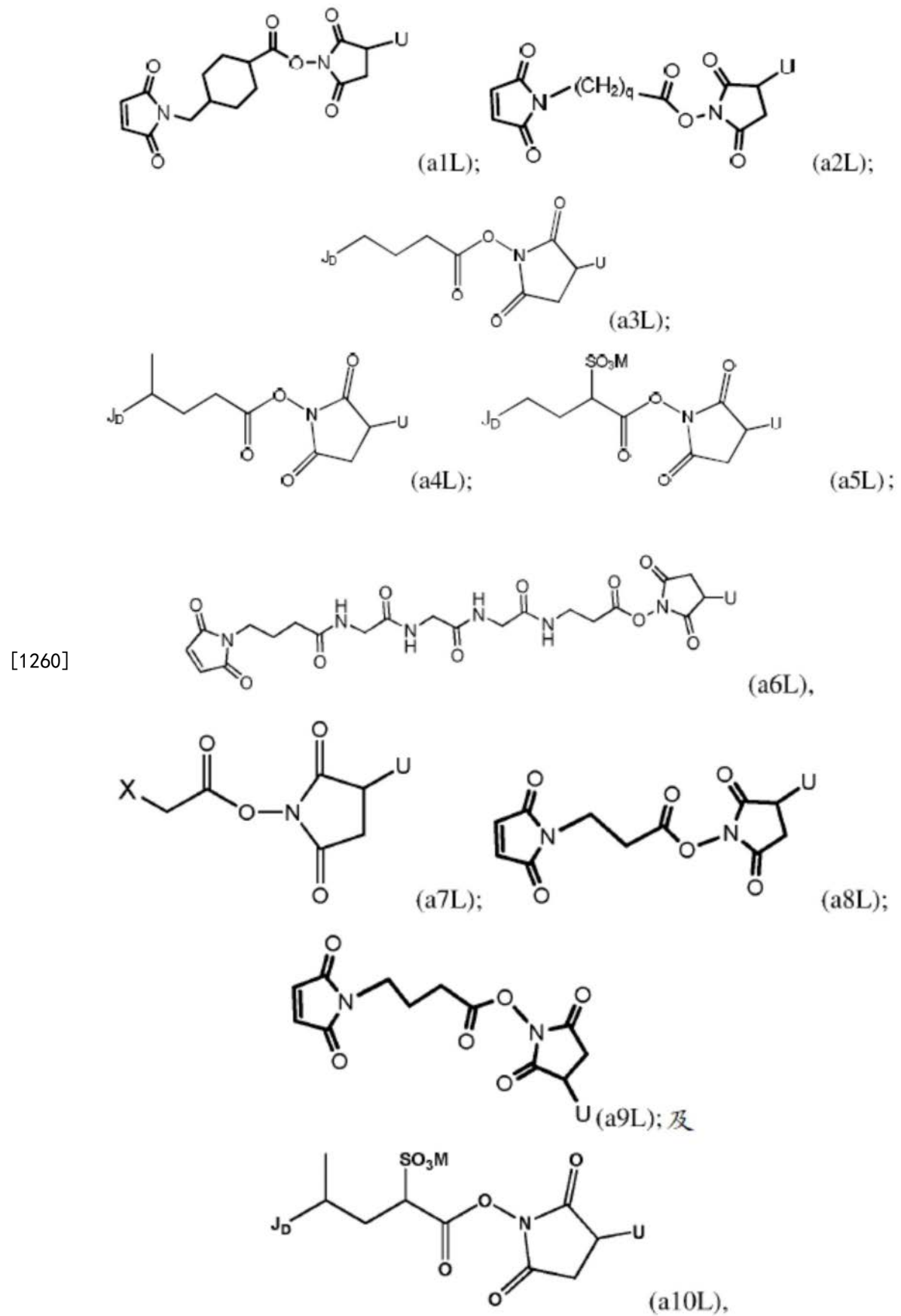
[1255] (b) 使所述修饰的CBA与细胞毒性剂反应。

[1256] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第三种方法,步骤(b)中的反应是在亚胺反应性试剂存在下进行。

[1257] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第四种方法来制备,所述方法包括使CBA、细胞毒性化合物和具有胺反应性基团和硫醇反应性基团的接头化合物反应的步骤。

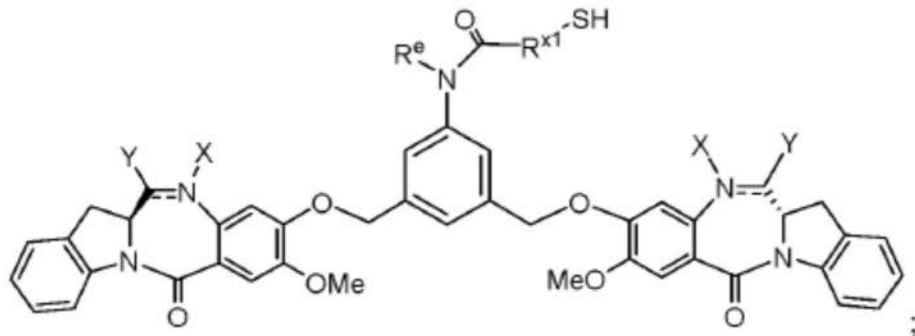
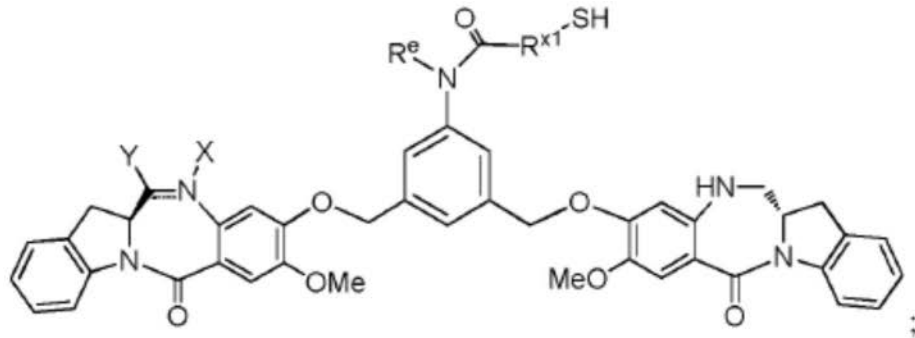
[1258] 在一个实施方案中,对于第四种方法,所述反应是在亚胺反应性试剂存在下进行。

[1259] 在某些实施方案中,对于以上所描述的第二、第三或第四实施方案,具有胺反应性基团和硫醇反应性基团的接头化合物由以下各式表示:

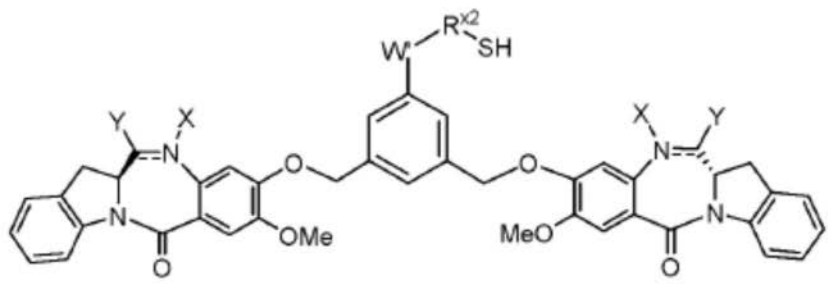
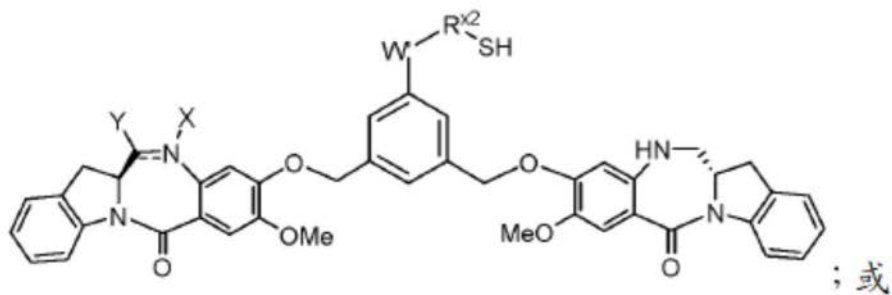


[1261] 其中X是卤素, J_D 是-SH、-SSR^d或-SC(=O)R^e; R^d是苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基; R^e是烷基; 且其余变量如以上针对式(a1)至式(a10)所

描述;且细胞毒性剂由以下各式表示:

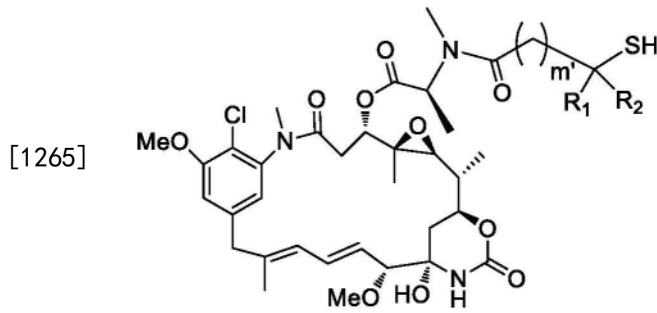


[1262]



[1263] 或其药学上可接受的盐,其中变量如第八至第十二和第十七具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

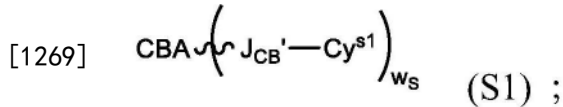
[1264] 在某些实施方案中,对于以上所描述的第二种、第三种或第四种方法,具有胺反应性基团和硫醇反应性基团的接头化合物由式(a1L)-式(a10L)中的任一者表示,且细胞毒性剂由下式表示:



[1266] 其中变量如以上在第十三至第十七具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1267] 在第二实施方案中,本发明的免疫缀合物包含本文所描述的本发明第一方面中所描述的氧化CD123/IL-3R α 结合剂(包括抗体、其抗原结合片段,或包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽)(例如氧化的抗体或其抗原结合片段,或其多肽),其通过位于氧化CD123结合剂上中的一个或多个醛基而共价连接于本文所描述的细胞毒性剂。位于氧化CD123/IL-3R α 结合剂上的醛基可通过使CD123/IL-3R α 结合剂中的一个或多个2-羟基乙胺部分氧化而产生,其中所述2-羟基乙胺部分是丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸、4-羟基鸟氨酸或2,4-二氨基-5-羟基戊酸残基中的一部分。在一个实施方案中,醛基可通过使位于CD123/IL-3R α 结合剂上中的一个或多个N末端丝氨酸残基(例如,轻链和/或重链的N末端上的1、2、3或至多4个Ser残基)的2-羟基乙胺部分氧化来产生。

[1268] 在第二实施方案的第一具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

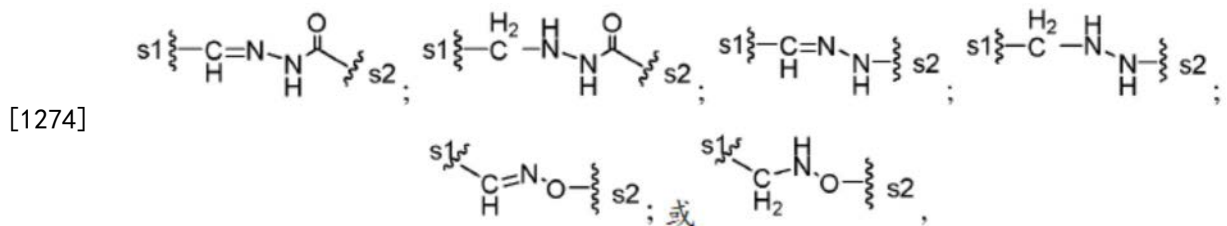


[1270] 其中:

[1271] CBA是本发明的第一方面中所描述的氧化CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文中所描述的主题氧化抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题氧化多肽);

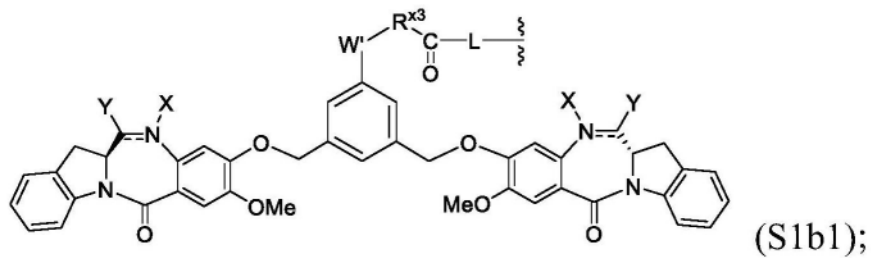
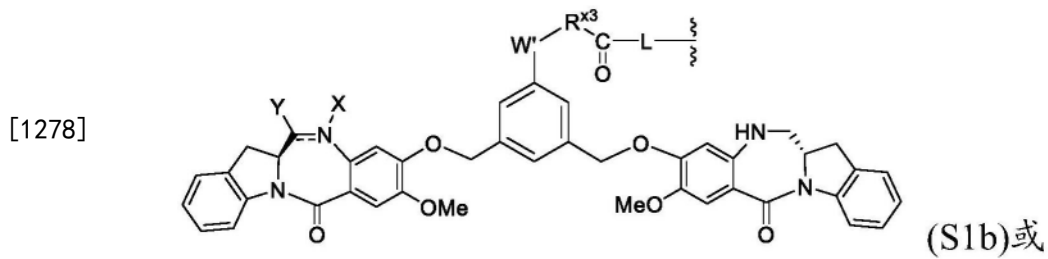
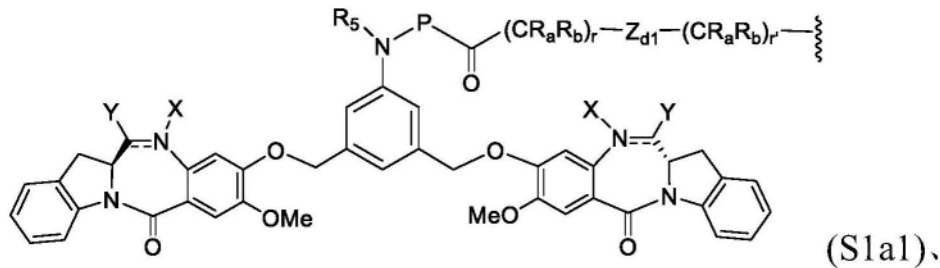
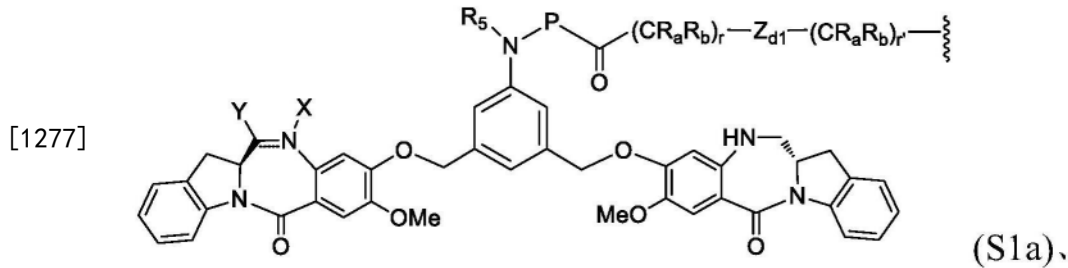
[1272] w_s 是1、2、3或4;

[1273] J_{CB}' 是通过使CBA上的醛基与 Cy^{s1} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:



[1275] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;且s2是与 Cy^{s1} 共价连接的位点;

[1276] Cy^{s1} 由以下各式表示:



[1279] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1280] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[1281] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1282] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[1283] Z_{d1}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[1284] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

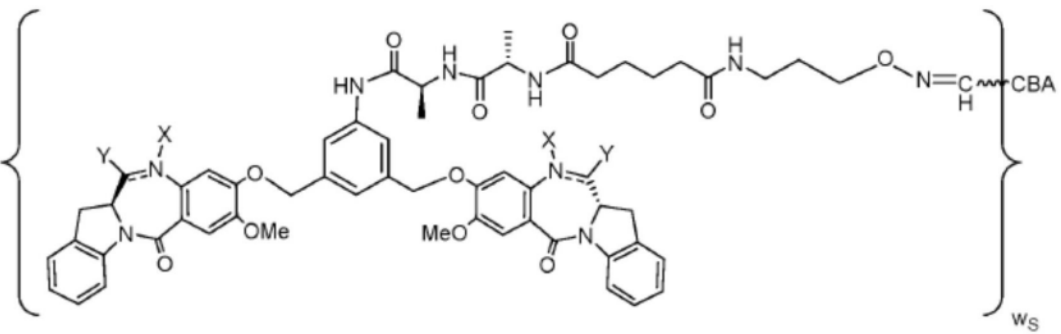
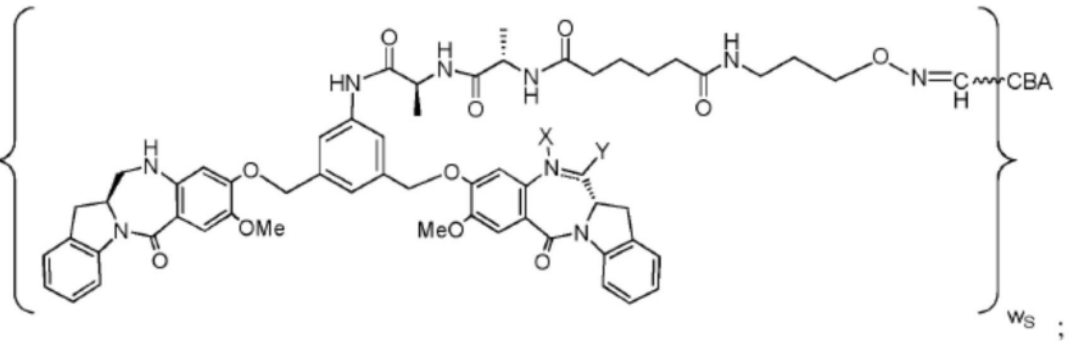
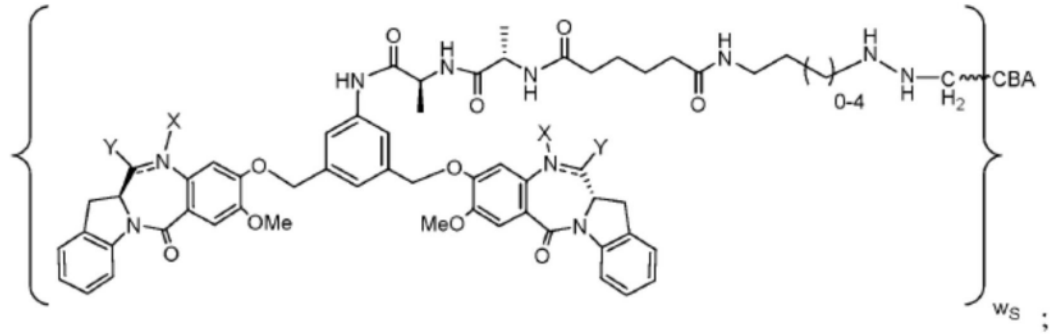
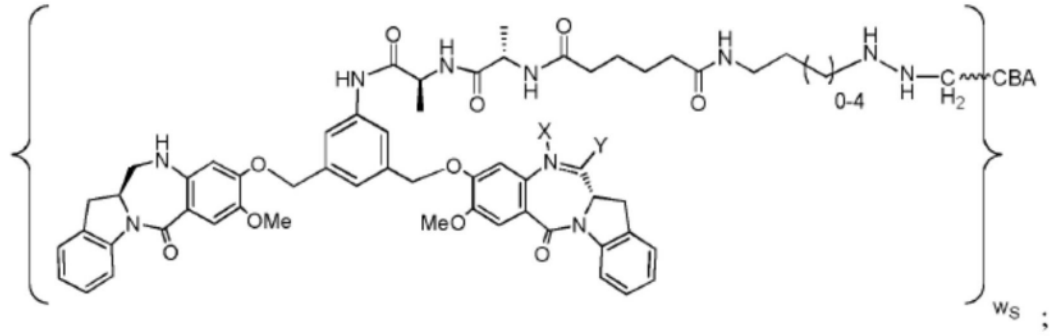
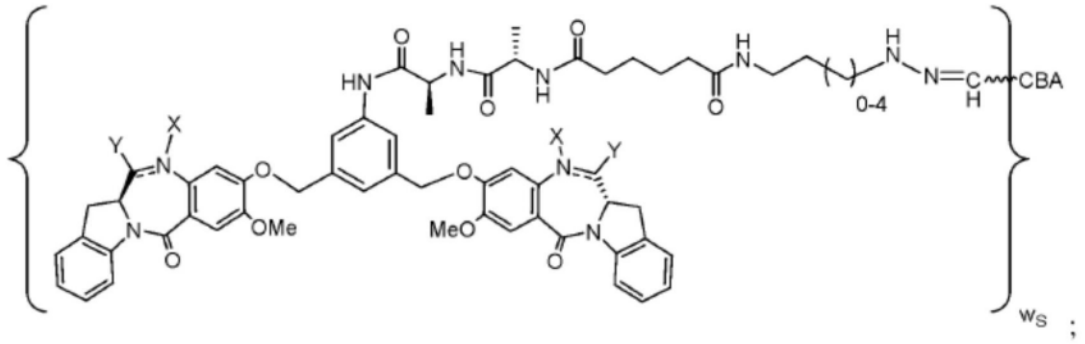
[1285] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

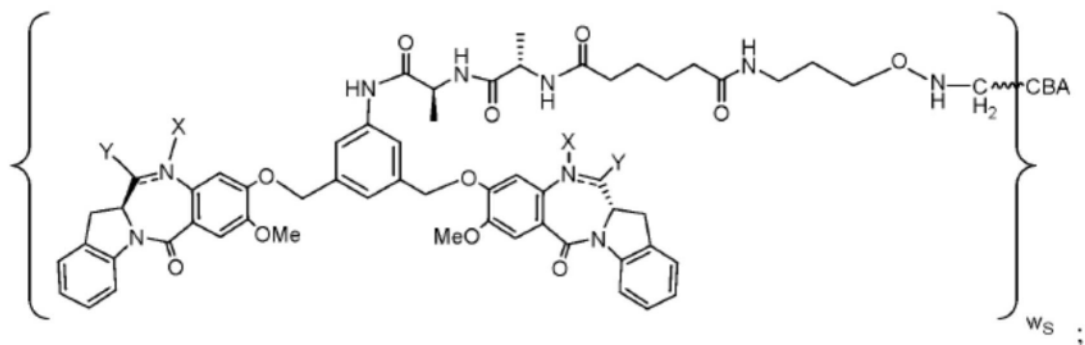
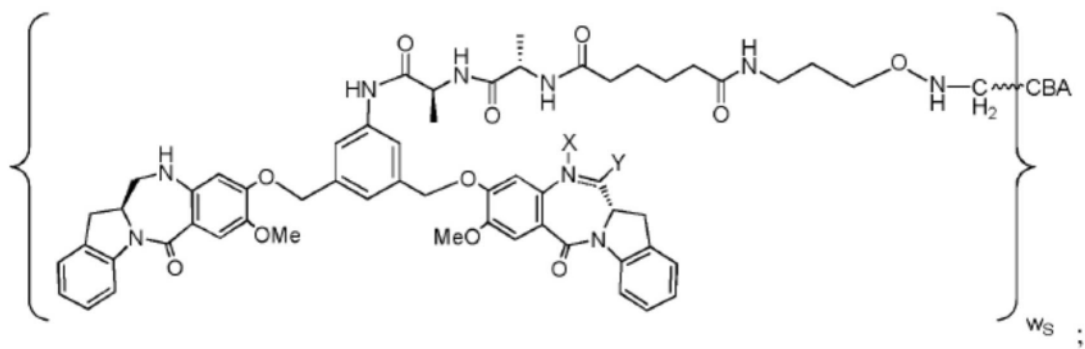
[1286] r和r'独立地是1至6的整数;

[1287] W'是-NR^{e'};

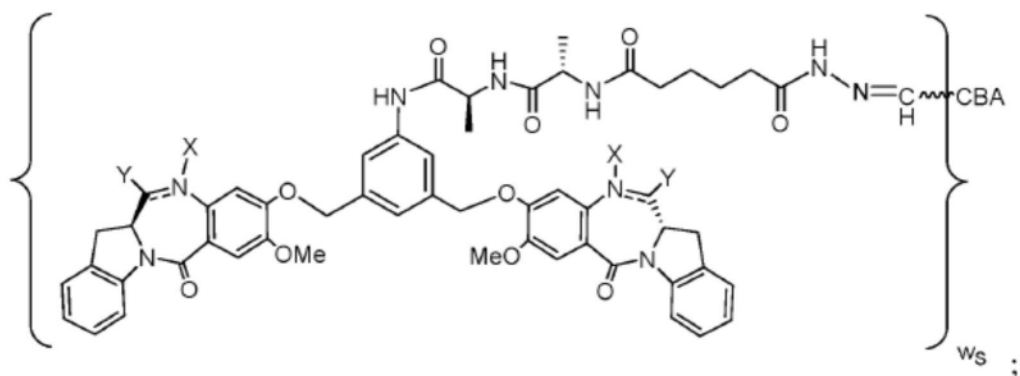
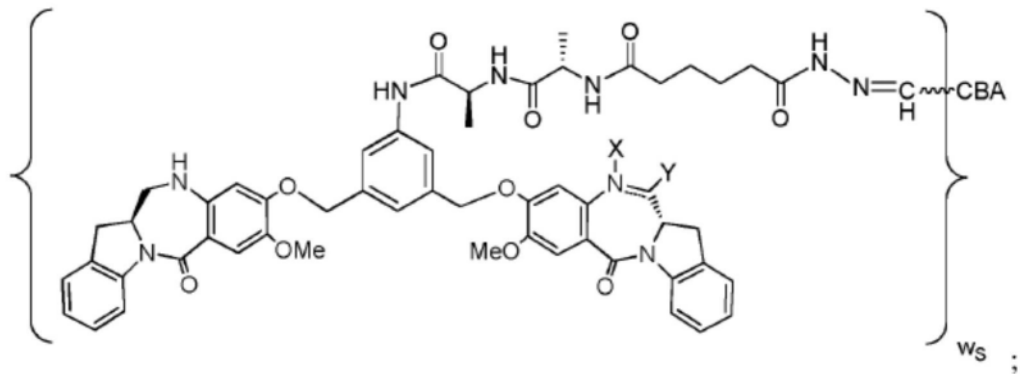
[1288] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

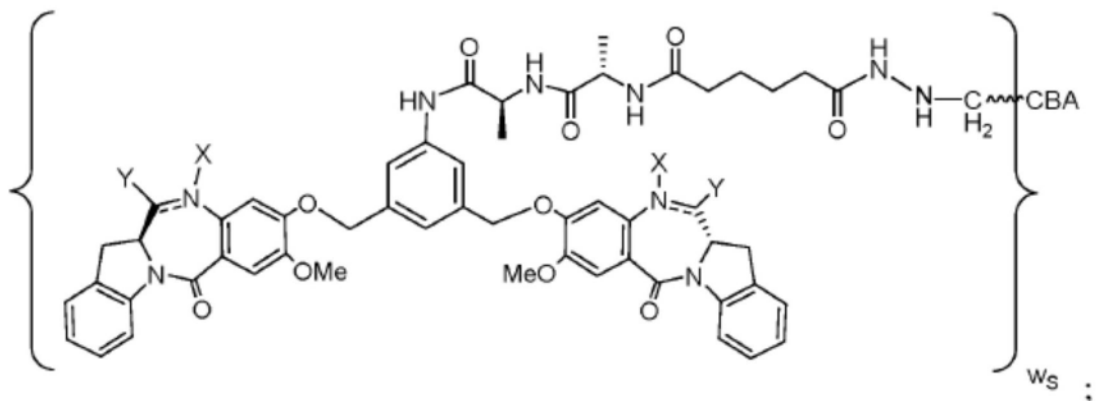
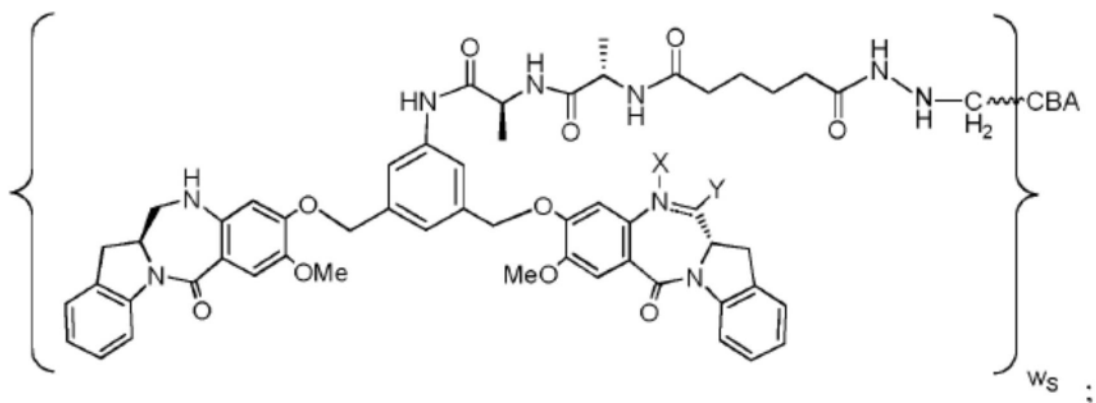
[1301]



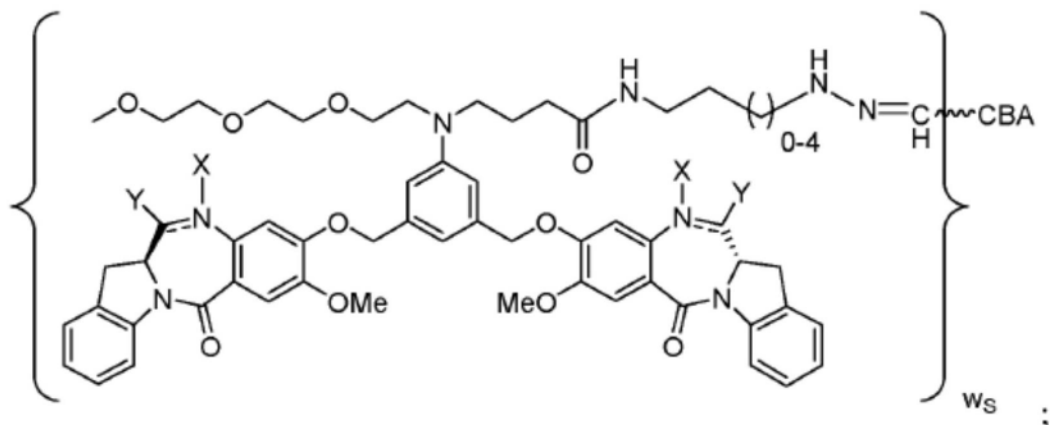
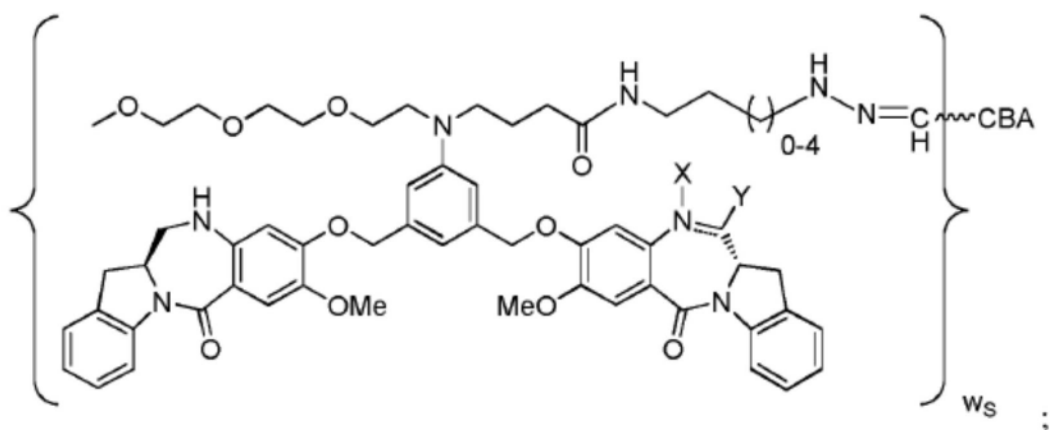


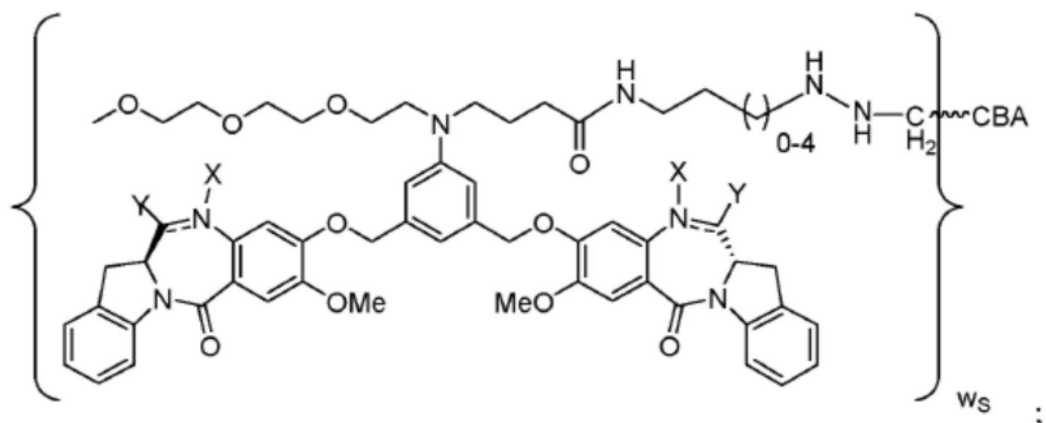
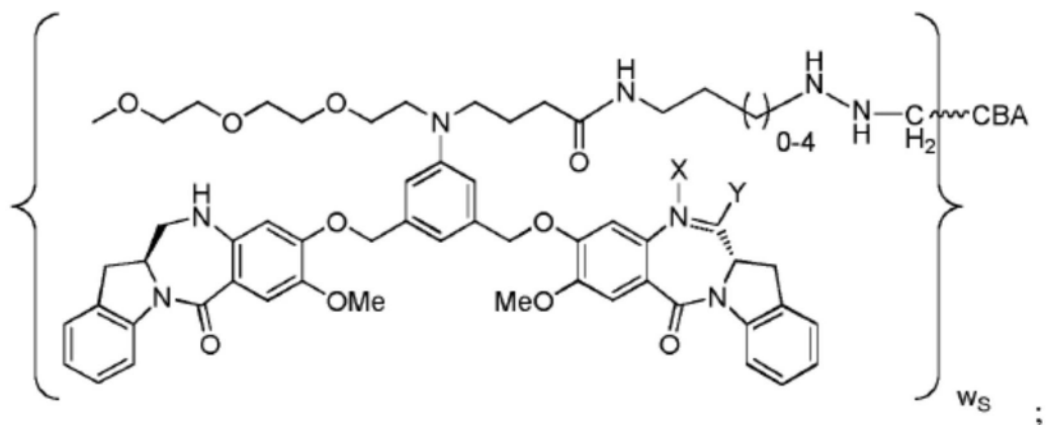
[1302]



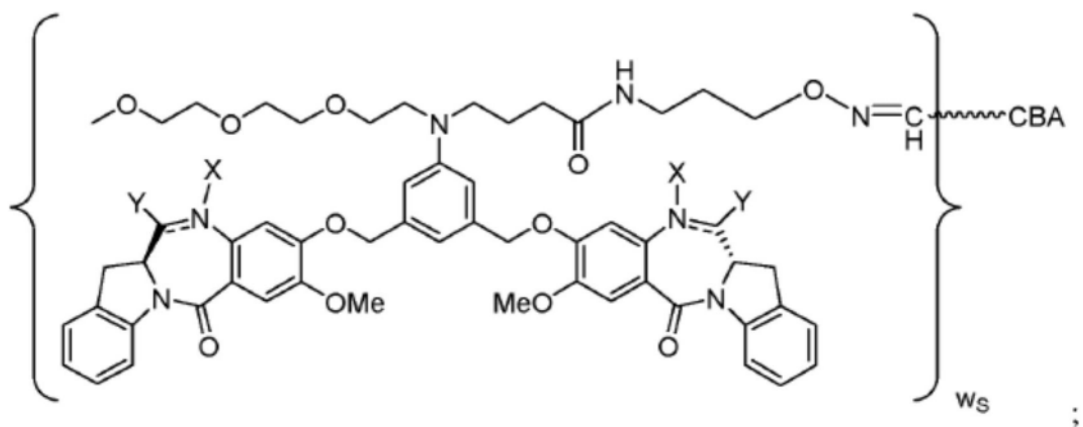
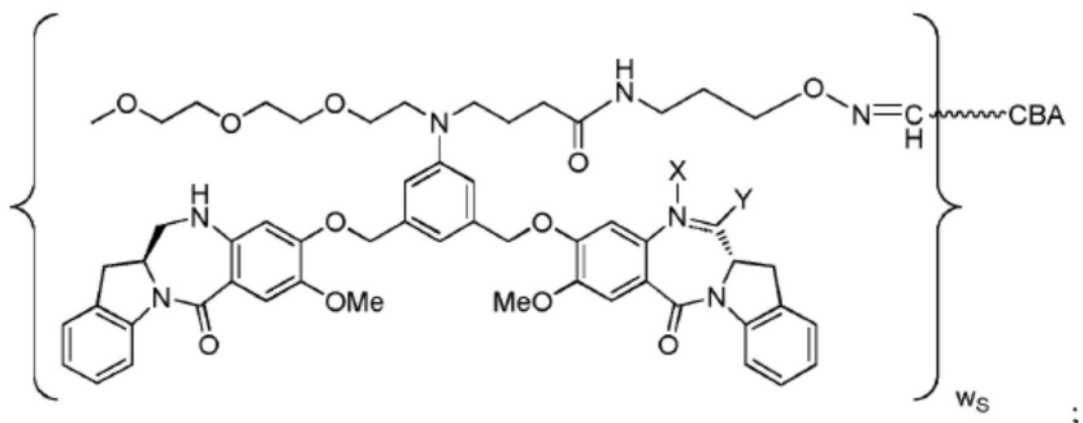


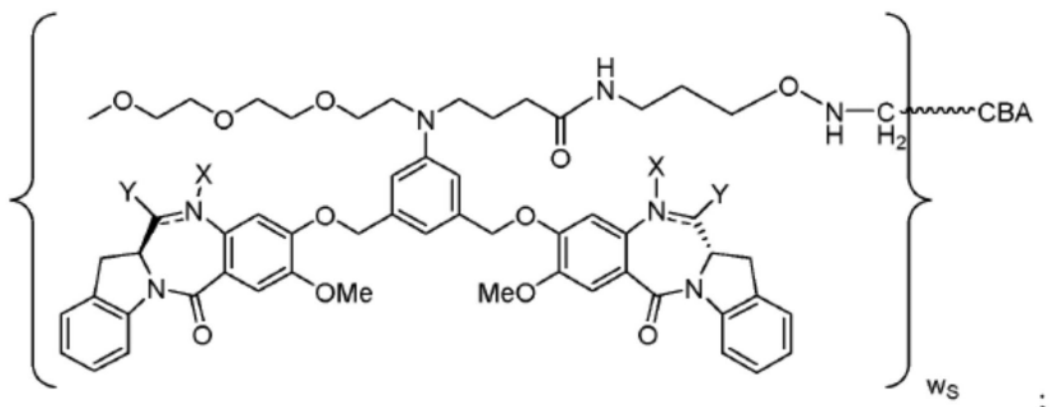
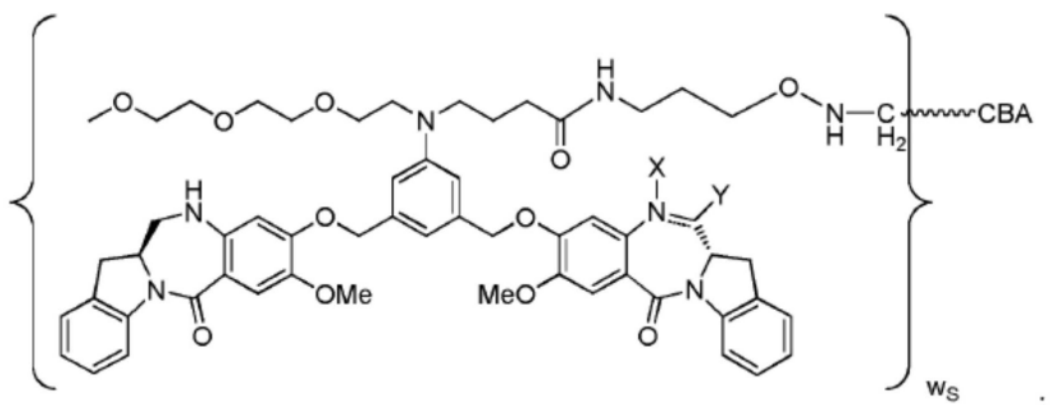
[1303]



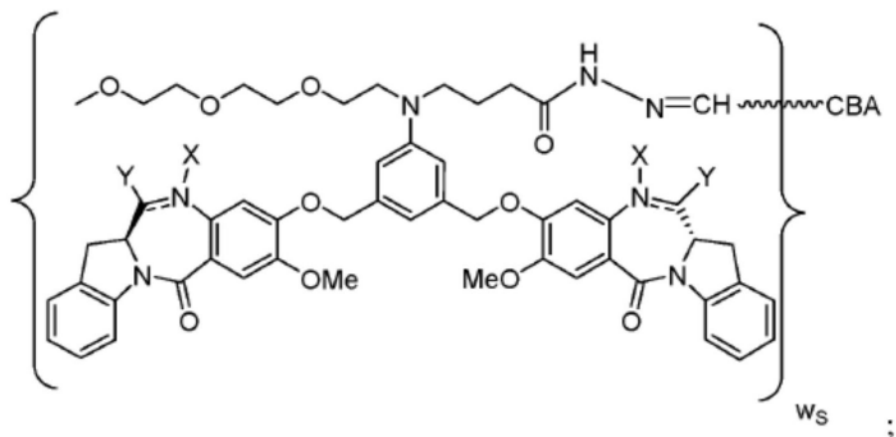
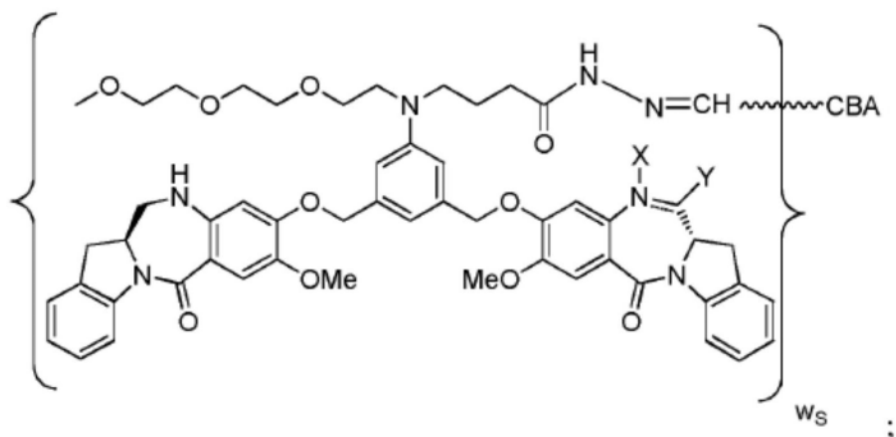


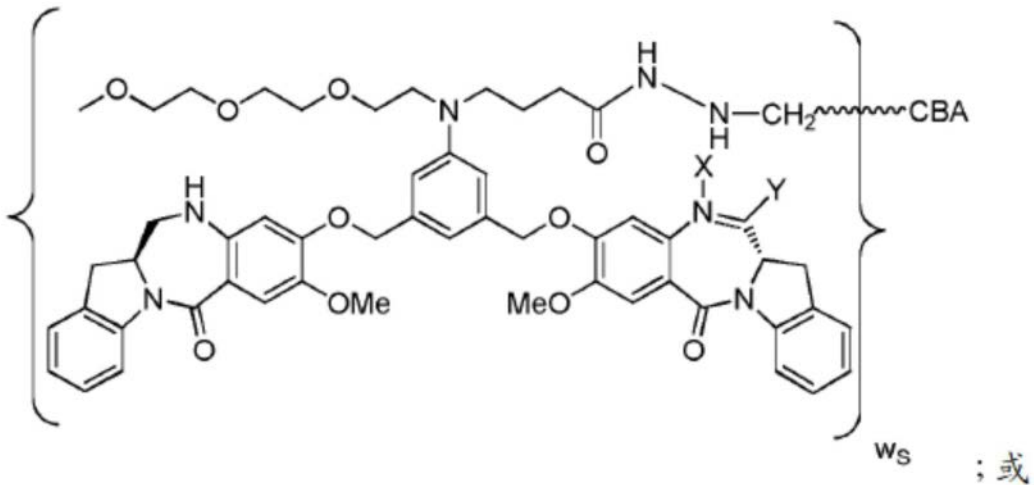
[1304]



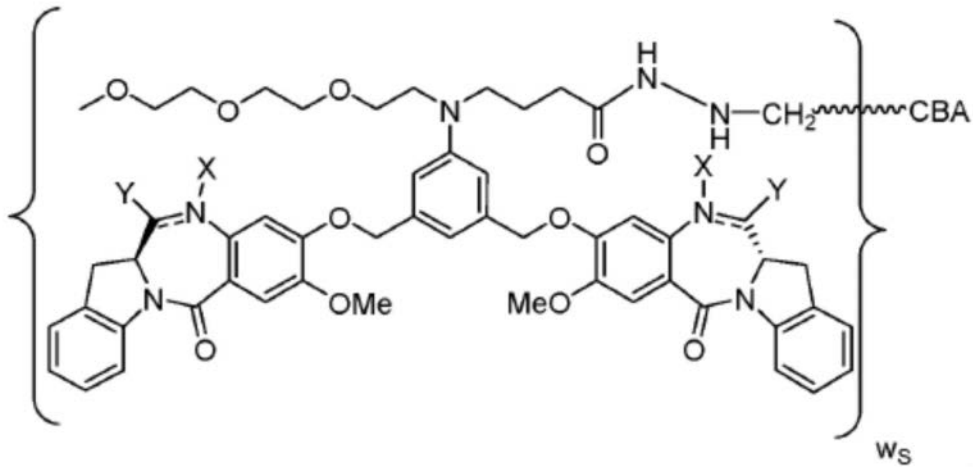


[1305]



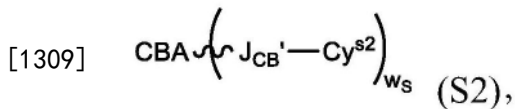


[1306]



[1307] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。在一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。在另一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

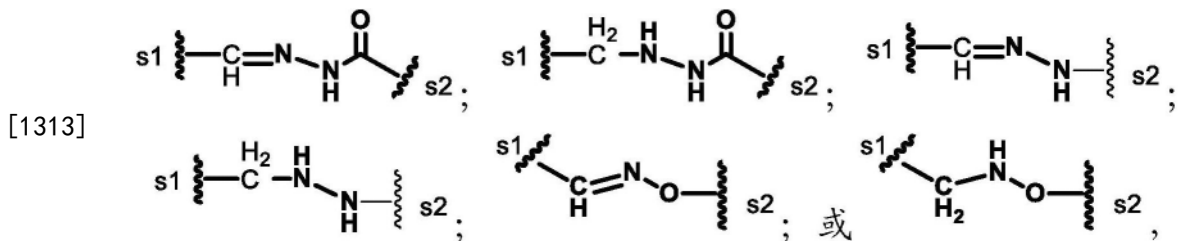
[1308] 在第八具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:



[1310] 其中:

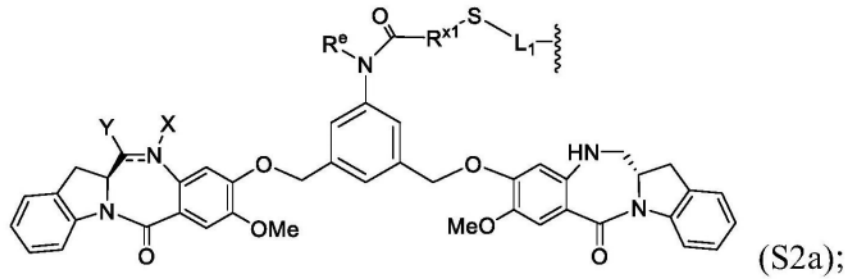
[1311] CBA是本发明的第一方面中所描述的氧化CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文中所描述的主题氧化抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题氧化多肽);

[1312] J_{CB'}是通过使CBA上的醛基与Cy^{s2}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

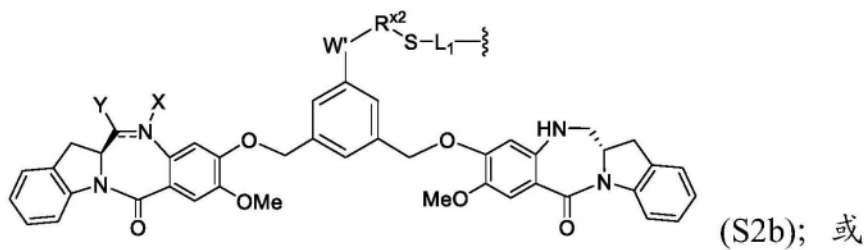
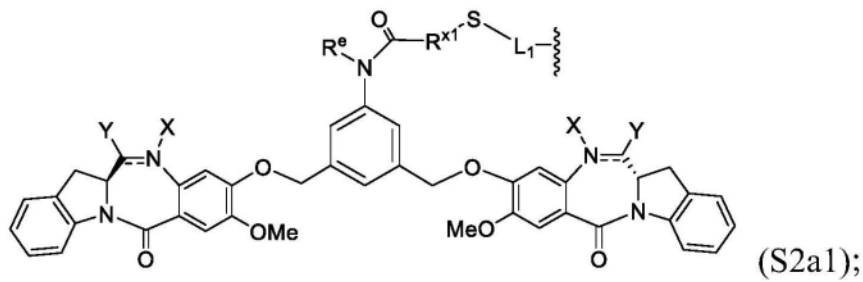


[1314] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;且s2是与Cy^{s2}共价连接的位点;

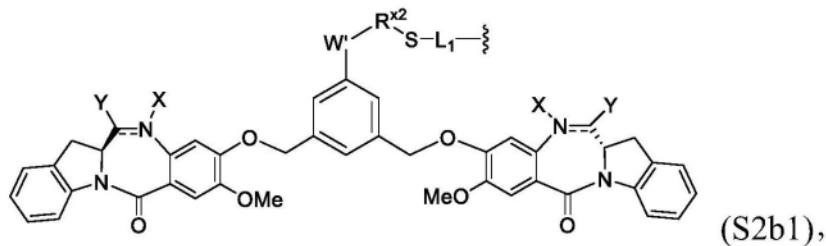
[1315] Cy^{s2}由以下各式表示:



[1316]



[1317]



[1318] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1319] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

[1320] M是H⁺或阳离子;

[1321] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基;

[1322] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

[1323] W'是-NR^{e'};

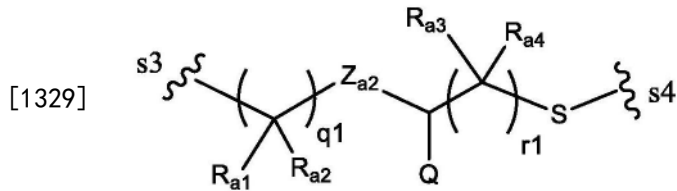
[1324] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[1325] n是2至6的整数;

[1326] R^k是-H或-Me;

[1327] R^{x2}是(C₁-C₆)烷基;

[1328] L₁由下式表示:



[1330] 其中:

[1331] s3是与基团J_{CB}'共价连接的位点;

[1332] s4是与Cy^{s2}上的-S-基团共价连接的位点;

[1333] Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[1334] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1335] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[1336] R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[1337] q1和r1各自独立地是0至10的整数,其限制条件是q1和r1不均为0。

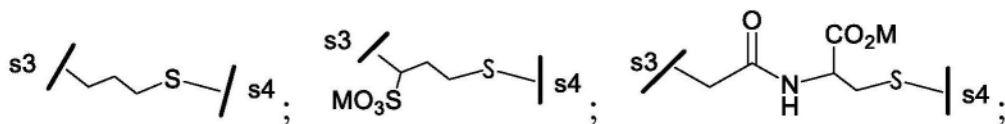
[1338] 在一个更具体实施方案中,Z_{a2}不存在;q1和r1各自独立地是0至3的整数,其限制条件是q1和r1不均为0;且其余变量如以上在第八具体实施方案中所描述。甚至更具体地说,R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}均是-H。

[1339] 在另一个更具体实施方案中,Z_{a2}是-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-;q1和r1各自独立地是1至6的整数;且其余变量如以上在第八具体实施方案中所描述。甚至更具体地说,R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}均是-H。

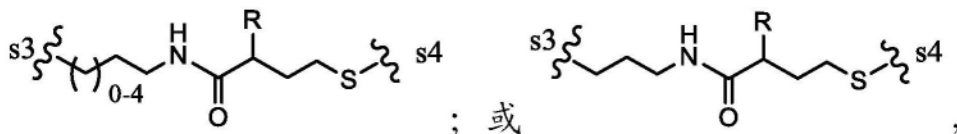
[1340] 在第九具体实施方案中,对于式(S2)的免疫缀合物,Cy^{s2}由式(S2a)或(S2a1)表示;且其余变量如以上在第八具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1341] 在第十具体实施方案中,对于式(S2)的免疫缀合物,Cy^{s2}由式(S2b)或(S2b1)表示;且其余变量如以上在第八具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1342] 在第十一具体实施方案中,对于式(S2)的免疫缀合物,-L₁-由以下各式表示:



[1343]

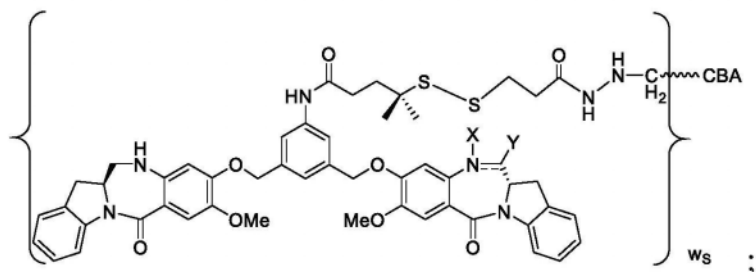
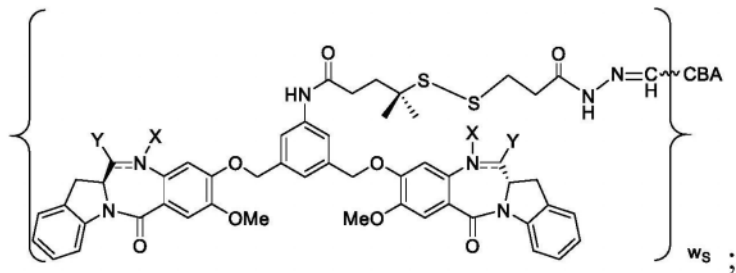
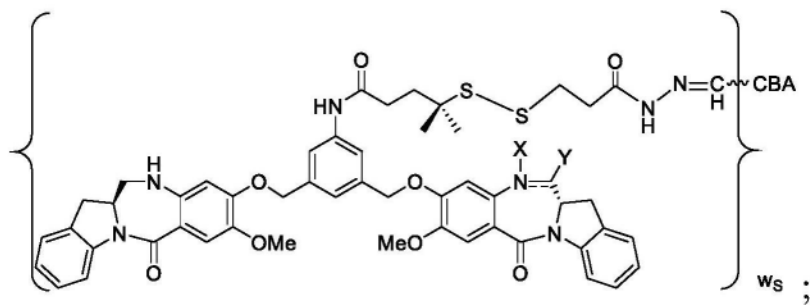


[1344] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M;且其余变量如以上在第八、第九或第十具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

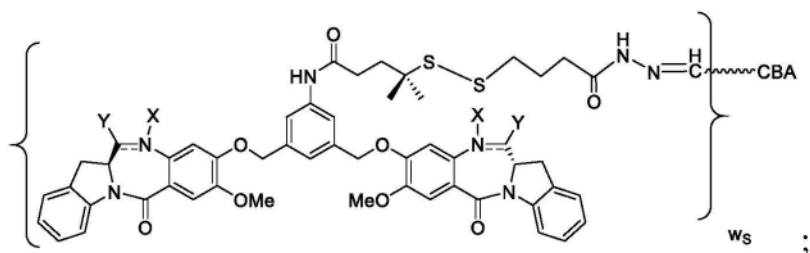
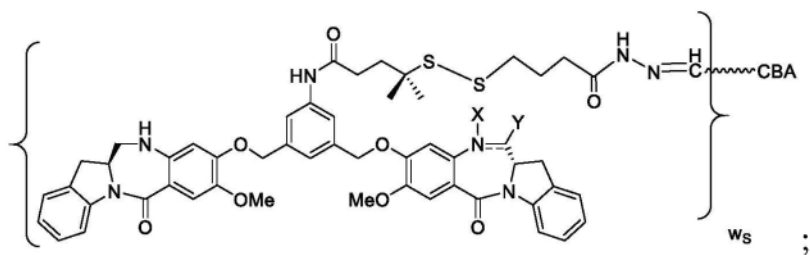
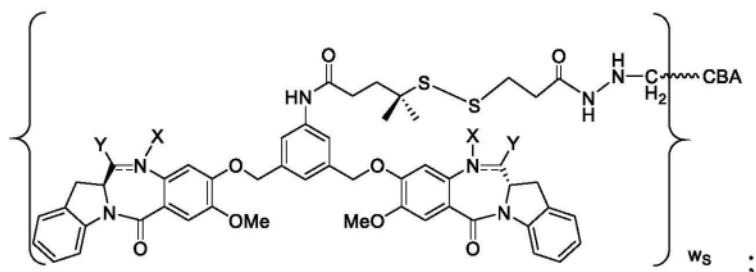
[1345] 在第十二具体实施方案中,对于式(S2)的免疫缀合物,R^e是H或Me;且R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;且p是0、1、2或3。更具体地说,R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[1346] 在第十三具体实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:

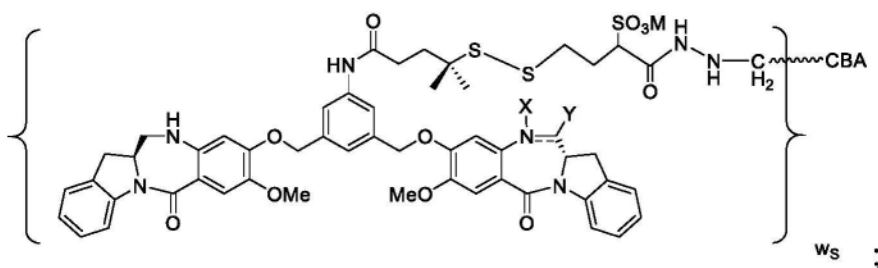
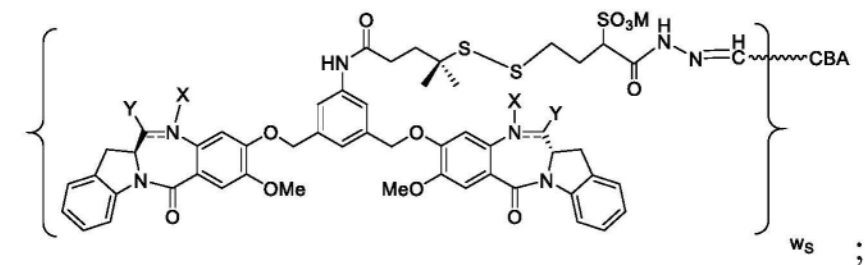
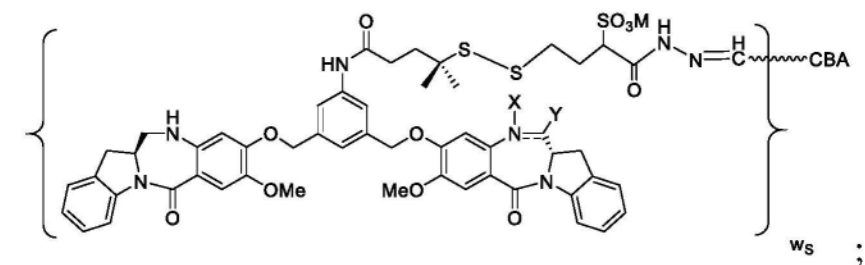
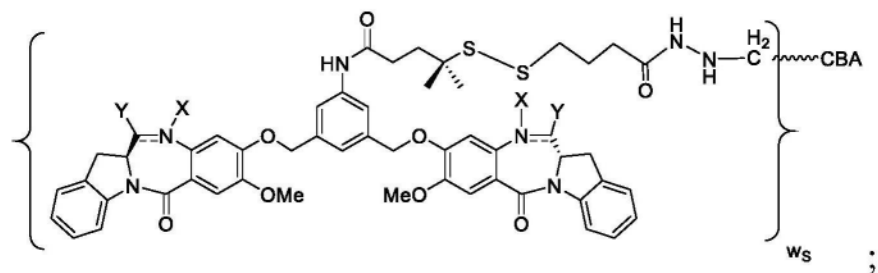
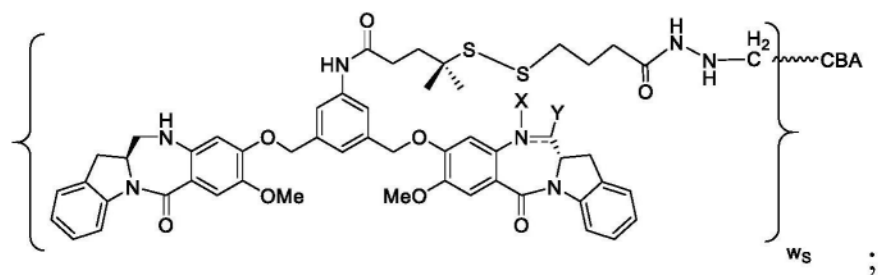
[1347]

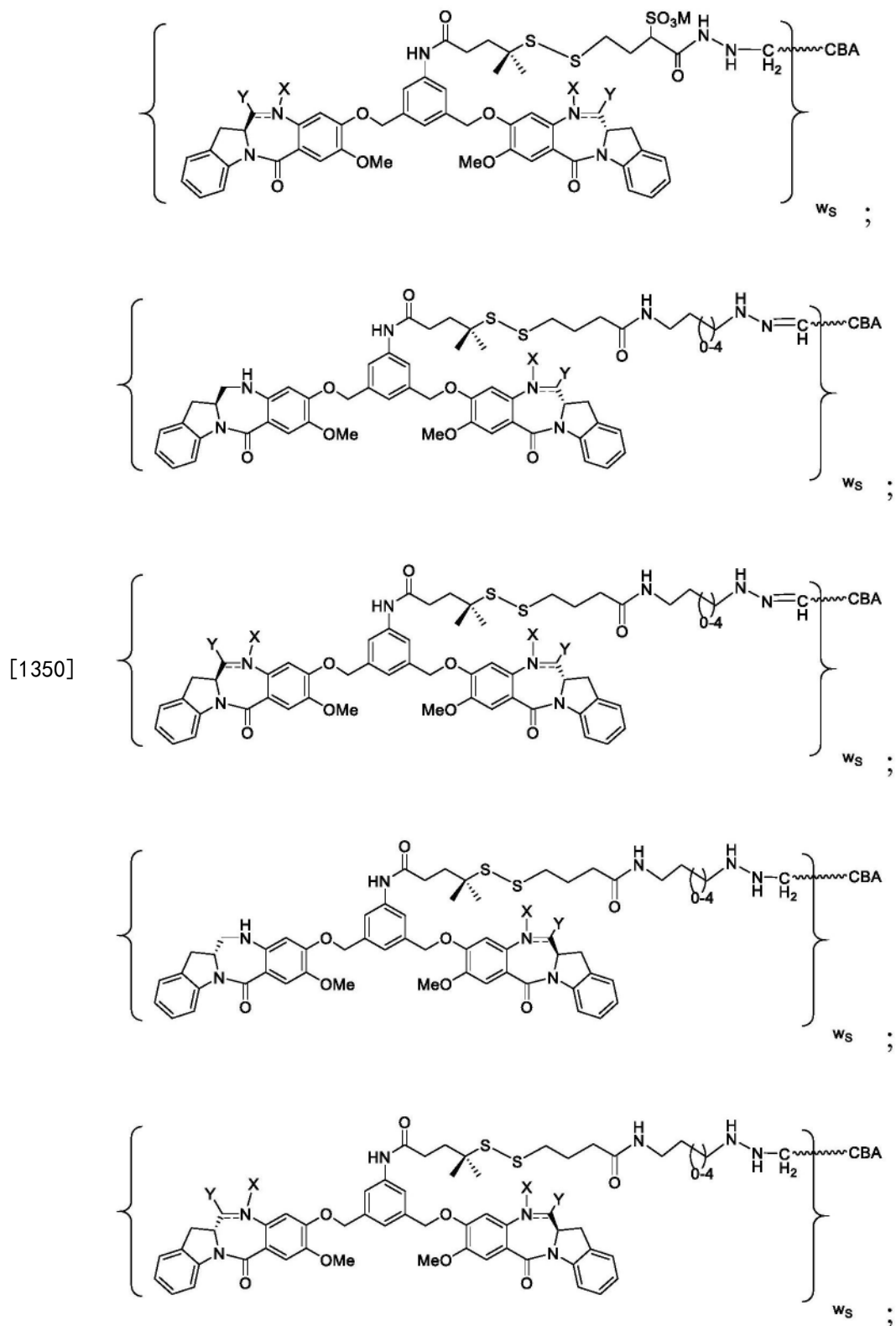


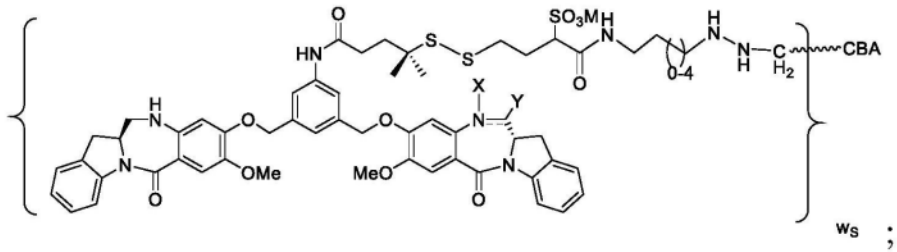
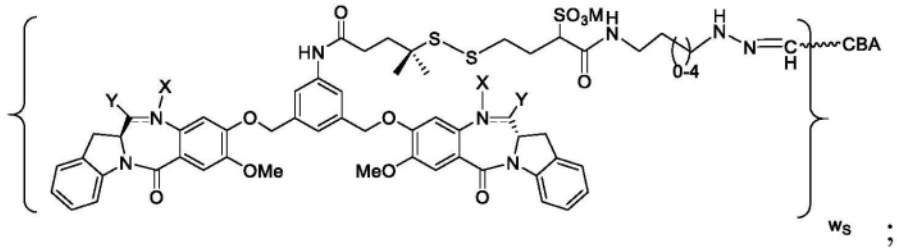
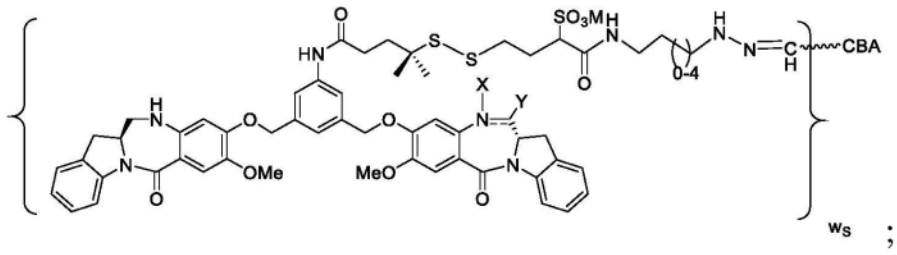
[1348]



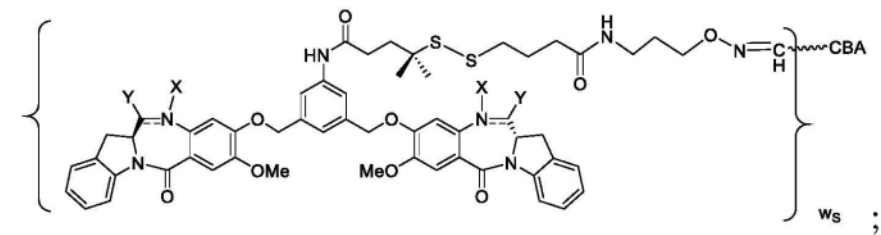
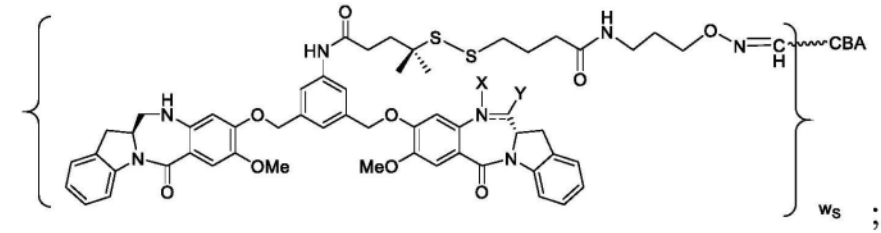
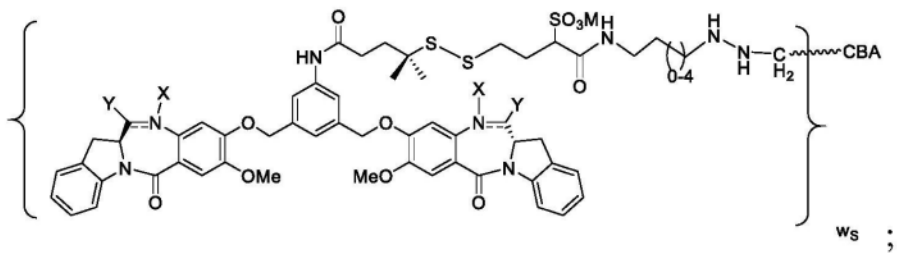
[1349]

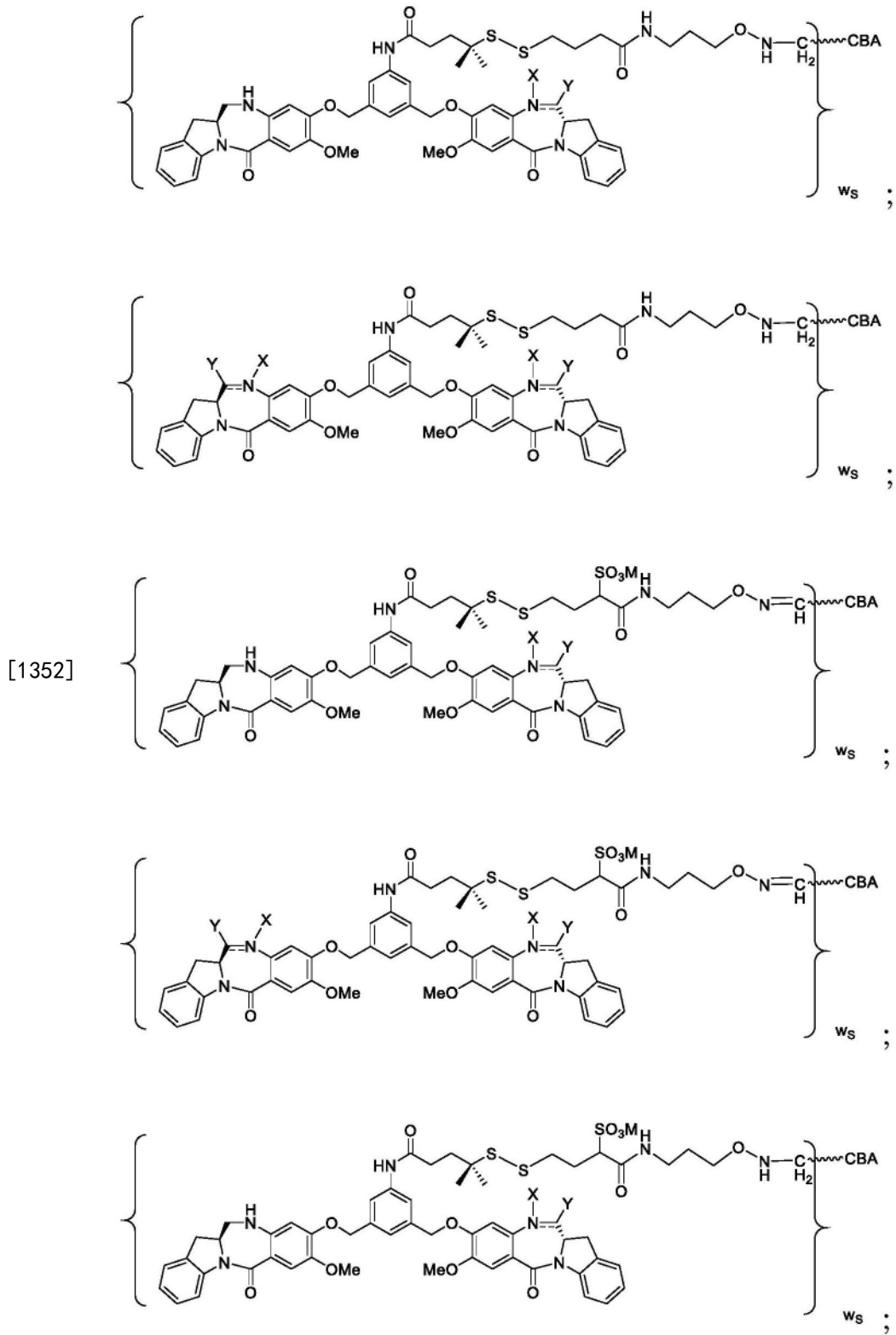




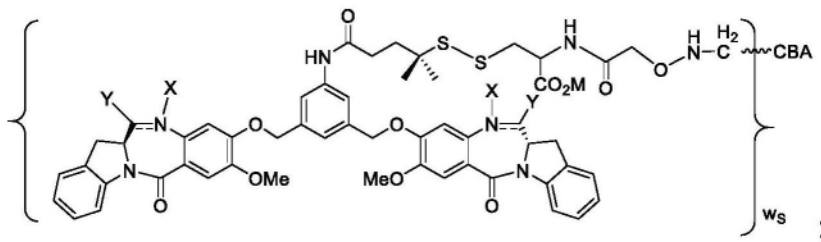
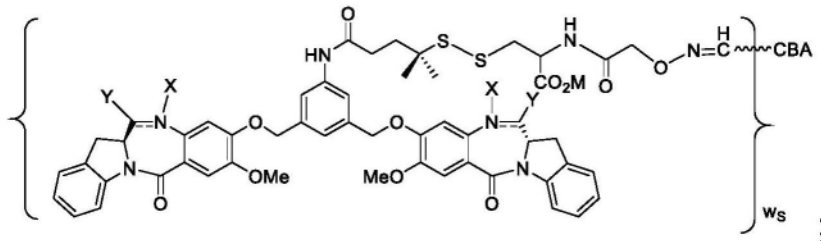
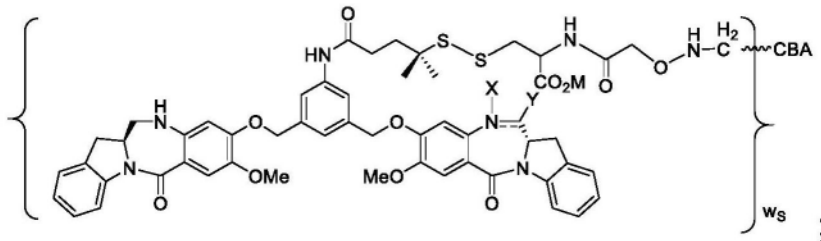
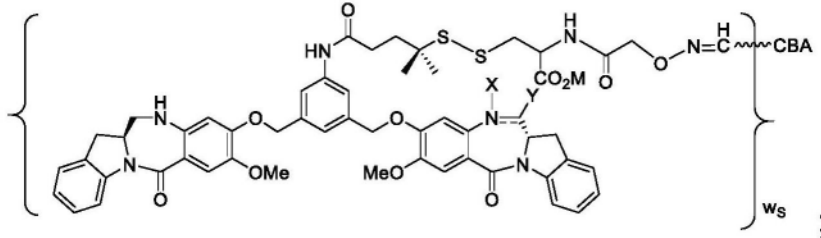
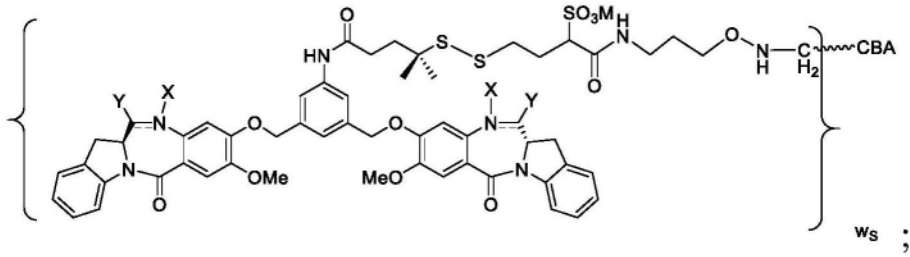


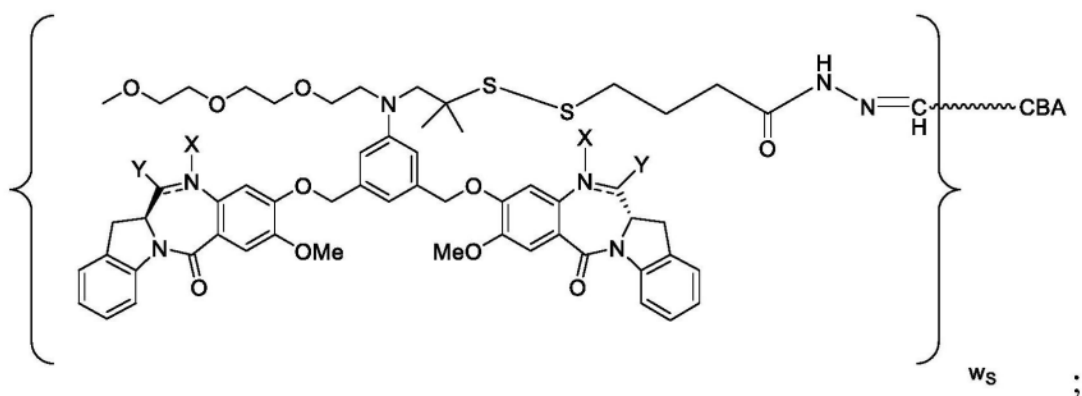
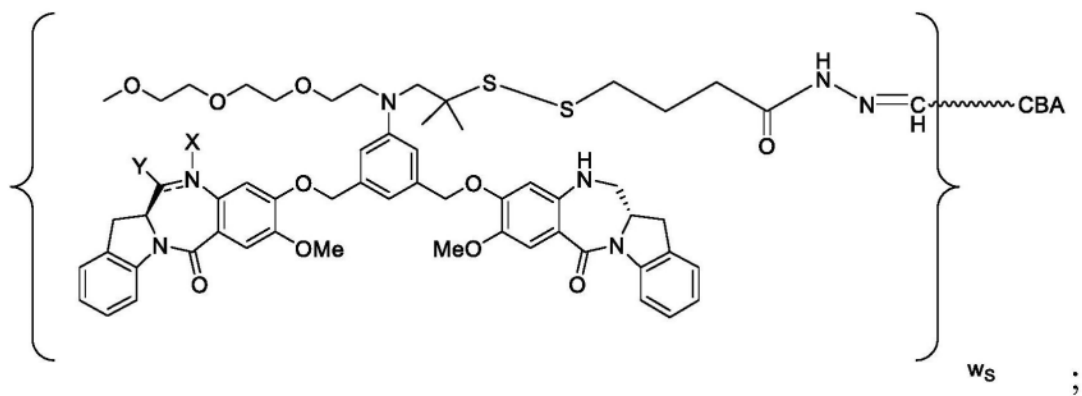
[1351]



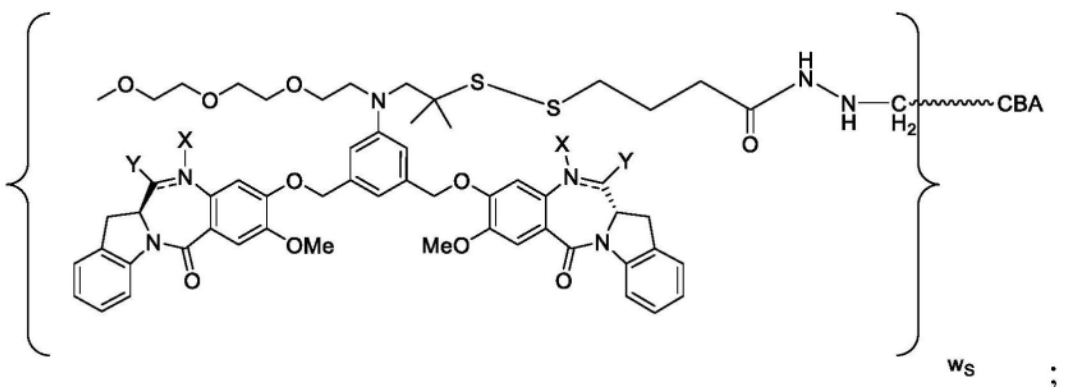
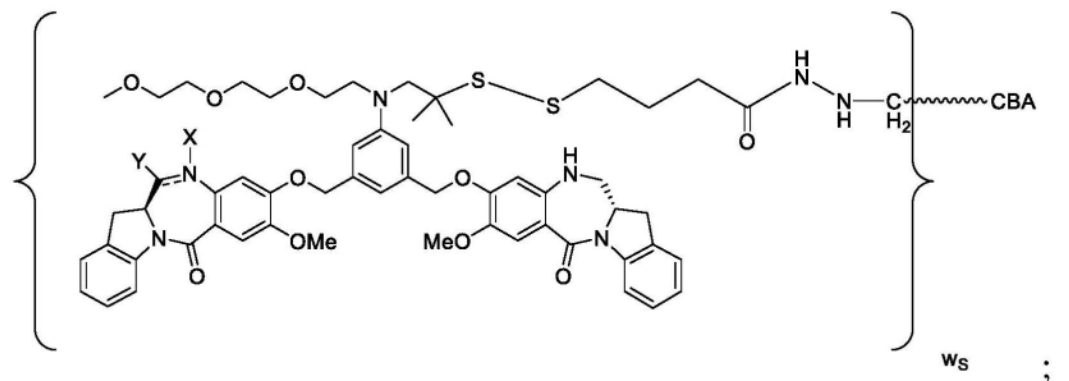


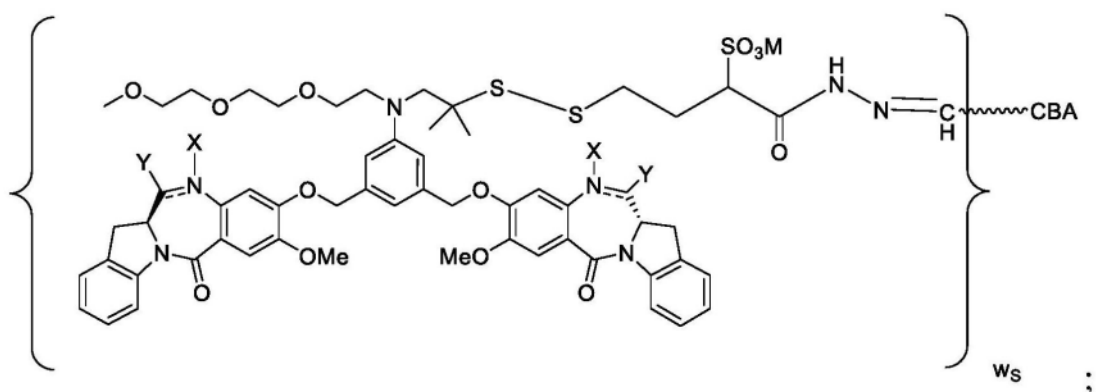
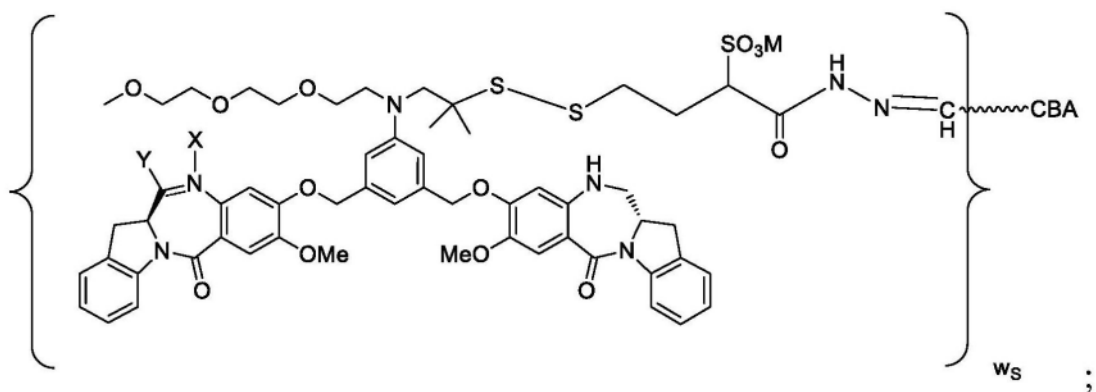
[1353]



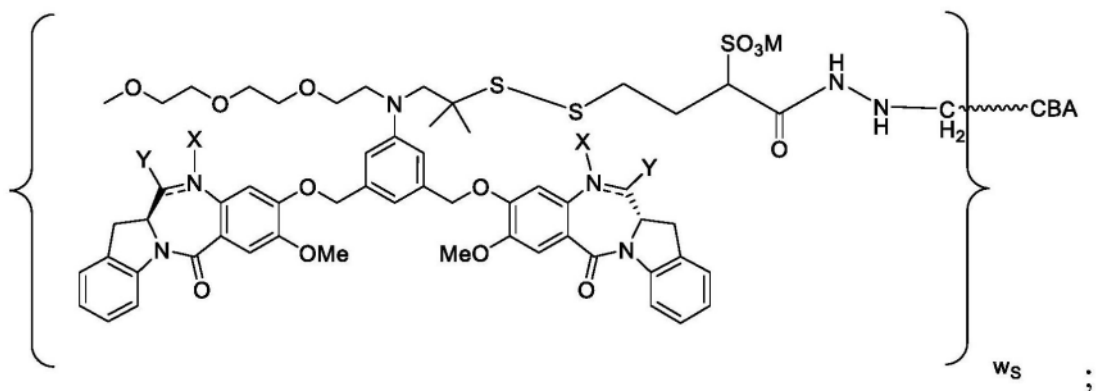
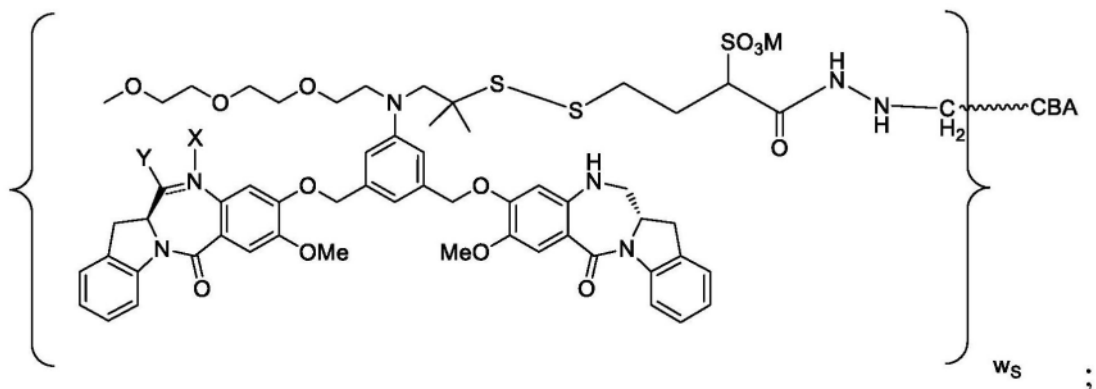


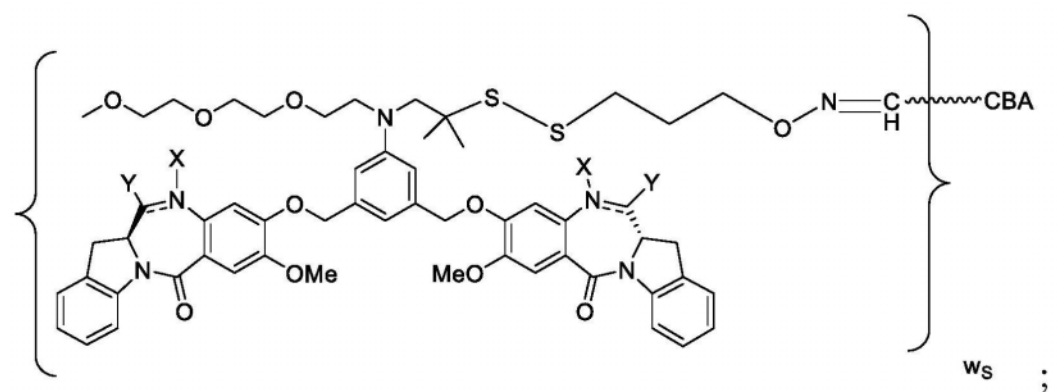
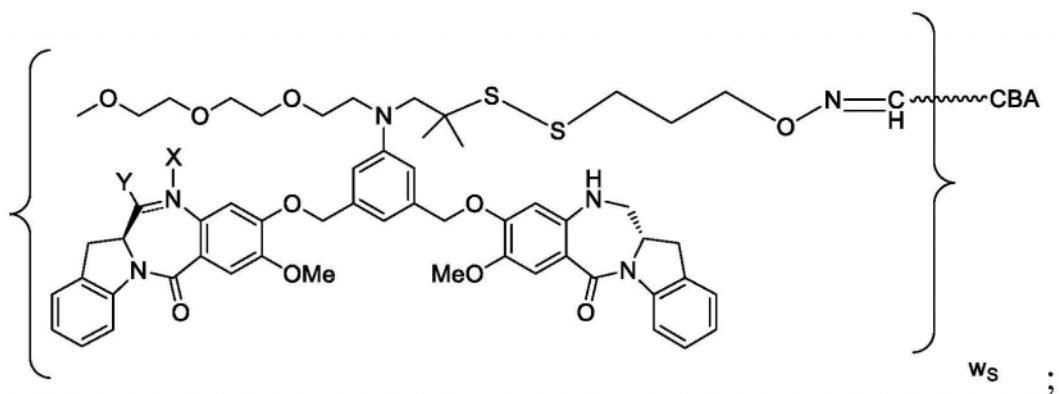
[1354]



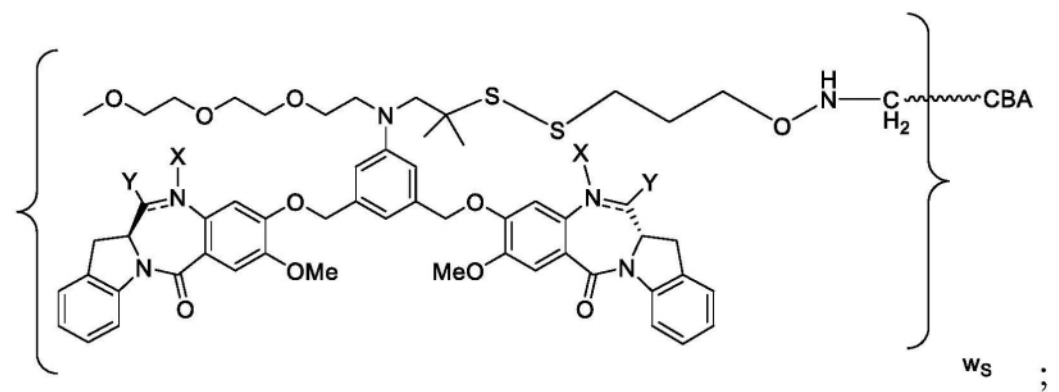
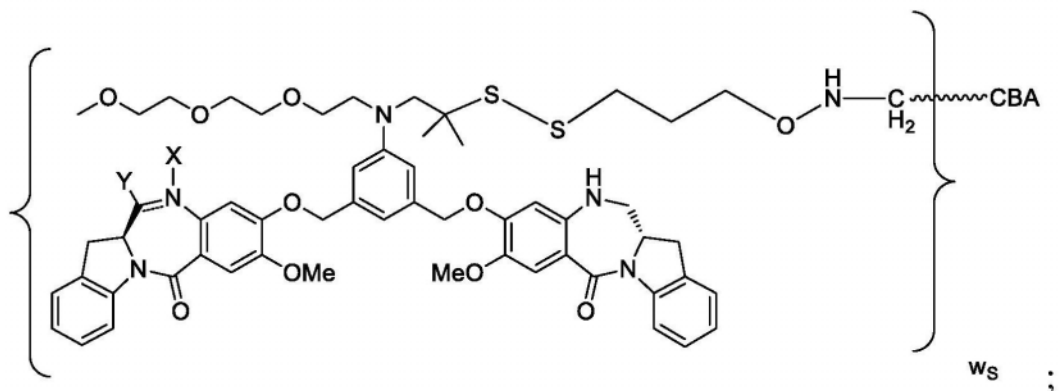


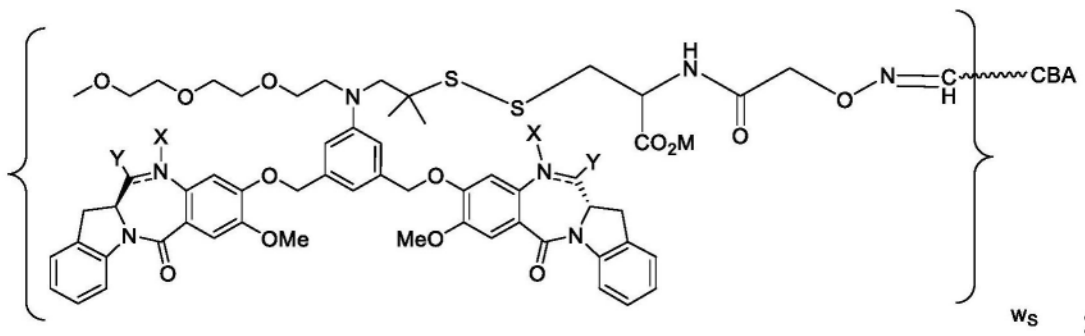
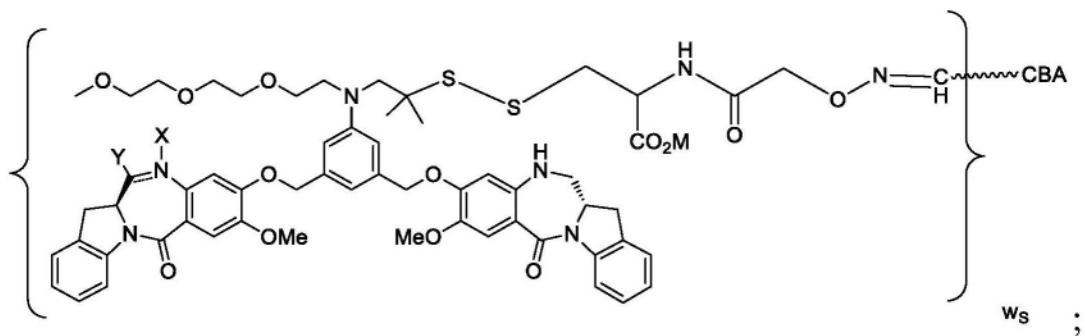
[1355]



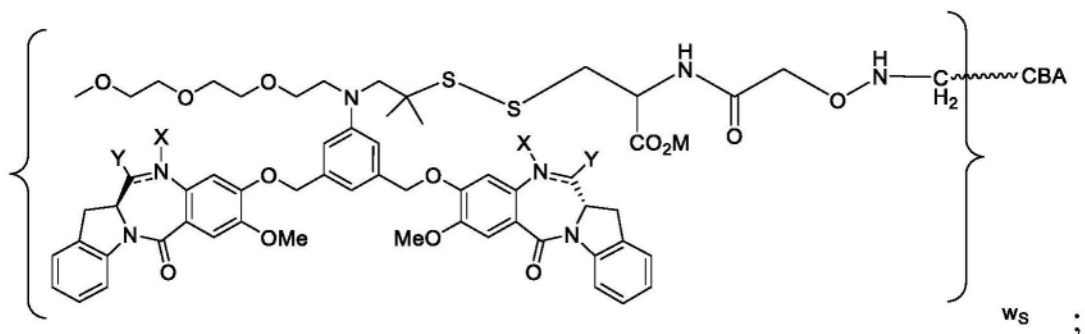
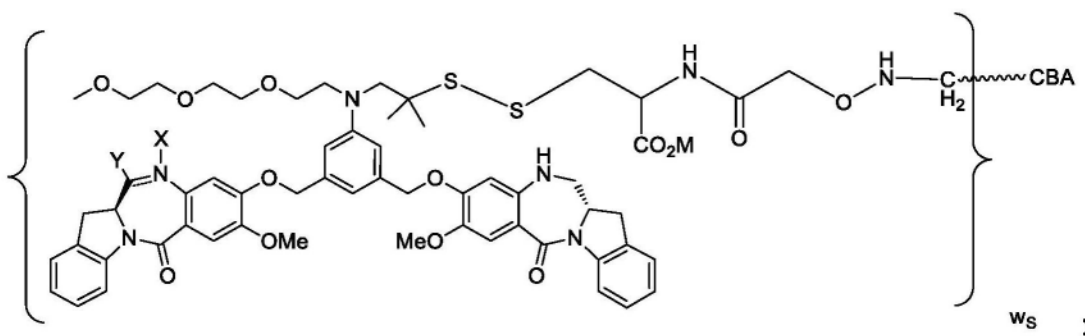


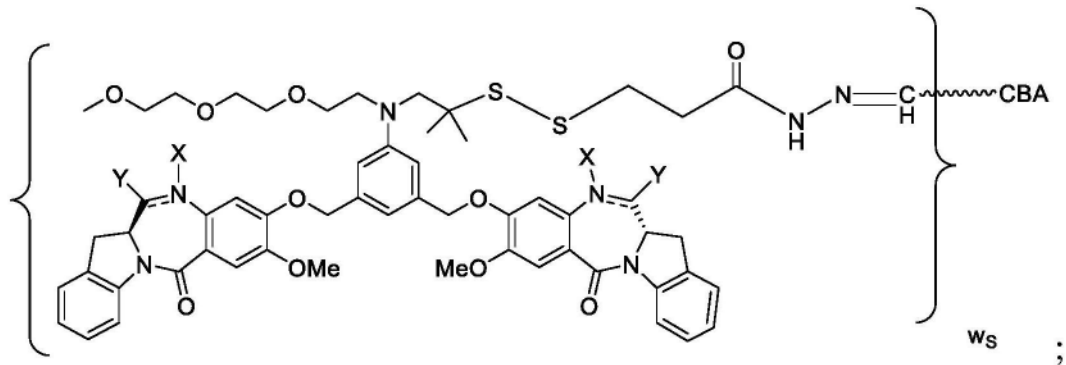
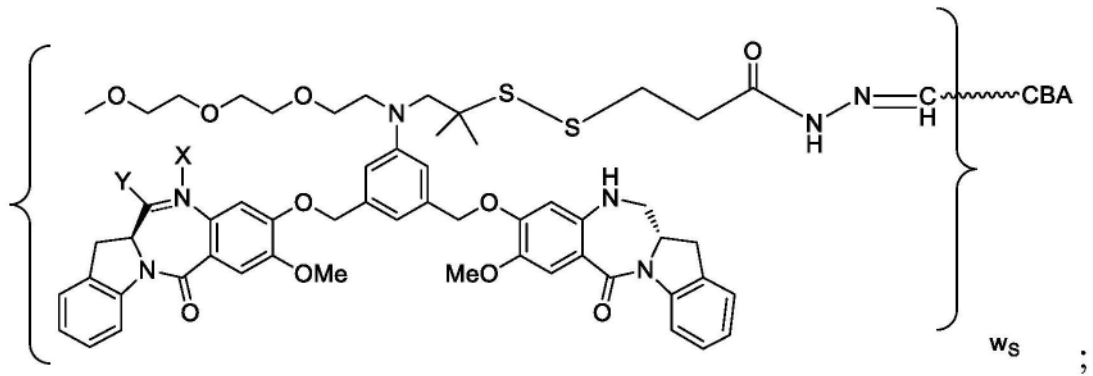
[1356]



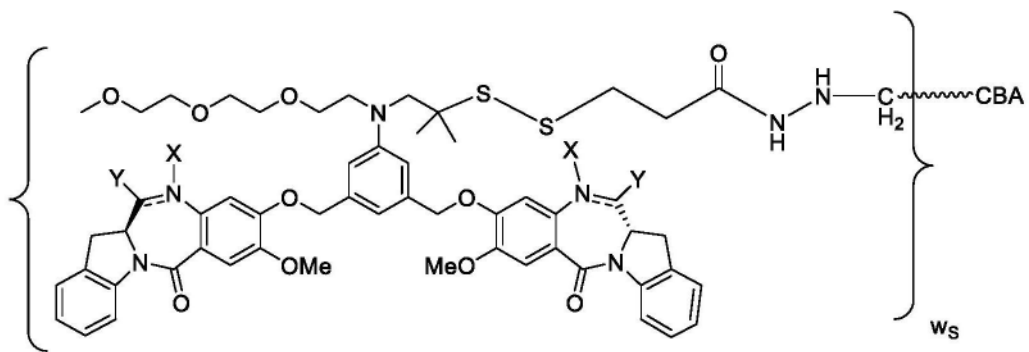
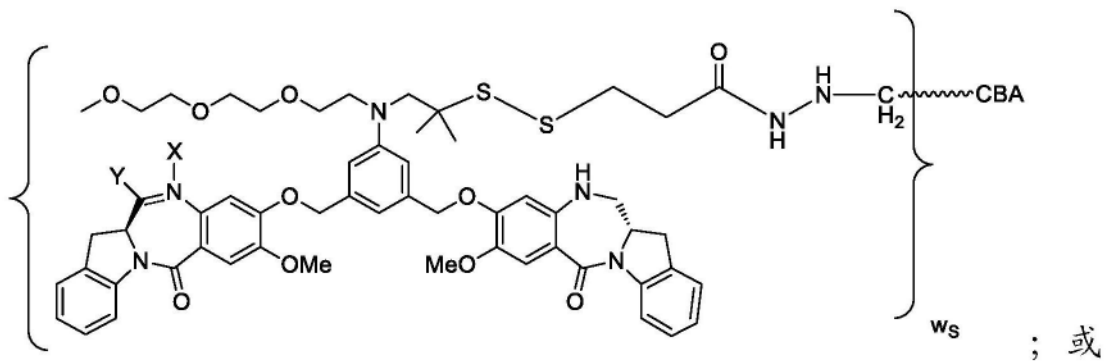


[1357]





[1358]



[1359] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H;且Y是-OH或-SO₃M。在一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 $=$ 表示双键,X不存在且Y是-H。在另一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[1381] q_1 和 r_1 各自独立地是0至10的整数,其限制条件是 q_1 和 r_1 不均为0。

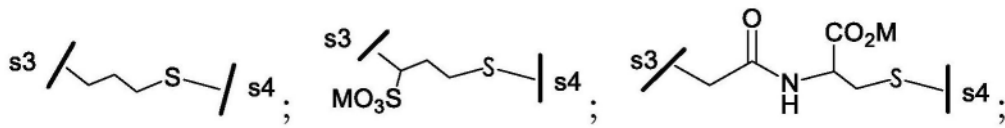
[1382] 在一个更具体实施方案中, Z_{a_2} 不存在; q_1 和 r_1 各自独立地是0至3的整数,其限制条件为 q_1 和 r_1 不均为0;且其余变量如以上在第十四具体实施方案中所描述。甚至更具体地说, R_{a_1} 、 R_{a_2} 、 R_{a_3} 、 R_{a_4} 均是-H。

[1383] 在另一个更具体实施方案中, Z_{a_2} 是-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-; q_1 和 r_1 各自独立地是1至6的整数;且其余变量如以上在第十四具体实施方案中所描述。甚至更具体地说, R_{a_1} 、 R_{a_2} 、 R_{a_3} 、 R_{a_4} 均是-H。

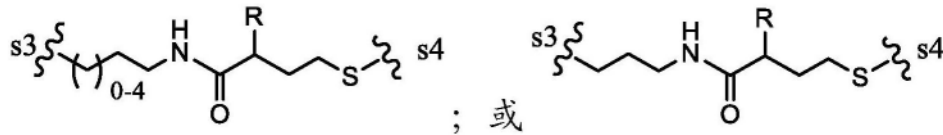
[1384] 在第十五具体实施方案中,对于式(S3)的免疫缀合物, m' 是1,且 R_1 和 R_2 均是H;且其余变量如以上在第十四具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1385] 在第十六具体实施方案中,对于式(S3)的免疫缀合物, m' 是2,且 R_1 和 R_2 均是Me;且其余变量如以上在第十四具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1386] 在第十七具体实施方案中,对于式(S3)的免疫缀合物,- L_1 -由以下各式表示:

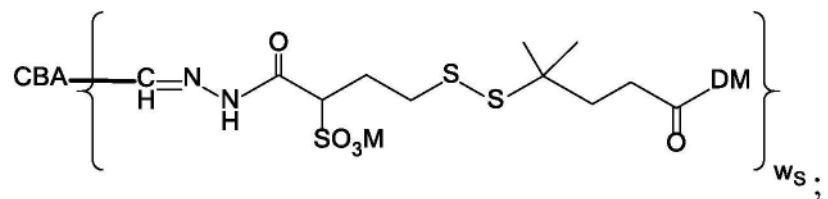
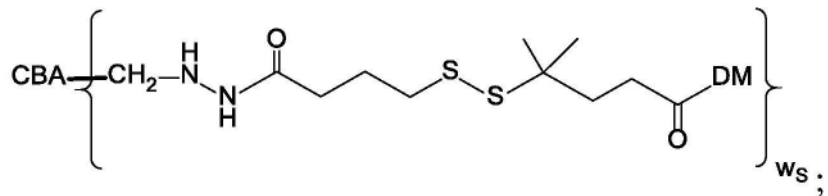
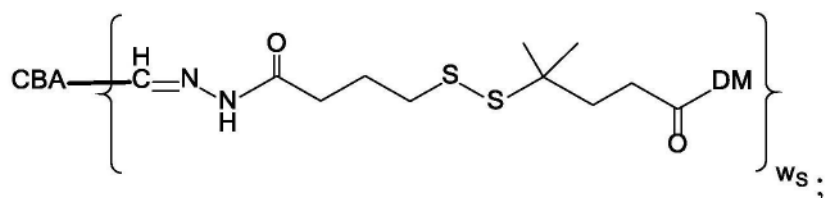


[1387]

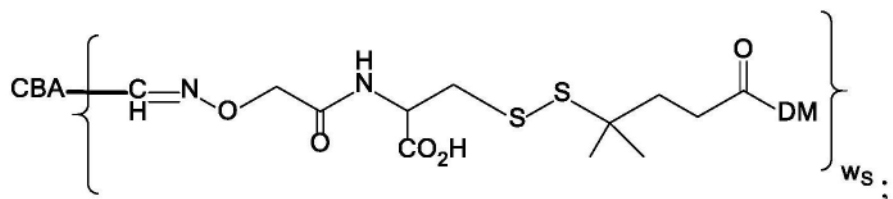
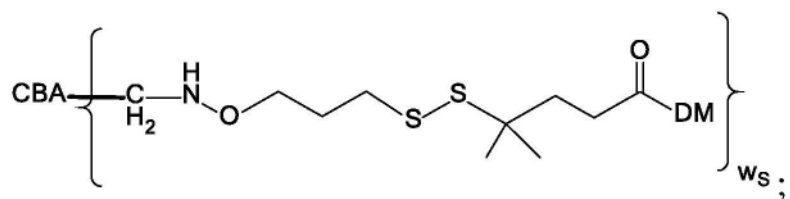
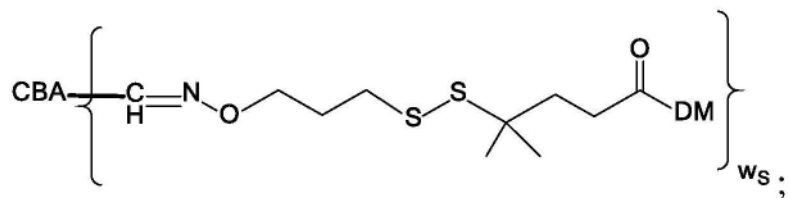
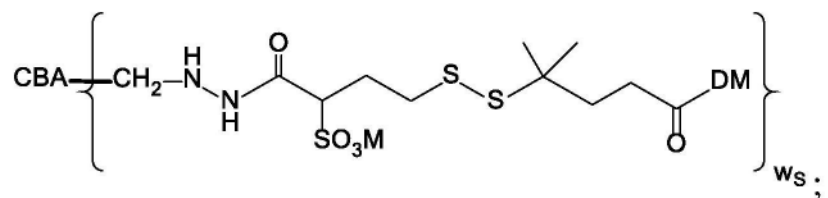


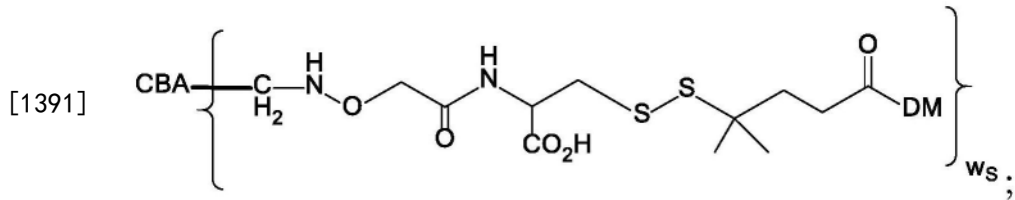
[1388] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子。

[1389] 在第十八具体实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:

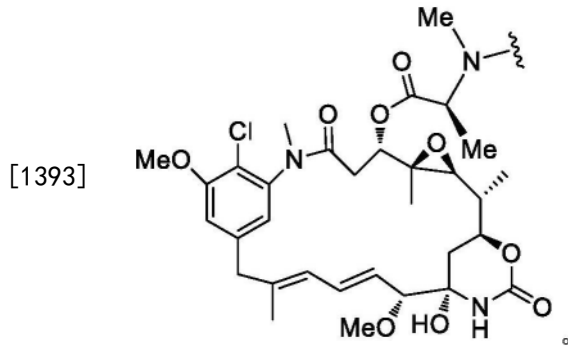


[1390]

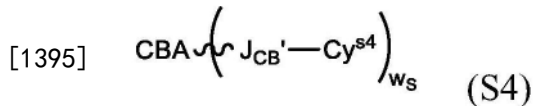




[1392] 或其药学上可接受的盐;其中DM由下式表示:



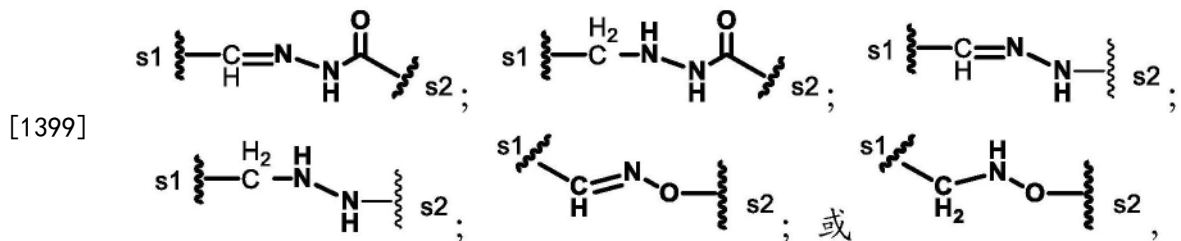
[1394] 在第十九具体实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物由下式表示:



[1396] 其中:

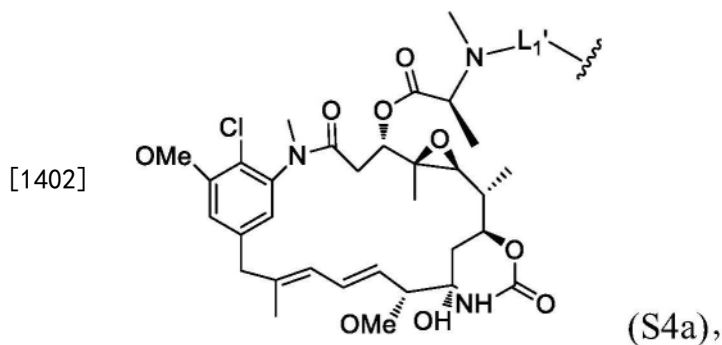
[1397] CBA是本发明的第一方面中所描述的氧化CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文中所描述的主题氧化抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题氧化多肽);

[1398] J_{CB'}是通过使CBA上的醛基与Cy^{s4}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

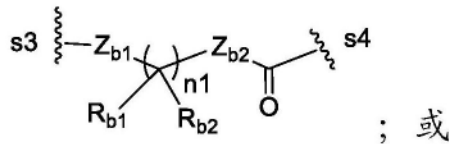


[1400] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;且s2是与Cy^{s4}共价连接的位点;

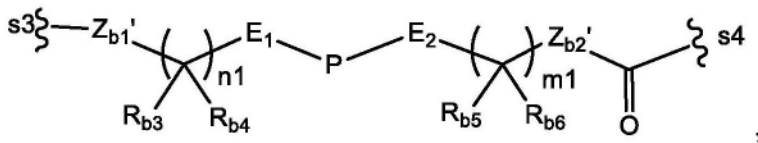
[1401] Cy^{s4}由以下各式表示:



[1403] L_{1'}由以下各式表示:



[1404]



[1405] 其中:

[1406] s3是与基团J_{CB}'基团共价连接的位点;[1407] s4是与Cy^{s4}上的-NMe-基团共价连接的位点;[1408] Z_{b1}和Z_{b2}均不存在,或Z_{b1}和Z_{b2}中一者不存在且另一者是-CH₂-O-或-O-CH₂-;[1409] Z_{b1}'和Z_{b2}'各自独立地是不存在、-CH₂-O-、-O-CH₂-、-NR₉-C(=O)-CH₂-或-CH₂-C(=O)-NR₉-;[1410] R₉是H或(C₁-C₃)烷基;

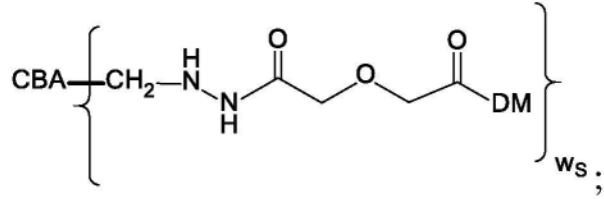
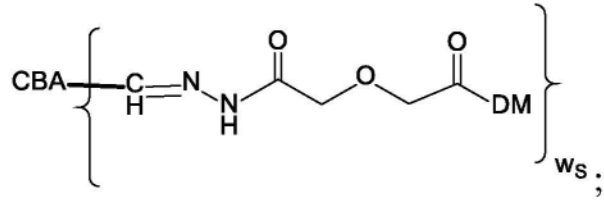
[1411] n1和m1各自独立地是1至6的整数;

[1412] E₁和E₂中一者是-C(=O)-且另一者是-NR₉-;或E₁和E₂中一者是-C(=O)-或-NR₉-且另一者是不存在;

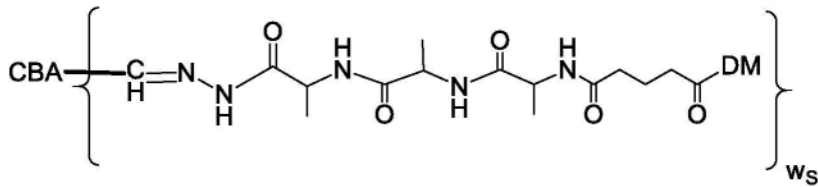
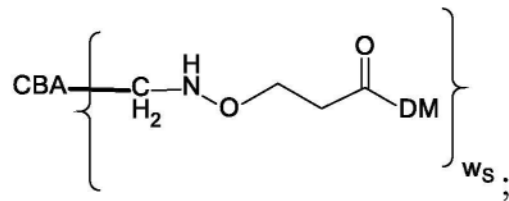
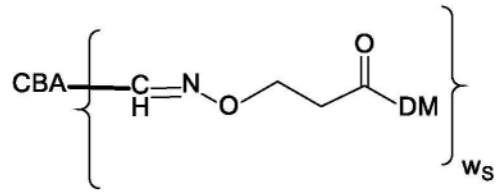
[1413] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;且

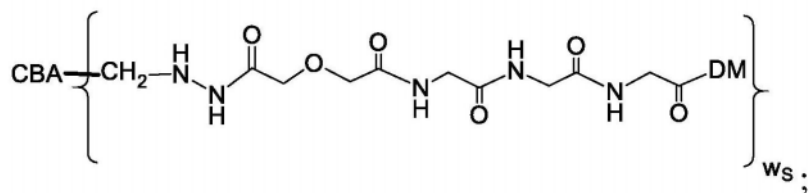
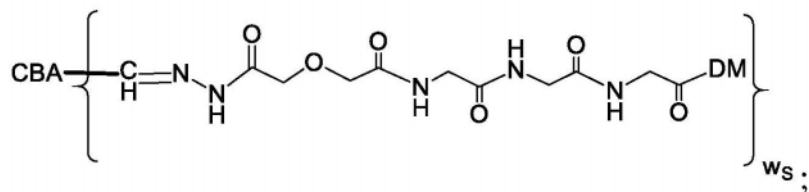
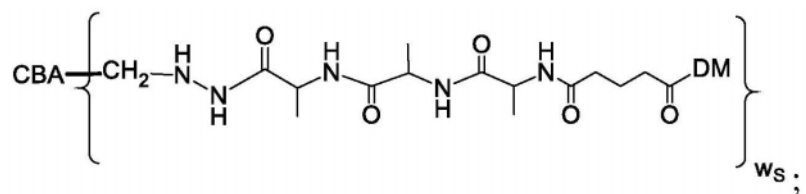
[1414] R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}在每次出现时各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基。[1415] 在第二十具体实施方案中,对于式(S4)的免疫缀合物,R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}和R_{b6}均是H;且其余变量如以上在第十九具体实施方案中所描述。[1416] 在第二十一具体实施方案中,对于式(S4)的免疫缀合物,R₉是H;且其余变量如以上在第十九或第二十具体实施方案中所描述。[1417] 在第二十二具体实施方案中,对于式(S4)的免疫缀合物,Z_{b1}'和Z_{b2}'均不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-O-且Z_{b2}'不存在;或Z_{b1}'是-CH₂-C(=O)-NR₉-且Z_{b2}'是-O-CH₂-或不存在;且其余变量如以上在第十九、第二十或第二十一具体实施方案中所描述。[1418] 在第二十三具体实施方案中,对于式(S4)的免疫缀合物,P是含有2至5个氨基酸残基的肽;且其余变量如以上在第十九、第二十、第二十一或第二十二具体实施方案中所描述。在一个更具体实施方案中,P选自由以下各项组成的组:Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala;且其余变量如以上在第二十三具体实施方案中所描述。甚至更具体地说,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[1419] 在第二十四具体实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:

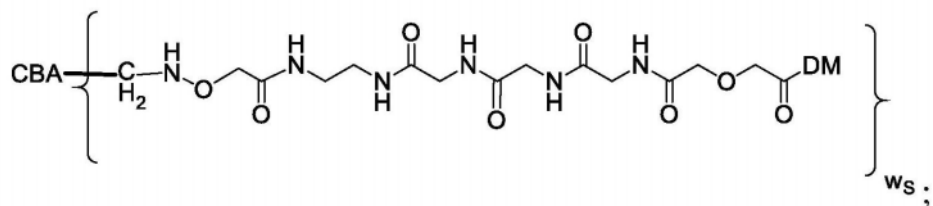
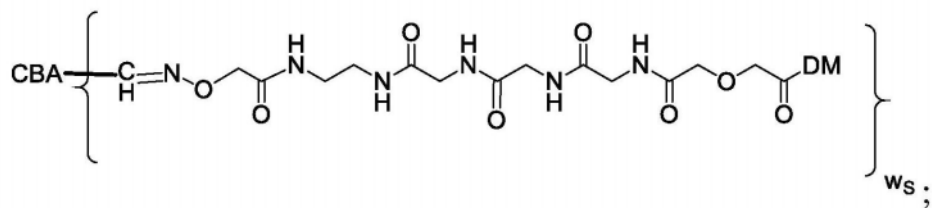
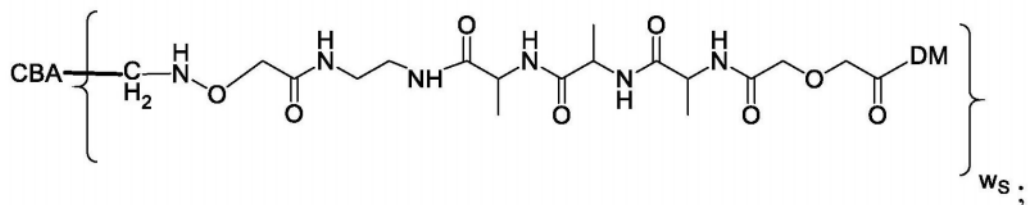
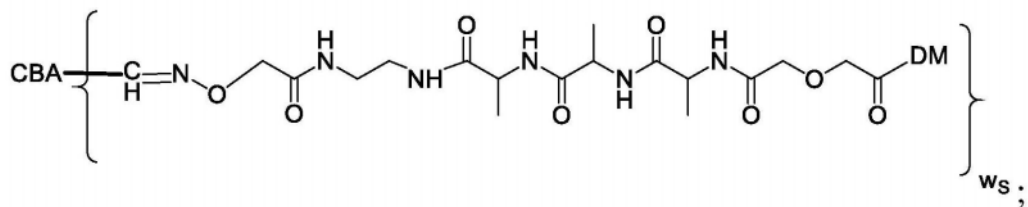


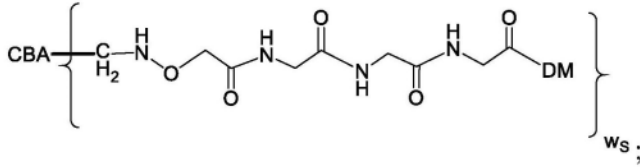
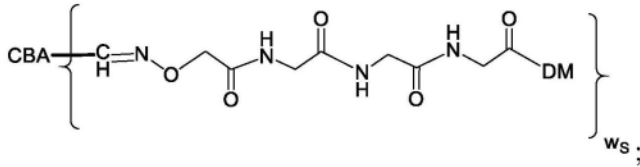
[1420]



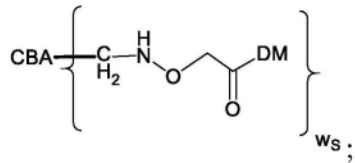
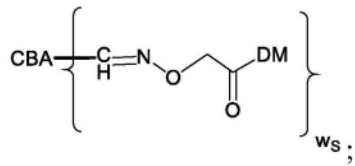


[1421]

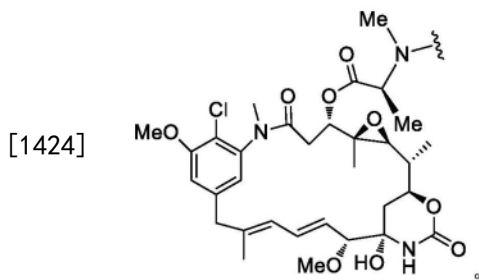




[1422]



[1423] 或其药学上可接受的盐,其中DM由以下结构式表示:



[1425] 在第二十五具体实施方案中,对于第二实施方案的免疫缀合物,M是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ ;且其余变量如以上在第一至第二十四具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1426] 在以上第一至第二十五具体实施方案中的任一者中,主题氧化抗体或其抗原结合片段可允许1、2、3或至多4个N末端2-羟基乙胺部分氧化成醛基,以便共价连接于本文所描述的细胞毒性剂。N末端2-羟基乙胺部分可以是丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸、4-羟基鸟氨酸或2,4-二氨基-5-羟基戊酸残基,优选是Ser或Thr中的一部分。出于简单起见,以下描述,包括氧化反应和任何随后与接头或细胞毒性剂结合,均可指Ser作为此类N末端2-羟基乙胺部分的特定实例,但一般应被视为指所有N末端2-羟基乙胺部分。主题抗体或其抗原结合片段可包含具有SEQ ID NO:38中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区(HCVR);和具有SEQ ID NO:33、35、37或41(优选SEQ ID NO:35或37)中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(LCVR)。主题抗体或其抗原结合片段还可包含具有SEQ ID NO:32、34、38、39或40(优选SEQ ID NO:34)中所阐述的氨基酸序列的Ig HCVR;和具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。主题抗体或其抗原结合片段还可包含具有SEQ ID NO:53或56中

所阐述的氨基酸序列的Ig重链(HC)区;和具有SEQ ID NO:33、35、37或41(优选SEQ ID NO:35或37)中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。主题抗体或其抗原结合片段还可包含具有SEQ ID NO:48、50、53、54、56、59或60(优选SEQ ID NO:53)中所阐述的氨基酸序列的Ig HC区;和具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:34、38、50、53、54或56的N末端的第二个残基是Phe,而在某些其他实施方案中,来自SEQ ID NO:34、38、50、53、54或56的N末端的第二个残基是Val。

[1427] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第一种方法来制备,所述方法包括使本发明的第一方面中所描述的具有N末端醛的氧化CD123/IL-3R α -结合剂与具有醛反应性基团的细胞毒性剂反应。

[1428] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第二种方法来制备,所述方法包括使本发明的第一方面中所描述的具有N末端醛的氧化CD123/IL-3R α 结合剂与具有醛反应性基团的接头化合物反应,以形成具有与其结合的接头的修饰的CD123/IL-3R α 结合剂,随后使所述修饰的CD123/IL-3R α 结合剂与细胞毒性剂反应。

[1429] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第三种方法来制备,所述方法包括使本发明的第一方面中所描述的具有N末端醛的氧化CD123/IL-3R α 结合剂与细胞毒性剂接触,随后添加具有醛反应性基团的接头化合物。

[1430] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第四种方法来制备,所述方法包括以下步骤:

[1431] (a) 用氧化剂使具有N末端2-羟基乙胺部分的CD123/IL-3R α 结合剂(例如,Ser/Thr)氧化,以形成具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂;以及

[1432] (b) 使具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂与具有醛反应性基团的细胞毒性剂反应。

[1433] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第五种方法来制备,所述方法包括以下步骤:

[1434] (a) 用氧化剂使具有N末端2-羟基乙胺部分的CD123/IL-3R α 结合剂(例如,Ser/Thr)氧化,以形成具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂;

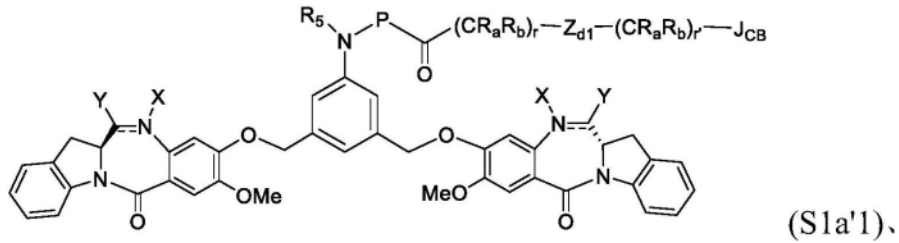
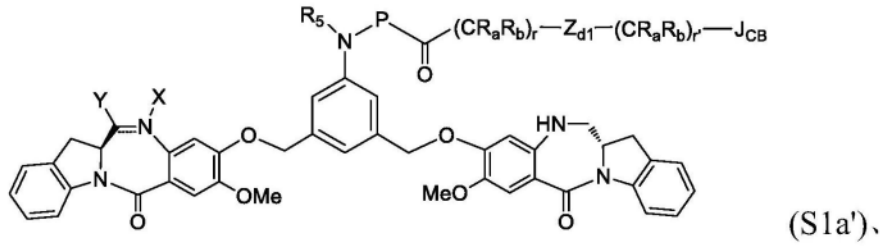
[1435] (b) 使具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂与具有醛反应性基团的接头化合物反应,以形成具有与其结合的接头的修饰的CD123/IL-3R α 结合剂,随后使所述修饰的CD123/IL-3R α 结合剂与细胞毒性剂反应。

[1436] 在某些实施方案中,第二实施方案的免疫缀合物可通过第六种方法来制备,所述方法包括以下步骤:

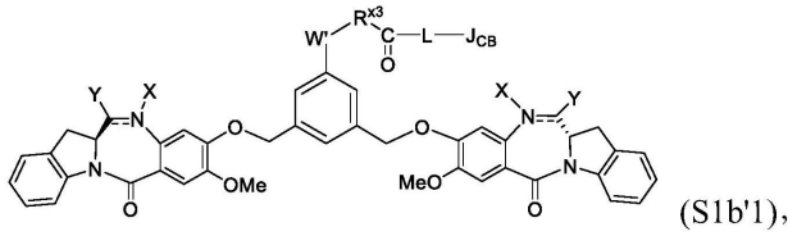
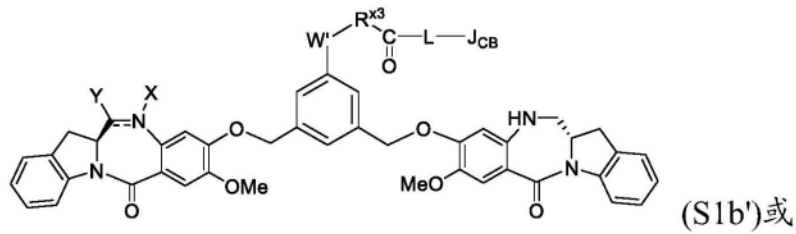
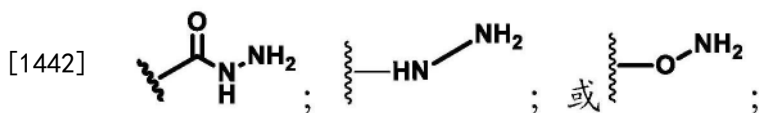
[1437] (a) 用氧化剂使具有N末端2-羟基乙胺部分的CD123/IL-3R α 结合剂(例如,Ser/Thr)氧化,以形成具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂;

[1438] (b) 使具有N末端醛基的氧化CD123/IL-3R α 结合剂与细胞毒性剂接触,随后添加具有醛反应性基团的接头化合物。

[1439] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第一种或第四种方法,具有醛反应性基团的细胞毒性剂由以下各式表示:

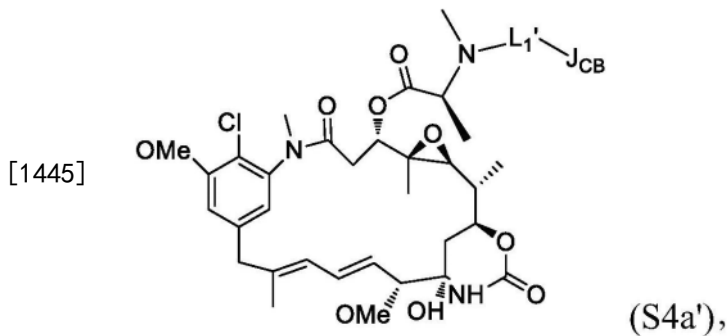


[1440]

[1441] 或其药学上可接受的盐,其中J_{CB}由以下各式表示:

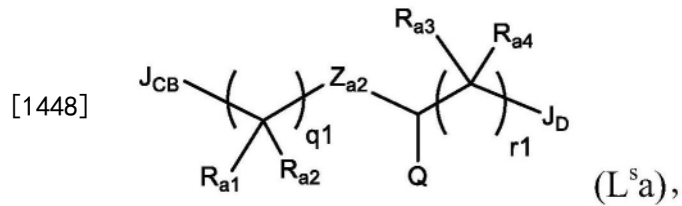
[1443] 且其余变量如以上在第一至第七和第二十五具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1444] 在另一实施方案中,对于以上所描述的第一种或第四种方法,具有醛反应性基团的细胞毒性剂由下式表示:

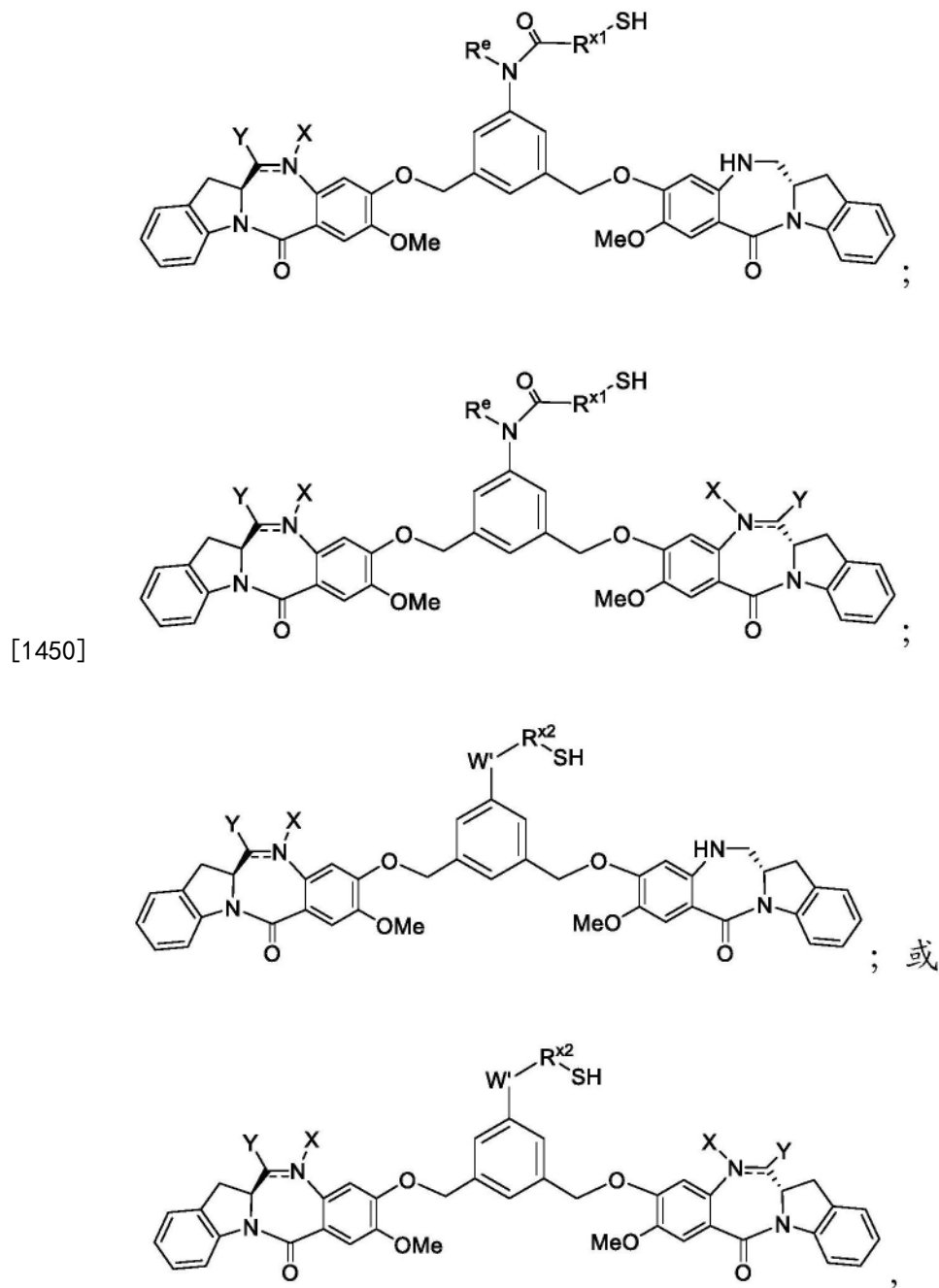


[1446] 或其药学上可接受的盐,其中 J_{CB} 如以上所描述且其余变量如第十九至第二十五具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1447] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第二种、第三种、第五种或第六种方法,接头化合物由下式表示:

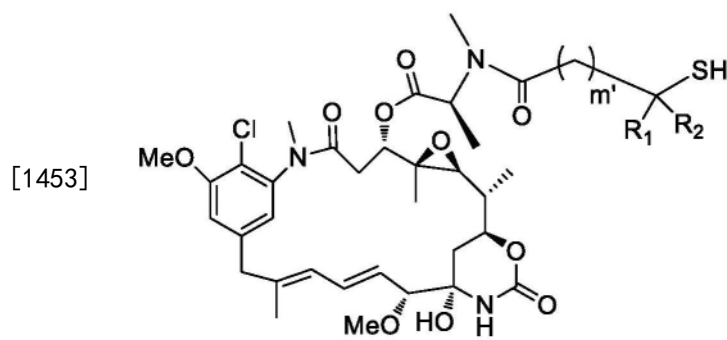


[1449] 其中 J_D 是-SH、-SSR^d或-SC(=O)R^g;R^d是苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基;R^g是烷基; J_{CB} 如以上所描述;细胞毒性剂由以下各式表示:



[1451] 且其余变量如以上在第八至第十三和第二十五具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1452] 在另一实施方案中,对于以上所描述的第二种、第三种、第五种或第六种方法,接头化合物由以上式(L^sa)表示;细胞毒性化合物由下式表示:



[1454] 且其余变量如第十四至第十八和第二十五具体实施方案和其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1455] 在一个实施方案中,对于以上所描述的第一种或第四种方法,使细胞毒性剂与诸如NaHSO₃的亚胺反应性试剂反应,以形成修饰的细胞毒性剂,随后与具有N末端醛的氧化CD123/IL-3R α 结合剂反应。在一个实施方案中,修饰的细胞毒性剂在与具有N末端醛的氧化CBA反应之前未经纯化。或者,修饰的细胞毒性剂在与具有N末端醛的氧化CBA反应之前经纯化。

[1456] 在另一实施方案中,对于以上所描述的第二种或第五种方法,使细胞毒性剂与诸如NaHSO₃的亚胺反应性试剂反应,以形成修饰的细胞毒性剂,随后与具有与其结合的接头的修饰CD123/IL-3R α 结合剂反应。在一个实施方案中,修饰的细胞毒性剂在与具有与其结合的接头的修饰CD123/IL-3R α 结合剂反应之前进行纯化。或者,修饰的细胞毒性剂在与具有N末端醛的氧化CD123/IL-3R α 结合剂反应之前未进行纯化。

[1457] 在又一实施方案中,对于以上所描述的第三种或第六种方法,氧化CD123/IL-3R α 结合剂、细胞毒性剂和接头化合物的反应是在诸如NaHSO₃的亚胺反应性试剂存在下进行。

[1458] 任何适合的氧化剂均可用于以上所描述的第四种、第五种或第六种方法的步骤(a)中。在某些实施方案中,所述氧化剂是过碘酸盐。更具体地说,所述氧化剂是过碘酸钠。

[1459] 可使用相对于CD123/IL-3R α 结合剂过量摩尔当量的氧化剂。在某些实施方案中,可使用约2-100、5-80、10-50、1-10或5-10摩尔当量的氧化剂。在某些实施方案中,可使用约10或约50当量的氧化剂。当使用大量氧化剂时,使用短反应时间以避免过度氧化。例如,当使用50当量氧化剂时,氧化反应进行约5至约60分钟。或者,当使用10当量氧化剂时,氧化反应进行约30分钟至约24小时。在一个实施方案中,使用5-10摩尔当量氧化剂且氧化反应进行约5至约60分钟(例如约10至约30分钟、约20至约30分钟)。

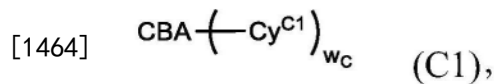
[1460] 在某些实施方案中,催化剂存在于以上所描述的第一种、第二种或第三种方法中的反应中或以上所描述的第四种、第五种或第六种方法中的步骤(b)的反应中。可使用本领域中的任何适合的催化剂。在一个实施方案中,催化剂是苯胺或取代的苯胺。示例性苯胺催化剂包括但不限于苯胺、邻苯二胺、间苯二胺、3,5-二氨基苯甲酸、对苯二胺、2-甲基-对苯二胺、N-甲基-对苯二胺、邻氨基苯酚、间氨基苯酚、对氨基苯酚、对甲氧基苯胺、5-甲氧基-氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸和4-氨基苯乙醇。在一个实施方案中,催化剂是4-氨基苯乙醇。

在某些实施方案中,步骤(b)的反应在约5.0至约6.5的pH值下进行。在某些实施方案中,步骤(b)的反应在约5.0的pH值下进行。

[1461] 在某些实施方案中,对于以上所描述的第一种、第二种或第三种方法中的反应或以上所描述的第四种、第五种或第六种方法中的步骤(b)的反应,具有醛反应性基团的化合物(例如,本文所描述的细胞毒性剂或接头化合物)相对于氧化细胞结合剂(例如,氧化抗体或氧化抗原结合部分)在摩尔过量下使用。在某些实施方案中,具有醛反应性基团的化合物与氧化细胞结合剂的比率介于约10:1至约1.1:1之间、介于约5:1至约2:1之间。在一个实施方案中,所述比率是约4:1。

[1462] 在第三实施方案中,本发明的免疫缀合物包含本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(包括抗体、其抗原结合片段,或包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽),其通过位于CD123结合剂上中的一个或多个半胱氨酸残基的巯基(-SH)共价连接于本文所描述的细胞毒性剂。

[1463] 在第一具体实施方案中,第三实施方案的免疫缀合物由下式表示:

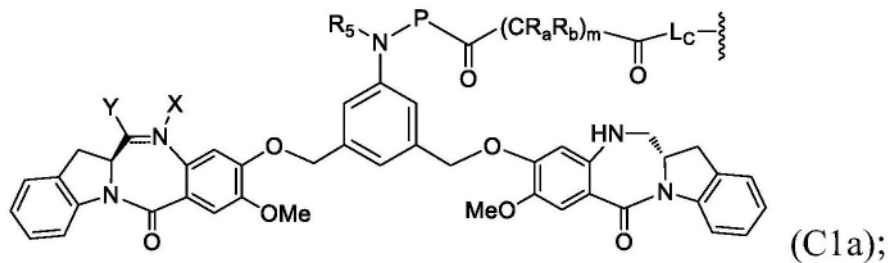


[1465] 其中:

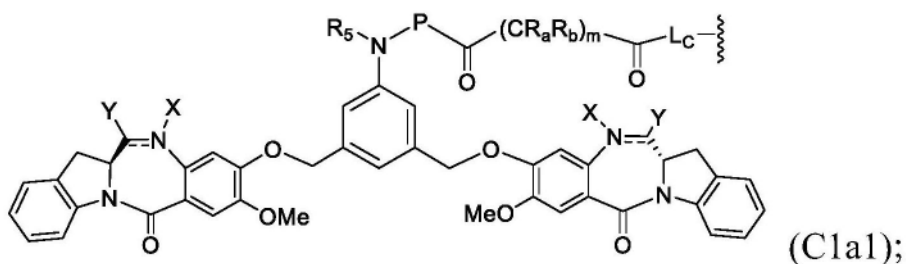
[1466] CBA是本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题多肽),其通过半胱氨酸残基共价连接于Cy^{C1};

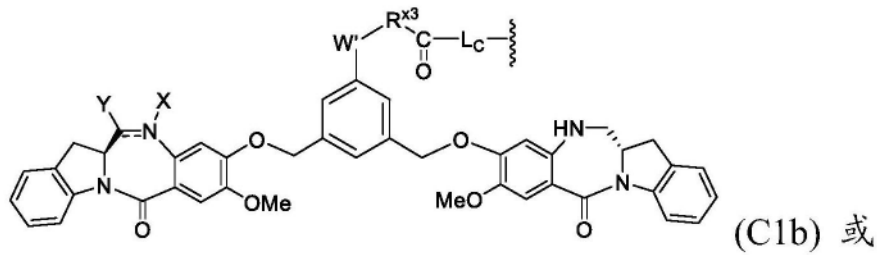
[1467] W_c是1或2;

[1468] Cy^{C1}由以下各式表示:

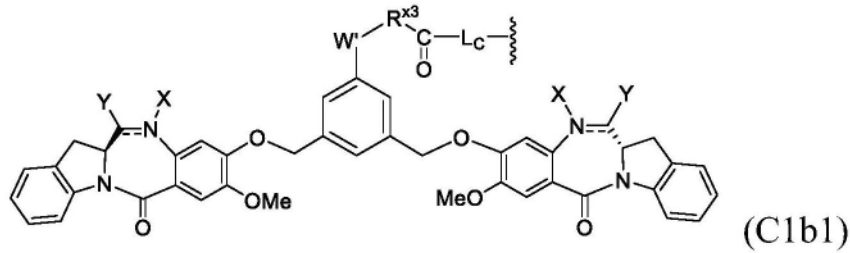


[1469]





[1470]



[1471] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1472] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[1473] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1474] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[1475] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

[1476] W'是-NR^{e'};

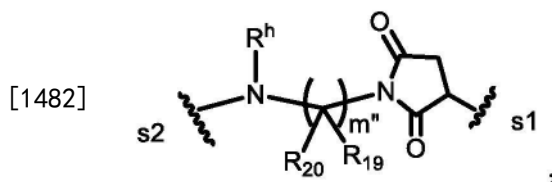
[1477] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[1478] n是2至6的整数;

[1479] R^k是-H或-Me;

[1480] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;并且

[1481] L_c由以下表示:



[1483] 其中s1是与CBA共价连接的位点,且s2是与Cy^{C1}上的-C(=O)-基团共价连接的位点;其中:

[1484] R₁₉和R₂₀在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1485] m''是介于1与10之间的整数;并且

[1486] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基。

[1487] 在第二具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,Cy^{C1}由式(C1a)或(C1a1)表示;且其余变量如以上在第一具体实施方案中所描述。

[1488] 在第三具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,Cy^{C1}由式(C1b)或(C1b1)表示;

且其余变量如以上在第一具体实施方案中所描述。

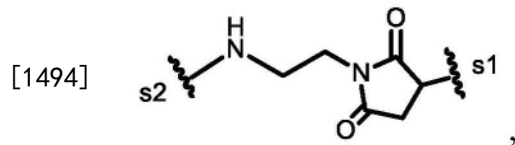
[1489] 在第四具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,Cy^{C1}由式(C1a)或(C1a1)表示;R_a和R_b两者均是H;且R₅是H或Me;且其余变量如以上在第一或第二具体实施方案中所描述。

[1490] 在第五具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,P是含有2至5个氨基酸残基的肽;且其余变量如以上在第一、第二或第四具体实施方案中所描述。在一个更具体实施方案中,P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在另一个更具体实施方案中,P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[1491] 在第六具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,Q是-SO₃M;且其余变量如以上在第一、第二、第四或第五具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

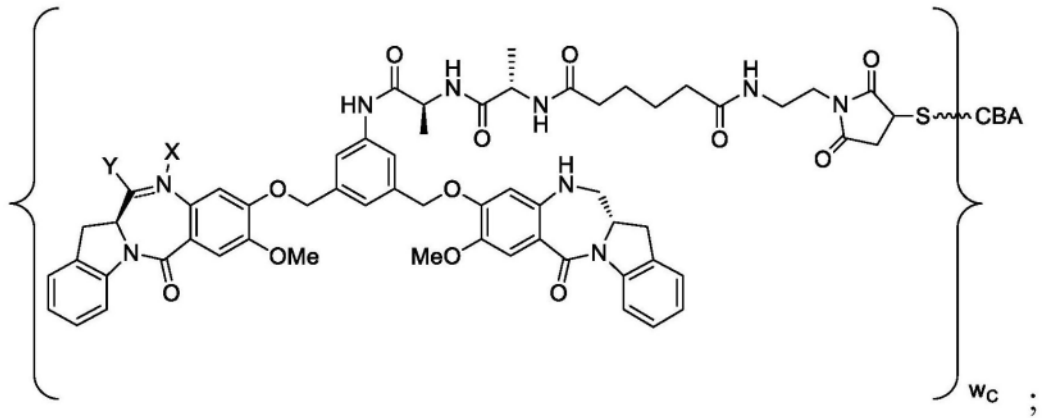
[1492] 在第七具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,R₁₉和R₂₀两者均是H;且m^{''}是1至6的整数;且其余变量如以上在第一、第二、第三、第四、第五或第六具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1493] 在第八具体实施方案中,对于式(C1)的免疫缀合物,-L-L_c-由下式表示:

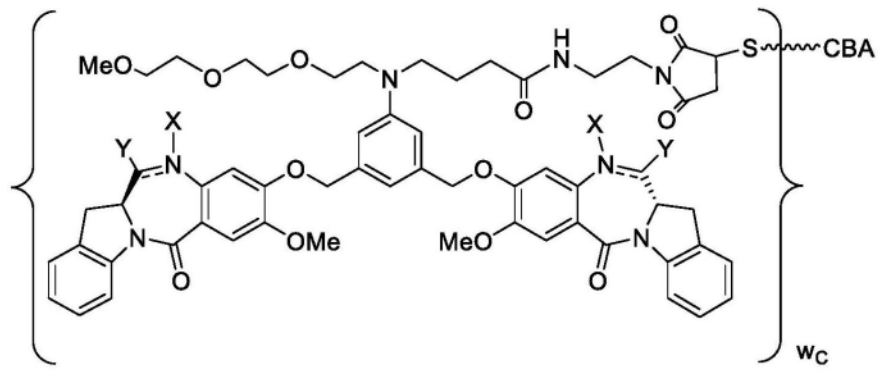
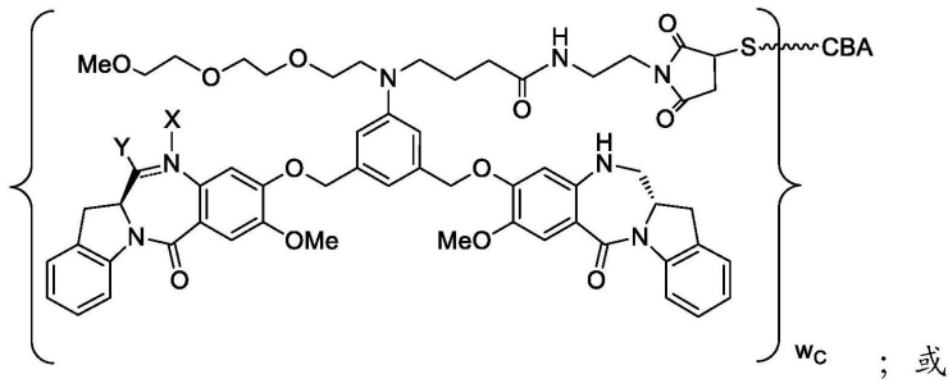
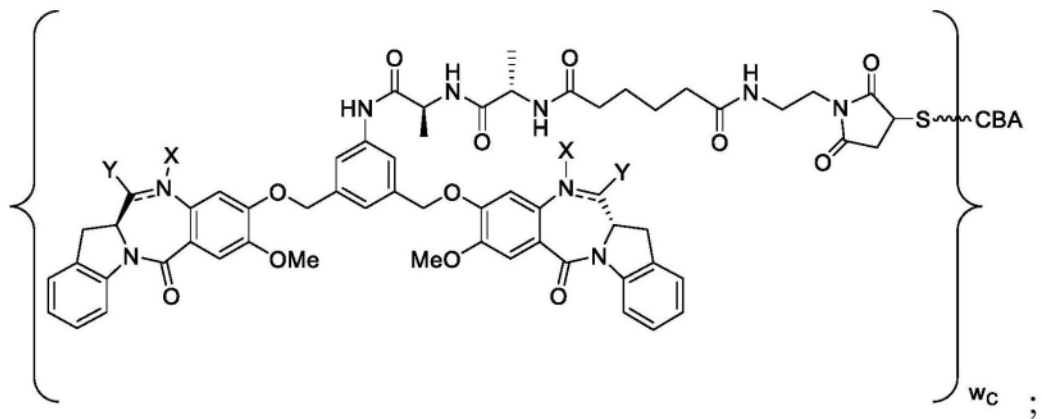


[1495] 且其余变量如以上在第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1496] 在第九具体实施方案中,第三实施方案的免疫缀合物由以下各式表示:



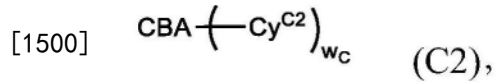
[1497]



[1498] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。在一个更

具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。在另一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[1499] 在第十具体实施方案中,第三实施方案的免疫缀合物由下式表示:

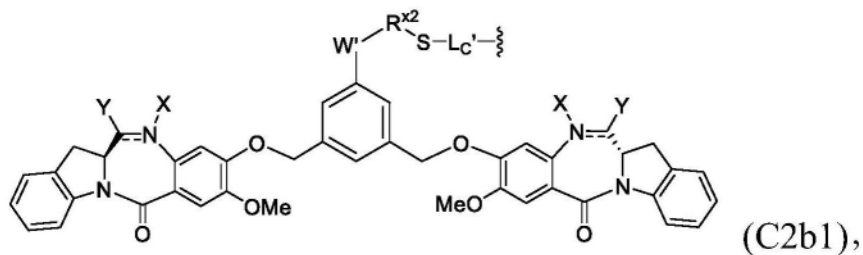
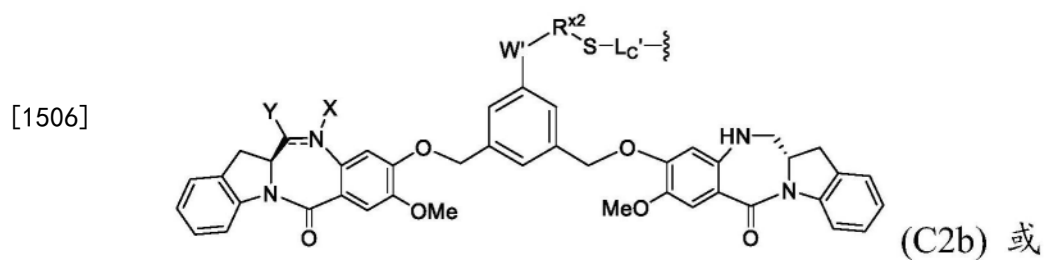
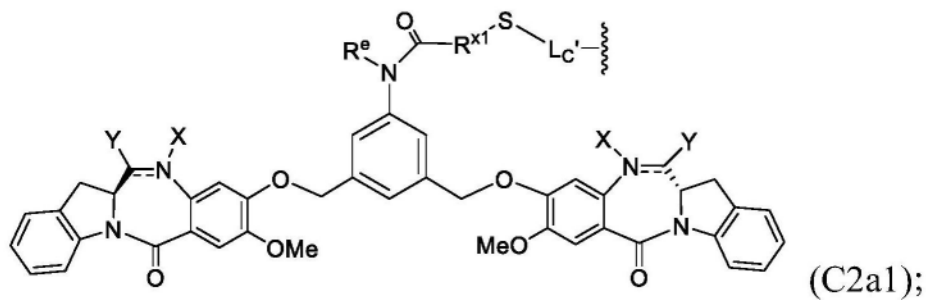
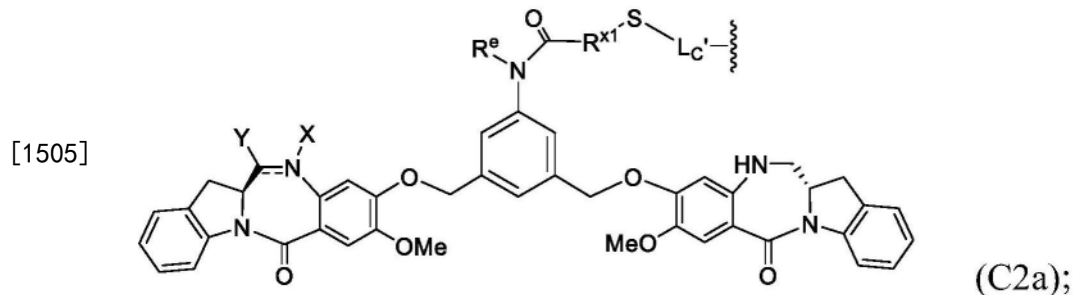


[1501] 其中:

[1502] CBA是本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题多肽),其通过半胱氨酸残基共价连接于Cy^{C2};

[1503] w_c是1或2;

[1504] Cy^{C2}由以下各式表示:



[1507] 或其药学上可接受的盐,其中:

[1508] 介于N与C之间的双键 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[1509] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基;

[1510] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

[1511] W'是-NR^{e'};

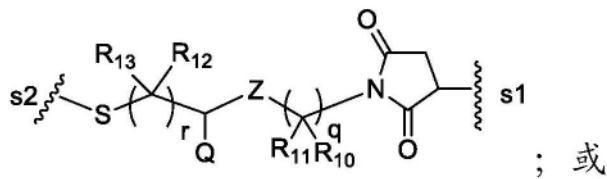
[1512] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[1513] n是2至6的整数;

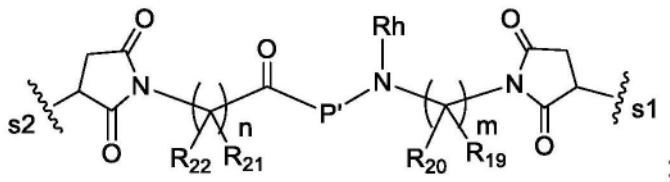
[1514] R^k是-H或-Me;

[1515] R^{x2}是(C₁-C₆)烷基;

[1516] L_C'由以下各式表示:



[1517]



[1518] 其中:

[1519] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C2}上的-S-基团共价连接的位点;

[1520] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[1521] Q是-H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[1522] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[1523] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[1524] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

[1525] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

[1526] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

[1527] 在一个更具体实施方案中,q和r各自独立地是介于1至6之间的整数,更具体地说,介于1至3之间的整数。甚至更具体地说,R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃均是H。

[1528] 在另一个更具体实施方案中,m和n各自独立地是介于1与6之间的整数,更具体地说,介于1至3之间的整数。甚至更具体地说,R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂均是H。

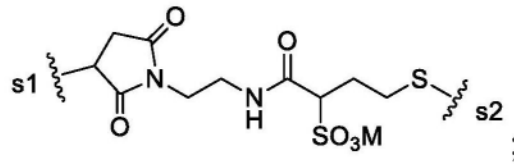
[1529] 在第十一具体实施方案中,对于式(C2)的免疫缀合物,Cy^{C2}由式(C2a)或(C2a1)表示;且其余变量如以上在第十具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1530] 在第十二具体实施方案中,对于式(C2)的免疫缀合物,Cy^{C2}由式(C2b)或(C2b1)表示;且其余变量如以上在第十具体实施方案中所描述。

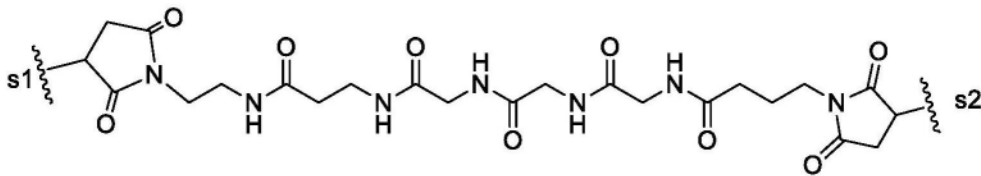
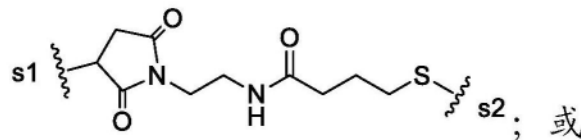
[1531] 在第十三具体实施方案中,对于式(C2)的免疫缀合物,P'是含有2至5个氨基酸残

基的肽；且其余变量如第十、第十一或第十二具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。在一个更具体实施方案中，P'选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在另一个更具体实施方案中，P'为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[1532] 在第十四具体实施方案中，对于式 (C2) 的免疫缀合物，-L_c'-由以下各式表示：

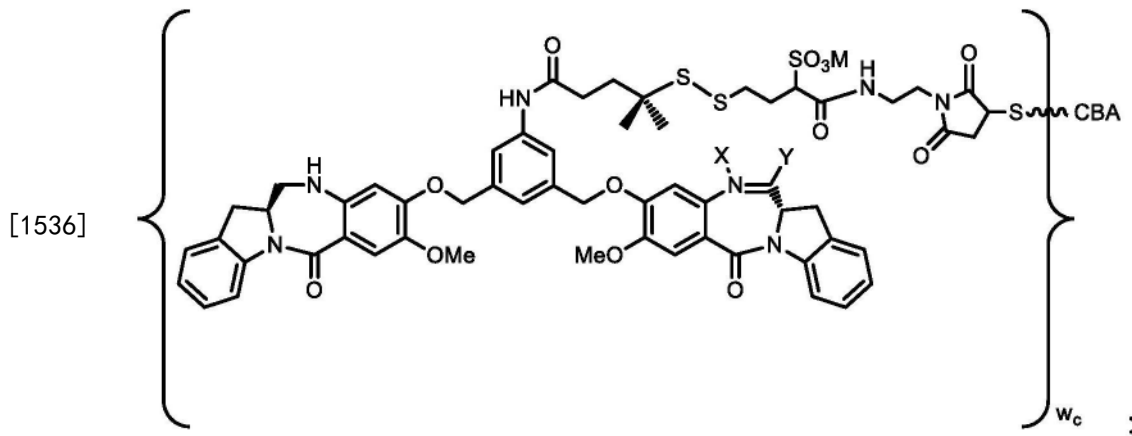


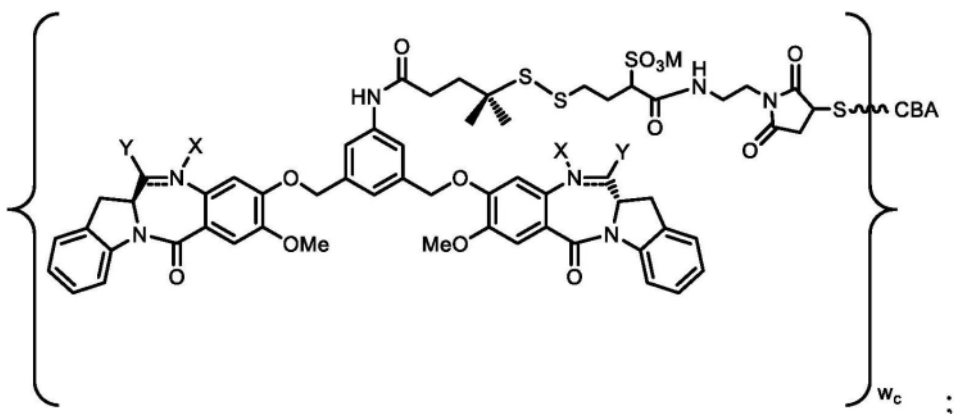
[1533]



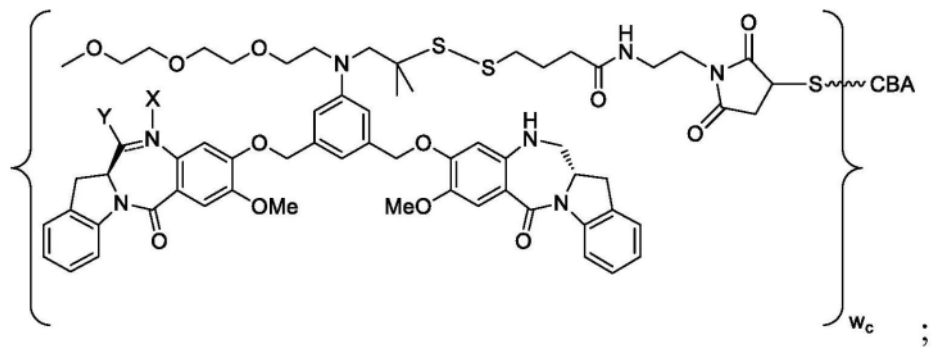
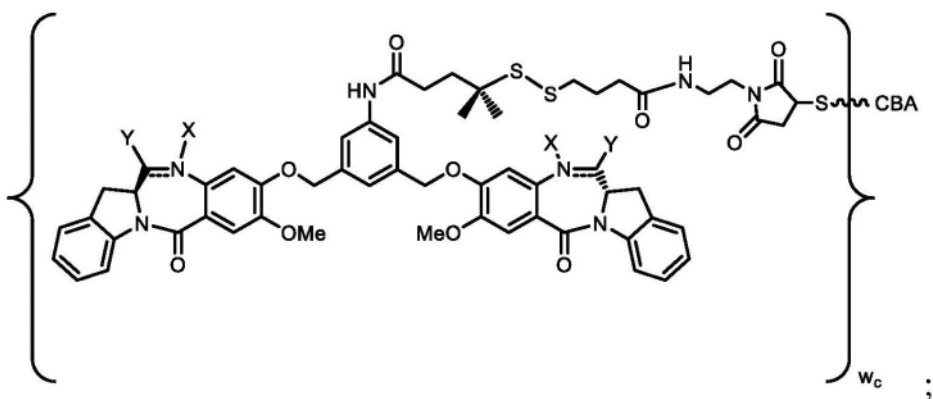
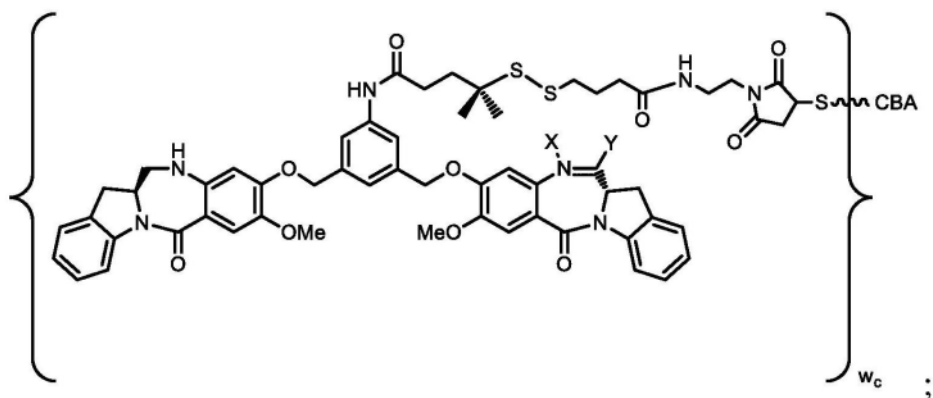
[1534] 在第十五具体实施方案中，对于式 (C2) 的免疫缀合物，R^e是H或Me；R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-，且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基；且p是0、1、2或3；且其余变量如以上在第十、第十一、第十二、第十三或第十四具体实施方案中所描述。更具体地说，R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

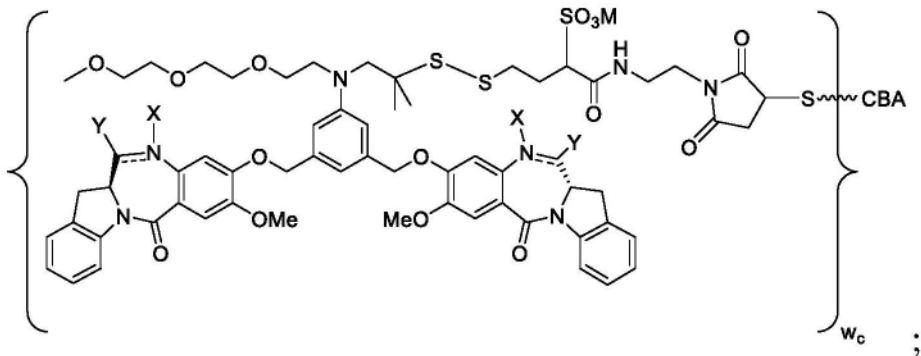
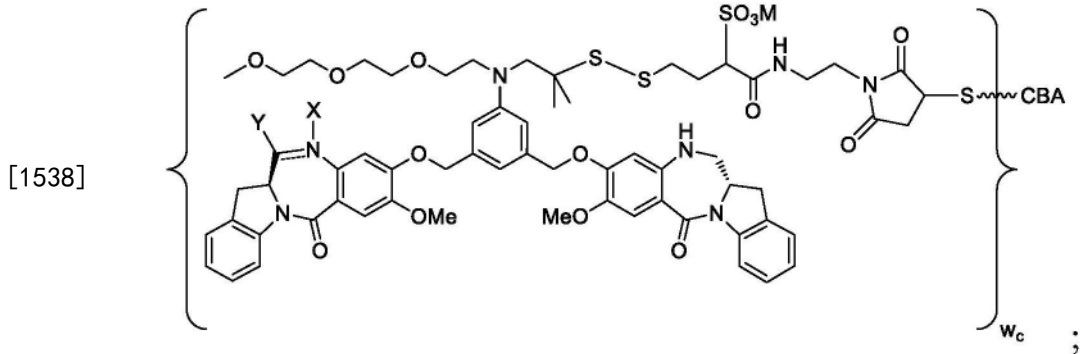
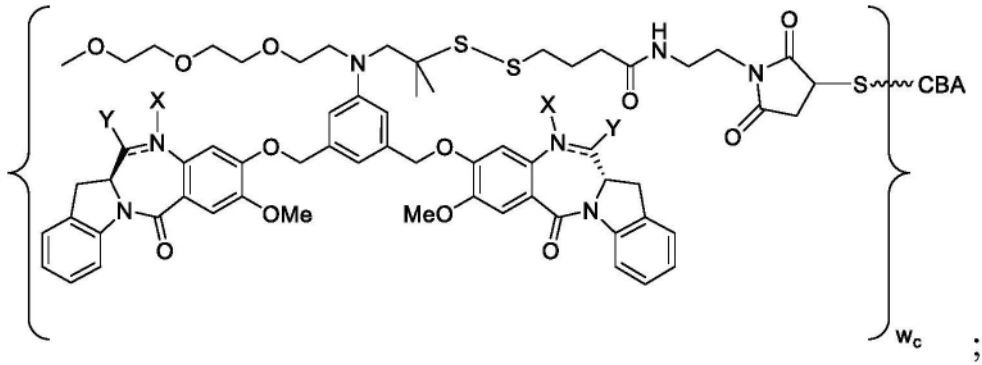
[1535] 在第十六具体实施方案中，第三实施方案的免疫缀合物由以下各式表示：





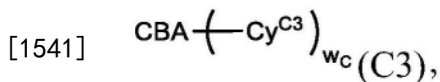
[1537]





[1539] 或其药学上可接受的盐,其中介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。在一个更具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。在另一具体实施方案中,介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[1540] 在第十七具体实施方案中,第三实施方案的免疫缀合物由下式表示:

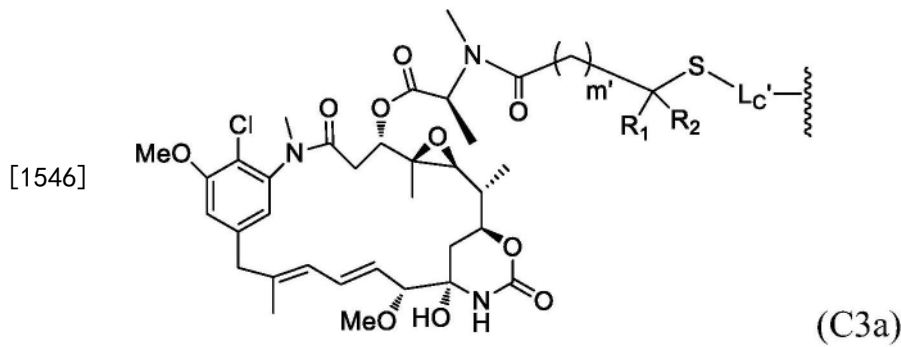


[1542] 其中:

[1543] CBA是本发明的第一方面中所描述的CD123/IL-3R α 结合剂(例如上文所描述的主题抗体或其抗原结合片段,或以上所描述的其主题多肽),其通过半胱氨酸残基共价连接于Cy^{C3};

[1544] W_c是1或2;

[1545] Cy^{C3}由下式表示:

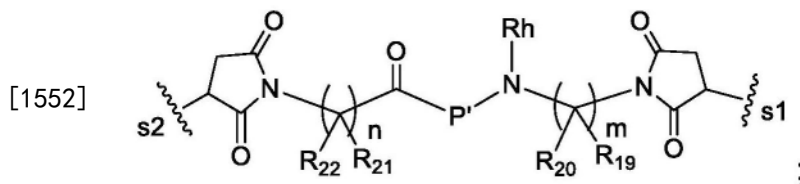
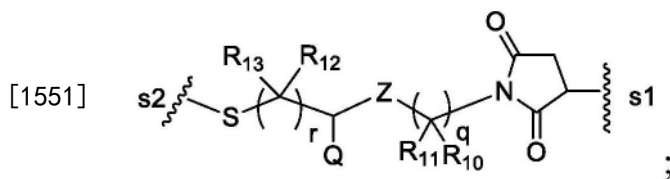


[1547] 其中:

[1548] m' 是1或2;

[1549] R_1 和 R_2 各自独立地是-H或(C_1 - C_3)烷基;

[1550] L_c' 由以下各式表示:



[1553] 其中:

[1554] s_1 是与所述CBA共价连接的位点且 s_2 是与 Cy^{C3} 上的-S-基团共价连接的位点;

[1555] Z是-C(=O)- NR_9 -或- NR_9 -C(=O)-;

[1556] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[1557] R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地是-H或(C_1 - C_3)烷基;

[1558] q 和 r 在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[1559] m 和 n 各自独立地是介于0与10之间的整数;

[1560] R^h 是-H或(C_1 - C_3)烷基;并且

[1561] P' 是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

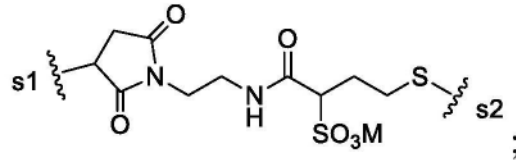
[1562] 在一个更具体实施方案中, q 和 r 各自独立地是介于1至6之间的整数,更具体地说,1至3的整数。甚至更具体地说, R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 均是H。

[1563] 在另一个更具体实施方案中, m 和 n 各自独立地是介于1与6之间的整数,更具体地说,1至3的整数。甚至更具体地说, R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 均是H。

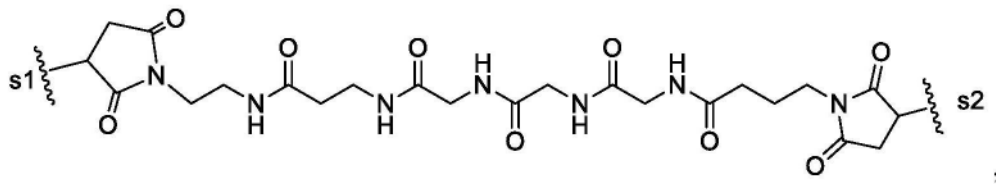
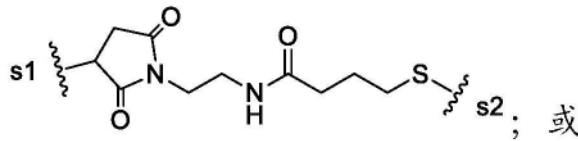
[1564] 在第十八具体实施方案中,对于式(C3)的免疫缀合物, P' 是含有2至5个氨基酸残基的肽;且其余变量如第十七具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。在一个更具体实施方案中, P' 选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ

ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。在另一个更具体实施方案中，P' 为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[1565] 在第十九具体实施方案中，对于式 (C3) 的免疫缀合物， $-L_c'$ 由以下各式表示：



[1566]

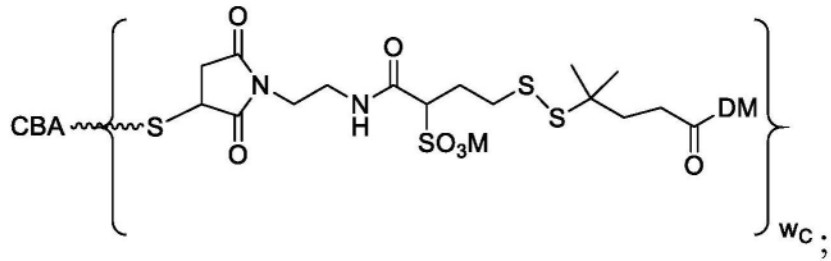


[1567] 其中M是 H^+ 或阳离子；且其余变量如以上在第十七或第十八具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

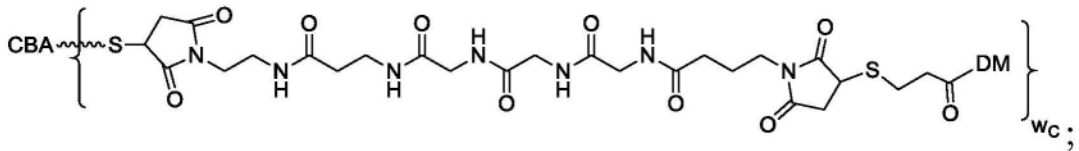
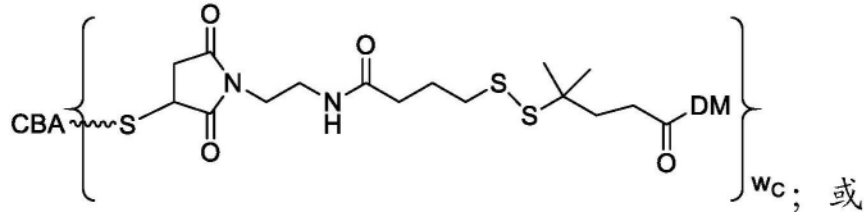
[1568] 在第二十具体实施方案中，对于式 (C3) 的免疫缀合物， m' 是1，且 R_1 和 R_2 均是H；并且其余变量如以上在第十七、第十八或第十九具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1569] 在第二十一具体实施方案中，对于式 (C3) 的免疫缀合物， m' 是2，且 R_1 和 R_2 均为Me；且其余变量如以上在第十七、第十八或第十九具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中所描述。

[1570] 在第二十二具体实施方案中，第三实施方案的免疫缀合物由以下各式表示：

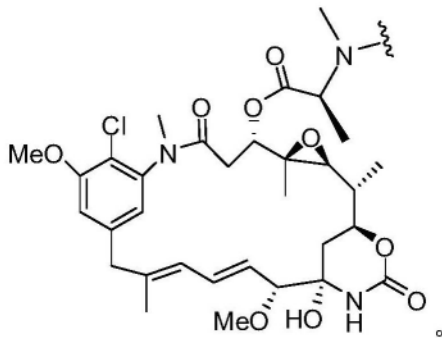


[1571]



[1572] 或其药学上可接受的盐,其中DM为由下式表示的药物部分:

[1573]



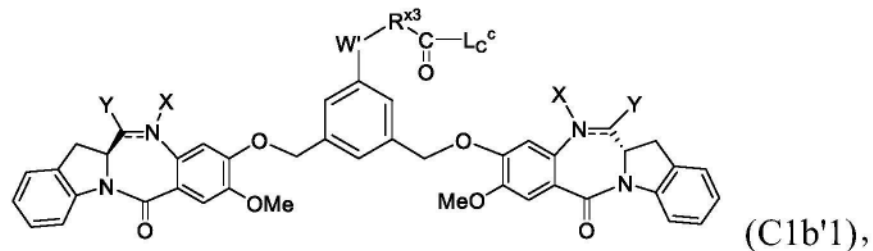
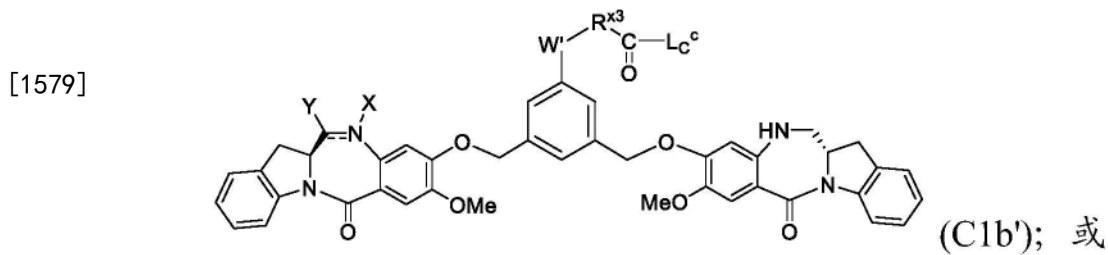
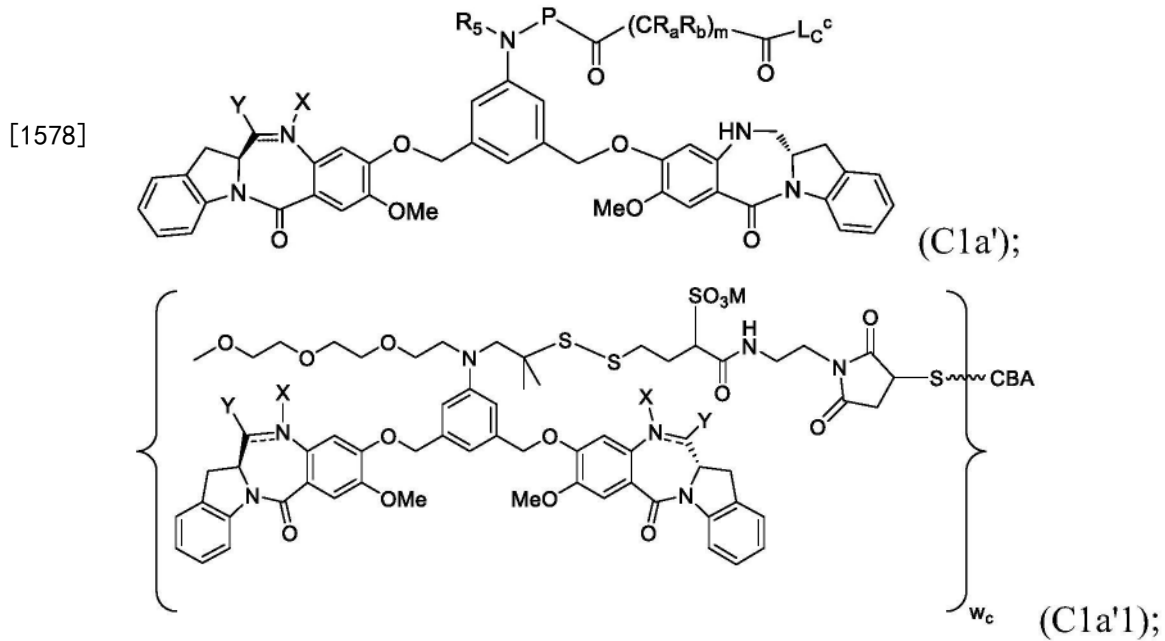
[1574] 在第二十三具体实施方案中,对于第三实施方案的免疫缀合物,M是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ ;且其余变量如第一至第二十二具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1575] 在以上第一至第二十三具体实施方案中的任一者中,主题抗体或其抗原结合片段或包含所述主题抗体或其抗原结合片段的多肽在对应于SEQ ID NO:54或56的重链CH3结构域中工程化的Cys(即,第5个至最后一个残基)的位置上具有Cys残基。主题抗体或其抗原结合片段可包含具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白重链区(HC);和具有SEQ ID NO:33、35、37或41(优选SEQ ID NO:35或37)中所阐述的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(LCVR)。主题抗体或其抗原结合片段还可包含具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列的Ig重链区;和具有SEQ ID NO:33、35、37或41(优选SEQ ID NO:35或37)中所阐述的氨基酸序列的Ig LCVR。在某些实施方案中,来自SEQ ID NO:54和56的N末端的第二个残基是Phe,而在某些其他实施方案中,来自SEQ ID NO:54和56的N末端的第二个残基是Val。

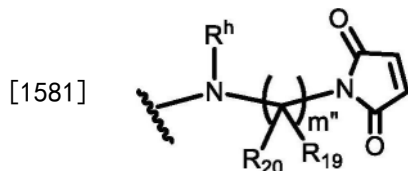
[1576] 以上所描述的第三实施方案的免疫缀合物(例如,第一至第二十三具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者的免疫缀合物)可通过使具有一个或多个

游离半胱氨酸的CBA与本文所描述的具有硫醇反应性基团的细胞毒性剂反应来制备。

[1577] 在一个实施方案中,具有硫醇反应性基团的细胞毒性剂由以下各式表示:

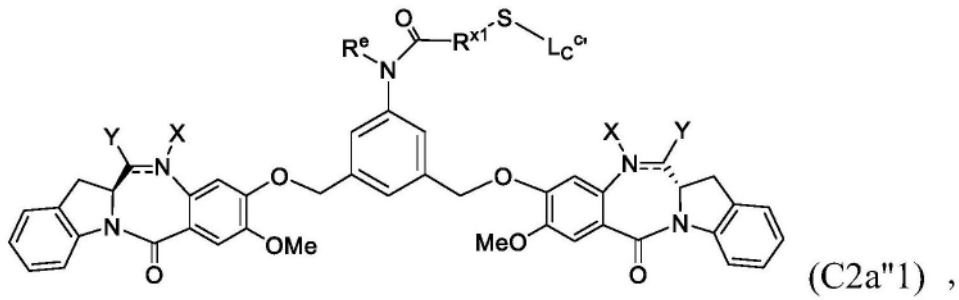
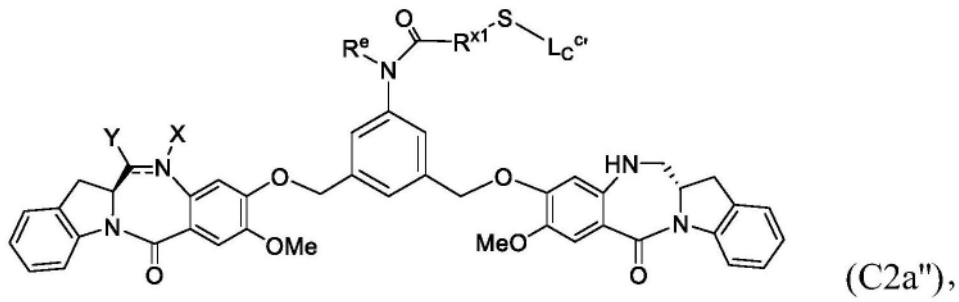


[1580] 或其药学上可接受的盐,其中 $-L_c^c$ 由以下各式表示:

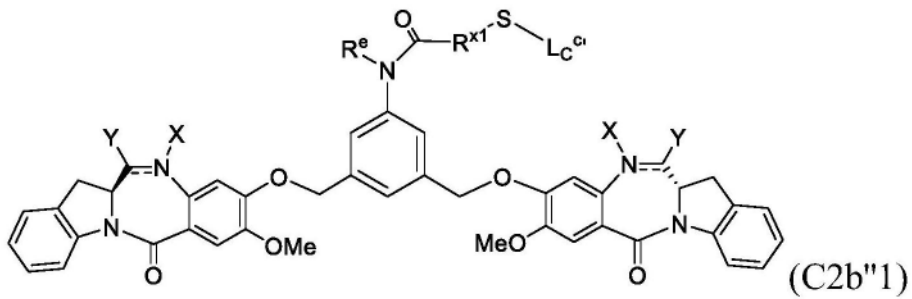
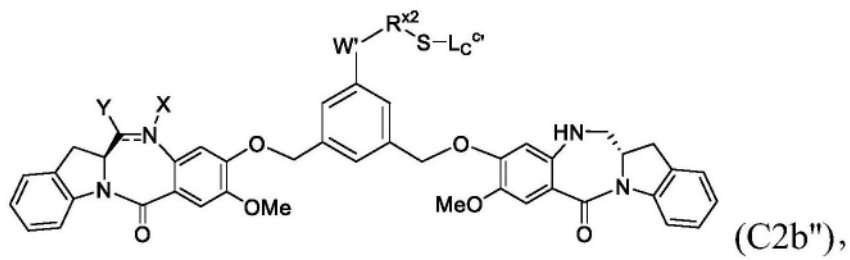
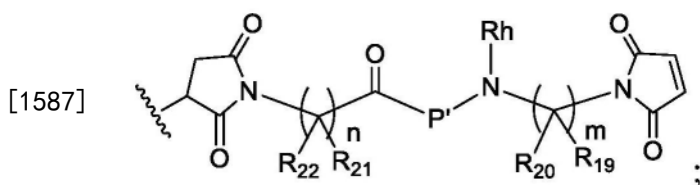
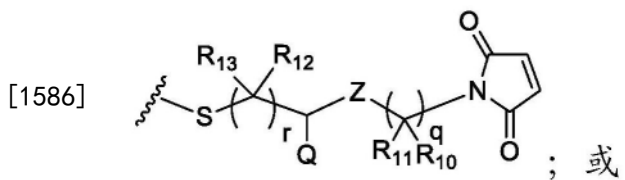


[1582] 其中变量如以上在第一至第九和第二十三具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1583] 在另一实施方案中,具有硫醇反应性基团的细胞毒性剂由以下各式表示:

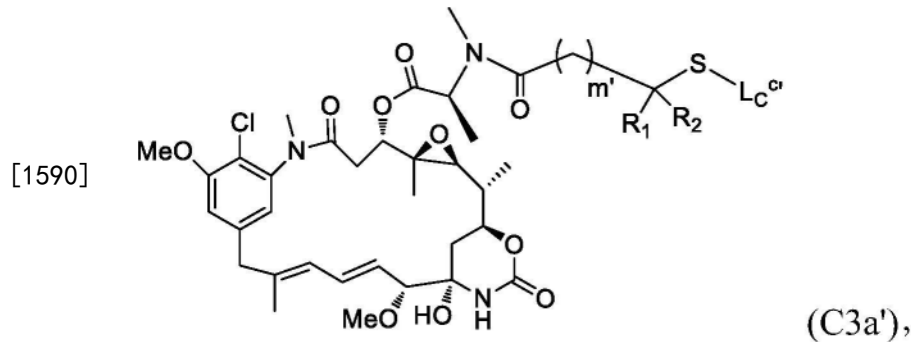


[1584]

[1585] 或其药学上可接受的盐,其中Lc^{c'}由以下各式表示:

[1588] 其中变量如以上在第十至第十六和第二十三具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1589] 在又一实施方案中,具有硫醇反应性基团的细胞毒性剂由下式表示:



[1591] 或其药学上可接受的盐,其中 L_c^+ 如以上所描述且其余变量如以上在第十七至第二十三具体实施方案或其中所描述的任何更具体实施方案中的任一者中所描述。

[1592] 在某些实施方案中,有机溶剂用于CBA与细胞毒性剂的反应中以溶解细胞毒性剂。示例性有机溶剂包括但不限于二甲基乙酰胺(DMA)、丙二醇等。在一个实施方案中,CBA与细胞毒性剂的反应在DMA和丙二醇存在下进行。

[1593] 4. 组合物和使用方法

[1594] 本发明包括一种组合物(例如,药物组合物),其包含本文所描述的主题抗体或其抗原结合片段、或其免疫缀合物(例如,式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)和式(C3)的缀合物)和载体(药学上可接受的载体)。本发明还包括一种组合物(例如,药物组合物),其包含主题抗体或其抗原结合片段、或式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)和式(C3)的免疫缀合物和载体(药学上可接受的载体)且还包含第二治疗剂。本发明组合物适用于在哺乳动物(例如人)中抑制异常细胞生长或治疗增殖性疾病,包括血液学癌症、白血病或淋巴瘤。

[1595] 具体地说,本发明提供药物组合物,其包含本文所描述的CD123结合剂或其免疫缀合物中的一种或多种。在某些实施方案中,所述药物组合物还包含药学上可接受的媒介物。这些药物组合物适用于在人患者中抑制肿瘤生长和治疗癌症,包括血液学癌症、白血病或淋巴瘤。

[1596] 在某些实施方案中,通过组合本发明的纯化的抗体或其免疫缀合物与药学上可接受的媒介物(例如载体、赋形剂)来制备制剂以便储存和使用(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000)。适合的药学上可接受的媒介物包括但不限于无毒缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐,诸如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;氯化苯铵;氯化苯钍;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟苯甲酸烷基酯,诸如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽(例如少于约10个氨基酸残基);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;碳水化合物,诸如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;盐形成抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和非离子表面

活性剂,诸如TWEEN或聚乙二(PEG)。

[1597] 本文所描述的 药物组合 可以许多方式施用以用于局部或系统治疗。施用可以是经局部(诸如至粘膜,包括阴道和直肠递送),诸如经皮贴片、软膏、洗液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾、液体和粉剂;经肺(例如,通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括通过雾化器;气管内、鼻内、表皮和经皮);经口;或胃肠外,包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内(例如鞘内或心室内)施用。在一些具体实施方案中,所述施用是静脉内。本文所描述的 药物组合 还可在体外或离体使用。

[1598] 本发明的抗体或免疫缀合物可与诸如已知可有效治疗相关疾病或病症的化合物的第二化合物组合于 药物组合 制剂或给药方案中作为组合疗法。在一些实施方案中,所述第二化合物是抗癌剂。在一些实施方案中,所述方法涵盖施用所述第二化合物和本发明的免疫缀合物,与施用单独免疫缀合物相比,产生更好效力。所述第二化合物可经由许多方式施用,包括例如局部、经肺、经口、胃肠外或颅内施用。在一些实施方案中,所述施用是经口。在一些实施方案中,所述施用是静脉内。在一些实施方案中,所述施用是经口和经静脉内。

[1599] 抗体或免疫缀合物还可与止痛剂或其他 药物组合 于 药物组合 制剂或给药方案中作为组合疗法。

[1600] 抗体或免疫缀合物还可与具有抗癌性质的第二化合物组合于 药物组合 制剂或给药方案中作为组合疗法。所述 药物组合 制剂或给药方案的第二化合物可与所述组合的ADC具有互补活性,以使得其不会对彼此产生不利影响。还提供包含CD123结合剂和第二抗癌剂的 药物组合 。

[1601] 本发明包括在哺乳动物(例如人)中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的单独或与第二治疗剂组合的本文所描述的主题抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物(例如式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)和式(C3)的缀合物)或其组合。

[1602] 在某些实施方案中,哺乳动物中的异常细胞生长或增殖性病症是与CD123的表达相关或以CD123的表达为特征的疾病或病状,诸如癌症,包括血液学癌症、白血病或淋巴瘤。在某些实施方案中,所述增殖性病症是淋巴器官癌或血液学恶性肿瘤。

[1603] 例如,癌症可选自由以下各项组成的组:急性骨髓性白血病(AML,包括低CD33 AML、P-糖蛋白阳性AML、复发性AML或难治性AML);慢性骨髓性白血病(CML),包括CML原始细胞危象和与CML相关的Abelson致癌基因(Bcr-ABL易位);骨髓发育不良综合征(MDS);急性B成淋巴细胞性白血病或B细胞急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL);慢性淋巴细胞性白血病(CLL),包括李希特氏综合征或李希特氏CLL转化;毛细胞白血病(HCL);急性前骨髓细胞性白血病(APL);B细胞慢性淋巴增生病(B-CLPD);非典型慢性淋巴细胞性白血病(优选具有显著CD11c表达);原始细胞性浆细胞样树突状细胞赘瘤(BPDCN);非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL);霍奇金淋巴瘤;系统性肥大细胞病和伯基特氏淋巴瘤。

[1604] 在某些实施方案中,所述B-ALL是CD19阳性B-ALL。在某些其他实施方案中,所述B-ALL是CD19阴性B-ALL。

[1605] 在某些实施方案中,所述癌症具有至少一个消极预后因子,例如,P-糖蛋白的过度表达、EVI1的过度表达、p53变化、DNMT3A突变、FLT3内部串联重复。

[1606] 在某些实施方案中,治疗有效量的单独或与第二治疗剂组合的本文所描述的主题抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物(例如式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)和式(C3)的缀合物)或其组合物优先抑制白血病干细胞(LSC)、白血病祖细胞(LP)和/或白血病原始细胞相对于正常造血干细胞(HSC)的增殖。在某些实施方案中,以上主题药剂抑制白血病干细胞(LSC)、白血病祖细胞(LP)和/或白血病原始细胞的增殖的 IC_{50} 值或半最大浓度比正常造血干细胞(HSC)低至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、300倍、500倍或更多。

[1607] 在某些实施方案中,本发明的抗白血病疗法不仅靶向并杀死白血病原始细胞,而且优选还靶向并杀死白血病祖细胞(LP)和白血病干细胞(LSC)。在某些实施方案中,所述疗法还对正常HSC具有较低选择性。在某些实施方案中,LSC、LP和白血病原始细胞上的CD123表达与正常淋巴细胞(其可能接近阴性)相比高得多(例如在LSC、AML祖细胞和AML原始细胞中高出至少20-25倍)。在某些实施方案中,LP和LSC上的CD123表达水平至少与白血病原始细胞上同样高。

[1608] 类似地,本发明提供一种在所选细胞群体中诱导细胞死亡的方法,所述方法包括使靶细胞或含有靶细胞的组织与有效量的本发明的主题抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物接触。靶细胞是缀合物的细胞结合剂可结合的细胞。

[1609] 如果需要,则可随缀合物施用其他活性剂,诸如其他抗肿瘤剂。

[1610] 癌症疗法和其剂量、施用途径和推荐用法在本领域中是已知的且已描述于诸如Physician's Desk Reference (PDR)的文献中。PDR公开治疗各种癌症时已使用的药剂剂量。这些上述化学治疗药物的治疗上有效的给药方案和剂量将取决于所治疗的特定癌症、疾病程度和熟习本领域的医师所熟知的其他因素,且可由医师决定。PDR的内容明确以引用的方式整体并入本文中。本领域的技术人员可回顾PDR,使用以下参数中的一个或多个来确定可根据本发明的教导加以使用的化学治疗剂和缀合物的给药方案和剂量。这些参数包括:综合指数;制造商;产品(公司或注册商主题药物名称);分类索引;一般/化学指标(非商标普通药物名称);药物的彩色影像;符合FDA标记的产品信息;化学信息;功能/作用;适应症和禁忌;试验研究、副作用、警告。

[1611] 体外用途的实例包括处理自体骨髓随后将其移植至相同患者中以杀死患病或恶性细胞:处理骨髓随后对其进行移植以便杀死胜任T细胞且预防移植物对抗宿主疾病(GVHD);处理细胞培养物以便杀死除不表达靶抗原的所需变体以外的所有细胞;或杀死表达非所需抗原的变体。

[1612] 非临床体外使用的条件由本领域的技术人员容易地确定。

[1613] 临床离体使用的实例是自骨髓中移除肿瘤细胞或淋巴样细胞随后进行自体移植用于癌症治疗或自体免疫性疾病治疗,或自自体或同种异体骨髓或组织中移除T细胞和其他淋巴样细胞随后进行移植以便预防GVHD。可如下进行治疗。自患者或其他受试者收集骨髓,且随后在含有血清的培养基中孵育,向其中添加本发明的细胞毒性剂,浓度范围为约10 μ M至1pM,在约37°C下持续约30分钟至约48小时。浓度和孵育时间的准确条件,即,剂量,由本领域的技术人员容易地确定。在孵育之后,用含有血清的培养基洗涤骨髓细胞且根据已知方法经静脉内返至患者。在患者于收集骨髓的时间与再输注经处理的细胞之间接受诸如摘除化学疗法或总体照射过程的其他治疗的情形下,使用标准医学设备将经处理的骨髓细

胞冷冻储存于液氮中。

[1614] 对于临床体内使用,测试无菌性和内毒素水平的本发明细胞毒性化合物或缀合物将作为溶液或冻干粉未供应。

[1615] 适合的药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂是熟知的且可在临床情形允许时由本领域的技术人员决定。适合的载体、稀释剂和/或赋形剂的实例包括:(1)杜尔贝科氏磷酸盐缓冲盐水,pH约7.4,含有或不含约1mg/mL至25mg/mL人血清白蛋白;(2)0.9%生理盐水(0.9%w/v NaCl);和(3)5%(w/v)葡萄糖;且还可含有诸如色胺的抗氧化剂和诸如Tween 20的稳定剂。

[1616] 用于在所选细胞群体中诱导细胞死亡、用于抑制细胞生长和/或用于治疗癌症的本发明方法可在体外、体内或离体实施。

实施例

[1617] 实施例1产生针对人和猕猴CD123抗原的小鼠单克隆抗体

[1618] 为了产生鼠类抗CD123抗体,将野生型BALB/c雌性小鼠(Charles River Laboratory,Wilmington,MA)每2周五次以 5×10^6 个细胞/小鼠的剂量皮下注射含表达人CD123的稳定300-19细胞系的PBS,所述细胞系是BALB/c源性的前体B细胞系(M.G.Reth等人,1985,Nature,317:353-355)。处死以用于杂交瘤产生的前三天,使免疫小鼠接受腹膜内注射另一剂量的抗原。根据标准动物方案自小鼠收集脾且在两个无菌雾面显微镜载玻片之间研磨以获得处于RPMI-1640培养基中的单细胞悬浮液。在用ACK溶解缓冲液溶解红细胞之后,随后将脾细胞与鼠类骨髓瘤P3X63Ag8.653细胞(P3细胞)(J.F.Kearney等人,1979,J.Immunol,123:1548-1550)以1个P3细胞:3个脾细胞的比率混合。对脾细胞与P3细胞的混合物进行洗涤且在室温下在融合培养基(0.3M甘露醇/D-山梨醇、0.1mM CaCl_2 、0.5mM MgCl_2 和1mg/mL BSA)中用链霉蛋白酶处理3分钟。通过添加胎牛血清(FBS,Invitrogen)终止反应;随后洗涤细胞,再悬浮于2mL冷融合培养基中且与BTX ECM 2001电融合机器(Harvard Apparatus)融合。将融合的细胞轻缓添加至含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)的RPMI-1640选择培养基(Sigma Aldrich)中,在37°C下孵育20分钟,且随后以200 μL /孔接种至平底96孔板中。随后在5% CO_2 孵育箱中在37°C下孵育各板,直至杂交瘤克隆可用于抗体筛选。还可使用其他免疫和杂交瘤产生技术,包括在以下文献中所描述的那些:J.Langone和H.Vunakis(编,Methods in Enzymology,第121卷,Immunochemical Techniques,Part I,Academic Press,Florida);以及E.Harlow和D.Lane(Antibodies:ALaboratory Manual,1988,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,NY)。

[1619] 杂交瘤筛选和选择

[1620] 使用流式细胞仪结合测定,用表达人CD123的稳定300-19细胞系和野生型300-19细胞进行杂交瘤筛选。简而言之,首先用CELLTRACE™远红外DDAO-SE(Invitrogen)标记野生型300-19细胞,与未处理的细胞以1:1比率混合,且与杂交瘤上清液一起在冰上孵育2小时。随后洗涤细胞,与PE标记的抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch)一起孵育,洗涤,用福尔马林固定且使用FACS阵列(BD Bioscience)进行分析。扩增对人CD123抗原具有特异性反应性的杂交瘤且通过流式细胞术结合测定,使用三个独立细胞系再筛选上清液:表达人CD123的稳定300-19细胞系、表达猕猴CD123的300-19细胞系和野生型300-19细胞系。通过限制稀

释对与人和猕猴CD123抗原具有阳性结合但在野生型300-19细胞上呈阴性的杂交瘤进行进一步亚克隆。自各杂交瘤选择一个显示与人和猕猴CD123抗原的特异性结合的亚克隆。

[1621] 在此研究过程中进行总计六次融合。筛选大约6,000个杂交瘤,产生对人和猕猴CD123抗原具有特异性的33个杂交瘤,且亚克隆18个杂交瘤。培养稳定亚克隆且使用可商购小鼠IgG同型分析试剂(诸如IsoStrip小鼠单克隆抗体同型分析试剂盒,Roche Diagnostics GmbH,Germany,产品编号11493027001)鉴别单克隆抗体的同型。

[1622] 抗体纯化

[1623] 使用标准方法,诸如,例如蛋白A或G色谱法(HiTrap蛋白A或G HP,1mL,Amersham Biosciences)自杂交瘤亚克隆上清液中纯化抗体。简而言之,通过添加1/10体积的1M Tris/HCl缓冲液pH 8.0来制备上清液以用于色谱法。使pH调节的上清液通过0.22 μ m滤膜进行过滤且负载至用结合缓冲液(PBS,pH 7.3)平衡的柱上。用结合缓冲液洗涤柱,直至获得稳定基线,在280nm下无吸光度。用含有0.15M NaCl的0.1M乙酸缓冲液(pH 2.8),使用0.5mL/分钟的流速来洗脱抗体。收集大约0.25mL的级分且通过添加1/10体积的1M Tris/HCl (pH8.0)进行中和。使峰级分针对1 \times PBS透析过夜两次,且通过经0.2 μ m滤膜过滤进行灭菌。通过在A280下的吸光度来定量纯化的抗体。

[1624] 使用离子交换色谱法(IEX)与针对鼠类抗体的季铵(Q)色谱法对蛋白A纯化的级分进行进一步抛光。简而言之,将来自蛋白A纯化的样品缓冲液交换至结合缓冲液(10mM Tris、10mM氯化钠,pH 8.0)中且通过0.22 μ m过滤器进行过滤。随后将所制备的样品以120cm/小时的流速负载至用结合缓冲液平衡的Q快速流树脂(GE Lifesciences)上。选择柱尺寸以具有足以结合样品中的所有MAb的容量。随后用结合缓冲液洗涤柱,直至获得稳定基线,在280nm下无吸光度。通过在20倍柱体积(CV)下起始10mM至500mM氯化钠的梯度来洗脱抗体。基于在280nm(A280)下的吸光度测量来收集峰级分。用尺寸排阻色谱法(SEC)在具有SWXL保护柱6.0 \times 40mm的TSK凝胶G3000SWXL 7.8 \times 300mm(Tosoh Bioscience, Montgomeryville,PA)上使用Agilent HPLC 1100系统(Agilent,Santa Clara,CA)评估单体的百分比。汇集单体含量在95%以上的级分,使用TFF系统缓冲液交换至PBS(pH 7.4),且通过经0.2 μ m滤膜过滤进行灭菌。通过A280,使用消光系数1.47来测定纯化的抗体的IgG浓度。还使用诸如陶瓷羟基磷灰石(CHT)的替代方法对抗体进行抛光,具有良好选择性。使用具有40 μ m粒度的II型CHT树脂(Bio-Rad Laboratories),利用与如针对IEX色谱法所描述类似的方案。用于CHT的结合缓冲液对应于20mM磷酸钠pH 7.0,且在20CV下用20-160mM磷酸钠的梯度洗脱抗体。

[1625] 实施例2抗CD123抗体V_L和V_H区的克隆和测序

[1626] V_L和V_H区的克隆

[1627] 使用RNeasy试剂盒(QIAgen),根据制造商的方案由5 \times 10⁶个CD123杂交瘤细胞制备总细胞RNA。使用SuperScript II cDNA合成试剂盒(Invitrogen)由总RNA随后合成cDNA。

[1628] 用于扩增来源于杂交瘤细胞的抗体可变区cDNA的PCR程序是基于Wang等人((2000)J Immunol Methods.233:167-77)和Co等人((1992)J Immunol.148:1149-54)中所描述的方法。通过5'-端上的简并引物和分别处于3'-端上的鼠类 κ 或IgG₁恒定区特异性引物来扩增V_L和V_H序列。将纯化的扩增子送至Beckman Coulter Genomics以进行测序。

[1629] 因为用于克隆V_L和V_H cDNA序列的简并引物改变5'-端,因此需要额外测序工作以

验证完整cDNA序列。将初步序列输入NCBI IgBlast网站的搜索查询以鉴别得到抗体序列的鼠类种系序列。随后设计PCR引物以便对鼠类抗体的种系连接的前导序列进行退火,以使得此新PCR反应将产生完整可变区cDNA序列,不因PCR引物而改变。

[1630] 用于序列证实的质量测定

[1631] 将针对各抗CD123抗体获得的可变区cDNA序列与种系恒定区序列组合以获得全长抗体cDNA序列。随后由cDNA序列的翻译计算重链和轻链的分子量,且与通过对纯化的鼠类抗CD123抗体进行LC/MS分析而获得的分子量相比较。各轻链和重链的观察分子量相配期望值。

[1632] 实施例3抗体人源化

[1633] 重组抗体表达

[1634] 对鼠类CD123抗体的证实的可变区氨基酸序列进行密码子优化,合成并且通过Blue Heron Biotechnology与人抗体恒定区一起进行同框克隆,以构建CD123抗体的嵌合型式。用于嵌合CD123抗体的载体、恒定区和克隆方案与以下所描述的用于人源化CD123抗体的那些相同。嵌合抗体chCD123-6由分别具有SEQ ID NO:28和29的小鼠可变区序列连同分别用于重链和轻链的人IgG1和 κ 恒测序列构成。将轻链可变区克隆至pAbKZeo质粒的EcoRI和BsiWI位点中,且将重链可变区克隆至pAbG1Neo质粒的HindIII和ApaI位点中。在振荡瓶中使用悬浮适应型HEK-293T细胞,使用改进型PEI程序在粘附HEK-293T细胞中瞬时产生这些表达构建体。如先前所描述来进行PEI瞬时转染(Durocher等人,Nucleic Acids Res.30(2):E9(2002)),除了使HEK-293T细胞在Freestyle 293(Invitrogen)中生长且在添加PEI-DNA复合物之后保持培养物体积未加稀释。将转染物孵育一周,且随后依序通过标准蛋白A色谱法和抛光色谱法程序来纯化澄清上清液。

[1635] 抗体人源化

[1636] 使用实质上如Jones等人,Nature 321:604-608,1986、Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536,1988、美国专利号5,225,539和美国专利号5,585,089中所描述的互补决定区(CDR)移植程序对鼠类CD123-6抗体进行人源化。CDR移植一般由用人抗体Fv框架区置换小鼠抗体的Fv框架区(FR)同时保留对亲本抗体的特异性抗原结合性质非常重要的小鼠CDR残基组成。遵循Kabat编号方案和Kabat CDR定义的CD123-6抗体的示例性CDR如以下表A中所指示。

[1637] 表A

CD123-6 CDRs (CDR 移植)	
轻链	
[1638]	CDR-L1: 鼠类: KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 19) CDR 移植: RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 20)
	CDR-L2: RVNRLVD (SEQ ID NO: 21)
	CDR-L3: LQYDAFPYT (SEQ ID NO: 22)
	重链
	CDR-H1: SSIMH (SEQ ID NO: 5)
	CDR-H2: YIKPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8)
	CDR-H3: EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO: 11)

[1639] CDR移植方法始于选择适当人受体框架,通常来源于与亲本鼠类抗体具有最高序列同源性的人抗体基因的那些。利用如Ehrenmann等人,Nucleic Acids Res.38:D301-307 (2010)中所描述的International ImMunoGeneTics information system[®] (IMGT(<http://imgt.cines.fr/>))的相互反应工具DomainGapAlign来鉴别与鼠类CD123-6抗体具有最高同源性的人免疫球蛋白种系轻链和重链序列。选择作为CD123-6抗体V_L和V_H结构域的受体框架的人种系序列分别是IGKV1-16*01和IGHV1-46*03。

[1640] 原始muCD123-6 V_L序列、相应人种系序列IGKV1-16*01以及相应huCD123-6VLGv1和huCD123-6VLGv4序列的相关部分间的序列比对显示如下。

```

muCD123-6 VL      (1) 1 DIKMTQSPSSMYASLGERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRVNRLVDGVP5R 61
huCD123-6VLGv1   (1) --Q-----LS--V-D-----R-----A-----A-S-----S----- (SEQ ID NO: 80)
huCD123-6VLGv4   (1) --Q-----LS--V-D-----R-----A-----A-----S----- (SEQ ID NO: 81)
IGKV1-16*01      (1) --Q-----LS--V-D-----R--G-SN--A-----A--S---AA5S-QS----- (SEQ ID NO: 82)

```

[1641]

```

muCD123-6 VL      (62) 62 FSGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQYDAFPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID NO: 83)
huCD123-6VLGv1   (62) -----T-FT-----QP--FAT-----Q--V----- (SEQ ID NO: 84)
huCD123-6VLGv4   (62) -----N-T-----QP--FAT-----Q--V----- (SEQ ID NO: 85)
IGKV1-16*01      (62) -----T-FT-----QP--FAT--Q--NSY- (SEQ ID NO: 86)

```

[1642] 原始muCD123-6 V_H序列、相应人种系序列IGHV1-46*03以及相应huCD123-6VHGv1、huCD123-6VHGv6和huCD123-6VHGv7序列的相关部分间的序列比对显示如下。

```

muCD123-6 VH      (1) 1 EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGSIYFTSSIMHMMKQKPGQGLEWIGYIKPYNDGTYN 61 (SEQ ID NO: 87)
huCD123-6VHGv1   (1) QV--V--A-VK-----V-----G-----VR-A-----M----- (SEQ ID NO: 88)
huCD123-6VHGv6   (1) Q--V--A-VK-----V-----VR-A----- (SEQ ID NO: 89)
huCD123-6VHGv7   (1) QV--V--A-VK-----V-----VR-A----- (SEQ ID NO: 90)
IGHV1-46*03      (1) QV--V--A-VK-----V-----T---YY---VR-A-----M-I-N-SGG5-S-A (SEQ ID NO: 91)

```

[1643]

```

muCD123-6 VH      (62) 62 EKFKGKATLTS5DK55STANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQTSVTVS5L 121 (SEQ ID NO: 92)
huCD123-6VHGv1   (62) ---RV-M-R-T-T-VY--S-R--T-----L----- (SEQ ID NO: 93)
huCD123-6VHGv6   (62) ---R---R-T-Y--S-R--T-----L----- (SEQ ID NO: 94)
huCD123-6VHGv7   (62) ---R---R-T-Y--S-R--T-----L----- (SEQ ID NO: 95)
IGHV1-46*03      (62) Q--Q-RV-M-R-T-T-VY--S-R--T----- (SEQ ID NO: 96)

```

[1644] 合成人源化DNA构建体,表达,且将如以上针对后续CD123结合分析所描述而纯化的重组抗体与亲本抗体相比较。

[1645] 非常确定框架残基还可对抗原结合存在结构贡献,且可作为回复突变再引入,以最大程度地保留抗原结合亲和力。Foote和Winter,J.Mol.Biol.224:487-499(1992)。称为维尔尼区残基的直接处于CDR下方的残基平台可有助于保留指引抗体的特异性和亲和力的CDR环的构象。因此,制造含有维尔尼区残基中的一个或多个回复突变的变体,且随后评估抗原结合以及功能IL3抑制活性。所测试的维尔尼区回复突变包括V_L中的3个残基(FW-L2中的位置46和FW-L3中的位置69、71)和V_H中的8个残基(FW-H1中的位置2、28,FW-H2中的位置48,和FW-H3中的位置67、69、71、73、78)。具有维尔尼区回复突变的若干CDR移植CD123-6抗体对TF-1细胞展现IL3抑制活性,如型式4.6或在本文中称为“Gv4.6”(V_L Gv4和V_H Gv6)和型式4.7或在本文中称为“Gv4.7”(V_L Gv4和V_H Gv7)所例示(图1)。

[1646] 所描述的CDR移植CD123-6抗体的特定框架残基使用提供于以下表B和表C中。

[1647] 表B CD123-6抗体V_L的CDR移植

CD123-6-V _L			
Kabat 位置	鼠类残 基	人 (CDR 移植) v1 残基	人 (CDR 移植) v4 残基
3	K	Q	Q
11	M	L	L
12	Y	S	S
15	L	V	V
17	E	D	D
43	S	A	A
46	T	S	<u>T</u>
69	Q	T	<u>N</u>
71	Y	F	<u>Y</u>
72	S	T	T
79	E	Q	Q
80	Y	P	P
83	M	F	F
84	G	A	A
85	I	T	T
100	G	Q	Q
104	L	V	V
24	K	R	R

[1650] 表C CD123-6抗体V_H的CDR移植

[1651]

CD123-6-V _H				
Kabat 位置	鼠类 残基	人 (CDR- 移植) v1 残 基	人 (CDR- 移植) v6 残 基	人 (CDR- 移植) v7 残 基
1	E	Q	Q	Q
2	F	V	<u>F</u>	V
5	Q	V	V	V
9	P	A	A	A
11	L	V	V	V
12	V	K	K	K
20	M	V	V	V
28	I	G	<u>I</u>	<u>I</u>
37	M	V	V	V

[1652]

38	K	R	R	R
40	K	A	A	A
48	I	M	<u>I</u>	<u>I</u>
66	K	R	R	R
67	A	V	<u>A</u>	<u>A</u>
69	L	M	<u>L</u>	<u>L</u>
71	S	R	<u>S</u>	<u>S</u>
73	K	T	<u>R</u>	<u>R</u>
75	S	T	T	T
78	A	V	<u>A</u>	<u>A</u>
79	N	Y	Y	Y
82a	N	S	S	S
83	T	R	R	R
87	S	T	T	T
108	S	L	L	L

[1653] 另外,为了最小化关于对属于CDR中的结合赖氨酸的影响的担心,在CDR移植时将鼠类CD123-6抗体CDR-L1中的赖氨酸24置换为精氨酸(参见以上表A)。

[1654] 还遵循Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,91(3):969-973,1994和Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904,1996先前所描述的方法,通过可变结构域表面重构的对CD123-6抗体进行人源化。表面重构一般涉及鉴别轻链和重链中的可变区框架表面残基且用人等效物对其进行置换。鼠类CDR和埋藏框架残基保留在表面重构的抗体中。CD123-6抗体的示例性CDR如表D中所指示进行定义。

[1655] 表D

	CD123-6 抗体 CDR (表面重构的)
	轻链
	CDR-L1: 鼠类: KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 19) 表面重构的: RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 20) CDR-L2: RVNRLVD (SEQ ID NO: 21) CDR-L3: LQYDAFPYT (SEQ ID NO: 22)
	重链
[1656]	CDR-H1: SSIMH (SEQ ID NO: 5) CDR-H2: 鼠类表面重构的 v1.1: YIKPYNDGTK (SEQ ID NO: 6) 表面重构的 v1.0: YIRPYNDGTR (SEQ ID NO: 7) CDR-H3: EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO: 11)
	Kabat CD123-6 CDR-H2
	鼠类 CDR-H2: YIKPYNDGTKY <u>NEKFKG</u> (SEQ ID NO: 8) 表面重构的 v1.0 CDR-H2: YIRPYNDGTRY <u>NQKFQG</u> (SEQ ID NO: 9) 表面重构的 v1.1 CDR-H2: YIKPYNDGTKY <u>NQKFQG</u> (SEQ ID NO: 10)
	*双下划线序列标记 Kabat 重链 CDR-H2 中不被视为用于表面重构的 CDR 的部分。

[1657] 为了最小化关于对属于CDR中的结合赖氨酸的影响的担心,将鼠类CD123-6抗体轻链CDR-L1的赖氨酸24置换为精氨酸。类似地,将鼠类CD123-6抗体重链CDR-H2的赖氨酸52和59置换为精氨酸以获得表面重构的型式1.0。将AbM重链CDR-H2定义用于表面重构,因此所述表提供用于CD123-6抗体的鼠类和人型式的那些以及示例性Kabat定义重链CDR-H2序列。

[1658] 表面残基位置被定义为具有30%或更大相对可及性的任何位置(Pedersen等人, J.Mol.Biol.235:959-973,1994)。随后将计算的表面残基与人种系表面序列比对,以鉴别最同源的人表面序列。用作CD123-6抗体轻链可变结构域的置换表面的人种系序列是IGKV1-16*01,而IGHV1-69*10用作重链可变结构域的置换表面。特定框架表面残基变化提供于以下表E和表F中。

[1659] 表E CD123-6抗体V_L的表面重构

CD123-6 V _L		
Kabat 位置	鼠类 残基	人(表面 重构的) 残基
1	D	D
3	K	<u>Q</u>
5	T	T
9	S	S
12	Y	<u>S</u>
15	L	<u>V</u>
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	S	S

[1660]

[1661]

67	S	S
80	Y	<u>P</u>
81	E	E
100	G	<u>Q</u>
103	K	K
107	K	K
108	R	R
24	K	<u>R</u>

[1662] 表F CD123-6抗体V_H的表面重构

[1663]

CD123-6 V _H			
Kabat 位置	鼠类 残基	人 v1.0 残基	人(表面 重构的) v1.1 残基
1	E	<u>Q</u>	<u>Q</u>
2	F	<u>V</u>	F
3	Q	Q	Q
5	Q	<u>V</u>	<u>V</u>
9	P	<u>A</u>	<u>A</u>
11	L	<u>V</u>	<u>V</u>
13	K	K	K
14	P	P	P
19	K	K	K
23	K	K	K

[1664]

28	I	<u>T</u>	<u>T</u>
41	P	P	P
42	G	G	G
43	Q	Q	Q
61	E	<u>Q</u>	<u>Q</u>
62	K	K	K
64	K	<u>Q</u>	<u>Q</u>
65	G	G	G
73	K	<u>R</u>	K
74	S	S	S
82B	S	S	S
84	S	S	S
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S
52	K	<u>R</u>	K
59	K	<u>R</u>	K

[1665] 以下序列比对显示轻链 (V_L) 和重链 (V_H) CD123-6抗体可变结构域与其鼠类对应物的表面重构的序列。表面重构的huCD123-6 V_L序列参见SEQ ID NO:41,且表面重构的huCD123-6 V_H序列参见SEQ ID NO:39和40。

```

muCD123-6 VL 1 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFFQQKPGKSPKTLIYRVNRLVDGVP5R (SEQ ID NO: 79)
huCD123-6 VL --Q-----S--Y-----R----- (SEQ ID NO: 74)

muCD123-6 VL 62 FSGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIZYCLQYDAFPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 83)
huCD123-6 VL -----P-----Q----- (SEQ ID NO: 75)
    
```

[1666]

```

muCD123-6 VH 1 EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFITSSIMHWKQKPGQGLEWIGYIKPYNDGTYM (SEQ ID NO: 87)
huCD123-6 VHv1.0 QV--V--A-V-----T-----R-----R----- (SEQ ID NO: 76)
huCD123-6 VHv1.1 Q--V--A-V-----T----- (SEQ ID NO: 77)

muCD123-6 VH 62 EKFKGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 92)
huCD123-6 VHv1.0 Q--Q-----R----- (SEQ ID NO: 78)
huCD123-6 VHv1.1 Q--Q----- (SEQ ID NO: 97)
    
```

[1667]

实施例4筛选可抑制IL3介导的信号传导和增殖的抗CD123抗体

[1668]

在体外使用可仅在存在以下生长因子中的一个IL-3或GM-CSF的情况下增殖的红

白血病细胞系TF-1来研究抗CD123抗体抑制IL3介导的信号传导和增殖的能力。在补充有GM-CSF(2ng/mL)的完全RPMI培养基(RPMI-1640,10%胎牛血清和50 μ g/mL硫酸庆大霉素;所有试剂均来自Invitrogen)中培养TF-1细胞。在设定增殖测定之前,洗涤细胞且随后对生长因子饥饿过夜。为了阻断细胞表面上的Fc受体,培养基补充有100nM chKTI抗体(属于相同同型的非结合抗体)。在存在或不存在10 μ g/mL抗CD123抗体的情况下将TF-1细胞以6,000个细胞/孔接种于完全RPMI培养基中。向细胞中添加生长因子IL-3(1ng/mL)或GM-CSF(2ng/mL)以起始细胞增殖。在37 $^{\circ}$ C下在湿润5% CO₂孵育箱中将细胞孵育3天。通过比色WST-8测定(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US)测定各孔中的活细胞的相对数目。WST-8在活细胞中由脱氢酶还原成可溶于组织培养基中的橘色甲贍产物。所产生的甲贍的量与活细胞数目成正比。以最终体积的10%向孔中添加WST-8,且在37 $^{\circ}$ C下在湿润5% CO₂孵育箱中将各板再孵育2至6小时。随后在板读取光谱仪上以双波长模式450nm/650nm测量吸光度,且将650nm下的吸光度(细胞所致的非特异性光散射)减去450nm下的吸光度。通过首先修正培养基背景吸光度,且随后将用抗体处理的各样品的值除以含未处理细胞的孔(对照)的平均值来计算各孔中的相对细胞数目。

[1669] 来自典型测定的结果提供于图2A和图2B中。与先前报道的数据(Sun等人1996)相同,7G3而非6H6或9F5抗体实质上抑制IL-3依赖性增殖。出人意料地,此研究中所产生的若干抗CD123抗体能够比7G3甚至更显著地抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖(图2A)。例如,抗体3、6和14将TF-1细胞数目减至小于对照(在不存在抗体的情况下生长的TF-1细胞)中的细胞数目的5%,而7G3抗体将细胞数目减至对照中的细胞数目的15%。相比之下,用其他抗CD123抗体(例如,抗体2、5、7、8、9、12、13、16、18、20、21和22)处理对细胞增殖仅具有最低作用或完全无作用。

[1670] 抗体3、6、14和7G3对TF-1细胞增殖的抑制具有IL-3依赖性,因为当细胞在存在另一生长因子GM-CSF的情况下生长时,这些抗体不具有抑制作用(图2B)。

[1671] 接下来,确定抑制IL3依赖性增殖所需的抗体3、6、14(分别重命名为muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14)和7G3的浓度。将TF-1细胞以6,000个细胞/孔接种于100 μ L培养基中。使用6倍稀释系列将所述抗体稀释至培养基中且每孔添加50 μ L稀释物质。随后将IL3以最终浓度1ng/mL添加至细胞。最终抗体浓度通常介于 6×10^{-8} M至 8×10^{-12} M的范围内。在37 $^{\circ}$ C下在湿润5% CO₂孵育箱中将细胞孵育3天。如以上所描述通过WST-8测定来测定各孔中的相对细胞数目。将相对细胞数目值相对于抗体浓度绘制曲线图且提供于图3中。显而易见,muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14和7G3实质上且以剂量依赖性方式抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖,而对照无功能抗CD123抗体不具有这种作用。例如,在所测试的最高抗体浓度下,用7G3处理使相对细胞数目减至18%,IC₅₀值是0.33nM。在所测试的最高抗体浓度下,用muCD123-3处理使相对细胞数目减至2%,IC₅₀值是0.26nM。同样,在所测试的最高抗体浓度下,用muCD123-14或muCD123-6处理使相对细胞数目减至小于1%,IC₅₀值分别是0.08nM或0.05nM。因此,muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14抑制TF-1细胞的IL-3依赖性增殖达与7G3抗体相比显著更高的程度。

[1672] 实施例5鼠类抗CD123抗体的结合亲和力

[1673] 通过流式细胞术使用纯化的抗体来测试结合亲和力。说明muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14和7G3与表达CD123的TF-1和HNT-34细胞的结合的FACS直方图分别示于图4A和

图4B中。将TF-1细胞(5×10^4 个细胞/样品)与不同浓度的鼠类抗体一起在200 μ L FACS缓冲液(补充有2%正常山羊血清的DMEM培养基)中孵育。随后使细胞团块化,洗涤两次,且与100 μ L藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(Jackson Laboratory)一起孵育1小时。再次使细胞团块化,用FACS缓冲液洗涤且再悬浮于200 μ L含1%甲醛的PBS中。样品可使用具有HTS多孔取样器的FACSCalibur流式细胞仪或FACS阵列流式细胞仪获取,且使用CellQuest Pro进行分析(均来自BD Biosciences, San Diego, US)。对于各样品,计算FL2的几何平均荧光强度且针对抗体浓度绘于半对数图中。通过非线性回归产生剂量反应曲线,且使用GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)计算对应于各抗体的表观解离常数(K_d)的各曲线的 EC_{50} 值。对于所有测试抗体均观察到强结合,且对于muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14和7G3抗体, K_d 值分别对应于0.3nM、0.1nM、0.3nM和0.9nM(图4A)。因此,在此实验中,主题鼠类CD123抗体的结合比7G3抗体强至少3-9倍。

[1674] 同样,当另一CD123阳性急性骨髓性白血病细胞系HNT-34用于以上所描述的相同流式细胞术测定时还观察到强结合。对于muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14和7G3,如以上所描述而计算的 K_d 值分别是0.2nM、0.07nM、0.5nM和2nM(图4B)。因此,在此实验中,主题鼠类CD123抗体的结合比7G3抗体强至少4-28倍。

[1675] 这些数据证明,muCD123-3、muCD123-6和muCD123-14与7G3抗体相比对CD123阳性AML细胞具有较低 K_d (其表示较高亲和力)。

[1676] 实施例6嵌合抗CD123抗体的结合亲和力

[1677] 测定嵌合抗体chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14对HNT-34细胞的结合亲和力,与嵌合同型对照IgG(chKTI)相比较。如实施例5中所描述使用二级PE缀合的山羊抗人抗体进行流式细胞术结合测定并分析。图5A描绘各抗体的剂量反应曲线。使用GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)计算各抗体的表观解离常数(K_d)的值。数据显示嵌合化仅适度影响这些抗体的结合亲和力。chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14的 K_d 值分别是0.1nM、0.04nM和0.2nM。这些值与实施例5中所报道的其鼠类对应物的那些值相差至多2.5倍。不出所料,chKTI抗体在测试浓度下不结合细胞(图5A)。

[1678] 使用另一CD123阳性急性骨髓性白血病细胞系MOLM-13来证实chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14对AML细胞的高亲和力。如以上所描述进行流式细胞术结合测定并分析。图5B描绘各抗体的剂量反应曲线。chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14的表观解离常数(K_d)值分别是0.2nM、0.08nM和0.2nM。在最高测试浓度(10nM)下,对于嵌合同型对照IgG(chKTI抗体),仅观察到边界结合。

[1679] 因此,chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14保留其鼠类对应物的高亲和力。

[1680] 嵌合抗体的功能活性

[1681] 测定chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14和用作阴性对照的无功能抗CD123抗体抑制TF-1细胞的IL3依赖性增殖的能力。如实施例4中所描述进行所述测定并分析。用chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14处理以剂量依赖性方式减少相对细胞数目, IC_{50} 值分别是0.1nM、0.03和0.05nM(图6)。对照无功能抗体不影响细胞生长。因此,chCD123-3、chCD123-6和chCD123-14保留其鼠类对应物的功能活性。

[1682] 实施例7人源化抗CD123抗体的结合亲和力

[1683] 将示例性人源化抗CD123抗体huCD123-6Gv4.7S2和huCD123-6Gv4.7S3对HNT-34细

胞的结合亲和力分别与其鼠类和嵌合对应物muCD123-6和chCD123-6相比较。并行测试7G3抗体和嵌合同型对照IgG(chKTI)。如实施例5中所描述进行流式细胞术结合测定并分析。图7A描绘各抗体的剂量反应曲线。这些数据显示人源化不影响抗体的结合亲和力,因为huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3、chCD123-6和muCD123-6的 K_d 是大约0.06nM。7G3抗体的表观 K_d 显著较高,大约是2nM。chKTI抗体在所测试的浓度下不结合细胞。因此,两种huCD123-6Gv4.7克隆均保留鼠类和嵌合对应物的高亲和力且与7G3抗体相比对表达CD123的细胞具有更高亲和力(例如高至少约30倍)。

[1684] 类似地,使用HNT-34细胞来测定示例性人源化huCD123-6Gv4.7抗体的ADC缀合物的结合亲和力,与未缀合huCD123-6Gv4.7相比较。如实施例5中所描述使用二级PE缀合的山羊抗人抗体进行流式细胞术结合测定并分析。图7B和图7C描绘各抗体和相应缀合物的剂量反应曲线。数据显示缀合仅适度影响这些抗体的结合亲和力。

[1685] 人源化抗CD123抗体的功能活性

[1686] 将示例性人源化抗CD123抗体huCD123-6Gv4.7S2和huCD123-6Gv4.7S3的功能活性(抑制TF-1细胞的IL3依赖性增殖的能力)与其嵌合对应物chCD123-6抗体相比较。并行测试7G3抗体。如实施例4中所描述进行所述测定并分析。

[1687] 用huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3和chCD123-6处理类似地抑制IL-3依赖性增殖:所述增殖在1nM下受到完全抑制, IC_{50} 是0.02nM(图8A)。然而,用7G3处理对细胞增殖不具有这种深远影响:抗体 IC_{50} 是0.2nM且不能够完全抑制细胞增殖,而是仅在最高浓度(10nM)下将细胞数目减至18%。

[1688] huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3、chCD123-6和7G3对TF-1细胞增殖的抑制具有IL-3依赖性,因为当细胞在存在另一生长因子GM-CSF的情况下生长时,这些抗体不具有抑制作用(图8B)。

[1689] 因此,huCD123-6Gv4.7保留其鼠类和嵌合对应物的功能活性,且与7G3抗体相比在抑制IL-3依赖性增殖方面显著更具活性。

[1690] 实施例8表位作图

[1691] CD123抗原IL-3受体链 α (IL-3R α)由378个氨基酸构成,其含有涉及IL-3结合的306个氨基酸的细胞外结构域、20个氨基酸的跨膜结构域和具有52个氨基酸的短细胞质尾。细胞外结构域可进一步分成N末端结构域(NTD),其包含自成熟蛋白质的19位苏氨酸(例如信号肽裂解后)至100位丝氨酸的区域;和细胞因子识别基序(CRM),其由两个离散折叠结构域构成:结构域2(氨基酸101-204)和结构域3(氨基酸205-306)。通过利用IL-3R α 细胞外结构域与保留IL-3R α 拓扑结构且共用对信号传导必不可少的共同 β 亚基的粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子受体 α 链(GMR α)的组合对嵌合蛋白质进行工程化本文所描述的某些抗CD123抗体的表位进行作图。

[1692] IL-3R α 变体克隆和表达

[1693] CD123/IL-3R α 细胞外结构域(残基1-306)表达为组氨酸标签化蛋白质。对蛋白质序列进行密码子优化且通过Life Technologies来合成,并且利用EcoRI和HindIII限制位点与10组氨酸标签一起同框克隆于pABLT哺乳动物表达载体中。类似地合成并克隆还包含自成熟蛋白质的25位丝氨酸至114位丝氨酸的N末端结构域的对照GMR α 蛋白质的细胞外结构域(残基1-325)和包含115位甘氨酸至325位缬氨酸的CRM结构域。随后通过限制消化以

GMR α 分子的相应序列置换IL-3R α 分子的N末端结构域(残基1-100)或CRM结构域(残基101-306)来构建IL3R α /GMR α 嵌合受体蛋白表达载体。IL3R α (1-100)编码与GMR α 残基115-325融合的IL3R α 残基1-100,且IL3R α (101-306)编码与IL3R α 残基101-306融合的GMR α 残基1-114,如图9A中所说明。

[1694] 经由HEK 293T细胞的瞬时转染来表达IL3-R α 、GMR α 和两种嵌合IL-3R α His标签化蛋白质IL3-R α (1-100)和IL3-R α (101-306),且使用Ni琼脂糖排阻色谱法(GE healthcare)按照制造商的说明自转染细胞的上清液中纯化。

[1695] 与多种IL3Ra构建体的抗体结合

[1696] 在酶联免疫吸附测定(ELISA)形式中测试嵌合和人源化抗IL3R α 抗体与以上所描述的IL-3R α 蛋白的结合。简而言之,在50mM碳酸氢钠缓冲液pH 9.6中将通过Ni琼脂糖排阻色谱法纯化的各His标签化IL-3R α 蛋白稀释至1ng/mL且将100 μ L添加至各孔中。在4 $^{\circ}$ C下孵育16小时之后,用Tris缓冲盐水+0.1% Tween-20(TBST)洗涤各板,随后用200 μ L阻断缓冲液(TBS+1% BSA)阻断。接下来,以一式两份将连续稀释于阻断缓冲液中的100 μ L一级抗体添加至ELISA孔且在室温下孵育1小时。随后用TBST将各板洗涤3次,随后向各孔添加100 μ L抗人IgG(H+L)-HRP(Jackson ImmunoResearch)。再一次在室温下将各板孵育1小时,随后用TBST进行三次洗涤。最终,100 μ LTMB单组分HRP微孔底物(Surmodics)添加至各孔且孵育5分钟。通过添加100 μ L终止溶液(Surmodics)终止反应且在450nm下读取吸光度。

[1697] 评估CD123抗体与嵌合IL-3R α 蛋白的结合,与野生型IL-3R α 相比较。图9B说明huCD123-6抗体以类似的亚纳摩尔亲和力结合IL-3R α 和IL-3R α (101-306)。相反,huCD123-6抗体不结合GMR α 构建体且对于嵌合蛋白IL-3R α (1-100)构建体,结合几乎消除。这些结果指示huCD123-6抗体主要结合CRM结构域,仅允许来自IL-3R α 的N末端结构域的最小贡献。类似地,chCD123-3抗体主要结合IL-3R α CRM结构域,但结合亲和力与野生型IL-3R α 相比有所降低(图9C)。对嵌合受体蛋白IL-3R α (101-306)的结合亲和力降低表明在CD123-3抗体结合时可能涉及IL-3R α 的N末端结构域。然而,chCD123-14抗体不识别嵌合受体IL-3R α (101-306)(图9D);相反,其以等效亲和力结合IL-3R α 和IL-3R α (1-101)。这些结果说明,chCD123-14抗体排他性地结合IL-3R α 的N末端结构域。相较而言,7G3抗体以及两种其他可商购抗体6H6和9F5还结合IL-3R α N末端结构域和野生型IL-3R α 构建体,但不识别IL3R α 的CRM结构域(分别图9E、图9F和图9G)。总之,这些数据说明CD123-6和CD123-3抗体的表位主要位于IL-3R α 的CRM结构域内,且与限制于IL-3R α 的N末端结构域的7G3抗体表位不同。CD123-14抗体还结合限制于IL-3R α 的N末端结构域内的表位。

[1698] 实施例9制备huCD123-6抗体的赖氨酸连接的DM1和IGN缀合物

[1699] a. 制备huCD123Gv4.7S3-磺基-SPDB-D1

[1700] 允许含有2.0mg/mL CD123-6G4.7S3抗体和3.5摩尔当量磺基-SPDB-D1原位混合物的反应物在25 $^{\circ}$ C下在15mM HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液和15%v/v DMA(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂中通过接头缀合3-4小时。所述原位混合物是通过在25 $^{\circ}$ C下在20mM N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)存在下使3.0mM磺基-SPDB接头与3.9mM磺化合物D1在DMA中反应5小时而制得。

[1701] 反应后,使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将缀合物纯化并缓冲液交换至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5%w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M

亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液。在室温下在相同缓冲液中进行透析4小时,且随后利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000MWCO)在4℃下过夜。

[1702] 发现纯化的缀合物具有1.2mg/ml的最终蛋白质浓度,且平均每个抗体连接2.9分子的化合物D1(通过UV Vis,针对化合物D1使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且针对huCD123-6G4.7S3抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}}=207,360\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);94.3%单体(通过尺寸排阻色谱法);和<2%未缀合化合物D1(UPLC Dual柱,逆相HPLC分析)。

[1703] b.制备huCD123-6Gv4.7S3-D2

[1704] 将含有2.0mg/mL huCD123-6G4.7S3抗体和5.0摩尔当量化合物D2(在25℃下在90:10DMA:50mM琥珀酸盐pH 5.5中以5倍过量的亚硫酸氢钠预处理4小时)的反应物在25℃下在15mM HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液和10%v/v DMA(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂中孵育4小时。

[1705] 反应后,使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将缀合物纯化并缓冲液交换至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5%w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液。在室温下在相同缓冲液中进行透析4小时,且随后利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000MWCO)在4℃下过夜。

[1706] 发现纯化的缀合物具有1.2mg/ml的最终蛋白质浓度,且平均每个抗体连接2.9分子的化合物D2(通过UV Vis,针对化合物D2使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且针对huCD123-6Gv4.7S3抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}}=207,360\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);99.3%单体(通过尺寸排阻色谱法);和<2%未缀合化合物D2(UPLC Dual柱,逆相HPLC分析)。

[1707] c.制备huCD123-6Gv1.1-磺基-SPDB-DGN462

[1708] 通过在含有10mM DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)的DMA中将1.5mM磺基-SPDB接头、1.95mM磺化DGN462(sDGN462)孵育20分钟随后在25℃下添加0.9mM MPA(3-马来酰亚胺基丙酸)以淬灭未反应的IGN硫醇持续15分钟而在原位形成NHS-磺基-SPDB-sDGN462。在25℃下将含有2.5mg/mL huCD123-6Gv1.1抗体和7.5摩尔当量所得NHS-磺基-SPDB-DGN462的反应物在15mM HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液和15%v/v DMA共溶剂中孵育过夜。

[1709] 反应后,使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将缀合物纯化至20mM组氨酸、50mM NaCl、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液。在4℃下利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000MWCO)在相同缓冲液中进行透析过夜。

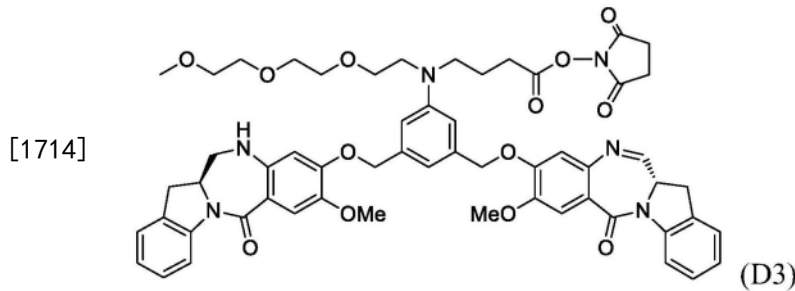
[1710] 发现纯化的缀合物具有0.95mg/ml的最终抗体浓度,且平均每个抗体连接2.8个DGN462分子(通过UV-Vis,针对DGN462使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且针对huCD123-6Gv1.1抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}}=207,360\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);99.5%单体(通过尺寸排阻色谱法);和0.6%未缀合DGN462(通过丙酮沉淀,逆相HPLC分析)。

[1711] d.制备huCD123-6Gv1.1-D3

[1712] 在25℃下将含有2.0mg/mL huCD123-6Gv1.1抗体和3.5摩尔当量D3(在25℃下在90:10DMA:50mM琥珀酸盐pH 5.5中以5倍过量的亚硫酸氢钠预处理4小时)的反应物在15mM HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液和10%v/v DMA(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂中孵育4小时。反应后,使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE

Healthcare) 将缀合物纯化并缓冲液交换至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液。在室温下在相同缓冲液中进行透析4小时,且随后利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000MWC0)在4 $^{\circ}$ C下过夜。

[1713] 发现纯化的缀合物具有0.9mg/ml的最终蛋白质浓度,且平均每个抗体连接3.4个D3分子(通过UV-Vis,针对D3使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}} = 15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且针对huCD123-6Gv1.1抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}} = 207,360\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);96%单体(通过尺寸排阻色谱法);和<1%未缀合D3(双柱,逆相HPLC分析)。



[1715] e. 制备huCD123-6Rv1.1-CX1-1-类美登素缀合物

[1716] 使人源化抗CD123抗体(表面重构的huCD123-6Rv1.1)在赖氨酸残基上经由三甘氨酸基CX1-1接头与类美登素有效负载结合。在室温下将含有处于含有20mM N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的N,N-二甲基乙酰胺(DMA)中的5mM三甘氨酸基CX1-1异双官能接头(携带N-羟基琥珀酰亚胺和马来酰亚胺基团)和6.5mM DM1类美登素的混合物孵育约20分钟。在室温下用2mM马来酰亚胺基丙酸(MPA)淬灭未反应的DM1持续约20分钟,随后以约7.6 \times 或15 \times CX1-1-DM1加合物相对于抗体的过量将反应混合物添加至以4mg/mL处于含有约8%DMA的140mM EPPS缓冲液pH 8中的人源化抗CD123抗体(huCD123-6Rv1.1)。在25 $^{\circ}$ C下将缀合反应混合物孵育过夜,此后使用NAP脱盐柱(Illustra,Sephadex G-25,GE Healthcare)将缀合物纯化并缓冲液交换至含有250mM甘氨酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20的10mM琥珀酸盐缓冲液pH 5.5中。利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific;10,000分子量截留膜)在4 $^{\circ}$ C下在以上所描述的琥珀酸盐缓冲液中进行透析过夜。

[1717] 发现纯化的缀合物含有平均每个抗体连接4.3和6.7个类美登素分子(通过UV/Vis光谱和尺寸排阻HPLC,针对DM1使用摩尔消光系数 $\epsilon_{252\text{nm}} = 26350\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}} = 5456\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且针对huCD123抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}} = 207076\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);98%单体(通过尺寸排阻色谱法);以及分别为2.1mg/mL和1.2mg/mL的最终蛋白质浓度。通过HPLC估计纯化的缀合物中的未结合类美登素的水平较低(<1%)。脱糖基化缀合物的质谱指示连接的类美登素物质。

[1718] 实施例10体外细胞毒性测定

[1719] 使用体外细胞毒性测定来测量huCD123-6的抗体-药物缀合物(ADC)杀死在细胞表面上表达CD123的细胞的能力。在培养基中按照细胞供应商(ATCC或DSMZ)所推荐来培养细胞系。将处于100 μ L培养基中的2,000至10,000个细胞添加至平底96孔板的各孔。为了阻断细胞表面上的Fc受体,培养基补充有100nM chKTI抗体(属于相同同型的抗体)。使用3倍稀释系列将缀合物稀释至培养基中且每孔添加100 μ L。为了测定CD123无关性细胞毒性的贡献,在缀合物之前向一些孔中添加CD123阻断剂(例如100nM chCD123-6抗体)。各测定板中包括含有细胞和培养基但缺乏缀合物的对照孔以及仅含有培养基的孔。对于各数据点,以一式三份进行测定。在37 $^{\circ}$ C下在湿润6% CO₂孵育箱中将各板孵育4至7天。随后如实施例4

中所描述使用基于WST-8的细胞计数试剂盒-8(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD) 测定各孔中的活细胞的相对数目。通过首先修正培养基背景吸光度且随后将各值除以对照孔(未处理的细胞)中的值的平均值来计算各孔中的细胞的表现存活分数。将细胞的存活分数相对于缀合物浓度绘于半对数图中。

[1720] 来自典型细胞毒性测定的结果示于图10中。AML细胞系OCI-AML4可在培养基中无生长因子的情况下增殖。用类美登素缀合物huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1处理细胞。所述处理导致剂量依赖性细胞杀死, IC_{50} 值是0.07nM。为了评估所述杀死是否起因于CD123表达, 通过过量未缀合chCD123-6抗体(500nM)阻断抗原且在细胞上测试缀合物的效力。后一种处理在低于3nM的浓度下不影响细胞的活力且在10nM(最高测试浓度)下对细胞活力仅具有中等影响。因此, huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1缀合物对OCI-AML4细胞显示高CD123依赖性细胞毒性。

[1721] 还在体外测试huCD123-6抗体经由赖氨酸与其他细胞毒性剂(DGN462、D3、D1和D2)连接的缀合物的细胞毒性。所述研究中使用十五个不同来源(AML、B-ALL、CML和NHL)的CD123阳性细胞系(下表)。所述细胞系中大多数来源于具有至少一个消极预后因子(例如P-糖蛋白过度表达、EVI1过度表达、p53变化、DNMT3A突变、FLT3内部串联重复)的携带恶性肿瘤的患者。所述缀合物对这些细胞系显示高效力, IC_{50} 值在亚pM至低nM范围内(下表、图11A)。多种赖氨酸连接的huCD123-6-IGN缀合物对不同来源的CD123阳性细胞系的体外细胞毒性

[1722]

细胞系名称	来源	消极预后因子	IC_{50} , M			
			DGN462 ADC	D3 ADC	D2 ADC	D1 ADC
THP1	AML	p53 缺失	1.9E-10	3.0E-11	6.7E-12	5.8E-11
SHI-1	AML	p53 基因改变	1.7E-10	2.9E-11	1.3E-11	3.2E-11
KO52	AML	p53 突变、Pgp 过度表达	3.9E-10	2.4E-10	1.4E-11	4.1E-10
KASUMI-3	AML	EVI1 和 Pgp 过度表达	2.8E-09	2.3E-11	9.8E-12	1.4E-10
KG-1	AML	p53 突变、Pgp 过度表达	8.5E-10	6.6E-09	2.2E-10	4.1E-09
OCI-AML2	AML	DNMT3A 突变	1.4E-10	1.0E-10	8.8E-11	2.1E-10
HNT-34	AML	MECOM (EVI1) 过度表达	2.3E-11	3.2E-12	2.0E-12	5.9E-12
MV4-11	AML	FLT3 内部串联重复	1.6E-12	5.4E-13	5.6E-13	1.3E-12
MOLM-13	AML	FLT3 内部串联重复	2.2E-12	4.6E-13	4.9E-13	1.2E-12
EOL-1	AML		9.0E-12	3.3E-12	2.5E-12	4.7E-12
MOLM-1	CML	EVI1 和 Pgp 过度表达	1.1E-09	7.1E-11	2.9E-11	2.1E-10
KOPN8	B-ALL		5.3E-11	2.2E-11	1.1E-11	3.0E-11
JM-1	B-ALL		3.2E-10	1.7E-10	2.4E-11	4.1E-10
KCL-22	CML		2.0E-09	9.5E-10	3.0E-11	2.9E-10
Granta519	NHL		1.2E-11	2.1E-12	1.2E-12	

[1723] 以上数据似乎表明B-ALL细胞系(KOPN8和JM-1)对IGN化合物非常敏感。为了进一步验证此发现,使用相同B-ALL细胞系KOPN8和JM-1加额外B-ALL细胞系“380细胞”测试huCD123-6Gv4.7抗体经由赖氨酸或半胱氨酸与D1或D2连接的缀合物的细胞毒性。所述测定中包括使用具有不结合这些B-ALL细胞系的抗体KTI的缀合物的阴性对照。图11B中的结果证实以上发现。

[1724] 上表还显示huCD123-IGN化合物对多种AML细胞系具有高活性。使用Lys和Cys连接的IGN化合物的代表数据示于图11C中。与图11C中所示的数据相同,关于Cys连接的缀合物(huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5)的细胞毒性的额外数据(示于下表和图21中)说明所述缀合物对多种CD123阳性AML细胞系,包括具有不良预后因子的那些非常有效。

细胞系	不良预后因子	huCD123-CysMab-D5	倍数特异性
		IC ₅₀ pMol	IC ₅₀ 对照 ADC / IC ₅₀ huCD123-CysMab-D5
CD123 阴性细胞系			
Namalwa		10000	1
K562		8000	1
CD123 阳性 AML 细胞系			
SKM-1	P53	7	57
KO52		20	100
EOL-1		2	1000
UCSD-AML1	EVI OX	1	400
KG-1	P53, MDR1	60	95
THP-1	P53	30	167
SHI-1	P53	6	>3,333
MOLM-1	MDR1 和 EVI1 OX	120	>167
Molm-13	FLT/ITD	0.5	2000
MV4-11	FLT/ITD	1	2000
KASUMI-3	P53 和 MDR1	3	100
HNT-34	EVI1 OX	1	1100

[1725] 令人感兴趣的是,初步数据表明,即使当与Lys连接的D2或Lys连接的D1的有效缀合物相比时,Cys连接的D5缀合物看似对AML祖细胞还尤其有效。参见图11D,其中使用9个AML患者样品来测试本发明的多种IGN缀合物的效力。

[1727] 另外体外细胞毒性研究显示Cys连接的D5缀合物在未选择的AML患者样品中具有比Mylotarg高74倍的活性。参见图18。

[1728] 另外,图11E和图19显示Cys连接的huCD123 D5缀合物在比杀死AML祖细胞所需的浓度高>100倍的浓度下杀死正常血细胞。相较而言,Mylotarg(吉妥单抗奥佐米星)不展现这种优先杀死作用,细胞毒性在正常祖细胞与AML祖细胞之间仅相差10倍。在图19中,测试额外AML患者样品。另外,还测试DNA交联剂D5'的huCD123缀合物且其展现细胞毒性在正常祖细胞与AML祖细胞之间仅相差6倍(参见图19)。

[1729] 实施例11赖氨酸连接的IGN缀合物对原发性AML患者样品的体外效力

[1730] 使用群落形成单位(CFU)测定来测量多种赖氨酸连接的huCD123-6-IGN缀合物杀死原发性AML细胞的能力。来自AML患者的冷冻周围血单核细胞(PBMC)和骨髓单核细胞(BMNC)购自Conversant Biologics Inc.(Huntsville,AL)和AllCells,LLC(Alameda,CA)。如供应商所推荐将细胞解冻,洗涤且再悬浮于RPMI培养基(RPMI-1640、10%胎牛血清、50ng/mL SCF和50ng/mL FLT3L)中。为了阻断细胞表面上的Fc受体,培养基补充有100nM

chKTI抗体(属于相同同型的抗体)。将处于150 μ L培养基中的200,000个细胞添加至平底96孔板的各孔。使用10倍稀释系列将缀合物稀释至培养基中且每孔添加50 μ L。对照孔含有细胞和培养基,但缺乏缀合物。在湿润6% CO₂孵育箱中在37 $^{\circ}$ C下将各板孵育18小时。随后将细胞转移至含有2.2mL无EPO的METHOCULTTM H4534(StemCell Technologies, Vancouver, BC)的管中,混合并且将混合物转移至6孔板中。在湿润6% CO₂孵育箱中在37 $^{\circ}$ C下孵育各板直至群落形成(通常10至16天)且进行计数。通过比较缀合物处理的样品中的计数与未处理的对照中的计数来测定群落形成的抑制百分比。将群落抑制百分比相对于缀合物浓度绘制曲线图,且由所述曲线确定抑制90%群落形成的缀合物浓度(IC₉₀)。

[1731] 来自对一个原发性患者样品进行典型CFU测定的结果提供于图12A中。huCD123-6-IGN缀合物显示剂量依赖性细胞毒性,对于huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462、huCD123-6Gv1.1-D3、huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1和huCD123-6Gv1.1-D2, IC₉₀值分别是0.1nM、0.01nM、0.03nM和0.012nM。图12B显示用所述缀合物处理的所有AML患者样品的IC₉₀值。对于huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462、huCD123-6Gv1.1-D3、huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1和huCD123-6Gv1.1-D2,各缀合物的中值IC₉₀值以实线形式提供且分别等于2nM、0.1nM、0.03nM和0.02nM。因此,赖氨酸连接的huCD123-6-IGN缀合物对来自AML患者的样品显示高效力。

[1732] 实施例12制备huCD123-6抗体的Ser位点特异性缀合物

[1733] a) N末端抗体缀合-两步法

[1734] 用5mM过碘酸钠水溶液(50当量, 25 $^{\circ}$ C, 30分钟)处理huCD123-6Gv4.6/7S3抗体(具有huCD123-6Gv4 LCVR(SEQ ID NO:37, 包括工程化N末端Ser)和HCVR Gv6/7(SEQ ID NO:34))(如图15中所示的方案1中的[1]; 3mg/mL, 于PBS中, pH 7.4)。随后通过NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级, GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至乙酸钠缓冲液(pH 5.0)。

[1735] 用4-氨基苯乙醇(100mM, 于DMA[N,N-二甲基乙酰胺]中)将所得溶液处理至10%v/v共溶剂。随后引入异双官能接头1(方案1中的[3]; 5当量)且密封反应容器并且在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。

[1736] 随后经由NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级, GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液。随后用DMA(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂(10%v/v)调节溶液且在25 $^{\circ}$ C下用碘化DGN462(sDGN462)([5], 方案1; 游离硫醇; 5当量)处理6小时。

[1737] 使用NAP过滤柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级, GE Healthcare)将所得缀合物缓冲液交换至250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠配制缓冲液pH 6.2。在25 $^{\circ}$ C下在相同缓冲液中利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific10,000MWC0)进行透析4小时。

[1738] 发现纯化的缀合物[6], 方案1)具有每个抗体平均连接两个DGN462分子(经由Q-ToF质谱)、>98%单体(经由尺寸排阻色谱法)、<2%游离药物(经由丙酮沉淀逆相HPLC分析)和0.18mg/mL的最终蛋白质浓度(经由UV-Vis, 针对huCD123-6Gv4.6/7S3抗体使用摩尔消光系数 $\epsilon_{280} = 213320\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[1739] b) N末端抗体缀合-IGN直接连接

[1740] 在25 $^{\circ}$ C下用5mM过碘酸钠水溶液(50摩尔当量)将工程化而在重链上具有N末端丝

氨酸的工程化含N末端Ser的huCD123-6Gv4.7S2抗体(huCD123-6Gv4.7S2,其包含重链序列SEQ ID NO:53,其中Xaa是Val,和轻链序列SEQ ID NO:51)(方案2中的[1],图16;3mg/mL,处于PBS中,pH 7.4)处理30分钟。随后通过NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至乙酸钠缓冲液(pH 5.0)。

[1741] 用对苯二胺(100mM,于DMA[N,N-二甲基乙酰胺]中)将所得溶液处理至10%v/v共溶剂。随后,随后引入原位碘化D8(或sD8)([3],方案2;5摩尔当量),且密封反应容器并且在37°C下孵育24小时。

[1742] 随后通过NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖缓冲液pH 6.2。在25°C下在相同缓冲液中利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000MWC0)进行透析4小时。

[1743] 发现纯化的缀合物([4],方案2)具有每个抗体平均连接两个D8分子(经由Q-ToF质谱)、>96%单体(经由尺寸排阻色谱法)、<3%游离药物(经由HISEP逆相HPLC分析)和1.4mg/mL的最终蛋白质浓度(经由UV-Vis,针对huCD123-6Gv4.7S2抗体使用摩尔消光系数 $\epsilon_{280} = 213320\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[1744] 根据以下程序制备以上所描述的原位碘化D8(或sD8):将呈冻干白色固体状的D8试剂溶解于DMA(N,N-二甲基乙酰胺)中,得到10-20mM储备浓缩溶液。添加新鲜亚硫酸氢钠(500mM水溶液,5摩尔当量)且使所得溶液在25°C下反应4-6小时,随后在4°C下进行15小时保持步骤。引入新鲜亚硫酸氢钠的另一等分试样(500mM水溶液,2摩尔当量)且允许在25°C下反应4小时,随后储存在-80°C下直至进一步使用。

[1745] c)N末端抗体缀合-用于CD123-6Gv4.7的两步方案

[1746] 在25°C下用5mM过碘酸钠水溶液(50摩尔当量)将工程化而在轻链上具有N末端丝氨酸的huCD123-6Gv4.7S3抗体(参见以上)(huCD123-6Gv4.7S3)(方案3中的[1],图17;3mg/mL,处于PBS中,pH 7.4)处理30分钟。随后通过NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至乙酸钠缓冲液pH5.0。

[1747] 用4-氨基苯乙醇(100mM,于DMA[N,N-二甲基乙酰胺]中)将所得溶液处理至10%v/v共溶剂。随后引入异双官能接头1(方案3中的[3];5摩尔当量)且密封反应容器并且在37°C下孵育24小时。

[1748] 随后通过NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将混合物缓冲液交换至HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5缓冲液。随后用DMA(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂(10%v/v)调节溶液且在25°C下用碘化D1(或sD1)([5],方案3;游离硫醇;5摩尔当量)处理6小时。

[1749] 使用NAP过滤柱(Illustra Sephadex G-25DNA等级,GE Healthcare)将所得缀合物缓冲液交换至250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亚硫酸氢钠配制缓冲液pH 6.2。在25°C下在相同缓冲液中利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific10,000MWC0)进行透析4小时。

[1750] 发现纯化的缀合物([6],方案3)具有每个抗体平均连接2.0分子的D1(经由Q-ToF质谱)、>96%单体(经由尺寸排阻色谱法)、<3%游离药物(经由丙酮沉淀逆相HPLC分析)和0.4mg/mL的最终蛋白质浓度(经由UV-Vis,针对huCD123-6Gv4.7S3抗体使用摩尔消光系数 $\epsilon_{280} = 213320\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[1751] 实施例13huCD123-6抗体的位点特异性缀合物的体外细胞毒性

[1752] 使用体外细胞毒性测定将huCD123-6与多种IGN化合物的位点特异性缀合物(huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5和huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8)杀死在细胞表面上表达CD123的细胞的能力与含有匹配抗体和有效负载的赖氨酸连接缀合物(huCD123-6Gv4.6-D2和huCD123-6Rv1.1-D2)的相比较。如实施例10中所描述进行细胞毒性测定并分析。

[1753] huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5缀合物(其中huCD123-6Gv4.6-Cys Mab具有SEQ ID NO:54的Ig重链序列和SEQ ID NO:51的轻链序列)对多个细胞系的活性至少与赖氨酸连接的huCD123-6Gv4.6-D2缀合物(其中huCD123-6Gv4.6抗体具有SEQ ID NO:50的Ig重链序列和SEQ ID NO:51的轻链序列)相同。使用AML细胞系EOL-1、B-ALL细胞系KOPN-8和CML细胞系MOLM-1的细胞毒性测定的若干实施例分别示于图13A-13C中。两种缀合物均以剂量依赖性方式杀死细胞,对EOL-1细胞、KOPN-8细胞和MOLM-1细胞的IC₅₀值分别为大约0.002nM、0.005nM和0.02nM。所述杀死具有CD123依赖性,因为当通过未缀合的chCD123-6抗体阻断CD123抗原时,所述缀合物对细胞的毒性变弱至少100倍。

[1754] huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8缀合物(其中表面重构的huCD123-6Rv1.1S2抗体具有SEQ ID NO:60的Ig重链序列(除了N末端残基是Ser)和SEQ ID NO:61的轻链序列)维持靶标(CD123)结合,且对多个细胞系的活性至少与赖氨酸连接的huCD123-6Rv1.1-D2缀合物(其中表面重构的huCD123-6Rv1.1抗体具有SEQ ID NO:60的Ig重链序列和SEQ ID NO:61的轻链序列)相同。使用AML细胞系SHI-1和HNT-34以及CML细胞系MOLM-1的细胞毒性测定的若干实施例分别示于图14A-14C中。两种缀合物均以剂量依赖性方式杀死细胞,对SHI-1细胞、HNT-34细胞和MOLM-1细胞的IC₅₀值分别为大约0.01nM、0.002nM和0.03nM。所述杀死具有CD123依赖性,因为当通过未缀合的huCD123-6抗体阻断CD123抗原时所述缀合物对细胞的毒性变弱至少100倍。

[1755] 在另一实验中,发现具有huCD123抗体的Ser连接的DGN462化合物与具有较高DAR的赖氨酸连接的形式相比具有3倍抗原特异性效力(数据未显示)。

[1756] 实施例14CD123-IGN缀合物用于MV4-11 AML皮下小鼠模型中的体内效力研究

[1757] 皮下植入肿瘤细胞代表一种在体内测试新颖潜在抗癌药物的便利手段。已对来源于实体肿瘤和白血病(涵盖多种肿瘤基因型和表型)的多种人和鼠类细胞系进行改造以便在鼠类宿主中生长,且因此允许在适当肿瘤模型中测试主题治疗剂。

[1758] 将如以下方案中所概述的皮下急性骨髓性白血病模型(AML)用于测试主题CD123抗体药物缀合物(ADC)在体内降低肿瘤负担的能力的效力。具体地说,使雌性SCID小鼠各自在右肋部皮下接种约 1×10^7 个人AML细胞系MV4-11细胞。在接种后第14天,基于肿瘤体积将小鼠随机分组,且用400mg/kg人IgG通过腹膜内注射进行处理以阻断MV4-11细胞上的Fc受体。在接种后第15天以1或3 μ g/kg的剂量一次性静脉内施用主题抗D123 ADC或非靶向抗体对照(chKTI-赖氨酸连接的-D1、chKTI-赖氨酸连接的-D2和huKTI-CysMab连接的-D2,其中所述huKTI抗体在对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的位置上具有工程化的Cys)。接种后第20天用100mg/kg人IgG再次处理小鼠。每日监测动物,且每周两次测量肿瘤体积。以下列出处理组和对照组与对应剂量。

组	处理	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (实际剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$))	途径和方案
	1 媒介物	-	静脉内, $\times 1$
	2 huCD123-sSPDB-D1	1 (0.78)	静脉内, $\times 1$
	3 huCD123-赖氨酸连接的-D2	1 (0.89)	静脉内, $\times 1$
[1759]	4 huCD123-CysMab-D5	1 (0.91)	静脉内, $\times 1$
	5 huCD123-sSPDB-D1	3 (2.35)	静脉内, $\times 1$
	6 huCD123-赖氨酸连接的-D2	3 (2.69)	静脉内, $\times 1$
	7 huCD123-CysMab-D5	3 (2.88)	静脉内, $\times 1$
	8 chKTI-sSPDB-D1	3	静脉内, $\times 1$
	9 chKTI-赖氨酸连接的-D2	3	静脉内, $\times 1$
	10 huKTI-CysMab-D5	1 (0.91)	静脉内, $\times 1$
	11 huKTI-CysMab-D5	3 (2.88)	静脉内, $\times 1$

[1760] 所述研究中所使用的huCD123抗体是人源化huCD123-6Gv4.7抗体,其通过Lys键联或通过如上文中所描述的工程化的Cys键联与D1或D2连接。还包括Lys连接的基于嵌合KTI抗体的IGN缀合物和Cys连接的基于人KTI抗体的IGN缀合物作为对照。后一种KTI CysMab抗体在重链CH3结构域中在对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的位置上具有工程化的Cys。

[1761] 初步数据显示Lys和Cys连接的IGN化合物在体内小鼠模型中对MV4-11异种移植肿瘤具有高活性(参见图20)。

[1762] 实施例15. 制备huCD123-6抗体的Cys位点特异性缀合物

[1763] huCD123-6Gv1.1S2-CysMab-D7

[1764] huCD123-6Gv1.1S2-CysMab是具有SEQ ID NO:33的LCVR序列和SEQ ID NO:48的HC序列(除了第一个残基是Ser)且包括对应于SEQ ID NO:54或56的第5个至最后一个残基的工程化Cys的CDR移植人源化抗体。

[1765] 使用标准程序制备这种携带两个呈还原状态的未配对半胱氨酸残基的huCD123抗体。向这种中间体于磷酸盐缓冲盐水(PBS)、5mM N,N,N',N'-乙二胺四乙酸(EDTA) pH 6.0中的溶液中添加N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、丙二醇和10摩尔当量呈处于DMA中的储备溶液形式的D7,得到反应混合物,所述反应混合物具有含2% v/v DMA和38% v/v丙二醇的PBS 5mM EDTA pH 6.0的最终溶剂组成。允许反应在25°C下进行24小时。

[1766] 使用Sephadex G25脱盐柱将所述缀合物纯化至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液中,通过用具有10kDa分子量截止值的膜超滤进行浓缩,且通过0.22 μm 注射过滤器进行过滤。随后使用具有10kDa分子量截止值的膜使缀合物相对于相同缓冲液进行透析。

[1767] 发现所述缀合物具有2mol D7/mol抗体(通过UV-Vis);97.2%单体(通过SEC);和1.9%未缀合D7(通过SEC/逆相HPLC)。未显示脱糖基化缀合物的LC-MS。

[1768] huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5

[1769] huCD123-6Gv4.7-CysMab是具有SEQ ID NO:34的LCVR序列(其中Xaa是Val)和SEQ ID NO:35的HCVR序列且包括对应于SEQ ID NO:54或56的第5个至最后一个残基的工程化Cys的CDR移植人源化抗体。

[1770] 使用标准程序制备这种携带两个呈还原状态的未配对半胱氨酸残基的huCD123抗体。向这种中间体于磷酸盐缓冲盐水(PBS)、5mM N,N,N',N'-乙二胺四乙酸(EDTA)pH 6.0中的溶液中添加N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、丙二醇和10摩尔当量呈处于DMA中的储备溶液形式的D5,得到反应混合物,所述反应混合物具有含2%v/v DMA和38%v/v丙二醇的PBS 5mM EDTApH 6.0的最终溶剂组成。允许反应在25℃下进行24小时。

[1771] 使用Sephadex G25脱盐柱将所述缀合物纯化至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50μM亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液中,通过用具有10kDa分子量截止值的膜超滤进行浓缩,且通过0.22μm注射过滤器进行过滤。随后使用具有10kDa分子量截止值的膜使缀合物相对于相同缓冲液进行透析。

[1772] 发现所述缀合物具有2mol D5/mol抗体(通过UV-Vis)和94.8%单体(通过SEC)。未显示脱糖基化缀合物的LC-MS。

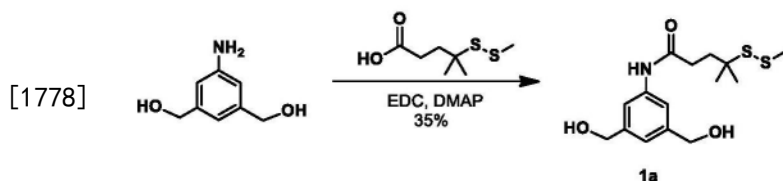
[1773] huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4

[1774] 使用标准程序制备以上携带两个呈还原状态的未配对半胱氨酸残基的huCD123抗体。向这种中间体于磷酸盐缓冲盐水(PBS)、5mM N,N,N',N'-乙二胺四乙酸(EDTA)pH 6.0中的溶液中添加N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、丙二醇和5摩尔当量呈处于DMA中的储备溶液形式的D4,得到反应混合物,所述反应混合物具有含2%v/v DMA和38%v/v丙二醇的PBS 5mM EDTApH 6.0的最终溶剂组成。允许反应在25℃下进行6小时。

[1775] 使用Sephadex G25脱盐柱将所述缀合物纯化至20mM组氨酸、50mM氯化钠、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50μM亚硫酸氢钠pH 6.2配制缓冲液中,通过用具有10kDa分子量截止值的膜超滤进行浓缩,且通过0.22μm注射过滤器进行过滤。随后使用具有10kDa分子量截止值的膜使缀合物相对于相同缓冲液进行透析。

[1776] 发现所述缀合物具有1.8mol D4/mol抗体(通过UV-Vis)和97.4%单体(通过SEC)。未显示脱糖基化缀合物的LC-MS。

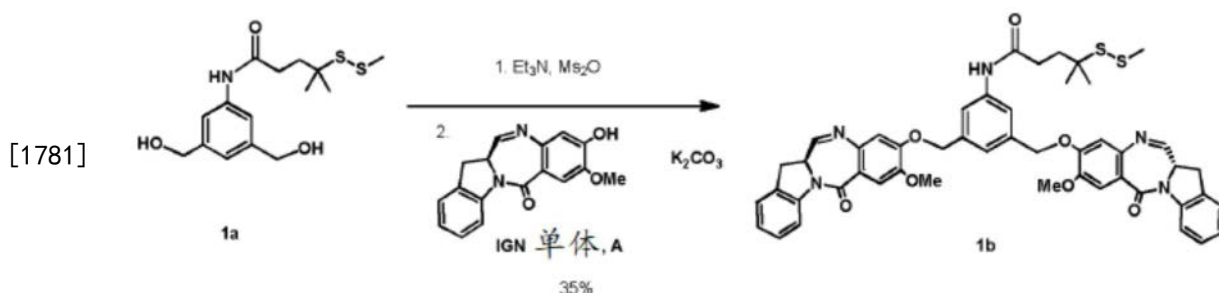
[1777] 实施例16. 化合物D1的合成



[1779] 化合物1a:

[1780] 向(5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇(1.01g,6.59mmol)于无水二甲基甲酰胺(16.48mL)和无水四氢呋喃(16.48mL)中的搅拌溶液中添加4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊酸(1.281g,6.59mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(2.53g,13.19mmol)和4-二甲基氨基吡啶(0.081g,0.659mmol)。在室温下将所得混合物搅拌18小时。用饱和氯化铵溶液淬灭反应且用乙酸乙酯(3×50mL)萃取。用水和盐水洗涤有机萃取物,随后经无水硫酸钠干燥。过滤溶液且在真空中浓缩,并且通过硅胶色谱法(乙酸乙酯/己

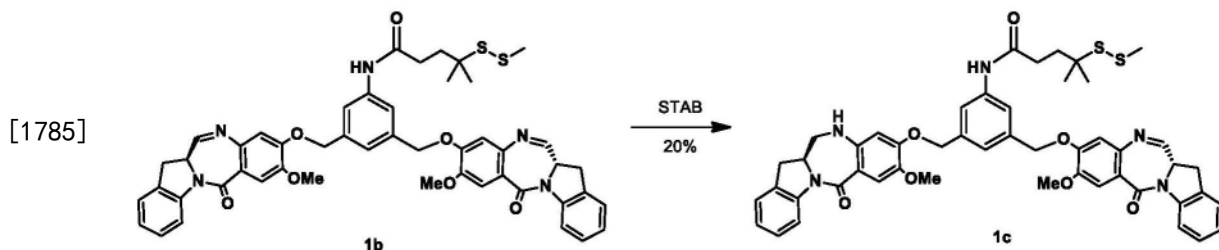
烷)纯化所得残余物,获得呈白色固体状的化合物1a (0.70g, 32%产率)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 9.90 (s, 1H), 7.43 (s, 2H), 6.93 (s, 1H), 5.16 (t, 2H, $J=5.7\text{Hz}$), 4.44 (d, 4H, $J=5.7\text{Hz}$), 2.43 (s, 3H), 2.41-2.38 (m, 2H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.29 (s, 6H)。MS (m/z), 实测值 330.0 ($M+1$) $^+$ 。



[1782] 化合物1b:

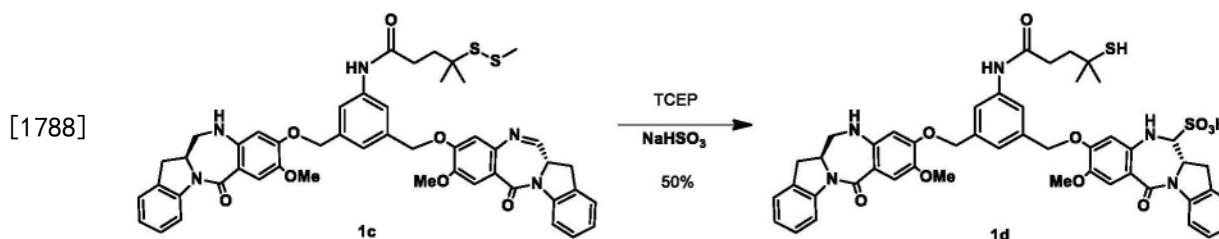
[1783] 向化合物1a (219mg, 0.665mmol) 于无水二氯甲烷 (6.65mL) 中的冷却 (-10°C) 溶液中添加三乙胺 (463 μl , 3.32mmol), 随后逐滴添加甲磺酸酐 (298mg, 1.662mmol)。在 -10°C 下将所述混合物搅拌2小时, 随后用冰水淬灭所述混合物且用冷乙酸乙酯 ($2 \times 30\text{mL}$) 萃取。用冰水洗涤有机萃取物, 用无水硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩, 获得粗二甲磺酸酯。

[1784] 将所述粗二甲磺酸酯 (227mg, 0.467mmol) 和IGN (或吡啶并苯并二氮杂卓) 单体A (303mg, 1.028mmol) 溶解于无水DMF (3.11mL) 中。添加碳酸钾 (161mg, 1.169mmol) 且在室温下将混合物搅拌18小时。添加去离子水且过滤所得沉淀物并且用水冲洗。将固体再溶解于二氯甲烷中且用水洗涤。用无水硫酸镁干燥有机层, 过滤并浓缩。通过硅胶色谱法 (甲醇/二氯甲烷) 纯化粗残余物, 得到化合物1b (227mg, 36%产率)。MS (m/z), 实测值 882.5 ($M+1$) $^+$ 。



[1786] 化合物1c:

[1787] 向化合物1b (227mg, 0.167mmol) 于无水1,2-二氯乙烷 (3.346mL) 中的悬浮液中添加三乙酰氧基硼氢化钠 (37.3mg, 0.167mmol)。在室温下将所述混合物搅拌一小时, 此后用饱和氯化铵溶液将其淬灭。用二氯甲烷萃取所述混合物且用盐水洗涤。用无水硫酸镁干燥有机层, 过滤并浓缩。通过RP-HPLC (C18, 水/乙腈) 纯化粗残余物。用二氯甲烷萃取含有所需产物的级分, 用无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物1c (35mg, 19%产率)。MS (m/z), 实测值 884.3 ($M+1$) $^+$ 。

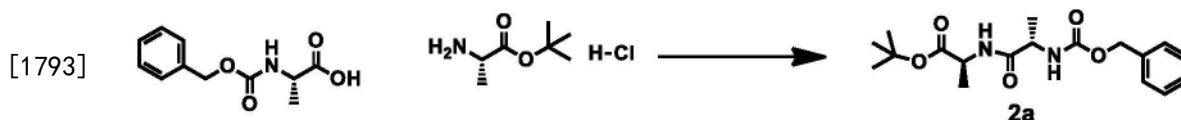


[1789] 化合物1d:

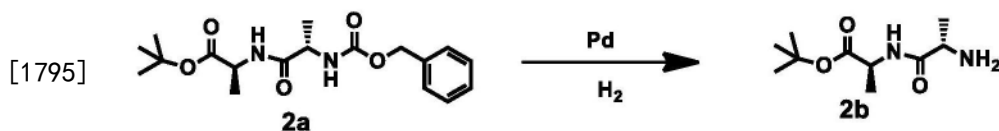
[1790] 向化合物1c (18mg, 0.017mmol) 于乙腈 (921 μ L) 和甲醇 (658 μ L) 中的溶液中添加含三(2-羧基乙基)膦盐酸盐 (17.51mg, 0.060mmol) (用饱和碳酸氢钠溶液 (0.2mL) 中和) 的磷酸钠缓冲液 (132 μ L, 0.75M, pH 6.5)。在室温下将混合物搅拌3.5小时, 随后用二氯甲烷和去离子水稀释。分离有机层, 用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩, 获得粗硫醇。MS(m/z), 实测值838.3(M+1)⁺。

[1791] 将粗硫醇 (15.5mg, 0.018mmol) 溶解于2-丙醇 (1.23mL) 中。添加去离子水 (617 μ L) 和亚硫酸氢钠 (5.77mg, 0.055mmol) 且在室温下将混合物搅拌五小时。在丙酮/干冰浴中冷冻反应物, 冻干, 且通过RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 进行纯化。将含有所需产物的级分冷冻并冻干, 得到化合物 (12S, 12aS) -9-((3-(4-巯基-4-甲基戊酰胺基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苄基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-12-磺酸(化合物磺化-D1 (sD1)) (6.6mg, 39%产率)。MS(m/z), 实测值918.2(M-1)⁻。

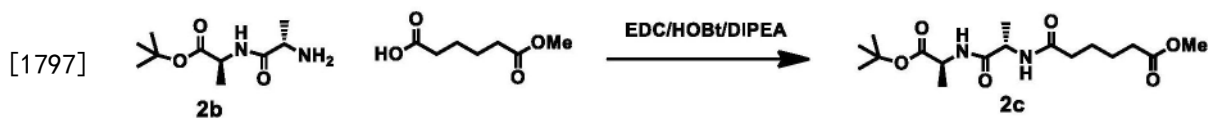
[1792] 实施例17.6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苄基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-6-氧代己酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯, 即化合物D2的合成



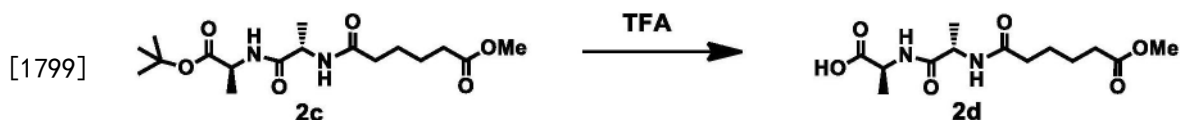
[1794] 步骤1: 将(S)-2-((苄氧基)羰基)氨基)丙酸 (5g, 22.40mmol) 和(S)-2-氨基丙酸叔丁酯盐酸盐 (4.48g, 24.64mmol) 溶解于无水DMF (44.8mL) 中。添加EDC·HCl (4.72g, 24.64mmol)、HOBT (3.43g, 22.40mmol) 和DIPEA (9.75mL, 56.0mmol)。在氩气下在室温下将反应物搅拌过夜。用二氯甲烷稀释反应混合物, 且随后用饱和氯化铵、饱和碳酸氢钠、水和盐水洗涤。使有机层经硫酸钠干燥并浓缩。经由硅胶色谱法(己烷/乙酸乙酯)纯化粗油, 产生化合物2a (6.7g, 85%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (d, 3H, J=6.8Hz), 1.38 (d, 3H, J=7.2Hz)。



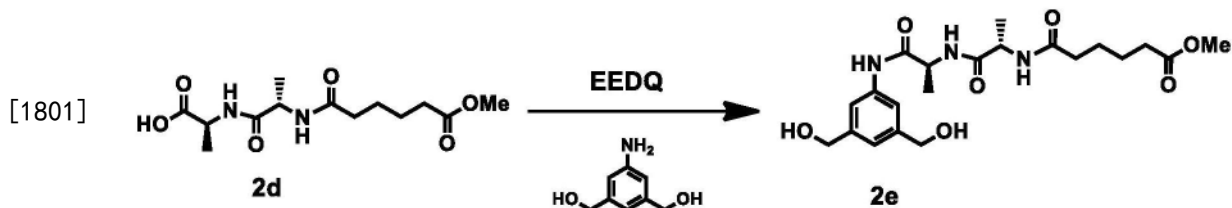
[1796] 步骤2: 将化合物2a (6.7g, 19.12mmol) 溶解于甲醇 (60.7mL) 和水 (3.03mL)。用氩气将所述溶液吹扫五分钟。缓慢添加钯/碳(湿, 10%) (1.017g, 0.956mmol)。在氢气氛围下将反应物搅拌过夜。经由硅藻土过滤所述溶液, 用甲醇冲洗并浓缩。使其与甲醇和乙腈一起共沸, 且将所得油直接置于高真空上, 得到化合物2b (4.02g, 97%产率), 其直接用于下一步骤中。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, 3H, J=7.2Hz), 1.36 (d, 3H, J=6.8Hz)。



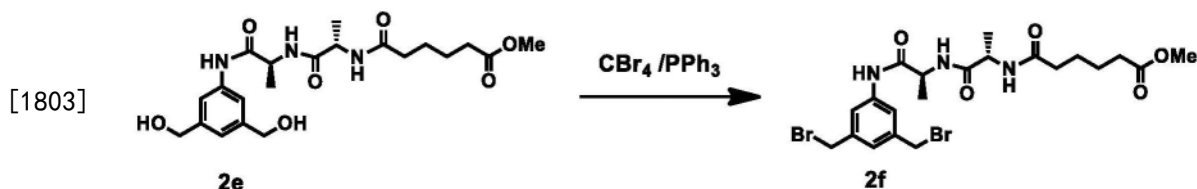
[1798] 步骤3:将化合物2b(4.02g,18.59mmol)和己二酸单甲酯(3.03mL,20.45mmol)溶解于无水DMF(62.0mL)中。添加EDC·HCl(3.92g,20.45mmol)、HOBt(2.85g,18.59mmol)和DIPEA(6.49mL,37.2mmol)。在室温下将混合物搅拌过夜。用二氯甲烷/甲醇(150mL,5:1)稀释反应物且用饱和氯化铵、饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。使其经硫酸钠干燥,过滤并汽提。使所述化合物与乙腈(5×)一起共沸,随后在高真空上在35℃下泵吸,得到化合物2c(6.66g,100%产率)。粗物质不经纯化即进行下一步骤。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ6.75(d,1H,J=6.8Hz),6.44(d,1H,J=6.8Hz),4.52-4.44(m,1H),4.43-4.36(m,1H),3.65(s,3H),2.35-2.29(m,2H),2.25-2.18(m,2H),1.71-1.60(m,4H),1.45(s,9H),1.36(t,6H,J=6.0Hz)。



[1800] 步骤4:在室温下在TFA(28.6mL,372mmol)和去离子水(1.5mL)中将化合物2c(5.91g,16.5mmol)搅拌三小时。将反应混合物与乙腈一起浓缩且置于高真空上,得到呈粘性固体状的粗化合物2d(5.88g,100%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.21(d,1H,J=6.8Hz),6.81(d,1H,J=7.6Hz),4.69-4.60(m,1H),4.59-4.51(m,1H),3.69(s,3H),2.40-2.33(m,2H),2.31-2.24(m,2H),1.72-1.63(m,4H),1.51-1.45(m,3H),1.42-1.37(m,3H)。

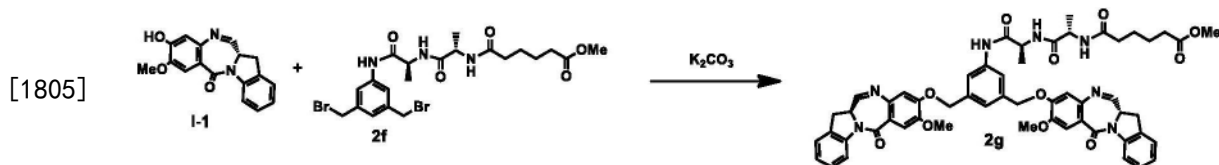


[1802] 步骤5:将化合物2d(5.6g,18.52mmol)溶解于无水二氯甲烷(118mL)和无水甲醇(58.8mL)中。添加(5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇(2.70g,17.64mmol)和EEDQ(8.72g,35.3mmol),且在室温下将反应物搅拌过夜。汽提溶剂且添加乙酸乙酯。过滤所得浆液,用乙酸乙酯洗涤且在真空/N₂下干燥,得到化合物2e(2.79g,36%产率)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ9.82(s,1H),8.05(d,1H,J=9.2Hz),8.01(d,1H,J=7.2Hz),7.46(s,2H),6.95(s,1H),5.21-5.12(m,2H),4.47-4.42(m,4H),4.40-4.33(m,1H),4.33-4.24(m,1H),3.58(s,3H),2.33-2.26(m,2H),2.16-2.09(m,2H),1.54-1.46(m,4H),1.30(d,3H,J=7.2Hz),1.22(d,3H,J=4.4Hz)。

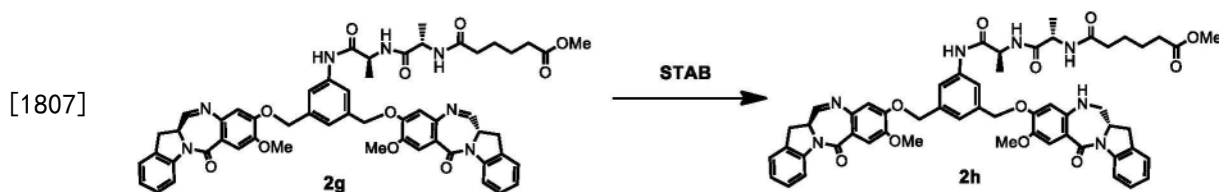


[1804] 步骤6:将化合物2e(0.52g,1.189mmol)和四溴化碳(1.183g,3.57mmol)溶解于无水DMF(11.89mL)中。添加三苯基膦(0.935g,3.57mmol)且在氩气下将反应物搅拌四小时。用DCM/MeOH(10:1)稀释反应混合物且用水和盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过硅胶

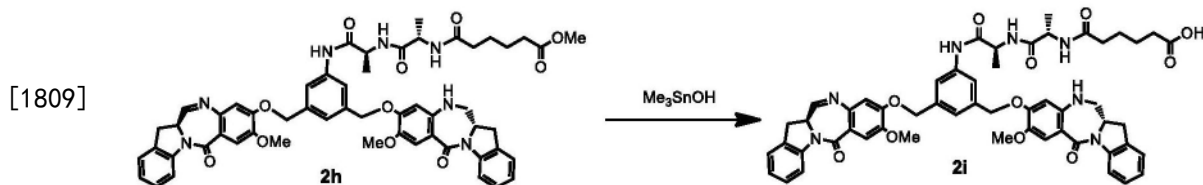
色谱法 (DCM/MeOH) 纯化粗物质, 得到化合物2f (262mg, 39% 产率)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ10.01 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, J=6.8Hz), 8.03 (d, 1H, J=6.8Hz), 7.67 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 4.70-4.64 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.31-4.23 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 4H), 1.31 (d, 3H, J=7.2Hz), 1.21 (d, 3H, J=7.2Hz)。



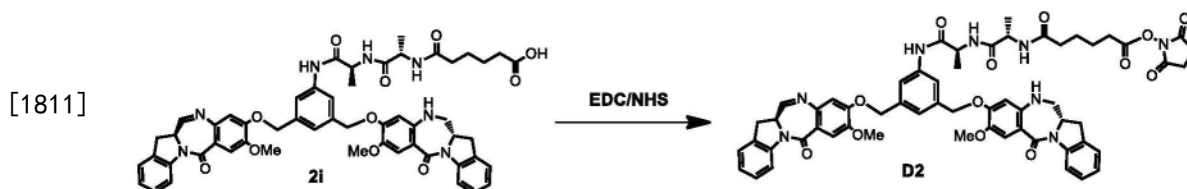
[1806] 步骤7: 将二溴化物化合物2f和IGN单体化合物I-1溶解于DMF中。添加碳酸钾且在室温下搅拌过夜。向反应混合物中添加水以使产物沉淀。在室温下将浆液搅拌5分钟, 且随后过滤并在真空/N₂下干燥1小时。通过硅胶色谱法 (二氯甲烷/甲醇) 纯化粗物质, 得到化合物2g (336mg, 74% 产率)。LCMS=5.91分钟 (15分钟方法)。MS (m/z): 990.6 (M+1)⁺。



[1808] 步骤8: 将二亚胺化合物2g溶解于1,2-二氯乙烷中。向反应混合物中添加NaBH(OAc)₃且在室温下搅拌1小时。用CH₂Cl₂稀释反应物且用饱和NH₄Cl水溶液淬灭。进行层分离且用盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥并浓缩。经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化粗物质, 得到化合物2h (85.5mg, 25% 产率)。LCMS=6.64分钟 (15分钟方法)。MS (m/z): 992.6 (M+1)⁺。



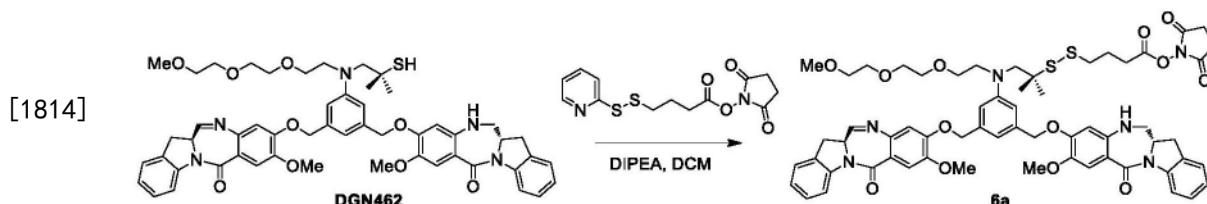
[1810] 步骤9: 将甲酯化合物2h溶解于1,2-二氯乙烷中。向反应混合物中添加三甲基锡醇且在80℃下加热过夜。使反应混合物冷却至室温且用水稀释。用1M HCl将水层酸化至pH~4。用CH₂Cl₂/MeOH (10:1, 3×20mL) 萃取混合物。用盐水洗涤所合并的有机层且经Na₂SO₄干燥并浓缩。使粗物质通过二氧化硅插塞, 得到化合物2i (48.8mg, 80% 产率)。LCMS=5.89分钟 (15分钟方法)。MS (m/z): 978.6 (M+1)⁺。



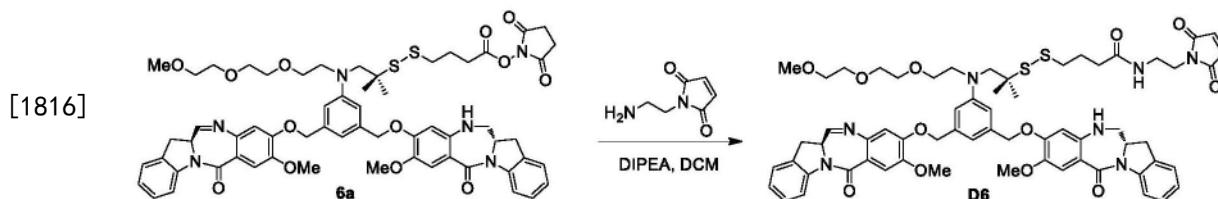
[1812] 步骤10: 在室温下将EDC·HCl添加至酸化合物2i和N-羟基琥珀酰亚胺于CH₂Cl₂中的搅拌溶液中。将反应混合物搅拌2h。用CH₂Cl₂稀释反应混合物且用水 (1×15mL) 和盐水 (1×15mL) 洗涤。使有机层经Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩。经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化粗物质, 得到6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-氧代-12a,

13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-6-氧代己酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯,即化合物D2(8.2mg,30%产率)。LCMS=6.64分钟(15分钟方法)。MS(m/z):1075.4(M+1)⁺。

[1813] 实施例18.N-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-13,13-二甲基-2,5,8-三氧杂-14,15-二硫杂-11-氮杂十九-19-酰胺,即化合物D6的合成

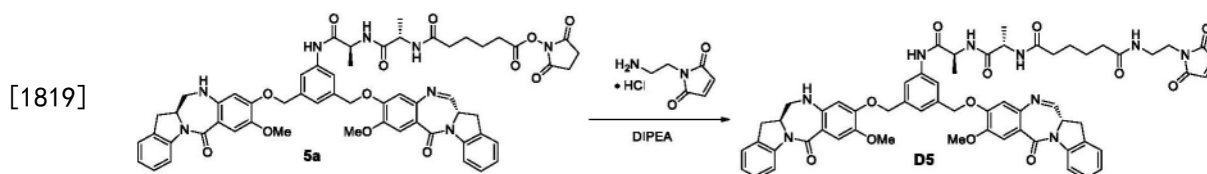


[1815] 步骤1:向游离硫醇DGN462(40mg,0.042mmol)和4-(2-吡啶基二硫代)丁酸NHS酯(35mg,80%纯度,0.085mmol)于无水二氯甲烷(0.5mL)中的溶液中添加无水二异丙基乙胺(0.015mL,0.085mmol)且在室温下搅拌16小时。用饱和氯化铵溶液淬灭反应混合物且用二氯甲烷稀释。在分液漏斗中分离所获得的混合物。用盐水洗涤有机层,经无水硫酸钠干燥,过滤且在减压下汽提。通过半制备型逆相HPLC(C18柱,CH₃CN/H₂O)纯化残余物。合并含有纯产物的部分,冷冻并冻干,得到所需NHS酯,即化合物6a(29.7mg,60%产率)。LCMS=9.1分钟(15分钟方法)。MS(m/z):1157.3(M+1)⁺。



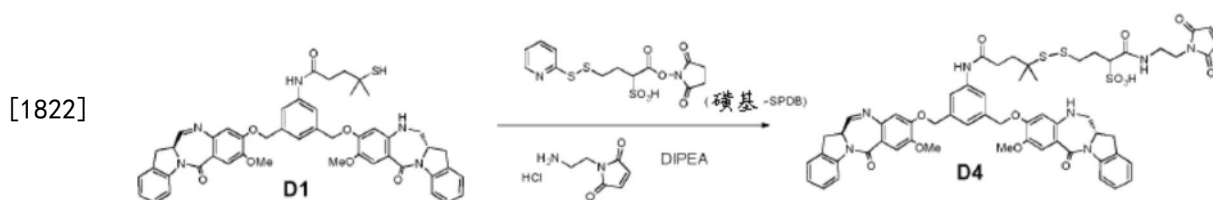
[1817] 步骤2:向NHS酯,即化合物6a(12.3mg,0.011mmol)和N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺盐酸盐(2.0mg,0.011mmol)于无水二氯甲烷(0.3mL)中的溶液中添加DIPEA(0.0022mL,0.013mmol)。在室温下将混合物搅拌3小时,随后在减压下对其进行汽提。通过半制备型逆相HPLC(C18柱,CH₃CN/H₂O)纯化残余物。合并含有纯产物的部分,冷冻并冻干,得到所需马来酰亚胺,即化合物D6(10mg,80%产率)。LCMS=8.3分钟(15分钟方法)。MS(m/z):1181.8(M+1)⁺。

[1818] 实施例19.N1-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-N6-((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)己二酰胺,即化合物D5的合成



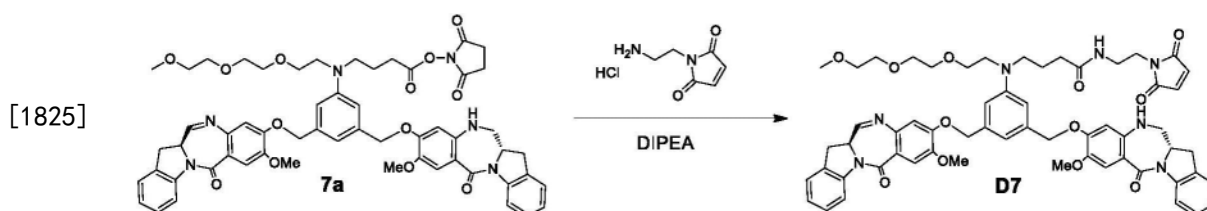
[1820] 在室温下将NHS酯,即化合物5a (8.2mg, 7.6 μ mol) 和1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (2.2mg, 0.011mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (305 μ L) 中。添加DIPEA (2.66 μ L, 0.015mmol) 且将反应物搅拌3.5小时。浓缩反应混合物且通过RPHPLC (C18柱, CH₃CN/H₂O, 梯度35%至55%) 加以纯化。将所需产物级分冷冻并冻干, 得到呈固体白色粉末状的马来酰亚胺, 即化合物D5 (5.3mg, 58%产率)。LCMS=5.11分钟 (8分钟方法)。MS (m/z): 1100.6 (M+1)⁺。

[1821] 实施例20. 1-((2-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)氨基)-4-((5-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)氨基)-2-甲基-5-氧代戊-2-基)二硫烷基)-1-氧代丁烷-2-磺酸, 即化合物D4的合成



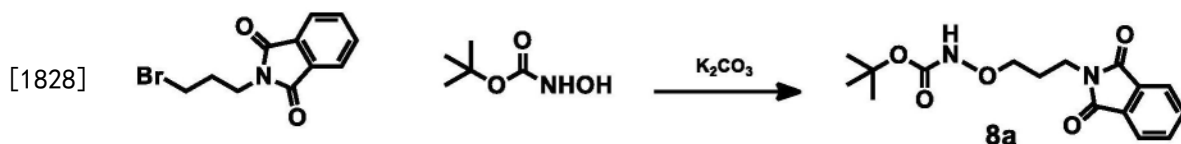
[1823] 在室温下, 在氮气下向游离硫醇D1 (88mg, 0.105mmol) 和1-((2,5-二氧化代吡咯烷-1-基)氧基)-1-氧代-4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁烷-2-磺酸(磺基-SPDB) (64.0mg, 0.158mmol) 于无水二氯甲烷 (2.10mL) 中的悬浮液中添加DIPEA (55.0 μ L, 0.315mmol)。将所述混合物搅拌16小时, 且随后添加1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (55.6mg, 0.315mmol)、无水二氯甲烷 (1.0mL) 和DIPEA (0.055mL, 0.315mmol)。在室温下将所述混合物再搅拌5小时, 此后在真空中浓缩反应物。通过RP-HPLC (C18, CH₃CN/H₂O) 纯化所得残余物。将含有所需产物的级分冷冻并冻干, 得到呈白色固体状的马来酰亚胺D4 (20mg, 16%产率)。LCMS=4.92分钟 (8分钟方法)。MS (m/z): 1158.6 (M+1)⁺。

[1824] 实施例21. N-(2-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂卓并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-2,5,8-三氧杂-11-氮杂十五-15-酰胺, 即化合物D7的合成

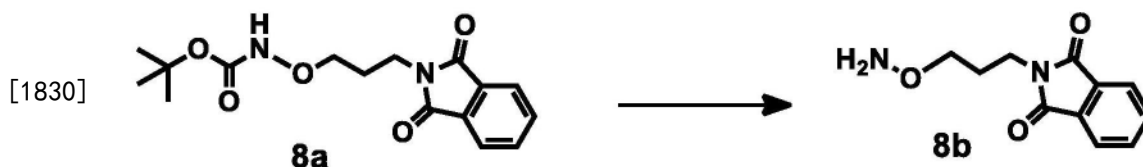


[1826] 在氮气下向NHS酯7a (5mg, 4.82 μ mol) 和1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (1.7mg, 9.64 μ mol) 于无水二氯甲烷 (200 μ L) 中的溶液中添加DIPEA (1.512 μ L, 8.68 μ mol)。在室温下将所述混合物搅拌4小时, 且随后在真空中浓缩。通过RP-HPLC (C18, CH₃CN/H₂O) 纯化所得残余物。将含有所需产物的级分冷冻并冻干, 得到马来酰亚胺化合物D7 (3.5mg, 68%产率)。LCMS=4.61分钟 (15分钟方法)。MS (m/z): 1062.8 (M+1)⁺。

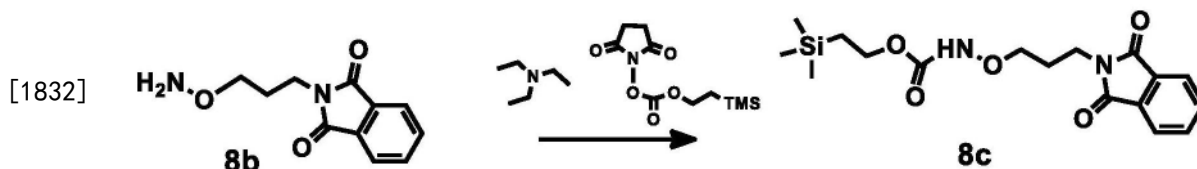
[1827] 实施例22. 化合物D8的合成



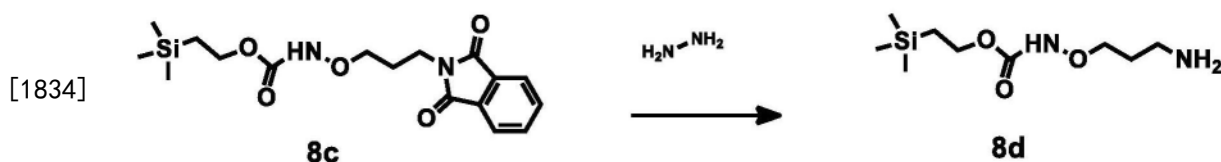
[1829] 步骤1:将羟基氨基甲酸叔丁酯(1.490g,11.19mmol)溶解于无水DMF(22.38mL)中。添加2-(3-溴丙基)异吲哚啉-1,3-二酮(3g,11.19mmol)和碳酸钾(3.09g,22.38mmol)且在室温下将反应物搅拌过夜。用冷水对其进行稀释且用EtOAc萃取。用盐水洗涤有机物,经硫酸钠干燥且通过硅胶快速色谱法(EtOAc/Hex,梯度0%至45%)纯化粗残余物,获得呈粘性固体状的化合物8a(2.41g,67%产率)。LCMS=4.99分钟(8分钟方法)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 7.86-7.83(m,2H),7.73-7.77(m,2H),7.28(bs,1H),3.92(t,2H,J=6.0Hz),3.82(t,2H,6.9Hz),2.05-1.98(m,2H),1.47(s,9H)。



[1831] 步骤2:将化合物8a(2.41g,7.52mmol)溶解于无水DCM(18.81mL)中且在冰浴中冷却至0℃。添加DCM(9.40ml)与TFA(9.40ml)的新混合溶液且移除冰浴。在室温下将反应物搅拌1小时且用DCM稀释并且用饱和碳酸氢钠洗涤。用盐水洗涤有机层,干燥,过滤并浓缩,得到化合物8b(1.32g,80%产率)。粗物质不经进一步纯化便使用。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 7.85-7.82(m,2H),7.72-7.69(m,2H),3.78(t,2H,J=7.0Hz),3.72(t,2H,6.0Hz),1.99-1.93(m,2H)。

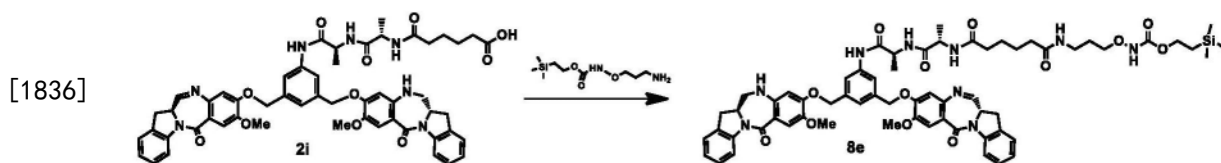


[1833] 步骤3:将化合物8b(100mg,0.454mmol)溶解于无水DCM(4.5mL)中,添加TEA(127 μ l,0.908mmol)和(2-(三甲基甲硅烷基)乙基)碳酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(177mg,0.681mmol)且在室温下将反应物搅拌过夜。用DCM稀释反应物,用盐水洗涤,干燥,过滤并蒸发。通过硅胶快速色谱法(EtOAc/Hex,梯度0%至40%)纯化粗残余物,获得化合物8c(148mg,89%产率)。LCMS=5.91分钟(8分钟方法)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 7.86-7.83(m,2H),7.73-7.69(m,2H),7.39(bs,1H),4.26-4.20(m,2H),3.94(t,2H,J=6.0Hz),3.83(t,2H,6.9Hz),2.06-1.98(m,2H),1.05-0.98(m,2H),0.04(s,9H)。

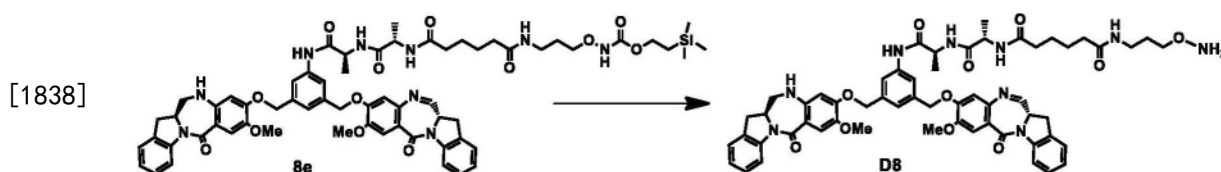


[1835] 步骤4:将化合物8c(148mg,0.406mmol)溶解于乙醇(2.7mL)中并且搅拌,直至完全溶解。添加胼(63.7 μ l,2.030mmol)且在室温下搅拌反应物,直至在1小时快速形成白色沉淀物。经由硅藻土过滤反应物且用额外的乙醇冲洗。蒸发滤液且通过硅胶快速色谱法(A=MeOH,B=EtOAc,梯度100%至10%)加以纯化。通过质谱检测产物级分并且蒸发,得到呈粘

性固体状的化合物8d (67.5mg, 71%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ4.27-4.21 (m, 2H), 3.98 (t, 2H, J=5.9Hz), 2.92-2.87 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 2H), 1.06-0.99 (m, 2H), 0.04 (s, 9H)。

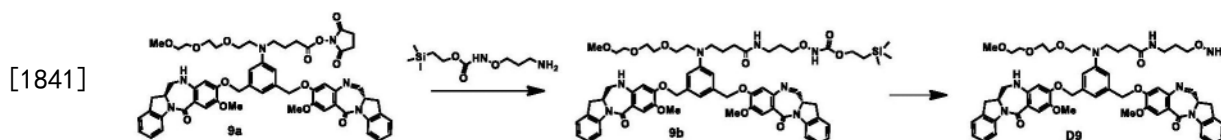


[1837] 步骤5:使以上实施例17中所描述的化合物2i (30mg, 0.031mmol) 悬浮于无水DCM (613μl) 中。逐滴添加无水DMF, 直至溶液澄清。添加化合物8d (21.57mg, 0.092mmol)、EDC·HCl (29.4mg, 0.153mmol) 和DMAP (0.749mg, 6.13μmol) 且在室温下将反应物搅拌1小时。用DCM/MeOH 10:1对其进行稀释, 且随后用水洗涤。用DCM/MeOH 10:1萃取水层, 且干燥所合并的有机物并浓缩, 得到化合物8e (49mg), 不进行进一步纯化便使用。LCMS=5.94分钟 (8分钟方法)。MS (m/z): 1194.4 (M+1)⁺。



[1839] 步骤6:将化合物8e (49mg, 0.041mmol) 溶解于THF (820μl) 中, 并且在冰浴中将反应物冷却至0℃。添加TBAF (205μl, 0.205mmol) 且将反应物搅拌15分钟, 随后移除冰浴。在室温下对其进行搅拌直至完毕。将反应物冷却至0℃, 用饱和氯化铵淬灭且用DCM/MeOH 10:1萃取。用盐水洗涤有机物, 用硫酸钠干燥并蒸发。经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化粗物质, 得到化合物D8 (17.6mg, 54%产率, 经2个步骤)。LCMS=5.1分钟 (8分钟方法)。MS (m/z): 1050.4 (M+1)⁺。

[1840] 实施例23. 化合物D9的合成



[1842] 步骤1:将化合物9a (17mg, 0.016mmol) 溶解于DCM (328μl) 中。在室温下添加化合物8d (5.76mg, 0.025mmol) 和DIPEA (5.71μl, 0.033mmol) 并且搅拌反应物直至完毕。用10:1DCM:MeOH对其进行稀释且用盐水洗涤。干燥有机物并浓缩, 得到化合物9b, 其直接使用。

[1843] 步骤2:类似于实施例23中的化合物D8来制备化合物D9。经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化粗物质, 得到化合物D9 (5mg, 31%产率, 经2个步骤)。LCMS=5.68分钟 (8分钟方法)。MS (m/z): 1012.5 (M+1)⁺。

[1844] 实施例24. huCD123-CysMab-D5在Kasumi-3-Luc-mCh-Puro播散性模型中的体内效力

[1845] 为了测试huCD123-CysMab-D5对降低体内播散性肿瘤负担的能力的效力, 将表达荧光素酶的播散性肿瘤模型与活动物成像组合使用, 如以下方案中所描述。

[1846] 对雌性NSG小鼠 (Jackson Labs) 各自在尾静脉中静脉内 (IV) 注射5×10⁶个Kasumi-3-Luc-mCh-Puro细胞, 即工程化以表达荧光素酶和mCherry的人AML细胞系 (Molecular Imaging, Ann Arbor, MI)。由Kasumi-3细胞进行荧光素酶表达允许使用活动物

成像器对肿瘤负担进行定量,所述活动物成像器检测由荧光素酶在体内暴露于所注射的荧光素酶底物D-荧光素后所产生的生物发光信号。在接种后第6天,对小鼠进行成像且基于生物发光成像(BLI)而随机分至研究组中。在各缀合物施用之前24小时,将小鼠腹膜内(IP)注射400mg/kg非靶向chKTI抗体以阻断Kasumi-3 AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性吸收。在Kasumi-3接种后第7天和第41天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、10 μ g/kg(以D5计;以huCD123计0.80mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3 μ g/kg(以D5计;以huCD123计0.240mg/kg) huCD123-CysMab-D5或10 μ g/kg非靶向KTI-CysMab-D5对照缀合物。在缀合物施用后第5天和第10天,使小鼠接受腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体,以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。

[1847] 在Kasumi-3接种后第11天、第13天、第17天、第20天、第24天、第27天、第31天、第38天、第41天、第45天、第52天、第59天、第66天、第73天和第80天对小鼠进行成像。在Molecular Imaging(Ann Arbor,MI)使用IVIS 50光学成像(Xenogen,Alameda,CA)进行体内生物发光成像。在约1%至2%异氟烷气体麻醉下对动物进行成像,每次三只。将各小鼠腹膜内注射150mg/kg D-荧光素(荧光素酶底物)且在注射之后10分钟依序在俯卧位和背卧位进行成像。使用CCD芯片的大至小分区,且调节暴露时间(2秒至2分钟)以便自各小鼠的影像中可观察的肿瘤获得至少数百次计数且避免CCD芯片饱和。使用Matlab R2015a分析影像。定制脚本将整体固定体积ROI置于各个别动物的俯卧和仰卧影像上,且基于动物鉴别进行标记。计算总流量(光子/秒)且输出所有ROI以有助于在组之间进行分析。将俯卧和仰卧ROI加和在一起以估计整体肿瘤负担。

[1848] %T/C计算如下= $[(T, \text{处理组的中值BLI}) / (C, \text{对照组的中值BLI})] \times 100\%$ 。根据NCI标准,T/C $\leq 42\%$ 为抗肿瘤活性的最低水平,而T/C值 $>42\%$ 为无活性,且T/C值 $<10\%$ 被视为高活性。

[1849] %肿瘤负担延迟(%TBD)计算如下:%TBD= $(T-C) / C \times 100\%$,其中T-C,其中T是处理组实现指定BLI信号的时间(天)且C是对照组实现指定BLI信号的时间(天)。改应用于%ILS的相同度量标准,将%TBD >25 视为最低活性,将%TBD >40 视为活性,且将%TBD >50 视为高活性。

[1850] 每周两次对小鼠进行称重且在研究持续时间期间监测临床病征。对达到安乐死准则的任何小鼠处以安乐死。在发现自发死亡时进行记录。所述研究在肿瘤细胞接种后第115天结束。

[1851] 初步实验显示,用任一剂量的huCD123-CysMab-D5进行处理引起肿瘤负担随时间初步消退,在第27天达到最低点,而在媒介物和KTI-CysMab-D5处理的组中,肿瘤负担在此时间段期间稳定增加。参见例如图22。针对这些初步实验计算的肿瘤生长抑制(T/C值)显示10 μ g/kg和3 μ g/kg的huCD123-CysMab-D5在第27天具有高活性,分别具有0.20和0.25的%T/C值。还使用媒介物处理的组在第45天的BLI信号作为指定BLI来计算%肿瘤负担延迟(%TBD)。根据此度量标准,huCD123-CysMab-D5的两种剂量均具有高活性,产生 $>75\%$ (10 μ g/kg huCD123-CysMab-D5)和 $>65\%$ (3 μ g/kg huCD123-CysM ab-D5)的%TBD,相比之下,在10 μ g/kg KTI-CysMab-D5对照缀合物下可见0% TBD。另外,利用huCD123-CysMab-D5以3 μ g/kg和10 μ g/kg剂量两者的治疗与对照相比在具有突变P53和多药物抗性AML的6/6小鼠中延长存活时间(参见图23)。

[1852] 四个研究组各自在研究结束时的存活时间提供于图31中且汇总于下表中。媒介物处理的小鼠具有70天的中值存活时间。相比之下,用10 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.80mg/kg) huCD123-CysMab-D5处理的小鼠具有115天的中值存活时间,产生64% ILS(高活性)。同样,经3 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.240mg/kg) huCD123-CysMab-D5处理的小鼠具有105天的中值存活时间,产生50% ILS(高活性)。用10 μ g/kg (以D5计) huKTI-CysMab-D5非靶向对照缀合物处理的小鼠具有65.5天的中值存活时间,产生0% ILS(无活性),指示用huCD123-CysMab-D5获得的高活性具有CD123依赖性。

组	处理	剂量 (μ g/kg D5)	剂量 (mg/kg huCD123)	中值 存活 时间	T-C	%IL S	活性
[1853]				(天)			
	1 媒介物	-	-	70	-	-	-
	2 huCD123-CysMab-D5	10	0.80	115	45	64	高活性
[1854]	3 huCD123-CysMab-D5	3	0.240	105	35	50	高活性
	4 huKTI-CysMab-D5	10	0.80	65.5	0	0	无活性

[1855] 对于N=6,中值存活时间(天)是第3只和第4只小鼠丧命的天数的平均值。使用中值存活时间值,%ILS(寿命增加)计算为: $\%ILS = (T-C)/C \times 100\%$,其中T是处理组的中值存活时间(天)且C是对照组的中值存活时间(天)。对于播散性模型的NCI标准是:ILS \geq 25%是最低活性,ILS $>$ 40%是活性,且ILS \geq 50%是高活性。

[1856] 实施例25.huCD123-CysMab-D5缀合物诱导DNA损伤,从而导致MV4-11细胞的细胞周期停滞在S期和细胞凋亡介导的细胞死亡

[1857] 为了评估huCD123-CysMab-D5介导的细胞死亡的机制,用10nM huCD123-CysMab-D5将表达CD123的MV4-11 AML细胞处理一小时,随后在37 $^{\circ}$ C下在无缀合物培养基中再孵育48小时。使用未处理的MV4-11细胞作为对照。收集细胞,且用多种试剂染色以定量处于细胞周期的不同阶段的细胞数目(碘化丙啶)、具有DNA损伤的细胞(pH2AX)、细胞凋亡(膜联蛋白-V(Annexin-V)和裂解的半胱天冬酶-3)和穿孔质膜(TO-PRO-3)。如图24中所显示,MV4-11细胞与huCD123-CysMab-D5一起孵育导致DNA损伤、停滞在细胞周期的S期和细胞凋亡介导的细胞死亡。

[1858] 实施例26.huCD123-CysMab-D5在Molm-13播散性模型中的体内效力

[1859] 所有播散性模型的数据收集和分析:每周两次对小鼠进行称重且在研究持续时间期间监测临床病征。测量终点是存活时间。当存在后腿瘫痪、体重减少 $>$ 处理前体重的20%、出现可见肿瘤或可见任何痛苦迹象时对动物处以安乐死。在发现自发死亡时对其进行记录。对于播散性模型,肿瘤生长延迟计算为T-C,其中T是处理组的中值存活时间(天)且C是媒介物对照组的中值存活时间(天)。使用下式计算播散性模型的寿命增加百分比(%

ILS) : % ILS = (T-C) / C × 100%。根据播散性模型的NCI标准评估抗肿瘤活性: ILS ≥ 25% 是最低活性, ILS > 40% 是活性, 且 ILS ≥ 50% 是高活性。

[1860] 为了测试huCD123-CysMab-D5对减少体内肿瘤负担的能力的效力, 使用如以下方案中所描述的播散性肿瘤模型。

[1861] 将雌性无胸腺裸鼠各自在侧尾静脉中经静脉内注射含 10×10^6 个人AML细胞系Mo1m-13细胞的100 μ l无血清培养基。在接种后第7天, 将小鼠随机分至研究组中。在缀合物施用前24小时, 将小鼠经腹膜内注射400mg/kg非靶向chKTI抗体以阻断Mo1m-13 AML细胞上的Fc受体, 从而防止缀合物的非特异性吸收。在Mo1m-13接种后第7天, 使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、0.1 μ g/kg (以D5计; 以huCD123计0.008mg/kg) huCD123-CysMab-D5、0.3 μ g/kg (以D5计; 以huCD123计0.024mg/kg) huCD123-CysMab-D5、1 μ g/kg (以D5计; 以huCD123计0.08mg/kg) huCD123-CysMab-D5、1 μ g/kg (以D5计; 以huKTI计0.08mg/kg) huKTI-CysMab-D5对照缀合物、0.1 μ g/kg (以D2计; 以huCD123计0.0059mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2、0.3 μ g/kg (以D2计; 以huCD123计0.018mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2、1 μ g/kg (以D2计; 以huCD123计0.059mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2或1 μ g/kg (以D2计; 以chKTI计0.059mg/kg) chKTI-赖氨酸连接的-D2对照缀合物。在缀合物施用后第4天和第9天, 使小鼠接受腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体, 以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。结果汇总于下表和图25中。

[1862] huCD123-CysMab-D5缀合物在所有三个测试剂量下均具有高活性, 各自产生>262.5天的% ILS。相比之下, 1 μ g/kg (以D5计) 剂量的非靶向huKTI-CysMab-D5对照缀合物无活性, 产生0% ILS。这说明huCD123-CysMab-D5的CD123依赖性活性。类似地, huCD123-赖氨酸连接的-D2在所有三个测试剂量下均具有高活性, 各自产生>59的% ILS。然而, 1 μ g/kg (以D2计) 剂量的chKTI-赖氨酸连接的-D2非靶向对照缀合物也无活性, 产生11% ILS, 说明huCD123-赖氨酸连接的-D2的CD123依赖性活性。当比较在各CD123靶向缀合物的最低测试剂量0.1 μ g/kg剂量下所获得的% ILS时, 可见huCD123-CysMab-D5与huCD123-赖氨酸连接的-D2之间的一个明显差异。在0.1 μ g/kg huCD123-CysMab-D5下所获得的% ILS是262.5天, 而在0.1 μ g/kg剂量的huCD123-赖氨酸连接-D2下所获得的% ILS是59天, 从而表明huCD123-CysMab-D5在此模型中的优越性。

处理组	中值存活时间 (天)	肿瘤生长延迟 (T-C, 天)	% ILS	结果
媒介物	28	0	0	---
huCD123-CysMab-D5 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	101.5	73.5	262.5	高活性
huCD123-CysMab-D5 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	> 101.5	> 73.5	> 262.5	高活性
huCD123-CysMab-D5 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	> 101.5	> 73.5	> 262.5	高活性
huKTI-CysMab-D5 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	26.5	0	0	无活性
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	44.5	16.5	59	高活性
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	> 101.5	> 73.5	> 262.5	高活性
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	> 101.5	> 73.5	> 262.5	高活性
chKTI-赖氨酸连接的-D2 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	31	3	11	无活性

[1864] 实施例27. huCD123-CysMab-D5在EOL-1皮下模型中的体内效力

[1865] 所有皮下模型的数据收集和分析:每周两次对小鼠进行称重且在研究持续时间期间监测临床病征。当存在后腿瘫痪、体重减少>处理前体重的20%、发生肿瘤溃疡或可见任何痛苦迹象时对动物处以安乐死。每周一至两次在三个维度上使用卡尺测量肿瘤体积。使用式 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 表示肿瘤体积(mm^3) (Tomayko和Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol. 24:148-54 (1989))。如Bissery等人, Cancer Res. 51:4845-52 (1991)中所描述来评估活性。还使用下式评估肿瘤生长抑制(T/C值): $T/C(\%) = (\text{处理组的中值肿瘤体积}/\text{对照组的中值肿瘤体积}) \times 100\%$ 。当媒介物对照的肿瘤体积达到预定尺寸时,同时测定处理组(T)和媒介物对照组(C)的肿瘤体积(Bissery等人, Cancer Res. 51:4845-52 (1991))。测定各处理组的每日中值肿瘤体积,包括无肿瘤小鼠(0mm^3)。根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[1866] 为了测试huCD123-CysMab-D5对减少体内肿瘤负担的能力的效力,使用如以下方案中所描述的皮下肿瘤模型进行三个研究。

[1867] 在第一个研究中,对雌性无胸腺裸鼠各自在右肋部皮下接种含 10×10^6 个人AML细胞系EOL-1细胞的 $100\mu\text{l}$ 无血清培养基/基质胶。在EOL-1接种后第6天,将小鼠随机分至研究组中。在缀合物施用前24小时,将小鼠经腹膜内注射 $400\text{mg}/\text{kg}$ 非靶向chKTI抗体以阻断EOL-1AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性吸收。在EOL-1接种后第7天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huCD123计 $0.08\text{mg}/\text{kg}$) huCD123-CysMab-D5、 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huCD123计 $0.24\text{mg}/\text{kg}$) huCD123-CysMab-D5、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D2计;以huCD123计 $0.050\text{mg}/\text{kg}$) huCD123-赖氨酸连接的-D2、 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D2计;以huCD123计 $0.151\text{mg}/\text{kg}$) huCD123-赖氨酸连接的-D2、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huKTI计 $0.08\text{mg}/\text{kg}$) huKTI-CysMab-D5对照缀合物、 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huKTI计 $0.24\text{mg}/\text{kg}$) huKTI-CysMab-D5对照缀合

物、1 μ g/kg (以D2计;以chKTI计0.050mg/kg) chKTI-赖氨酸连接的-D2或3 μ g/kg (以D2计;以chKTI计0.151mg/kg) chKTI-赖氨酸连接的-D2对照缀合物。在缀合物施用后第4天和第9天,使小鼠接受腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体,以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。结果呈现于下表和图26中。

[1868] huCD123-CysMab-D5的1 μ g/kg (以D5计) 和3 μ g/kg剂量分别具有活性和高活性,分别产生13% (3/6CR) 和2% T/C (5/6CR)。相比之下,huKTI-CysMab-D5非靶向对照缀合物的1 μ g/kg (以D5计) 和3 μ g/kg剂量无活性,具有 \geq 73的% T/C,说明huCD123-CysMab-D5的活性具有CD123依赖性。huCD123-赖氨酸连接的-D2的1 μ g/kg (以D2计) 和3 μ g/kg剂量分别具有活性和高活性,分别产生30% (1/6CR) 和1% (6/6CR)。相比之下,chKTI-赖氨酸连接的-D2非靶向对照缀合物的1 μ g/kg (以D2计) 和3 μ g/kg剂量均无活性,分别产生75% T/C (0/6CR) 和81% T/C (0/6CR)。这显示huCD123-赖氨酸连接的-D2的活性具有CD123依赖性。当比较1 μ g/kg (以D5计) huCD123-CysMab-D5与1 μ g/kg (以D2计) huCD123-赖氨酸连接的-D2时,两种CD123靶向缀合物之间的差异显而易见,因为前者产生13% T/C和3/6CR,而后者产生30% T/C和仅1/6CR,从而说明huCD123-CysMab-D5在此模型中具有明显优越性。

处理组	% T/C (第 15 天)	PR	CR	结果
媒介物	---	1/6	1/6	---
huCD123-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	13	3/6	3/6	活性
huCD123-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	2	5/6	5/6	高活性
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (1 μ g/kg)	30	1/6	1/6	活性
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (3 μ g/kg)	1	6/6	6/6	高活性
huKTI-CysMab-D5 (1 μ g/kg)	100	0/6	0/6	无活性
huKTI-CysMab-D5 (3 μ g/kg)	73	1/6	1/6	无活性
chKTI-赖氨酸连接的-D2 (1 μ g/kg)	75	0/6	0/6	无活性
chKTI-赖氨酸连接的-D2 (3 μ g/kg)	81	0/6	0/6	无活性

[1870] 在第二个研究中,对雌性无胸腺裸鼠各自在右肋部皮下接种含 10×10^6 个人AML细胞系EOL-1细胞的100 μ l无血清培养基/基质胶。在EOL-1接种后第6天,将小鼠随机分至研究组中。在缀合物施用前24小时,将小鼠腹膜内注射400mg/kg非靶向chKTI抗体以阻断EOL-1AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性吸收。EOL-1接种后第7天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、0.5 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.04mg/kg) huCD123-CysMab-D5或1 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.08mg/kg) huCD123-CysMab-D5。在缀合物施用后第4天和第9天,使小鼠接受腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体,以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。结果呈现于下表和图27中。

[1871] huCD123-CysMab-D5的0.5 μ g/kg (以D5计) 剂量具有活性,产生11% T/C和3/6CR。类似地,huCD123-CysMab-D5的1 μ g/kg剂量具有高活性,产生3% T/C和6/6CR。

处理组	% T/C (第 16 天)	PR	CR	结果
[1872] 媒介物	---	0/6	0/6	---
huCD123-CysMab-D5 (0.5 µg/kg)	11	3/6	3/6	活性
huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)	3	6/6	6/6	高活性

[1873] 在第三个研究中,对雌性无胸腺裸鼠各自在右肋部皮下接种含 10×10^6 个人AML细胞系EOL-1细胞的100µl无血清培养基/基质胶。在EOL-1接种后第6天,将小鼠随机分至研究组中。在缀合物施用前24小时,将小鼠腹膜内注射400mg/kg非靶向chKTI抗体以阻断EOL-1AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性摄取。在EOL-1接种后第7天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、3µg/kg (以D5计;以huCD123计0.24mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3µg/kg (以D5计) FGN849 (有效负载的游离药物形式)、0.24mg/kg未缀合(裸) huCD123抗体或3µg/kg (以D5计;以huKTI计0.24mg/kg) huKTI-CysMab-D5对照缀合物。经阿糖胞苷处理的小鼠在EOL-1接种后第7天、第8天、第9天、第10天和第11天接受单次腹膜内注射,而用阿扎胞苷处理的小鼠在EOL-1接种后第7天、第10天、第13天、第16天和第19天接受单次腹膜内注射。在缀合物施用后第4天和第9天,使小鼠接受腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体,以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。结果呈现于下表和图28中。

[1874] 在所测试的所有制品中,仅3µg/kg (以D5计) 剂量的huCD123-CysMab-D5显示活性,产生高活性1% T/C和8/8CR,相比之下,3µg/kg (以D5计) 剂量的huKTI-CysMab-D5非靶向对照缀合物产生69% T/C和0/8CR。3µg/kg (以D5计) 剂量的未结合游离药物FGN849也无活性,具有92% T/C和0/8CR。同样,与huCD123-CysMab-D5的抗体剂量相匹配的0.24mg/kg剂量的未缀合(“裸”) huCD123抗体无活性,具有60% T/C和0/8CR。以每日75mg/kg的剂量施用5天的阿糖胞苷无活性,具有84% T/C和0/8CR。以每三天一次3.75mg/kg的剂量施用5个剂量的阿扎胞苷无活性,具有59% T/C和0/8CR。

处理组	% T/C (第 16 天)	PR	CR	结果
[1875] 媒介物	---	0/8	0/8	---
huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)	1	8/8	8/8	高活性
FGN849 (3 µg/kg)	92	0/8	0/8	无活性
裸抗体(0.24 mg/kg)	60	0/8	0/8	无活性
huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)	69	0/8	0/8	无活性
阿糖胞苷; 75 mg/kg, qd x 5	84	0/8	0/8	无活性
阿扎胞苷; 3.75 mg/kg, q3d x 5	59	0/8	0/8	无活性

[1876] 实施例28.huCD123-CysMab-D5和huCD123-SeriMab-sD1在MV4-11播散性模型中的体内效力

[1877] 为了测试huCD123-CysMab-D5和huCD123-SeriMab-sD1对减少体内肿瘤负担的能力的效力,使用如以下方案中所描述的播散性肿瘤模型。

[1878] 用150mg/kg环磷酰胺对雌性NOD SCID小鼠进行预处理以部分消融骨髓,以便改进MV4-11细胞的植入。用0.9% NaCl还原环磷酰胺(Baxter,批次号4E011,Exp 05.2017),且在第0天的MV4-11细胞接种前第-3天和第-2天腹膜内施用小鼠。在如以上所描述的环磷酰

胺处理之后,将小鼠各自在侧尾静脉中经静脉内注射含 3×10^6 个人AML细胞系MV4-11细胞的 $100 \mu\text{l}$ 无血清培养基。在MV4-11接种后第7天,将小鼠随机分至研究组中。在缀合物施用前24小时,将小鼠腹膜内注射 $400 \text{mg}/\text{kg}$ 非靶向chKTI抗体以阻断MV4-11 AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性吸收。在MV4-11接种后第7天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huCD123计 $0.08 \text{mg}/\text{kg}$) huCD123-CysMab-D5、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计; $0.24 \text{mg}/\text{kg}$ huCD123) huCD123-CysMab-D5、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D1计;以huCD123计 $0.054 \text{mg}/\text{kg}$) huCD123-SeriMab-sD1、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D1计;以huCD123计 $0.163 \text{mg}/\text{kg}$) huCD123-SeriMab-sD1、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huKTI计 $0.08 \text{mg}/\text{kg}$) huKTI-CysMab-D5对照缀合物、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计;以huKTI计 $0.24 \text{mg}/\text{kg}$) huKTI-CysMab-D5对照缀合物、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D1计;以chKTI计 $0.07 \text{mg}/\text{kg}$) chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物或 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D1计;以chKTI计 $0.21 \text{mg}/\text{kg}$) chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物。结果汇总于下表和图29中。

[1879] huCD123-CysMab-D5的 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以D5计) 剂量均具有高活性,各自产生 ≥ 70 的% ILS。相比之下, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量 (以D5计) 的huKTI-CysMab-D5非靶向对照缀合物具有最低活性,产生28% ILS。huKTI-CysMab-D5的 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量无活性,具有0% ILS,说明huCD123-CysMab-D5具有CD123依赖性活性。huCD123-SeriMab-sD1的 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以sD1计) 剂量均具有高活性,各自产生 ≥ 101 的% ILS。然而,当研究非靶向chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物的活性时, $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量 (以sD1计) 显而易见高度非特异性非CD123靶向活性,其产生65% ILS (高活性)。这指示靶向CD123的huCD123-SeriMab-sD1的 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以sD1计) 剂量的高活性在一定程度上可能由于不涉及靶向CD123的非特异性药物摄取机制。相比之下,chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物的 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以sD1计) 剂量无活性,具有% ILS15,从而说明chKTI-SeriMab-sD1的 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的非特异性活性具有剂量依赖性且huCD123-SeriMab-sD1的 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以sD1计) 剂量的高活性实际上具有CD123依赖性。

处理组	中值存活时间 (天)	肿瘤生长 延迟 (T-C, 天)	% ILS	结果
媒介物	46	0	0	---
huCD123-CysMab-D5 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	81	35	76	高活性
huCD123-CysMab-D5 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	78	32	70	高活性
huCD123-SeriMab-sD1 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	92.5	46.5	101	高活性
huCD123-SeriMab-sD1 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	>92.5	>46.5	>101	高活性
huKTI-CysMab-D5 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	59	13	28	最低活性
huKTI-CysMab-D5 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	46	0	0	无活性
chKTI-SeriMab-sD1 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	53	7	15	无活性
chKTI-SeriMab-sD1 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	76	30	65	高活性

[1881] 实施例29. huCD123-CysMab-D5和huCD123-SeriMab-sD1在MV4-11皮下模型中的体内效力

[1882] 为了测试huCD123-CysMab-D5和huCD123-SeriMab-sD1对减少体内肿瘤负担的能力的效力,使用如以下方案中所描述的皮下肿瘤模型。

[1883] 将雌性CB.17SCID小鼠各自在右肋部皮下接种处于 $100 \mu\text{l}$ 无血清培养基/基质胶中的 10×10^6 个MV4-11细胞,即人AML细胞系。在MV4-11接种后第14天,将小鼠随机分至研究组

中。在缀合物施用前24小时,将小鼠腹膜内注射400mg/kg非靶向chKTI抗体以阻断MV4-11 AML细胞上的Fc受体,从而防止缀合物的非特异性摄取。在MV4-11接种后第15天,使小鼠在侧尾静脉中接受单次静脉内注射媒介物、0.3 μ g/kg (以D1计;以huCD123计0.016mg/kg) huCD123-SeriMab-sD1、1 μ g/kg (以D1计;以huCD123计0.054mg/kg) huCD123-SeriMab-sD1、3 μ g/kg (以D1计;以huCD123计0.16mg/kg) huCD123-SeriMab-sD1、0.3 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.024mg/kg) huCD123-CysMab-D5、1 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.08mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3 μ g/kg (以D5计;以huCD123计0.24mg/kg) huCD123-CysMab-D5、0.3 μ g/kg (以D1计;以chKTI计0.021mg/kg) chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物、1 μ g/kg (以D1计;以chKTI计0.07mg/kg) chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物、3 μ g/kg (以D1计;以chKTI计0.21mg/kg) chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物、0.3 μ g/kg (以D5计;以huKTI计0.024mg/kg) huKTI-CysMab-D5对照缀合物、1 μ g/kg (以D5计;以huKTI计0.08mg/kg) huKTI-CysMab-D5对照缀合物或3 μ g/kg (以D5计;以huKTI计0.24mg/kg) huKTI-CysMab-D5对照缀合物。在MV4-11接种后第20天,将小鼠腹膜内注射100mg/kg非靶向chKTI抗体以确保持续阻断AML肿瘤细胞上的Fc受体。结果呈现于下表和图30中。

[1884] huCD123-SeriMab-sD1的1 μ g/kg和3 μ g/kg (以sD1计) 剂量均具有高活性,各自产生0和6/6CR的%T/C。所测试的最低huCD123-SeriMab-sD1剂量0.3 μ g/kg (以sD1计) 无活性,具有43的%T/C和0/6CR。然而,当研究非靶向chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物的活性时,3 μ g/kg剂量 (以sD1计) 可见高度非特异性非CD123靶向活性,其产生6%T/C(高活性)和3/6CR。这指示靶向CD123的huCD123-SeriMab-sD1的3 μ g/kg (以sD1计) 剂量的高活性在一定程度上可能由于不涉及靶向CD123的非特异性药物摄取机制。相比之下,chKTI-SeriMab-sD1对照缀合物的1 μ g/kg (以sD1计) 和0.3 μ g/kg剂量均无活性,分别产生73% T/C和83% T/C,从而显示chKTI-SeriMab-sD1的3 μ g/kg剂量 (以sD1计) 的高非特异性活性具有剂量依赖性且huCD123-SeriMab-sD1的1 μ g/kg剂量 (以sD1计) 的高活性实际上具有CD123依赖性。

[1885] huCD123-CysMab-D5的1 μ g/kg和3 μ g/kg (以D5计) 剂量均具有高活性,各自产生0% T/C,以及分别5/6和6/6CR。huCD123-CysMab-D5的0.3 μ g/kg (以D5计) 剂量,即所测试的最低剂量无活性,具有69% T/C和0/6CR。相比之下,huKTI-CysMab-D5非靶向对照缀合物的所有三种剂量 (以D5计) 无活性,各自产生 \geq 43% T/C和0/6CR;从而显示huCD123-CysMab-D5的CD123依赖性活性。

处理组	% T/C (第 49 天)	PR	CR	结果
媒介物	---	0/6	0/6	---
huCD123-SeriMab-sD1 (0.3 μg/kg)	43	1/6	0/6	无活性
huCD123-SeriMab-sD1 (1 μg/kg)	0	6/6	6/6	高活性
huCD123-SeriMab-sD1 (3 μg/kg)	0	6/6	6/6	高活性
huCD123-CysMab-D5 (0.3 μg/kg)	69	0/6	0/6	无活性
huCD123-CysMab-D5 (1 μg/kg)	0	5/6	5/6	高活性
huCD123-CysMab-D5 (3 μg/kg)	0	6/6	6/6	高活性
chKTI-SeriMab-sD1 (0.3 μg/kg)	83	0/6	0/6	无活性
chKTI-SeriMab-sD1 (1 μg/kg)	73	0/6	0/6	无活性
chKTI-SeriMab-sD1 (3 μg/kg)	6	5/6	3/6	高活性
huKTI-CysMab-D5 (0.3 μg/kg)	102	0/6	0/6	无活性
huKTI-CysMab-D5 (1 μg/kg)	79	0/6	0/6	无活性
huKTI-CysMab-D5 (3 μg/kg)	43	0/6	0/6	无活性

[1887] 实施例30. huCD123-IGN缀合物在小鼠中的体内耐受性

[1888] 为了测试huCD123-CysMab-D5和其他huCD123-IGN缀合物在体内的耐受性,如以下方案中所描述来使用小鼠模型。

[1889] 使雌性CD-1小鼠接受向侧尾静脉中单次静脉内注射媒介物、150μg/kg (以D5计;以huCD123计12mg/kg) huCD123-CysMab-D5、125μg/kg (以D5计;以huCD123计10mg/kg) huCD123-CysMab-D5、100μg/kg (以D5计;以huCD123计8mg/kg) huCD123-CysMab-D5、150μg/kg (以sD1计;以huCD123计14.3mg/kg) huCD123-SeriMab-sD1或125μg/kg (以sD1计;以huCD123计11.9) huCD123-SeriMab-sD1. huCD123抗体不与小鼠CD123交叉反应,由此使得此体内小鼠模型仅为脱靶毒性的指标。每日观察小鼠,持续33天,且测定体重。如果动物经历大于20%体重损失或处于濒死状态,则对动物处以安乐死。除了体重损失以外,在任何处理中的研究过程中不进行其他临床观察。

[1890] 使雌性CD-1小鼠接收向侧尾静脉中单次静脉内注射媒介物、75μg/kg (以D2计;以huCD123计4.4mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2、100μg/kg (以D2计;以huCD123计5.9mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2或125μg/kg (以D2计;以huCD123计7.4mg/kg) huCD123-赖氨酸连接的-D2. huCD123抗体不与小鼠CD123交叉反应,由此使得此体内小鼠模型仅为脱靶毒性的指标。每日观察小鼠,持续22天,且测定体重。如果动物经历大于20%体重损失或处于濒死状态,则对动物处以安乐死。

[1891] 结果汇总于以下各表以及图32和图33中。

[1892] huCD123-CysMab-D5在150μg/kg (以D5计;以huCD123计12mg/kg) 下未得以耐受。平均体重变化最低点发生在第12天,减少11%。在第12天由于>20%体重损失而对八只小鼠中的一只处以安乐死。huCD123-CysMab-D5在125μg/kg (以D5计;以huCD123计10mg/kg) 下未得以良好耐受。平均体重变化最低点发生在第10天,减少8.6%。在第9天由于体重损失而对八只小鼠中的一只处以安乐死。huCD123-CysMab-D5在100μg/kg (以D5计;以huCD123计8mg/kg) 下得以耐受。平均体重变化最低点发生在第6天,减少7%。此处理组中的小鼠无一由于

体重损失而被处以安乐死。

[1893] huCD123-SeriMab-sD1在150 μ g/kg (以huCD123计14.3mg/kg) 下未得以耐受。平均体重变化最低点发生在第10天,减少17.3%。在第10天,由于体重损失而对八只小鼠中的两只处以安乐死。huCD123-SeriMab-sD1在125 μ g/kg (以sD1计;以huCD123计11.9mg/kg) 下未得以良好耐受。平均体重变化最低点发生在第10天,减少6.7%。在第12天,由于体重损失而对八只小鼠中的一只处以安乐死。

[1894] huCD123-赖氨酸连接的-D2在75 μ g/kg (以D2计;以huCD123计4.4mg/kg) 下得以耐受。平均体重变化最低点发生在第5天,减少6%。此处理组中的小鼠无一由于体重损失而被处以安乐死。huCD123-赖氨酸连接的-D2在100 μ g/kg (以D2计;以huCD123计5.9mg/kg) 下得以耐受。平均体重变化最低点发生在第7天,减少8%。此处理组中的小鼠无一由于体重损失而被处以安乐死。huCD123-赖氨酸连接的-D2在125 μ g/kg (以D2计;以huCD123计7.4mg/kg) 下未得以耐受。平均体重变化最低点发生在第9天(当N=6时),减少17%。由于>20%体重损失而在所指示的天数对原始八只小鼠中以下数目的小鼠处以安乐死:第8天,一只;第9天,一只;第10天,两只;第11天,一只;和第13天,一只。

处理	μ g/kg, 以 药物有效 负载计	mg/kg, 以 huCD123 计	因> 20 BW 损失 而处以 安乐死 的小鼠 数目	最低 体重 (天)	最低点 平均体 重降 低%
媒介物	-----	-----	0/8	-----	-----
huCD123-CysMab-D5	150	12	1/8	12	11
huCD123-CysMab-D5	125	10	1/8	10	8.6
huCD123-CysMab-D5	100	8	0/8	6	7
huCD123-SeriMab-sD1	150	14.3	2/8	10	17.3
huCD123-SeriMab-sD1	125	11.9	1/8	10	6.7

处理	μ g/kg, 以 药物有效 负载计	mg/kg, 以 huCD123 计	因> 20 BW 损失而处 以安乐 死的小 鼠数目	最低 体重 (天)	最低点 平均体 重降 低%
媒介物	-----	-----	0/8	-----	-----
huCD123-赖氨酸 连接的-D2	75	4.4	0/8	5	6
huCD123-赖氨酸 连接的-D2	100	5.9	0/8	7	8
huCD123-赖氨酸 连接的-D2	125	7.4	6/8	9	17

[1897] BW: 体重

[1898] 本申请还涉及以下项目。

[1899] 1. 一种抗体或其抗原结合片段, 其:

[1900] (a) 结合人CD123/IL3- α 抗原的氨基酸101至346内的表位, 以及

- [1901] (b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖。
- [1902] 2. 如项目1所述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结合人CD123抗原的氨基酸101至204内的表位。
- [1903] 3. 如项目1所述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结合人CD123抗原的氨基酸205至346内的表位。
- [1904] 4. 一种抗体或其抗原结合片段,其:
- [1905] (a) 结合人CD123抗原的氨基酸1至100内的表位,以及
- [1906] (b) 抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增殖,其中 IC_{50} 值为0.1nM或更小(例如,0.08nM、0.05nM、0.03nM)。
- [1907] 5. 如项目1-4中任一项所述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抑制白血病干细胞或白血病母细胞的增殖而不抑制造血干细胞的增殖。
- [1908] 6. 如项目1-5中任一项所述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在0.3nM或更低的解离常数(K_d)下结合至人CD123抗原阳性细胞。
- [1909] 7. 如项目6所述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在介于0.01nM与0.3nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。
- [1910] 8. 如项目7所述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在介于0.01nM与0.2nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。
- [1911] 9. 如项目8所述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在介于0.01nM与0.1nM之间的 K_d 下结合至人CD123抗原阳性细胞。
- [1912] 10. 如项目1-9中任一项所述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结合至食蟹猴CD123。
- [1913] 11. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.3nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。
- [1914] 12. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.2nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。
- [1915] 13. 如项目1-9中任一项所述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在介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至食蟹猴CD123。
- [1916] 14. 如项目1-13中任一项所述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在实质上类似的结合亲和力下结合人和食蟹猴CD123两者。
- [1917] 15. 如项目14所述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在介于0.05与0.3nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。
- [1918] 16. 如项目14所述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在介于0.05与0.2nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。
- [1919] 17. 如项目14所述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在介于0.05与0.1nM之间的 K_d 下结合至人和食蟹猴CD123。
- [1920] 18. 如项目6-17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中 K_d 通过流式细胞术、表面等离子体共振或放射免疫测定进行测量。
- [1921] 19. 如项目1-18中任一项所述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在0.5nM或更低的浓度下抑制抗原阳性TF-1细胞中至少50%的IL3依赖性增殖。

- [1922] 20. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1923] a) 至少一个重链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1、5和12;CDR2选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2、3、6-10、13和14;并且任选地,CDR3选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:4、11和15;以及
- [1924] b) 至少一个轻链可变区或其片段,其包含三个顺序互补决定区(CDR),分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中,除了1、2或3个保守氨基酸取代以外,CDR1选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:16、19、20和23;CDR2选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:17、21和24;并且任选地,CDR3选自自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18、22和25。
- [1925] 21. 如项目20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述保守氨基酸取代包括通过Arg取代CDR中的至少一个Lys。
- [1926] 22. 如项目20或21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是包含小鼠CDR区的CDR移植人源化抗体,并且其中所述抗体的一个或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)个重链和/或轻链框架区维尼尔区残基具有小鼠起源。
- [1927] 23. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1928] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1929] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。
- [1930] 24. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1931] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1932] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [1933] 25. 如项目24所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:34的N末端起的第二个残基Xaa是Phe。
- [1934] 26. 如项目24所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:34的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Val。
- [1935] 27. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1936] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser;以及
- [1937] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。
- [1938] 28. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1939] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:39或40中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1940] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。
- [1941] 29. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1942] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser,且除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;以及
- [1943] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。
- [1944] 30. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

- [1945] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的所述第5个至所述最后一个残基的所述残基是Cys;以及
- [1946] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,除了N末端残基是Ser。
- [1947] 31. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1948] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:38中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1949] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [1950] 32. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1951] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:34中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1952] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。
- [1953] 33. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1954] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:56中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1955] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [1956] 34. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1957] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1958] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37中所阐述的氨基酸序列。
- [1959] 35. 如项目31-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:38、34、56和54的N末端起第二个残基Xaa是Phe。
- [1960] 36. 如项目31-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:38、34、56和54的N末端起第二个残基Xaa是Val。
- [1961] 37. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1962] a) 免疫球蛋白重链区,其具有SEQ ID NO:59或60中所阐述的氨基酸序列,除了对应于SEQ ID NO:54的第5个至最后一个残基的残基是Cys;以及
- [1963] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列。
- [1964] 38. 如项目1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1965] a) 免疫球蛋白重链可变区,其具有SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列;以及
- [1966] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其具有SEQ ID NO:35中所阐述的氨基酸序列。
- [1967] 39. 如项目38、33或34所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:54或56的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Phe。
- [1968] 40. 如项目38、33或34所述的抗体或其抗原结合片段,其中自SEQ ID NO:54或56的所述N末端起的所述第二个残基Xaa是Val。
- [1969] 41. 如项目1-3和5-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:
- [1970] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:1中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:2或3中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:4中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及
- [1971] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列的CDR3。
- [1972] 42. 如项目1-3和5-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[1973] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:6、7、8、9或10中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及

[1974] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:19或20中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[1975] 43. 如项目4-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[1976] a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:13或14中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列的CDR3;以及

[1977] b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:23中所阐述的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:24中所阐述的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:25中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[1978] 44. 如项目1-43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[1979] a) V_H 序列,其与选自由以下各项组成的组的参考 V_H 序列至少95%相同:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或

[1980] b) V_L 序列,其与选自由以下各项组成的组的参考 V_L 序列至少95%相同:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。

[1981] 45. 如项目44所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述 V_H 序列与SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38)中的一个至少99%相同,和/或其中所述 V_L 序列与SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)中的一个至少99%相同。

[1982] 46. 如项目45所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[1983] a) V_H 序列,其选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39和40(优选26、28、30、32、34和38);和/或

[1984] b) V_L 序列,其选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37和41(优选27、29、31、35和37)。

[1985] 47. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:26的 V_H 序列和SEQ ID NO:27的 V_L 序列。

[1986] 48. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:28的 V_H 序列和SEQ ID NO:29的 V_L 序列。

[1987] 49. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:30的 V_H 序列和SEQ ID NO:31的 V_L 序列。

[1988] 50. 如项目46所述的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:34的 V_H 序列和SEQ ID NO:35的 V_L 序列。

[1989] 51. 如项目1-49中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是鼠类抗体、非人哺乳动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[1990] 52. 如项目51所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体是CDR移植抗体或表面重构的抗体。

[1991] 53. 如项目1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是全长抗体。

[1992] 54. 如项目1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v-V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG ΔCH₂、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。

[1993] 55. 一种多肽,其包含如项目1-54中任一项所述的V_H序列和V_L序列。

[1994] 56. 如项目55所述的多肽,其是与并非假单胞菌毒素的蛋白质的融合体。

[1995] 57. 一种细胞,其产生如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽。

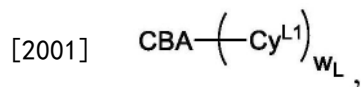
[1996] 58. 一种产生如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的多肽的方法,所述方法包括:

[1997] (a) 培养如项目57所述的细胞;以及,

[1998] (b) 自所述培养的细胞分离所述抗体、其抗原结合片段或多肽。

[1999] 59. 如项目58所述的方法,其中所述细胞是真核细胞。

[2000] 60. 一种免疫缀合物,其具有下式:

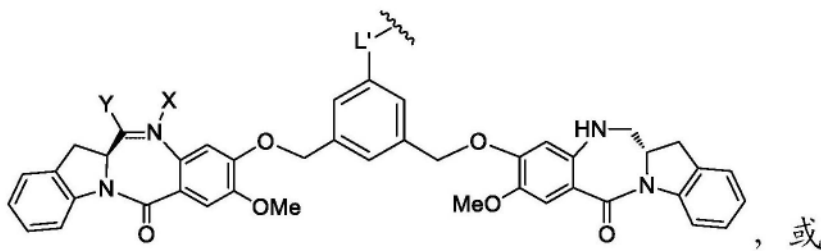


[2002] 其中:

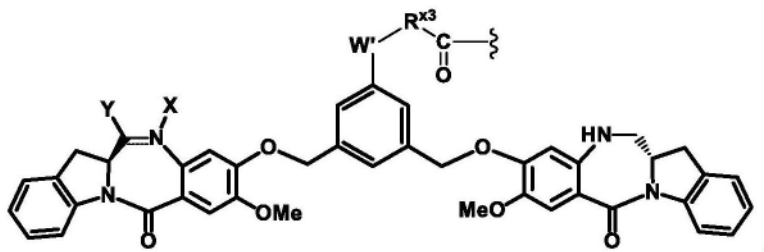
[2003] CBA是如项目23-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过赖氨酸残基共价连接至Cy^{L1};

[2004] W_L是1至20的整数;并且

[2005] Cy^{L1}由以下各式表示:



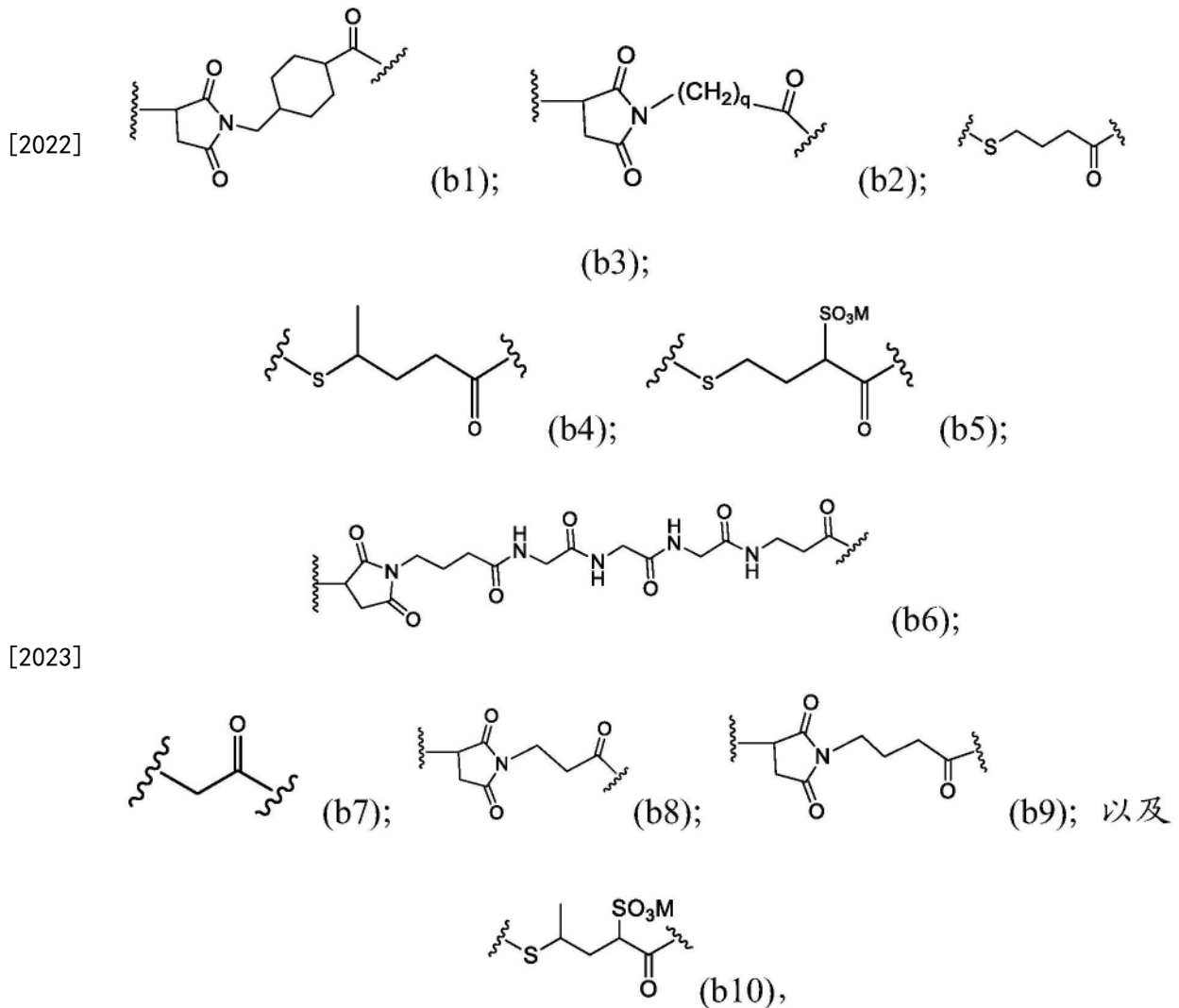
[2006]



[2007] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2008] 介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

- [2009] W' 是 $-\text{NR}^{\text{e}'}$;
 [2010] $\text{R}^{\text{e}'}$ 是 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^{\text{k}}$;
 [2011] n 是 2 至 6 的整数 ;
 [2012] R^{k} 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{Me}$;
 [2013] $\text{R}^{\text{x}3}$ 是 (C_1-C_6) 烷基 ;
 [2014] L' 由以下各式表示 :
 [2015] $-\text{NR}_5-\text{P}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-\text{C}(=\text{O})-(\text{B}1')$; 或
 [2016] $-\text{NR}_5-\text{P}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-\text{S}-\text{Z}^{\text{s}1}-(\text{B}3')$;
 [2017] R_5 是 $-\text{H}$ 或 (C_1-C_3) 烷基 ;
 [2018] P 是氨基酸残基或含有介于 2 至 20 个之间的氨基酸残基的肽 ;
 [2019] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地是 $-\text{H}$ 、 (C_1-C_3) 烷基或带电荷的取代基或可离子化基团 Q ;
 [2020] m 是 1 至 6 的整数 ; 并且
 [2021] $\text{Z}^{\text{s}1}$ 选自以下各式中的任一者 :



- [2024] 其中 :
 [2025] q 是 1 至 5 的整数 ; 并且

[2026] M是H⁺或阳离子。

[2027] 61. 如项目60所述的免疫缀合物, 其中R_a和R_b两者均是H; 并且R_c是H或Me。

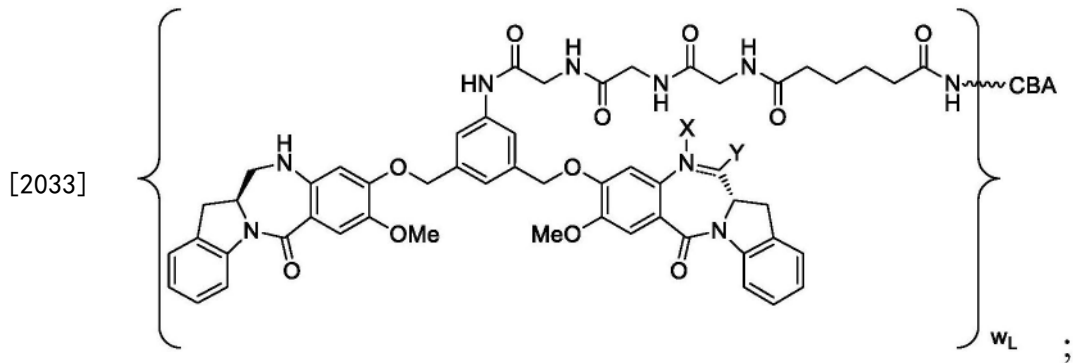
[2028] 62. 如项目60或61所述的免疫缀合物, 其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

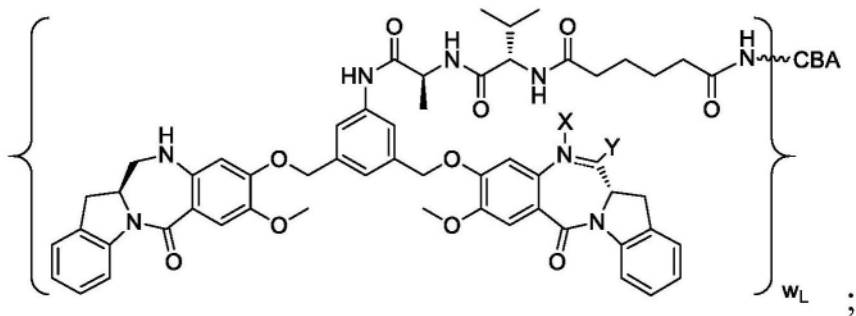
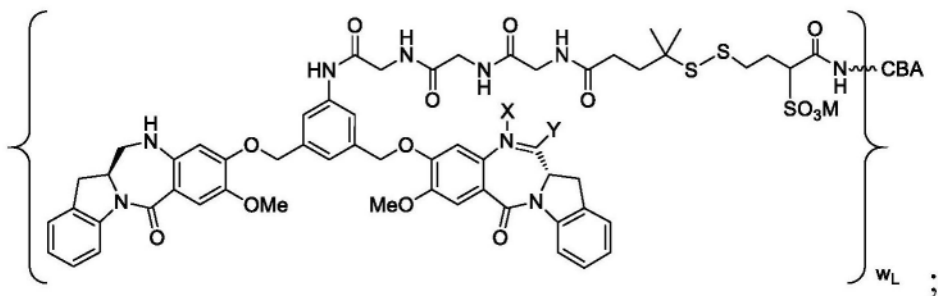
[2029] 63. 如项目60-62中任一项所述的免疫缀合物, 其中P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

[2030] 64. 如项目63所述的免疫缀合物, 其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

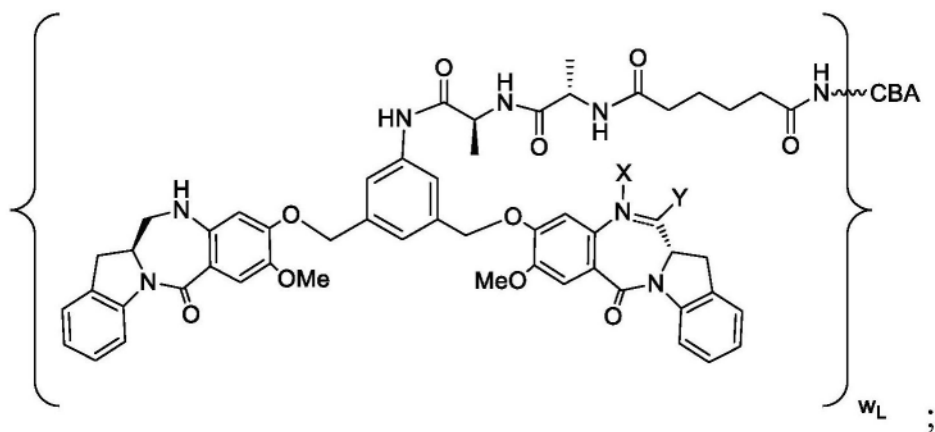
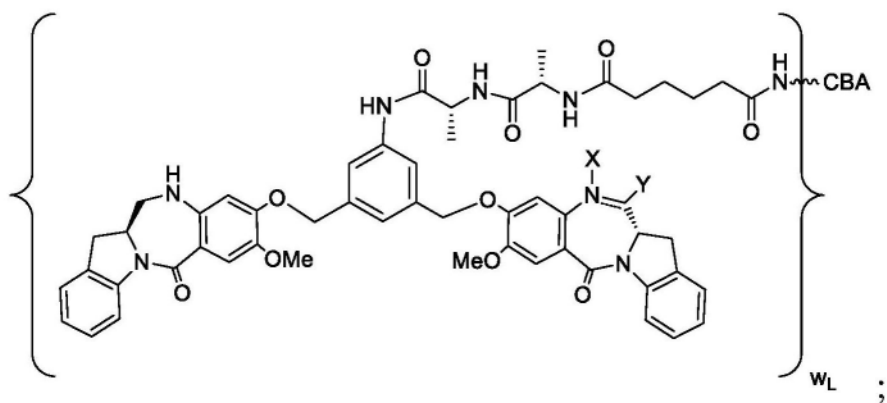
[2031] 65. 如项目60-64中任一项所述的免疫缀合物, 其中Q是-SO₃M。

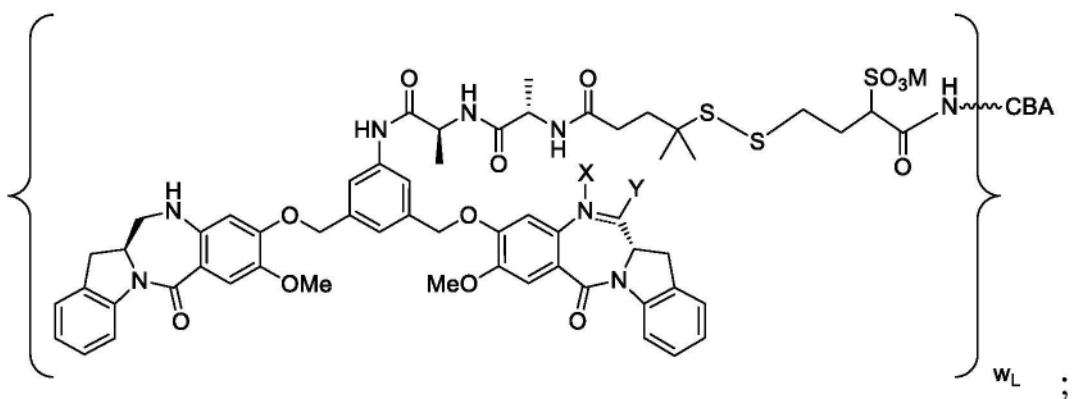
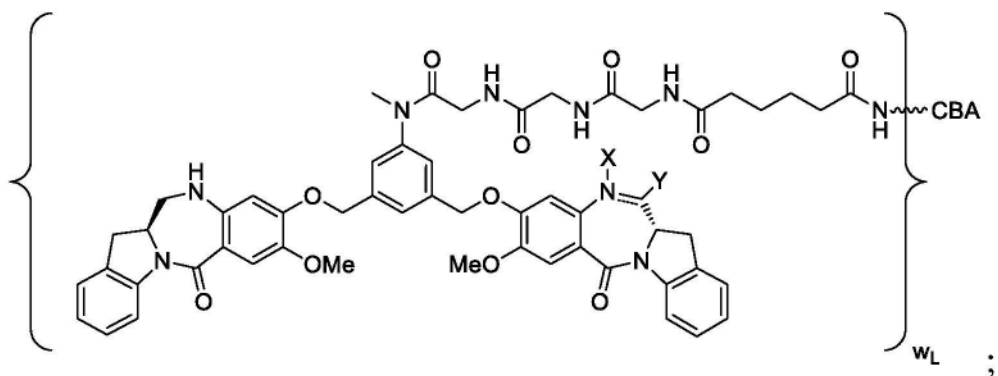
[2032] 66. 如项目60所述的免疫缀合物, 其中所述免疫缀合物由以下各式表示:



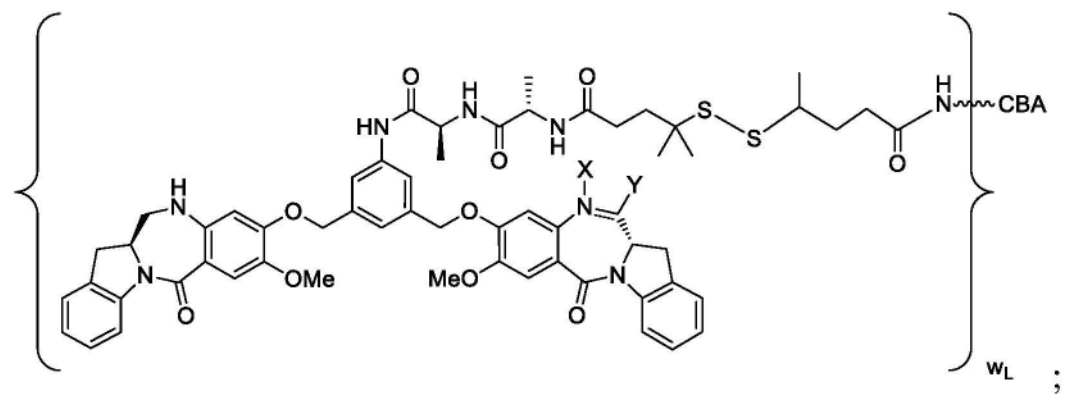
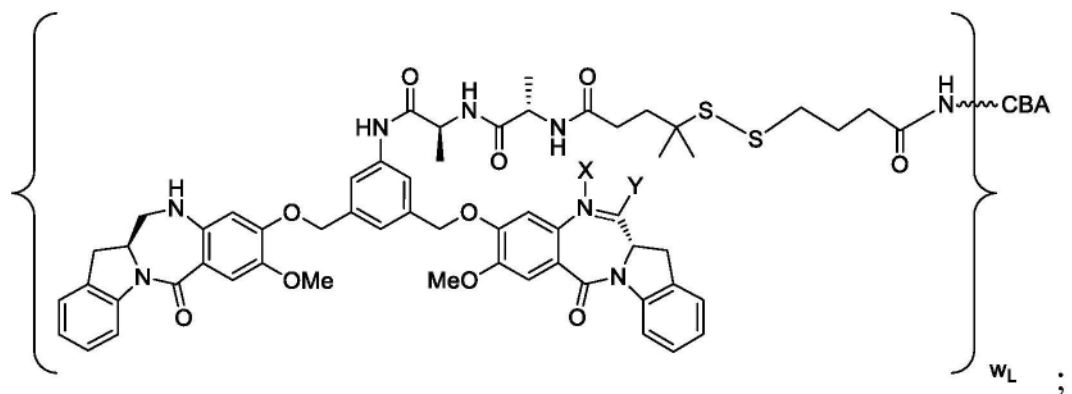


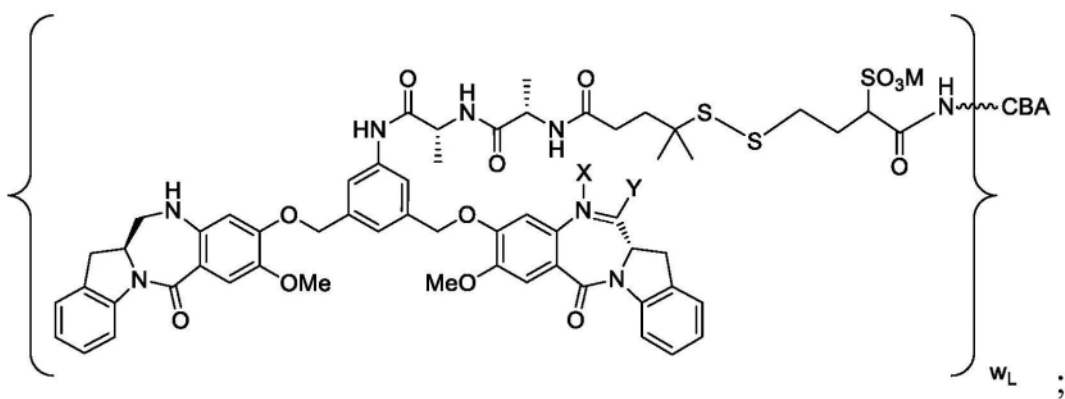
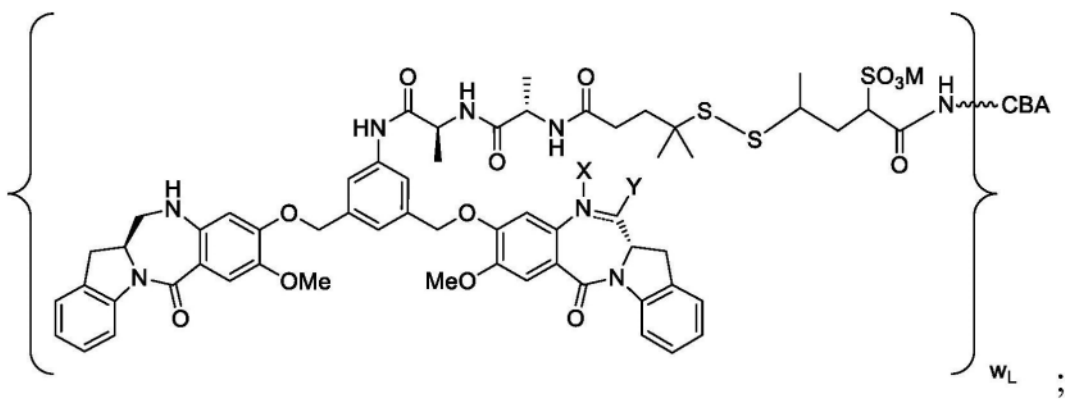
[2034]



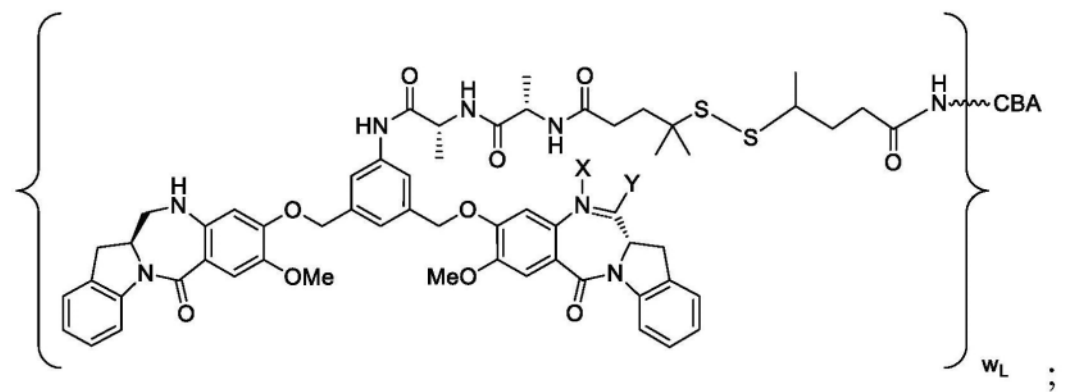
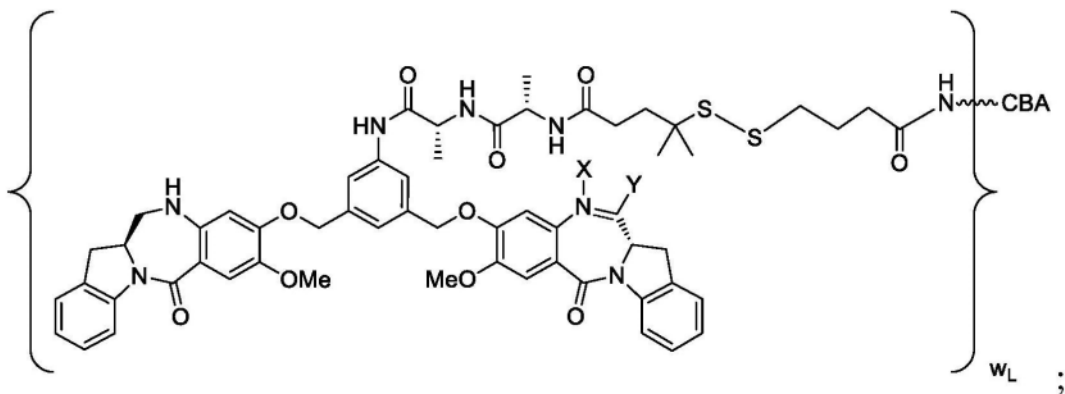


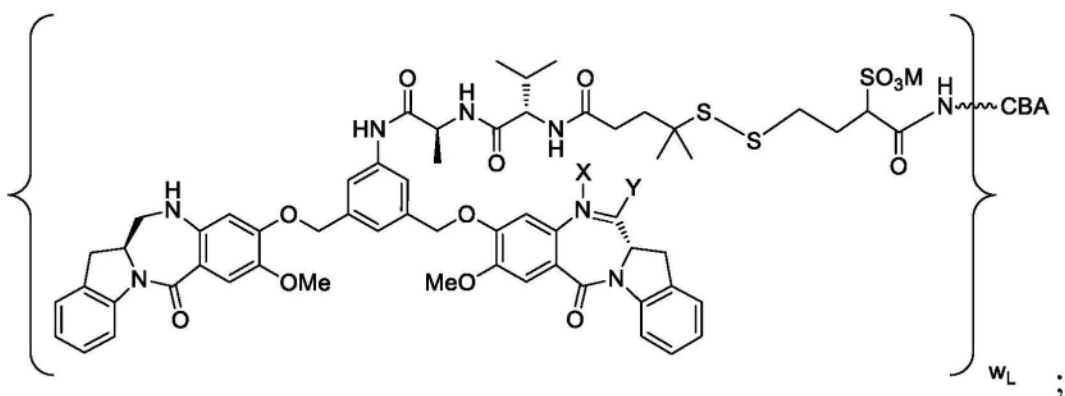
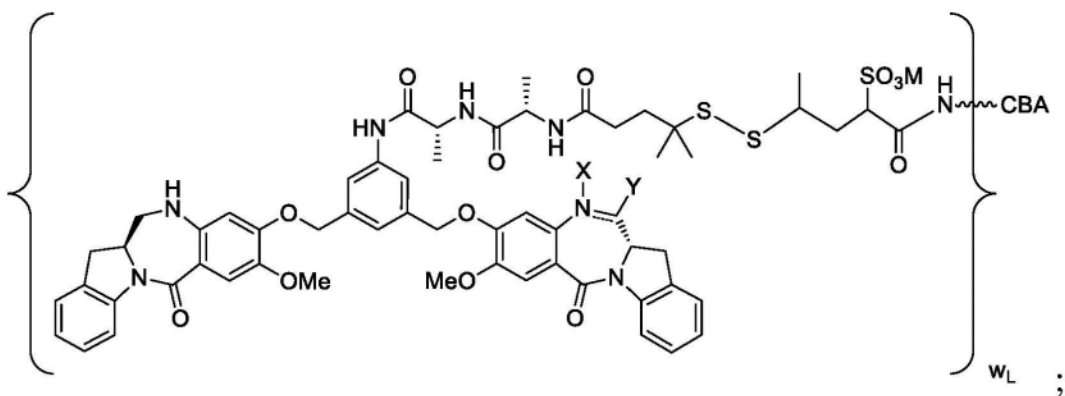
[2035]



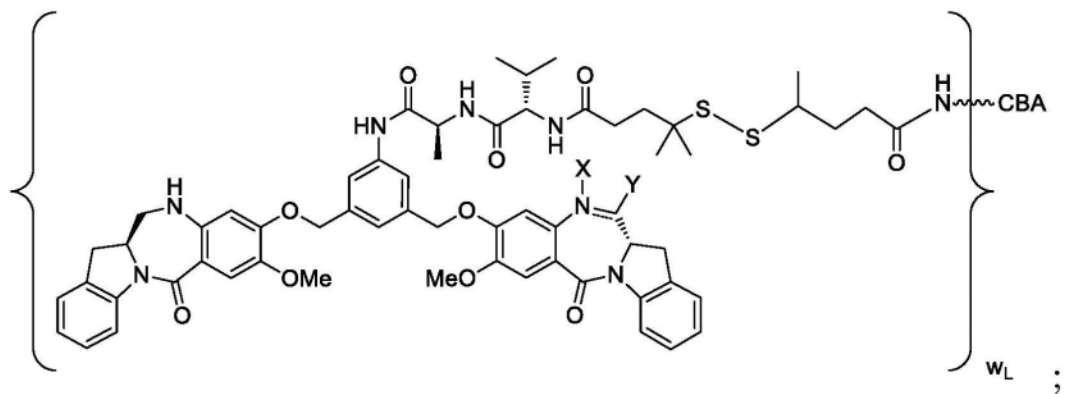
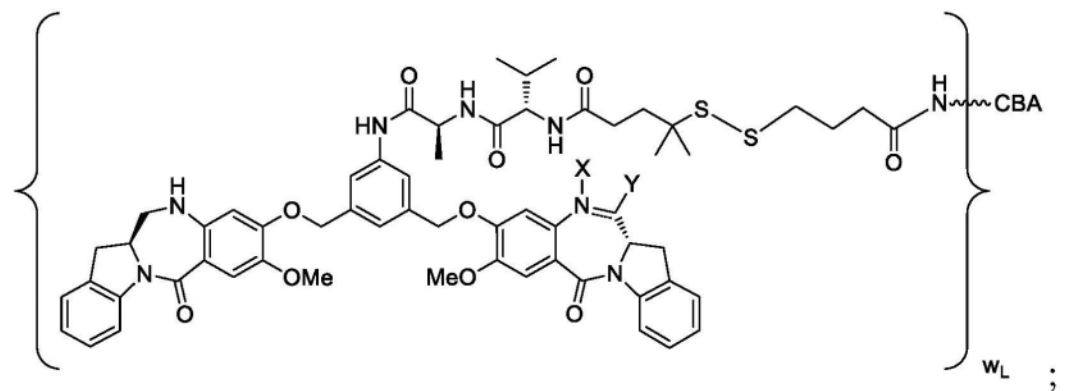


[2036]





[2037]



[2047] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2048] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;

[2049] R^{x1}和R^{x2}独立地是(C₁-C₆)烷基;

[2050] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;

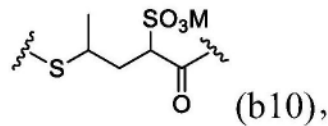
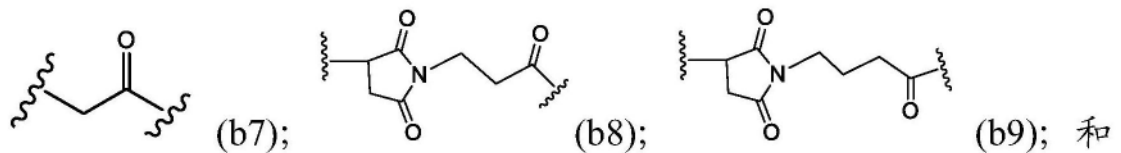
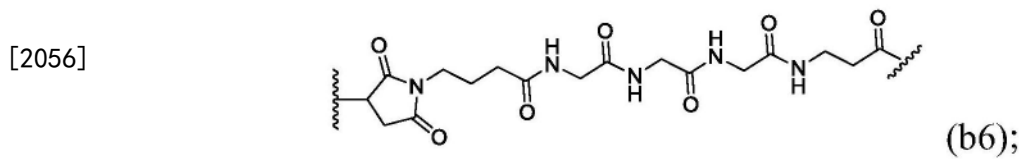
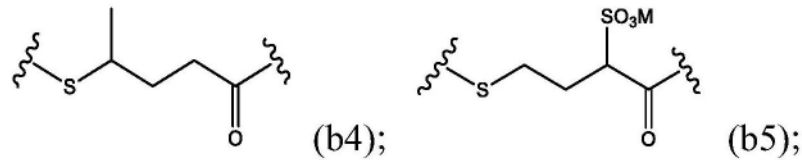
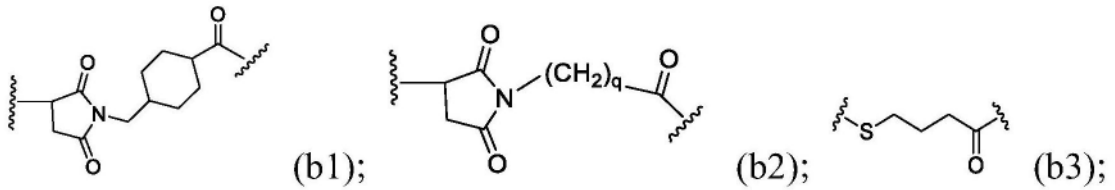
[2051] W'是-NR^{e'};

[2052] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[2053] n是2至6的整数;

[2054] R^k是-H或-Me;

[2055] Z^{s1}选自以下各式中的任一者:



[2057] 其中:

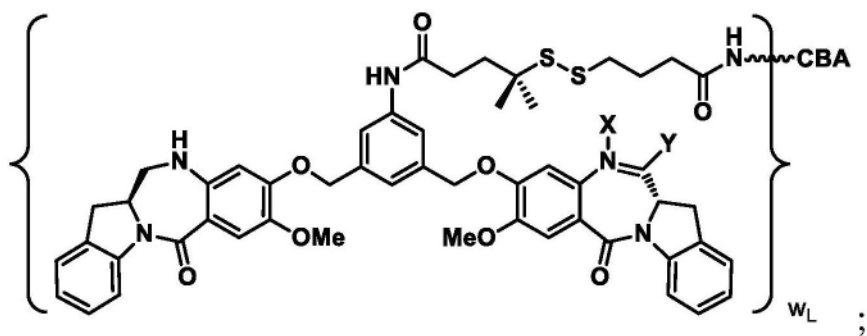
[2058] q是1至5的整数;并且

[2059] M是-H⁺或阳离子。

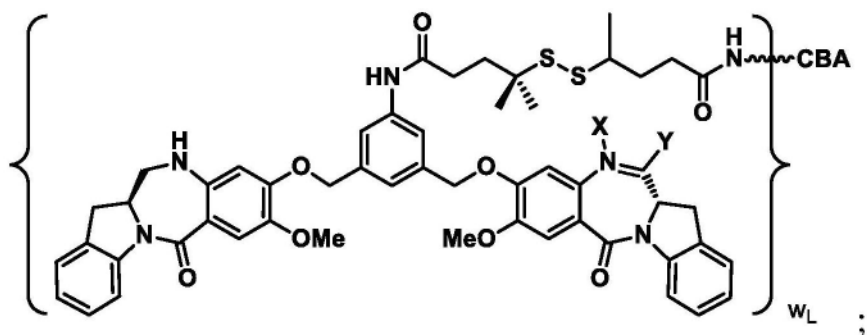
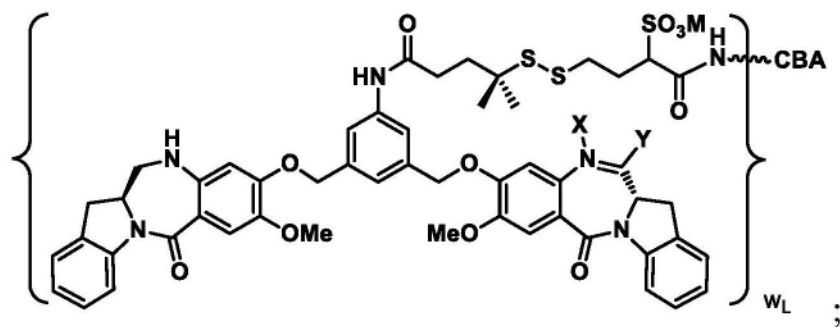
[2060] 68. 如项目67所述的免疫缀合物,其中R^e是H或Me;R^{x1}和R^{x2}独立地是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;并且p是0、1、2或3。

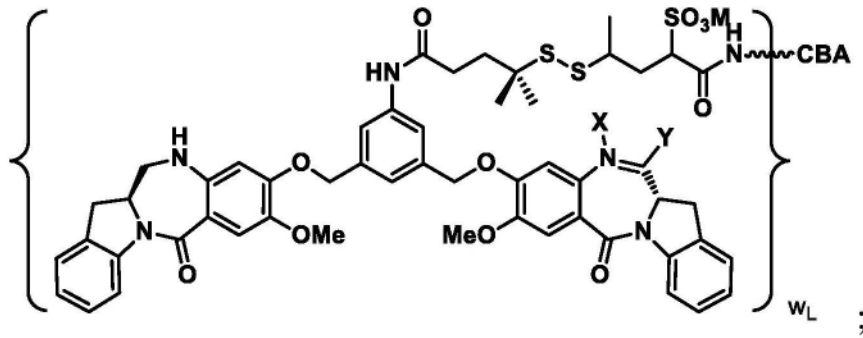
[2061] 69. 如项目68所述的免疫缀合物,其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[2062] 70. 如项目67所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

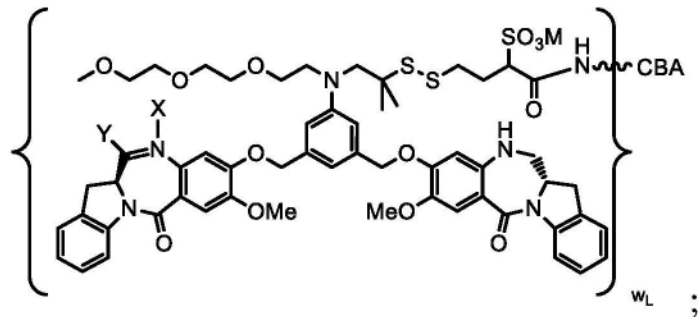
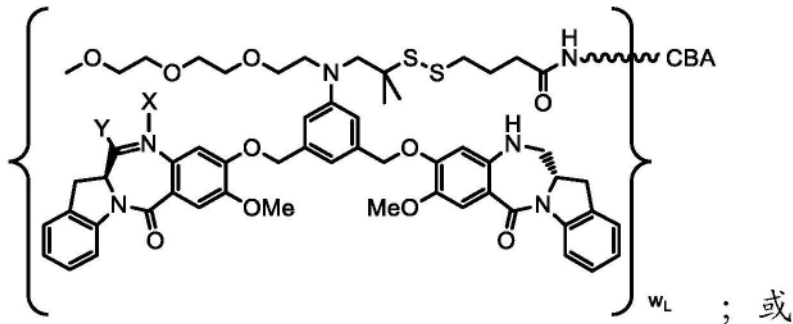


[2063]





[2064]



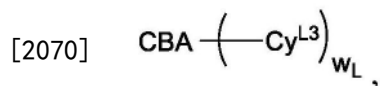
[2065] 或其药学上可接受的盐,其中 w_L 是1至10的整数;所述介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;并且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

[2066] 71.如项目60-70中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线 \equiv 表示双键,X不存在且Y是-H。

[2067] 72.如项目60-70中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[2068] 73.如项目72所述的免疫缀合物,其中M是H⁺、Na⁺或K⁺。

[2069] 74.一种免疫缀合物,其具有下式:

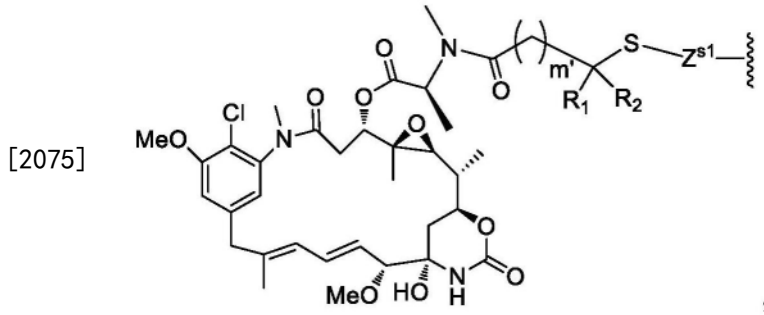


[2071] 其中:

[2072] CBA是如项目23-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,其通过Lys残基共价连接至Cy^{L3};

[2073] w_L 是1至20的整数;

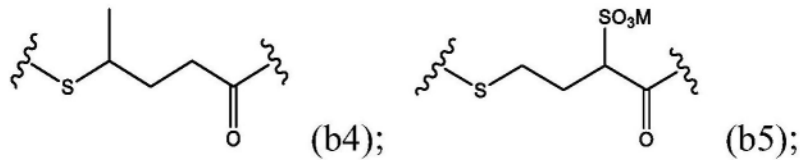
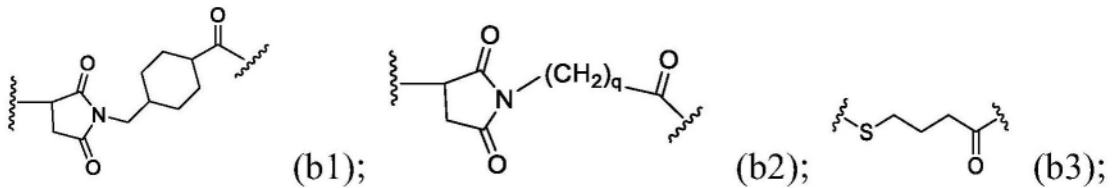
[2074] Cy^{L3} 由下式表示:



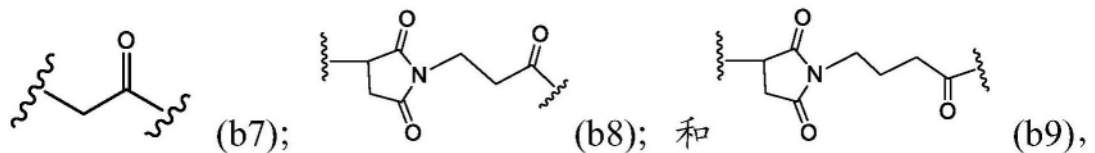
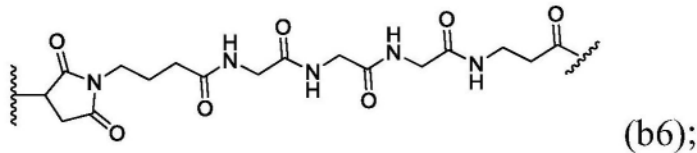
[2076] m' 是1或2;

[2077] R_1 和 R_2 各自独立地是H或(C_1-C_3)烷基;并且

[2078] Z^{s1} 选自以下各式中的任一者:



[2079]



[2080] 其中:

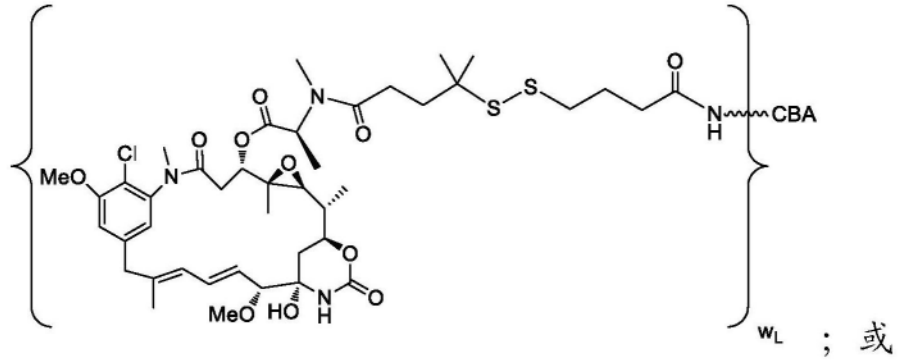
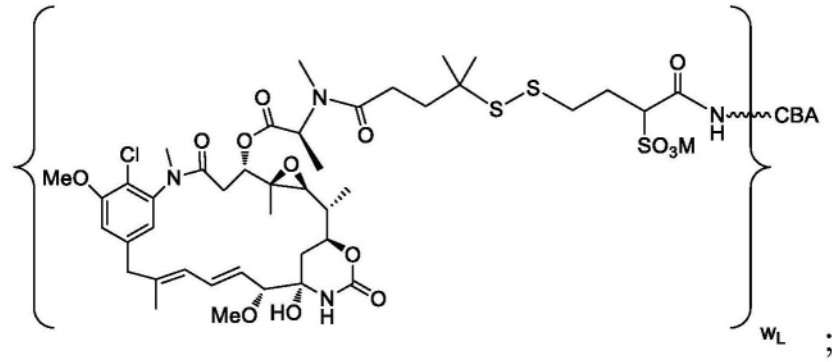
[2081] q 是1至5的整数;并且

[2082] M 是 H^+ 或阳离子。

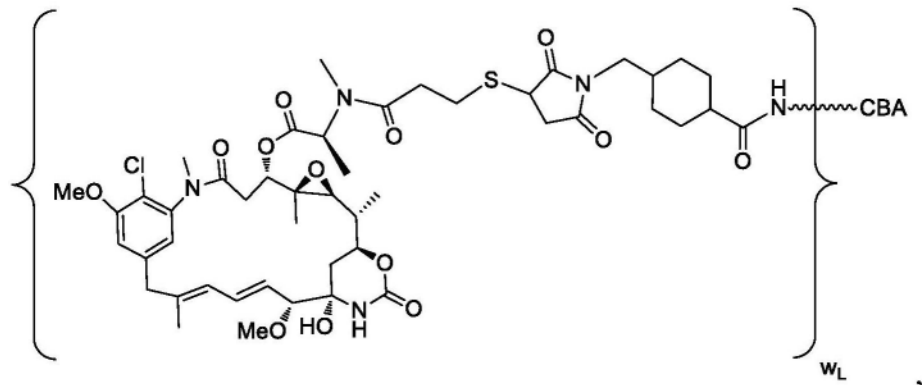
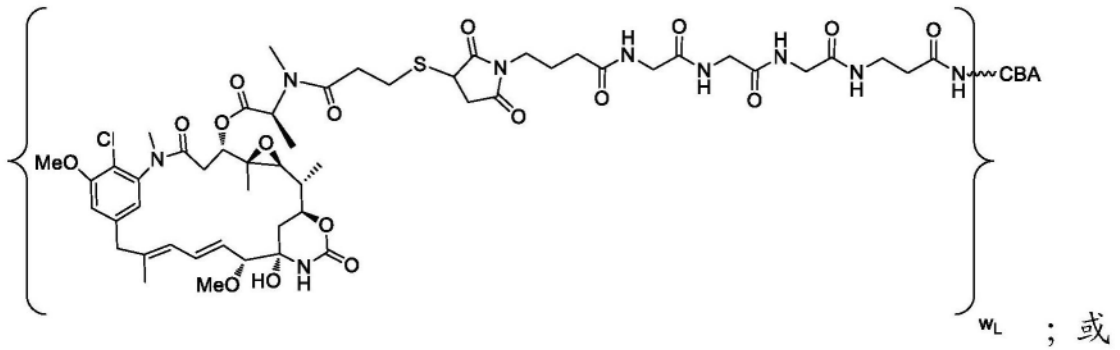
[2083] 75. 如项目74所述的免疫缀合物,其中 m' 是1,并且 R_1 和 R_2 两者均是H。

[2084] 76. 如项目74所述的免疫缀合物,其中 m' 是2,并且 R_1 和 R_2 两者均是Me。

[2085] 77. 如项目74所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:



[2086]

[2087] 或其药学上可接受的盐,其中 W_L 是1至10的整数。[2088] 78. 如项目77所述的免疫缀合物,其中M是 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ 。

[2089] 79. 一种免疫缀合物,其具有下式:

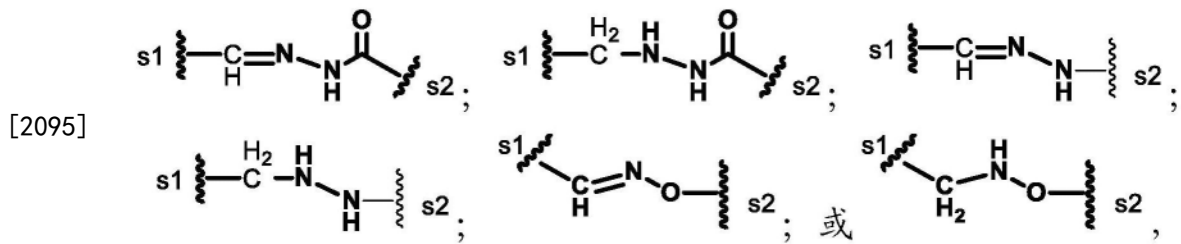


[2091] 其中:

[2092] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其共价连接至 J_{CB}' 基团;

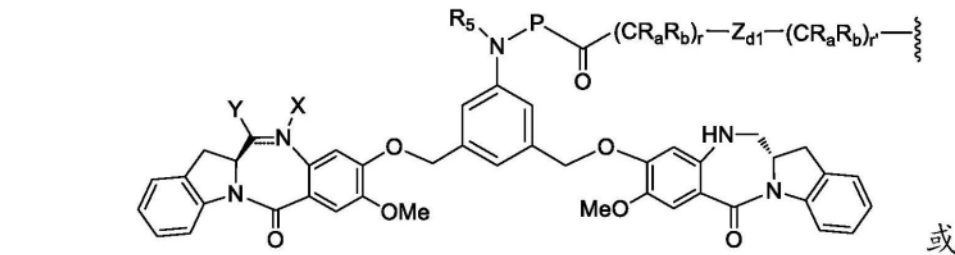
[2093] W_S 是1、2、3或4;

[2094] J_{CB}' 是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与 Cy^{s1} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,并且由以下各式表示:

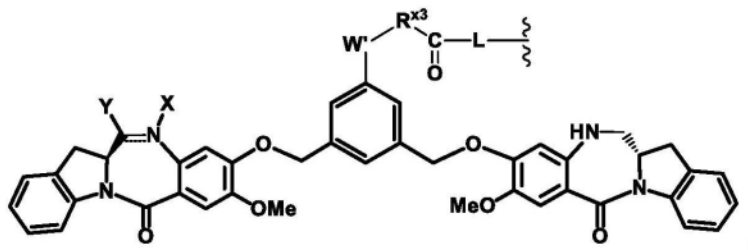


[2096] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与 Cy^{s1} 共价连接的位点;

[2097] Cy^{s1} 由以下各式表示:



[2098]



[2099] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2100] 介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或 $-\text{SO}_3\text{M}$,且M是 H^+ 或阳离子;

[2101] R_5 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

[2102] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[2103] Z_{d1} 是不存在、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 或 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$;

[2104] R_9 是-H或 (C_1-C_3) 烷基;

[2105] R_a 和 R_b 在每次出现时独立地是-H、 (C_1-C_3) 烷基或带电荷的取代基或可离子化基团

Q;

[2106] r和r'独立地是1至6的整数;

[2107] W'是-NR^{e'};

[2108] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[2109] n是2至6的整数;

[2110] R^k是-H或-Me;

[2111] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;

[2112] L是-NR₉-(CR_aR_b)_r,或不存在;并且

[2113] r"是0至6的整数。

[2114] 80.如项目79所述的免疫缀合物,其中R_a和R_b两者均是H,并且R₅和R₉两者均是H或Me。

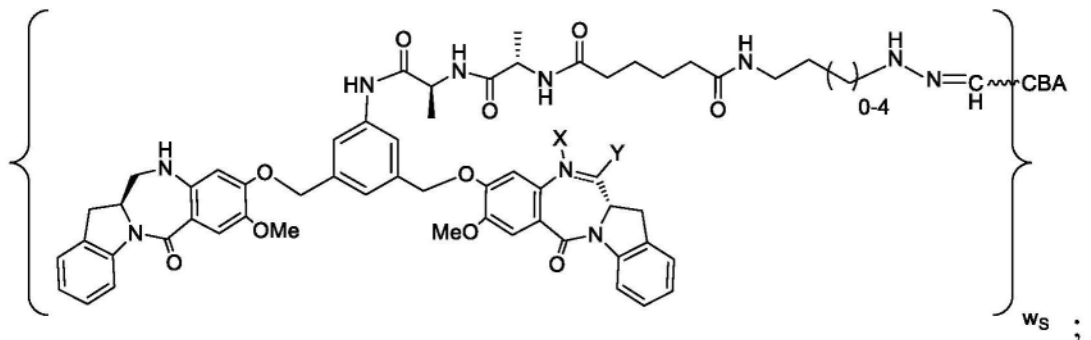
[2115] 81.如项目79或80所述的免疫缀合物,其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

[2116] 82.如项目79-81中任一项所述的免疫缀合物,其中P选自由以下各项组成的组: Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met以及Met-Ala。

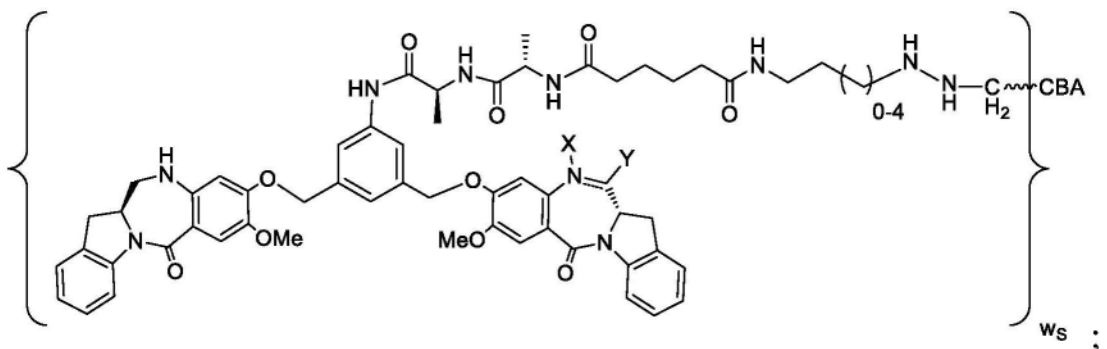
[2117] 83.如项目82所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

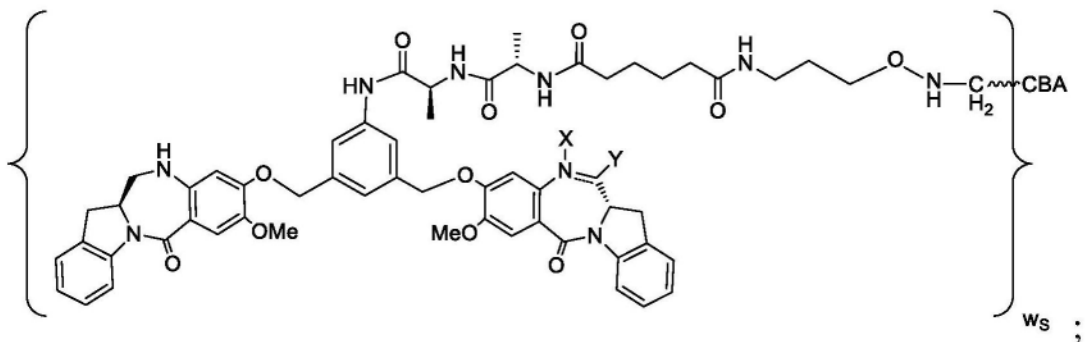
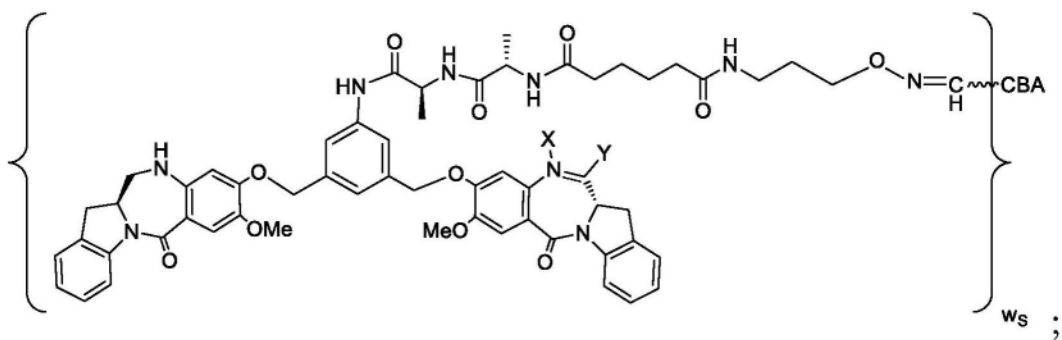
[2118] 84.如项目79-83中任一项所述的免疫缀合物,其中Q是-SO₃M。

[2119] 85.如项目80所述的免疫缀合物,其由以下各式表示:

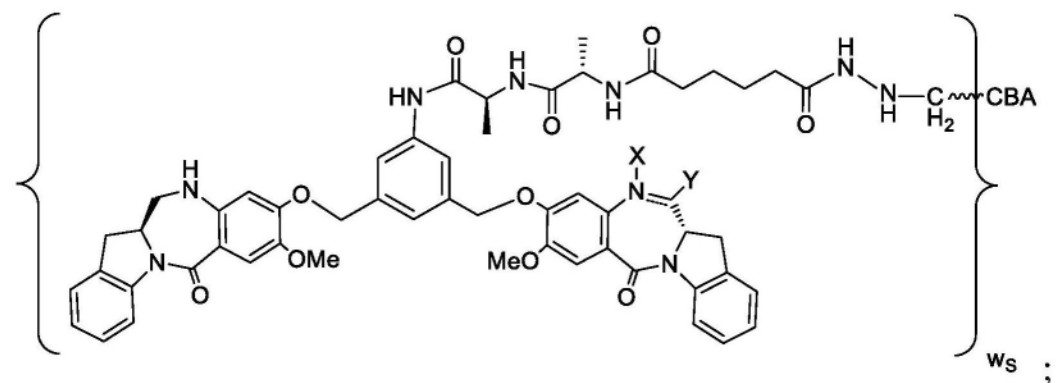
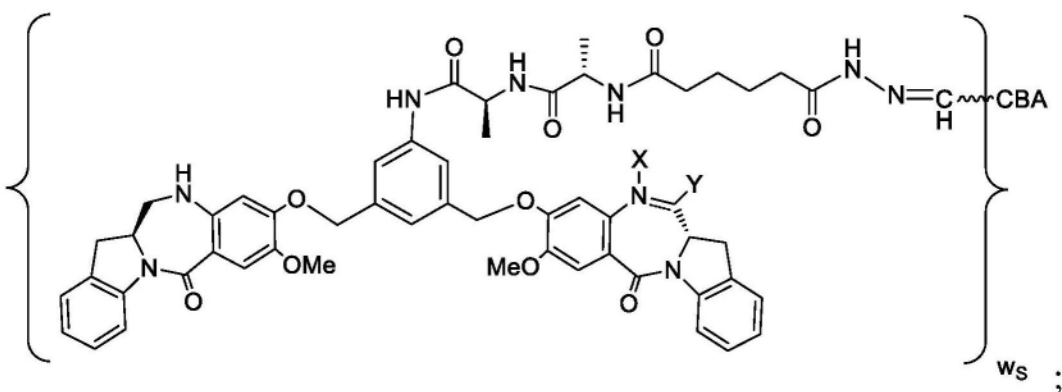


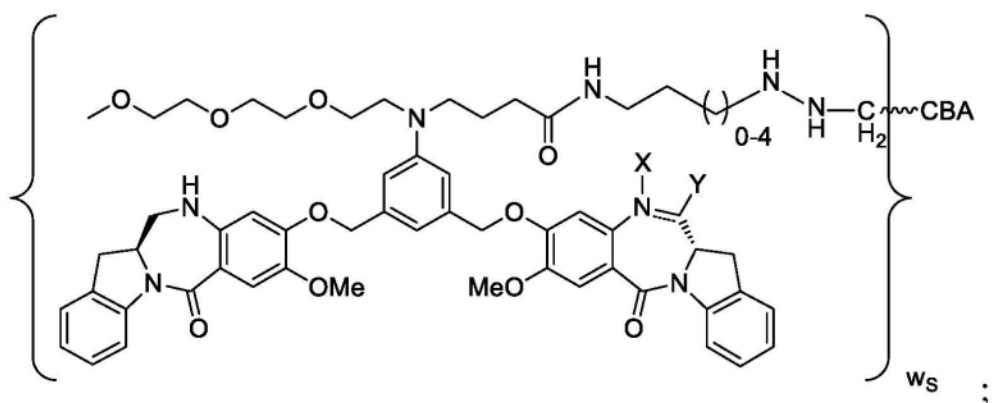
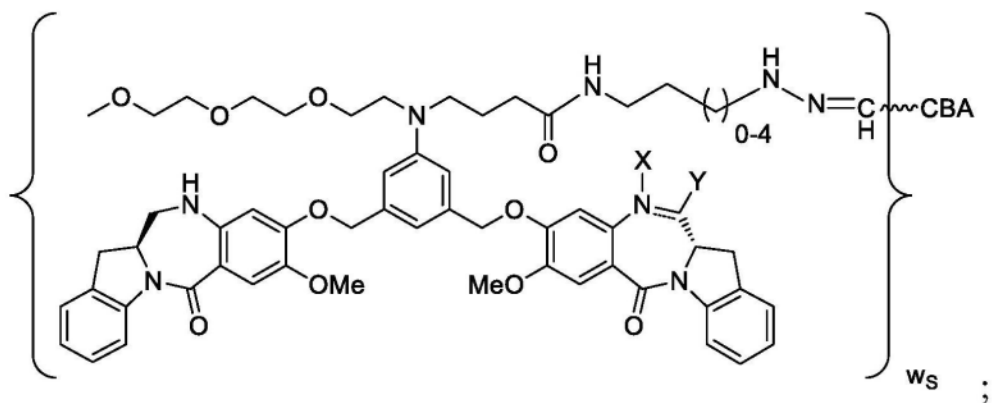
[2120]



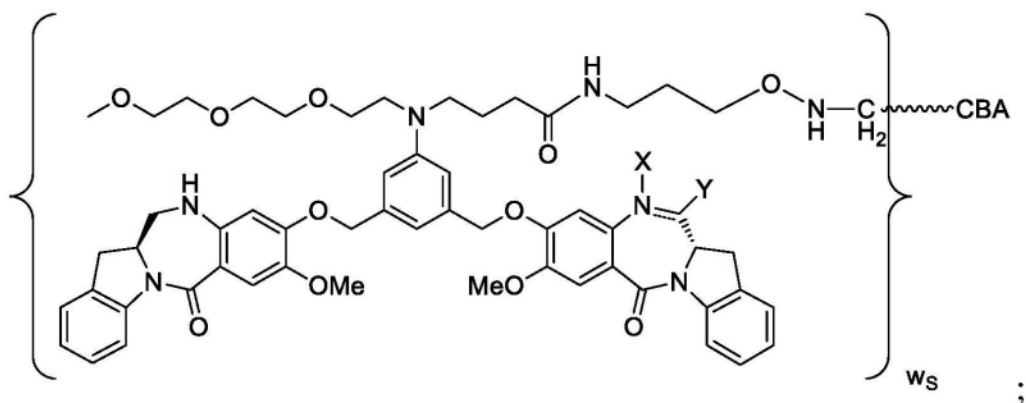
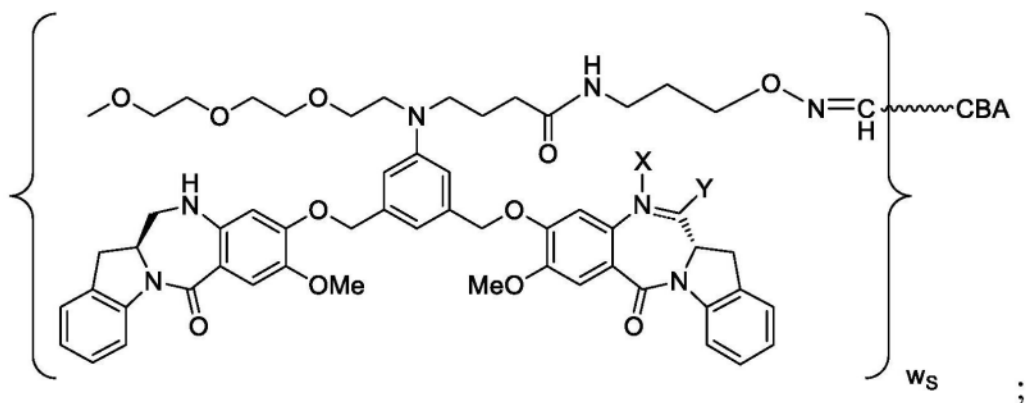


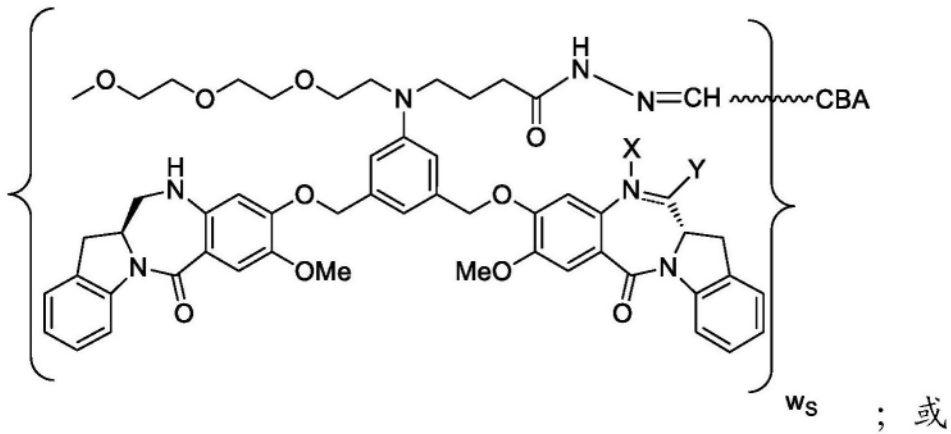
[2121]



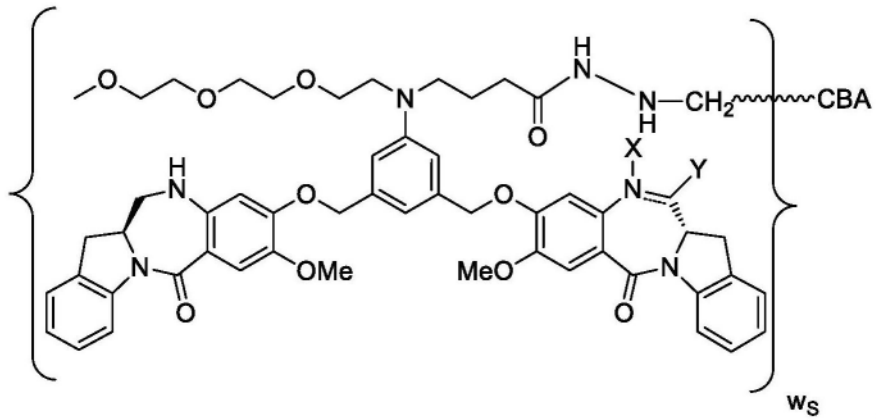


[2122]





[2123]



[2124] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其为双键时,X不存在且Y是-H;并且当其为单键时,X是-H且Y是-OH或-SO₃M。

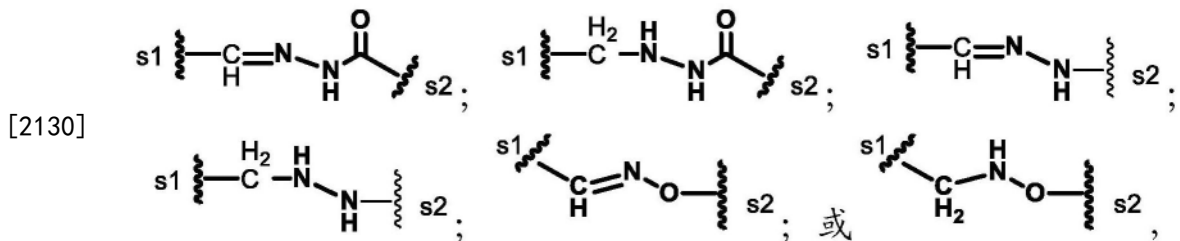
[2125] 86.一种免疫缀合物,其具有下式:



[2127] 其中:

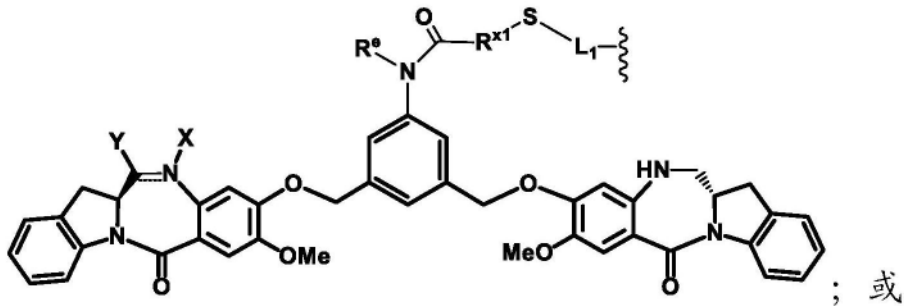
[2128] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56中任一项所述的其多肽,其共价连接至J_{CB}'基团;

[2129] J_{CB}'是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s2}上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

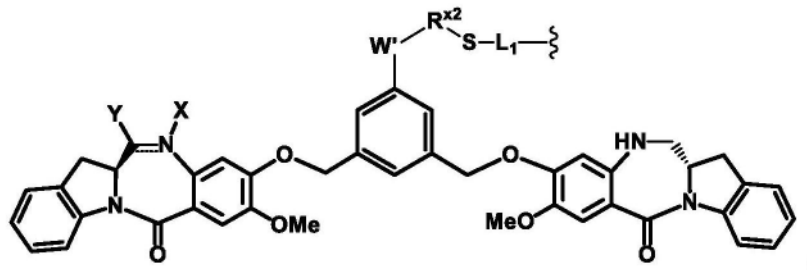


[2131] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与Cy^{s2}共价连接的位点;

[2132] Cy^{s2}由以下各式表示:



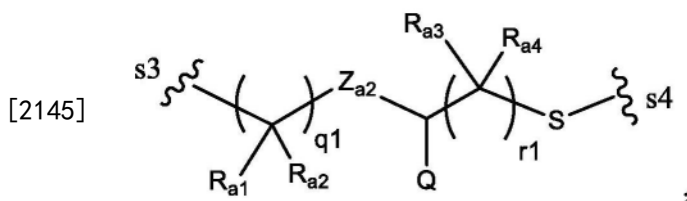
[2133]



[2134] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2135] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,且Y是-OH或-SO₃M;[2136] M是H⁺或阳离子;[2137] R^{x1}是(C₁-C₆)烷基;[2138] R^e是-H或(C₁-C₆)烷基;[2139] W'是-NR^{e'},[2140] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[2141] n是2至6的整数;

[2142] R^k是-H或-Me;[2143] R^{x2}是(C₁-C₆)烷基;[2144] L₁由下式表示:

[2146] 其中:

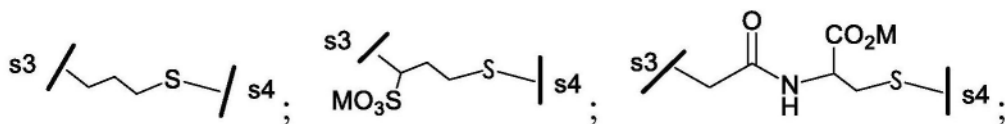
[2147] s3是与所述基团J_{CB}'共价连接的位点;[2148] s4是与Cy^{s2}上的-S-基团共价连接的位点;[2149] Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;[2150] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2151] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

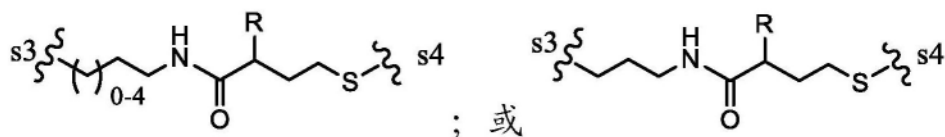
[2152] R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基;并且

[2153] q1和r1各自独立地是0至10的整数,其限制条件是q1和r1不均是0。

[2154] 87. 如项目86所述的免疫缀合物,其中-L₁-由以下各式表示:



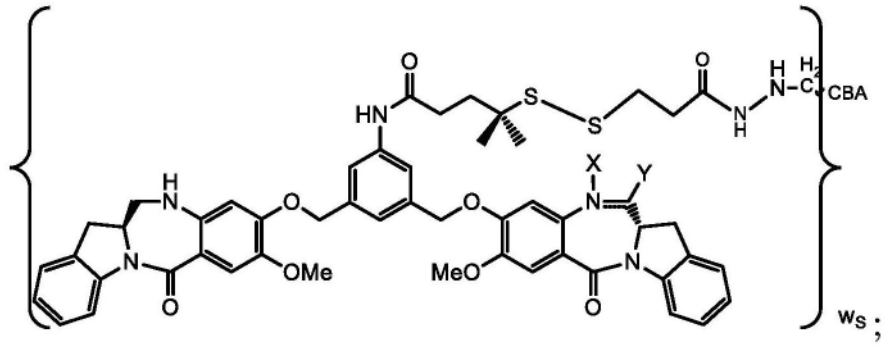
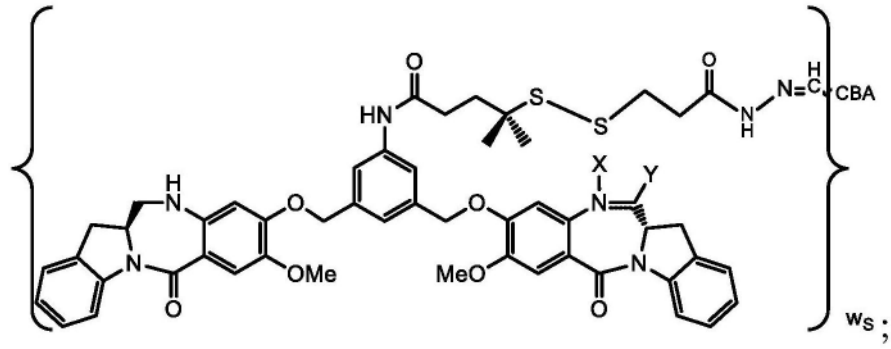
[2155]

[2156] 或其药学上可接受的盐,其中R是H或-SO₃M。

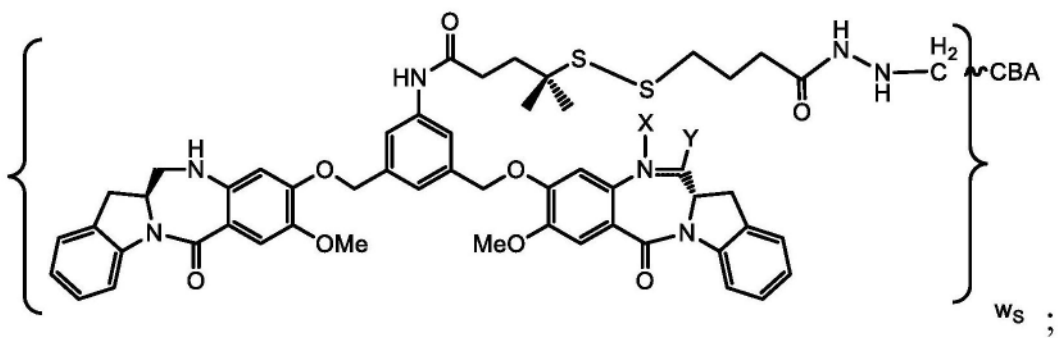
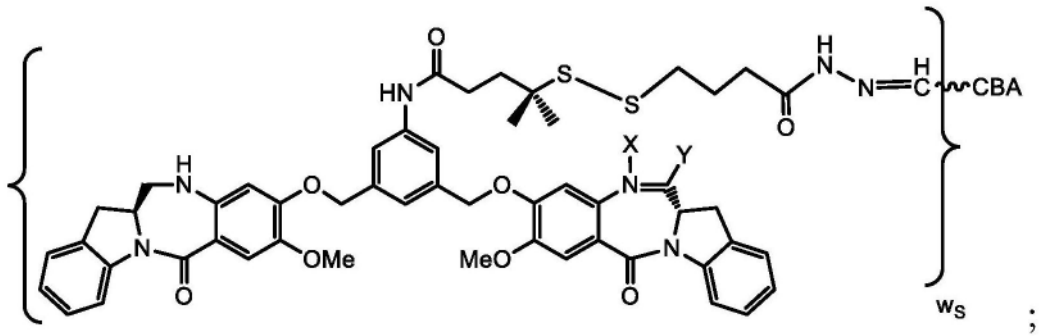
[2157] 88. 如项目86或87所述的免疫缀合物,其中R^e是H或Me;并且R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-,其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基;并且p是0、1、2或3。

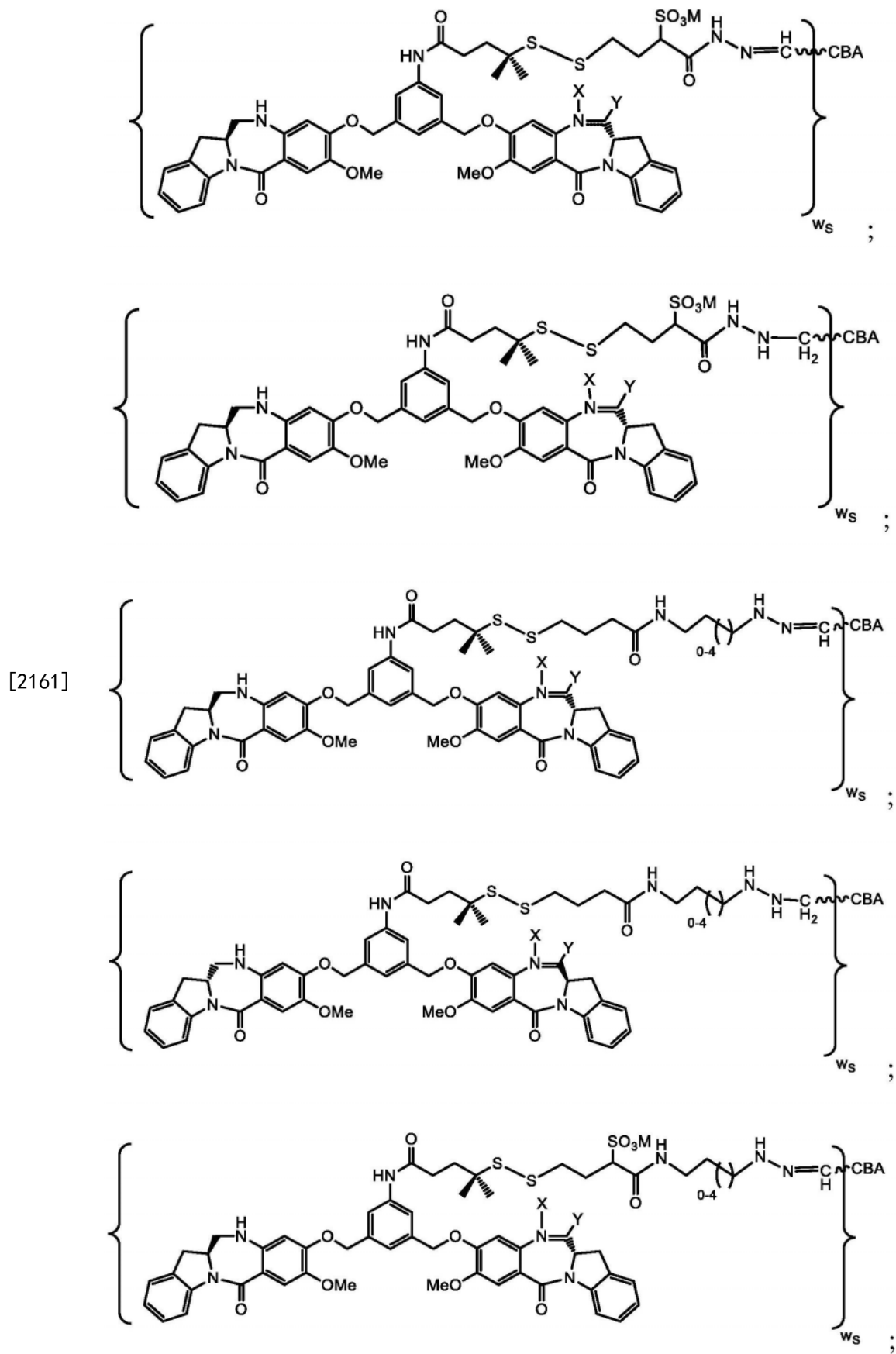
[2158] 89. 如项目88所述的免疫缀合物,其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

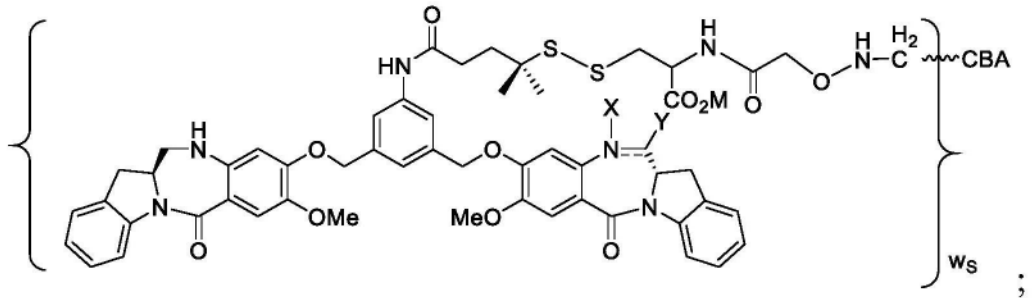
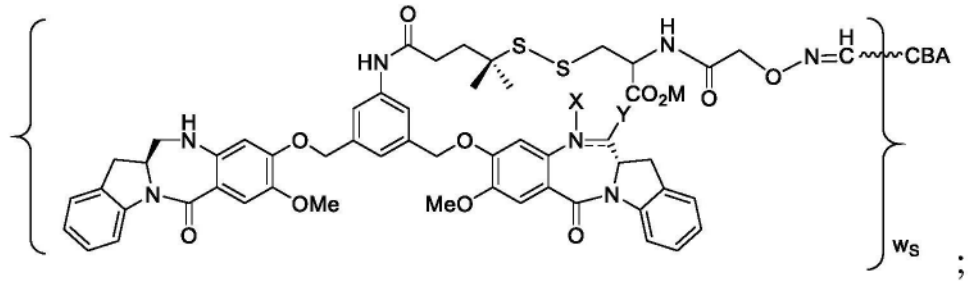
[2159] 90. 如项目86所述的免疫缀合物,其由以下各式表示:



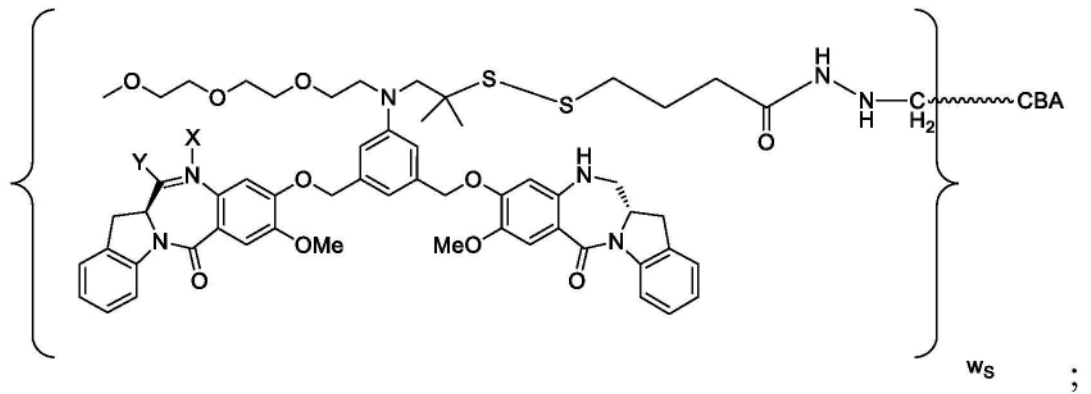
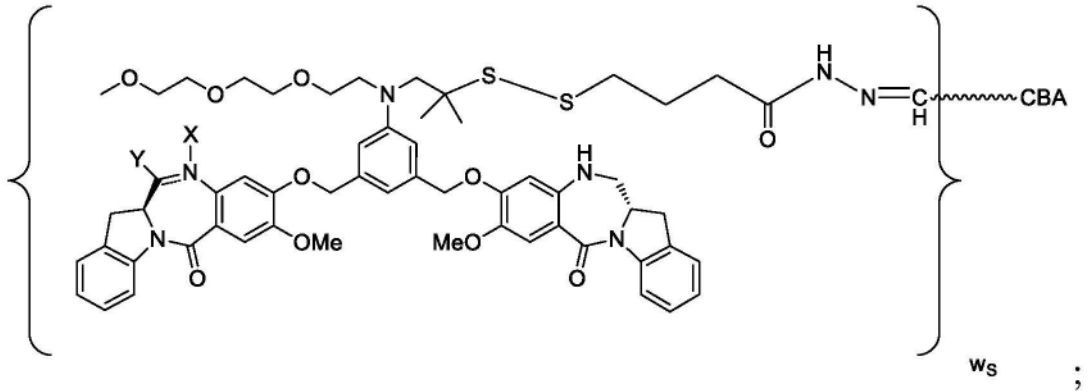
[2160]

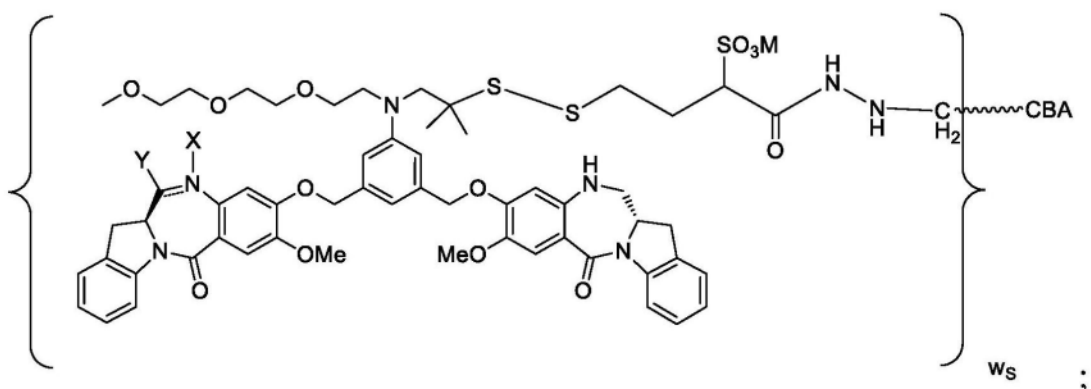
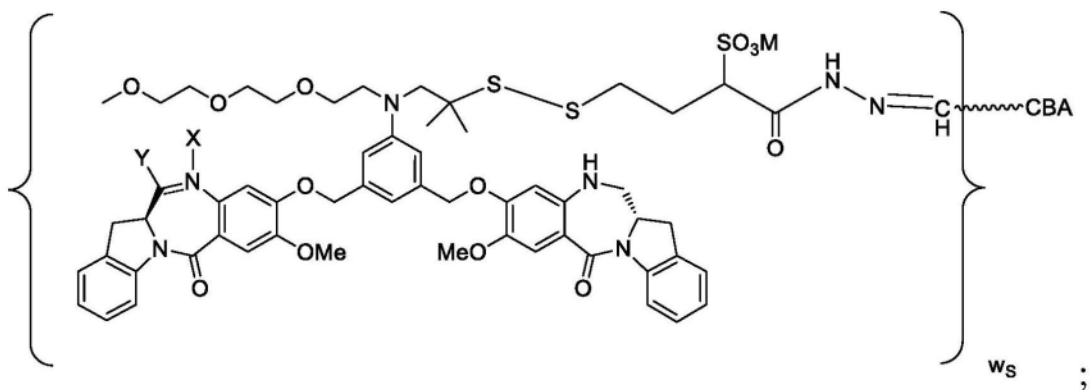




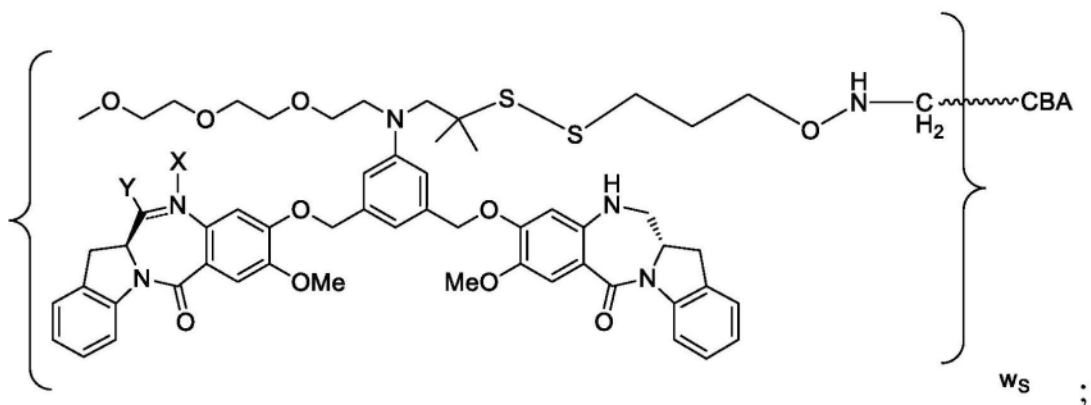
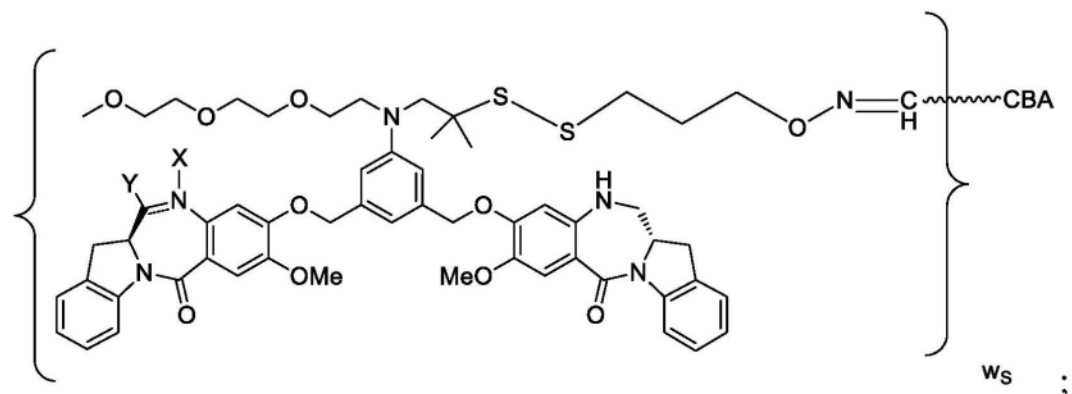


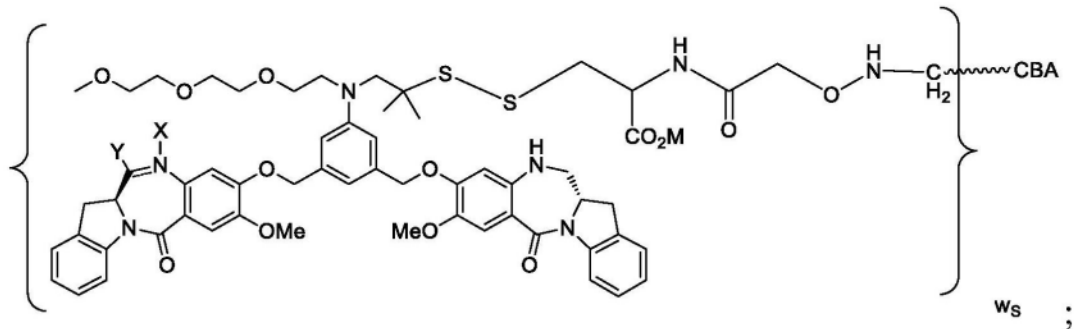
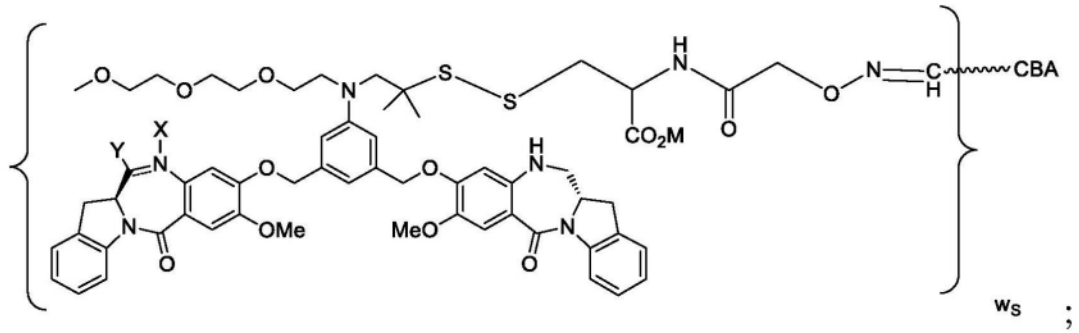
[2163]



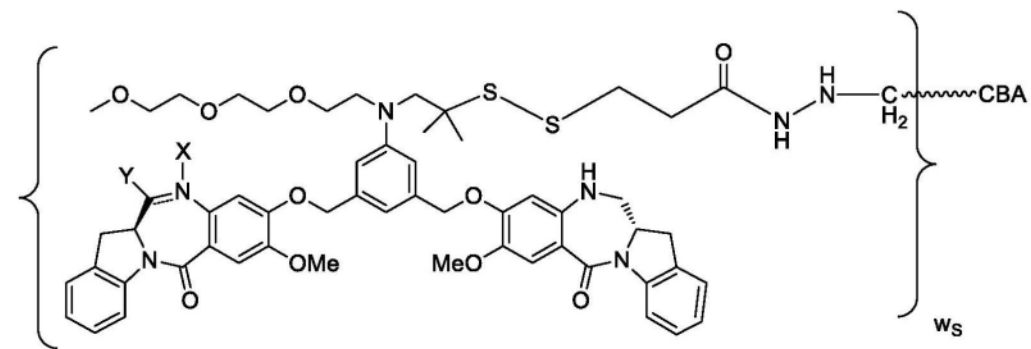
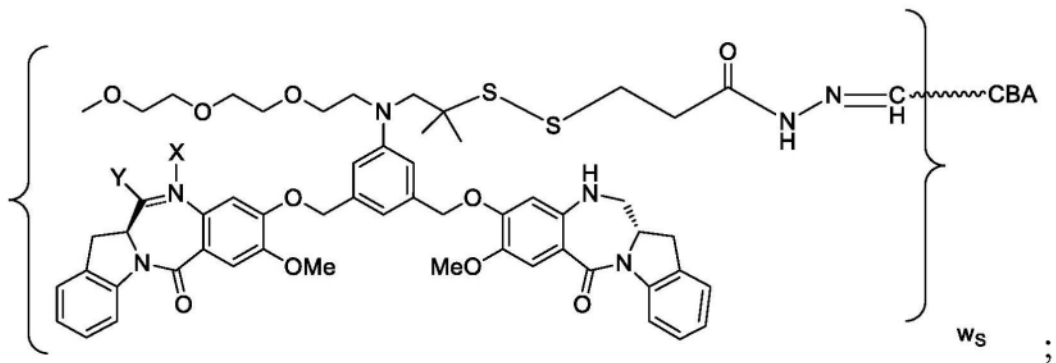


[2164]





[2165]



[2166] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件是当其为双键时,X不存在且Y是-H;并且当其为单键时,X是-H;并且Y是-OH或-SO₃M。

[2167] 91.如项目70-90中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线==表示双键,X不存在且Y是-H。

[2168] 92.如项目79-90中任一项所述的免疫缀合物,其中所述介于N与C之间的双线==表示单键,X是-H且Y是-SO₃M。

[2169] 93. 如项目92所述的免疫缀合物, 其中M是H⁺、Na⁺或K⁺。

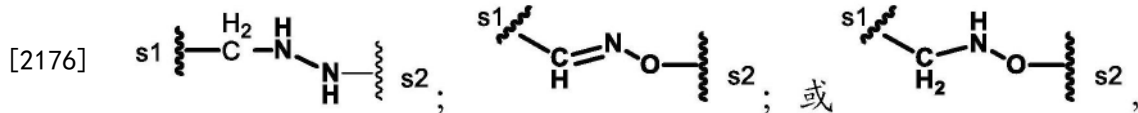
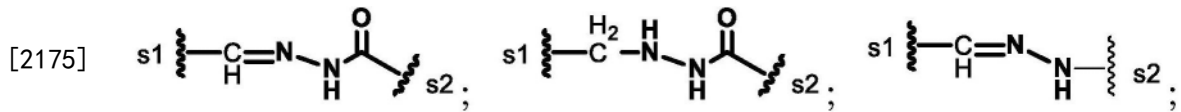
[2170] 94. 一种免疫缀合物, 其具有下式:



[2172] 其中:

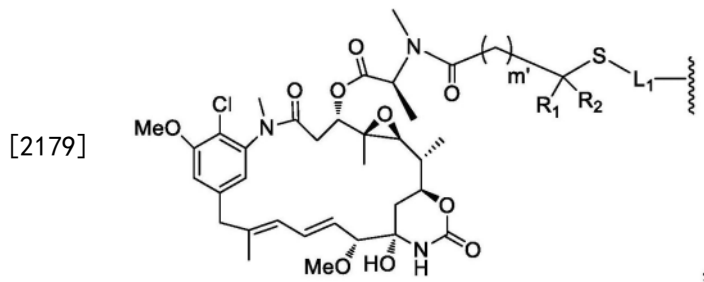
[2173] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽, 其共价连接至J_{CB}'基团;

[2174] J_{CB}'是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与Cy^{s3}上的醛反应性基团反应而形成的部分, 且由以下各式表示:



[2177] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点; 并且s2是与Cy^{s3}共价连接的位点;

[2178] Cy^{s3}由下式表示:

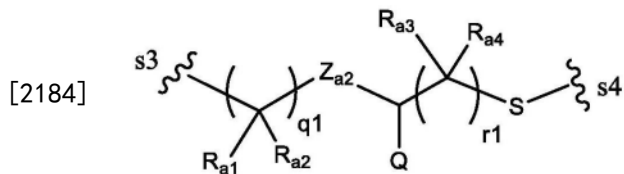


[2180] 其中:

[2181] m'是1或2;

[2182] R₁和R₂各自独立地是H或(C₁-C₃)烷基;

[2183] L₁由下式表示:



[2185] 其中:

[2186] s3是与所述基团J_{CB}'共价连接的位点;

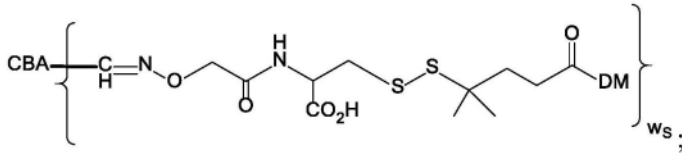
[2187] s4是与Cy^{s3}上的-S-基团共价连接的位点;

[2188] Z_{a2}是不存在、-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

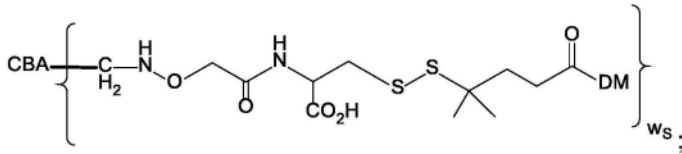
[2189] R₉是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2190] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

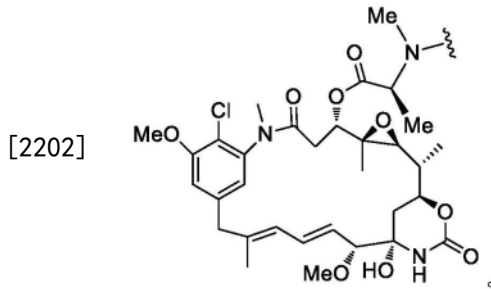
[2191] R_{a1}、R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}在每次出现时独立地是H或(C₁-C₃)烷基; 并且



[2200]



[2201] 或其药学上可接受的盐;其中DM由下式表示:



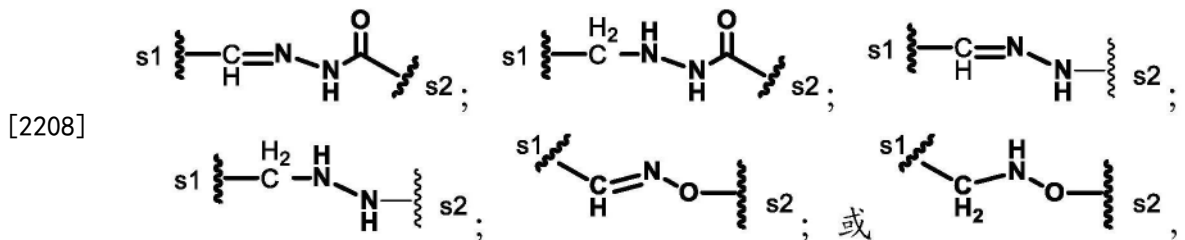
[2203] 99.一种免疫缀合物,其具有下式:



[2205] 其中:

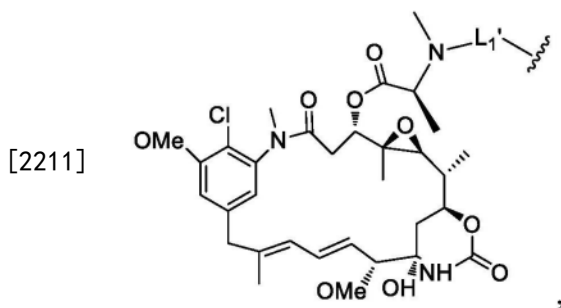
[2206] CBA是如项目27-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如项目66或56中任一项所述的其多肽,其共价连接至 $\text{J}_{\text{CB}'}$ 基团;

[2207] $\text{J}_{\text{CB}'}$ 是通过使来源于如项目27-36中任一项所述的所述抗体或其抗原结合片段或如项目55或56所述的其多肽的N末端上的2-羟基乙胺部分的氧化的醛基与 Cy^{s4} 上的醛反应性基团反应而形成的部分,且由以下各式表示:

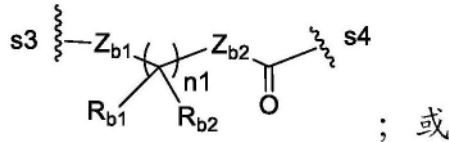


[2209] 其中s1是与所述CBA共价连接的位点;并且s2是与 Cy^{s4} 共价连接的位点;

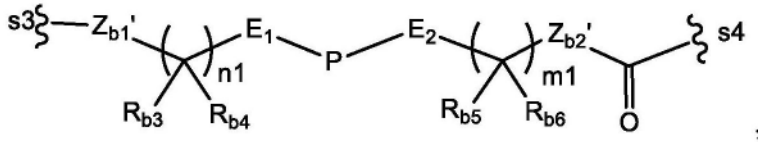
[2210] Cy^{s4} 由以下各式表示:



[2212] L_1' 由以下各式表示:



[2213]



[2214] 其中:

[2215] s_3 是与所述基团 J_{CB}' 基团共价连接的位点;

[2216] s_4 是与 Cy^{s4} 上的-NMe-基团共价连接的位点;

[2217] Z_{b1} 和 Z_{b2} 两者均不存在,或 Z_{b1} 和 Z_{b2} 中的一者不存在且另一者是 $-CH_2-O-$ 或 $-O-CH_2-$;

[2218] Z_{b1}' 和 Z_{b2}' 各自独立地是不存在、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-NR_9-C(=O)-CH_2-$ 或 $-CH_2-C(=O)-NR_9-$;

[2219] R_9 是H或 (C_1-C_3) 烷基;

[2220] n_1 和 m_1 各自独立地是1至6的整数;

[2221] E_1 和 E_2 中的一者是 $-C(=O)-$ 且另一者是 $-NR_9-$;或 E_1 和 E_2 中的一者是 $-C(=O)-$ 或 $-NR_9-$ 且另一者不存在;

[2222] P是氨基酸残基或含有介于2至20个之间的氨基酸残基的肽;并且

[2223] R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_{b4} 、 R_{b5} 和 R_{b6} 在每次出现时各自独立地是H或 (C_1-C_3) 烷基。

[2224] 100.如项目99所述的免疫缀合物,其中 R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_{b4} 、 R_{b5} 和 R_{b6} 都是H。

[2225] 101.如项目100所述的免疫缀合物,其中 R_9 是H。

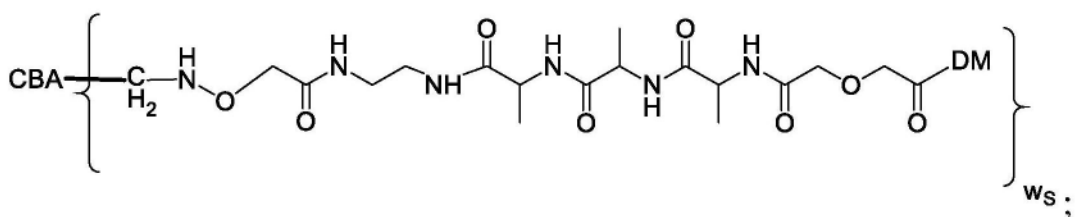
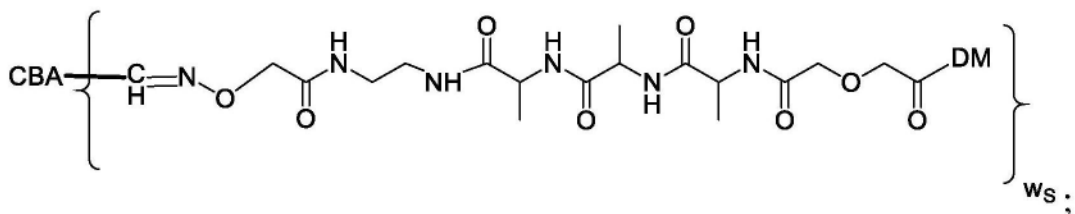
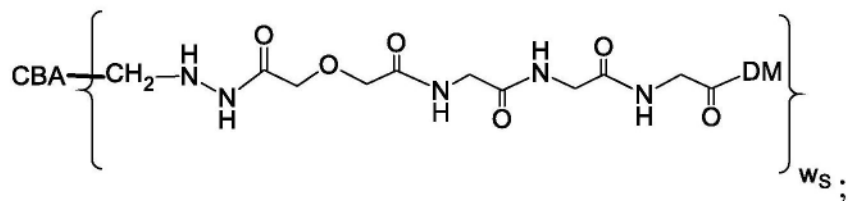
[2226] 102.如项目99-101中任一项所述的免疫缀合物,其中 Z_{b1}' 和 Z_{b2}' 两者均不存在;或 Z_{b1}' 是 $-CH_2-O-$;并且 Z_{b2}' 不存在;或 Z_{b1}' 是 $-CH_2-C(=O)-NR_9-$;并且 Z_{b2}' 是 $-O-CH_2-$ 或不存在。

[2227] 103.如项目99-102中任一项所述的免疫缀合物,其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

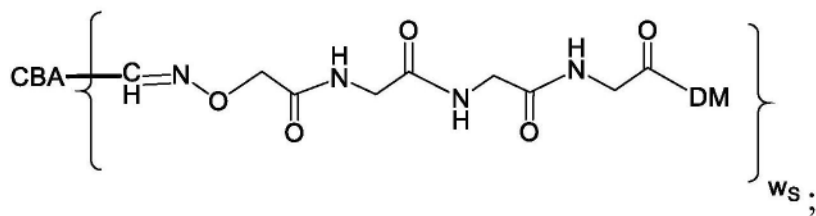
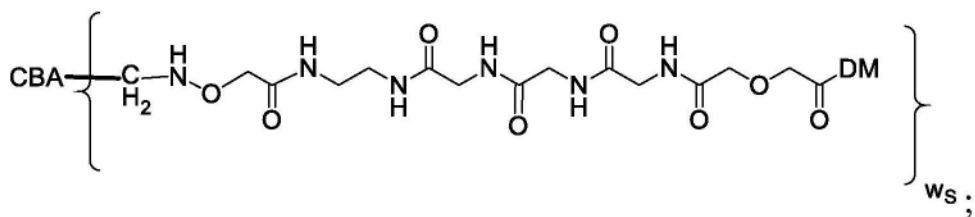
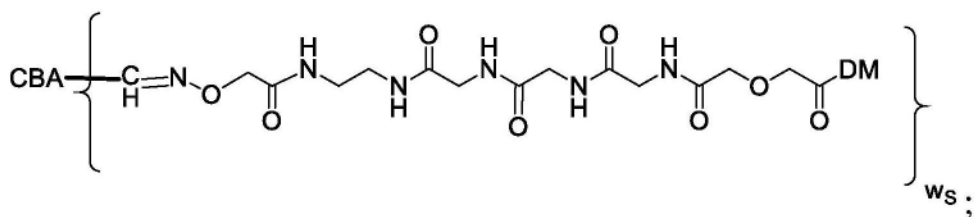
[2228] 104.如项目99-103中任一项所述的免疫缀合物,其中P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

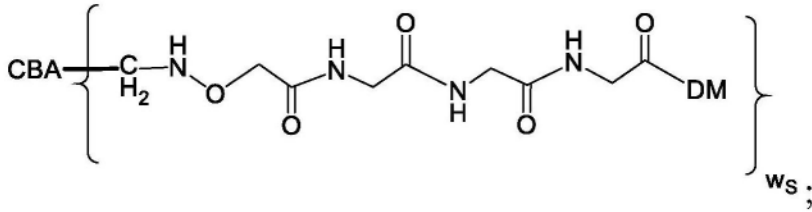
[2229] 105.如项目104所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala和D-Ala-D-Ala。

[2230] 106.如项目99所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由以下各式表示:

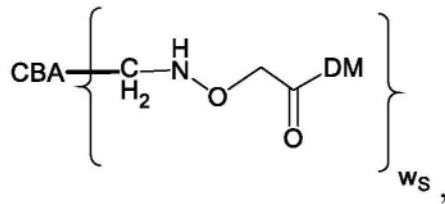
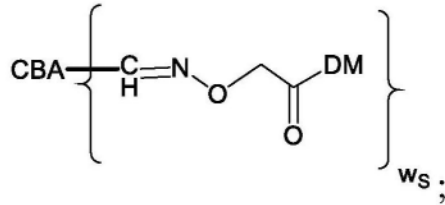


[2232]



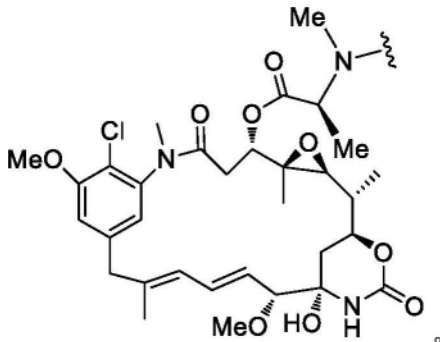


[2233]

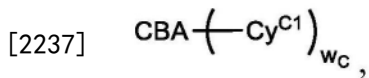


[2234] 或其药学上可接受的盐,其中DM由以下结构式表示:

[2235]

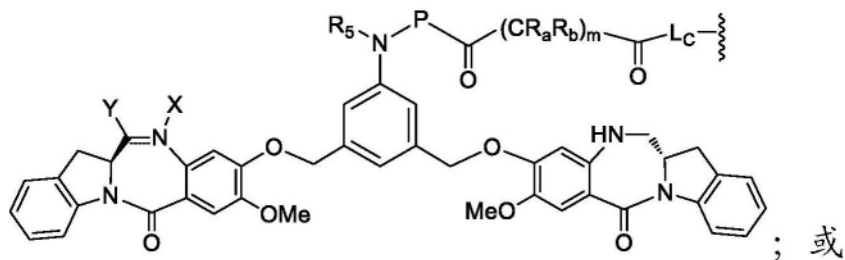


[2236] 107. 一种免疫缀合物,其由下式表示:

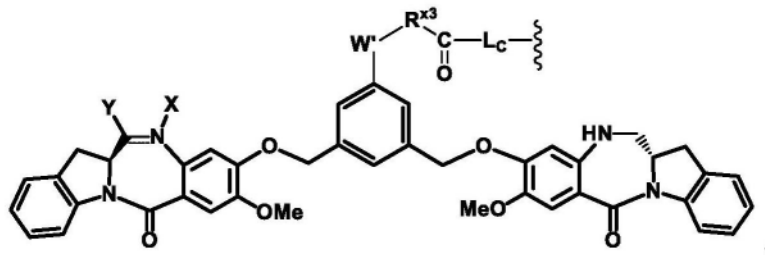


[2238] 其中:

[2239] CBA是如项目37、29、30、38、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至 $\text{Cy}^{\text{C}1}$;[2240] w_c 是1或2;[2241] $\text{Cy}^{\text{C}1}$ 由以下各式表示:



[2242]



[2243] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2244] 介于N与C之间的双线 \equiv 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或(C₁-C₄)烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或-SO₃M,且M是H⁺或阳离子;

[2245] R₅是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2246] P是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;

[2247] R_a和R_b在每次出现时独立地是-H、(C₁-C₃)烷基或带电荷的取代基或可离子化基团Q;

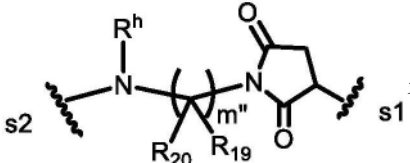
[2248] W'是-NR^{e'};

[2249] R^{e'}是-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[2250] n是2至6的整数;

[2251] R^k是-H或-Me;

[2252] R^{x3}是(C₁-C₆)烷基;并且

[2253] L_C由  表示,s1是与CBA共价连接的位点,且s2是与Cy^{C1}

上的-C(=O)-基团共价连接的位点;其中:

[2254] R₁₉和R₂₀在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2255] m''是介于1与10之间的整数;并且

[2256] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基。

[2257] 108.如项目107所述的免疫缀合物,其中R_a和R_b两者均是H;并且R₅是H或Me。

[2258] 109.如项目107或108所述的免疫缀合物,其中P是含有2至5个氨基酸残基的肽。

[2259] 110.如项目107-109中任一项所述的免疫缀合物,其中P选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-

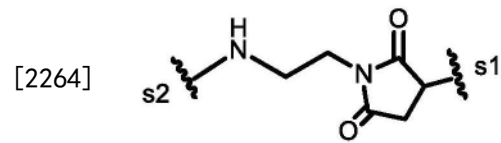
Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met以及Met-Ala。

[2260] 111. 如项目110所述的免疫缀合物,其中P是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

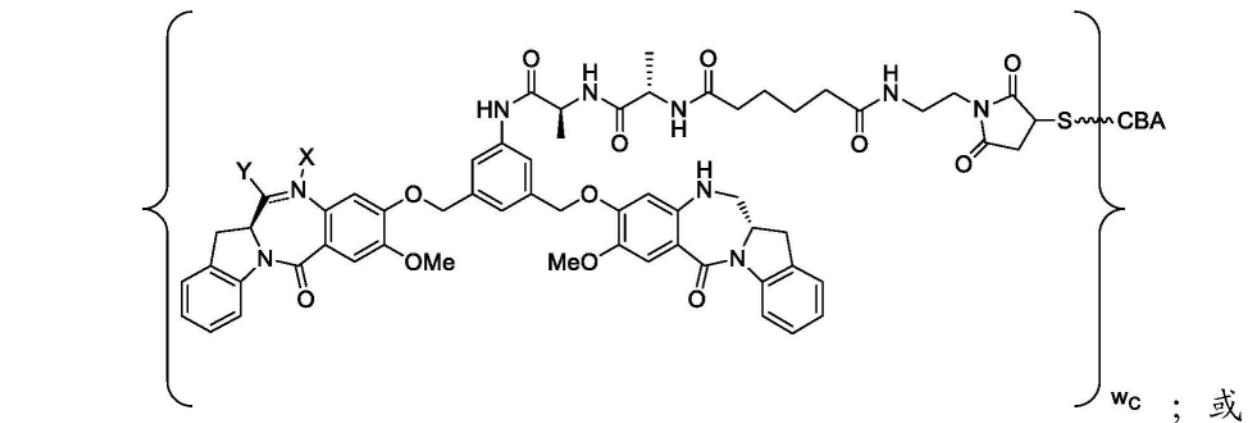
[2261] 112. 如项目107-111中任一项所述的免疫缀合物,其中Q是 $-SO_3M$ 。

[2262] 113. 如项目107-112中任一项所述的免疫缀合物,其中 R_{19} 和 R_{20} 两者均是H;并且m”是1至6的整数。

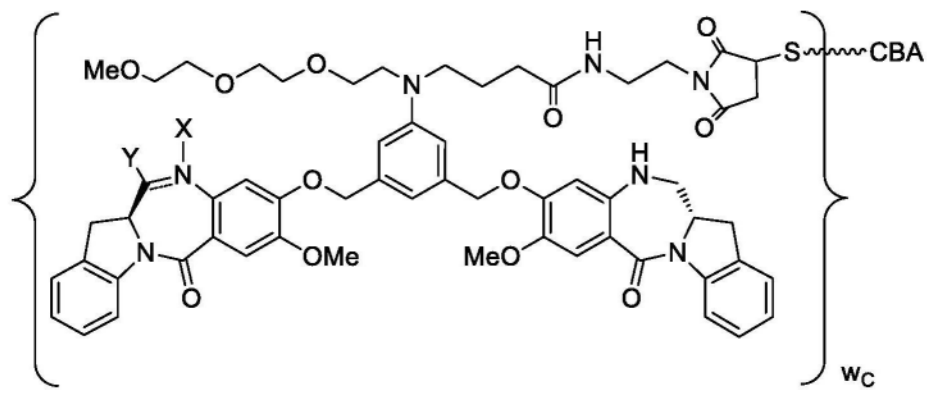
[2263] 114. 如项目113所述的免疫缀合物,其中 $-L_c-$ 由下式表示:



[2265] 115. 如项目107所述的免疫缀合物,其由以下各式表示:

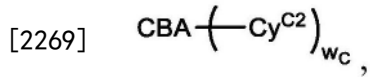


[2266]



[2267] 或其药学上可接受的盐,其中所述介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H;且当其是单键时,X是-H且Y是-OH或 $-SO_3M$ 。

[2268] 116. 一种免疫缀合物,其由下式表示:

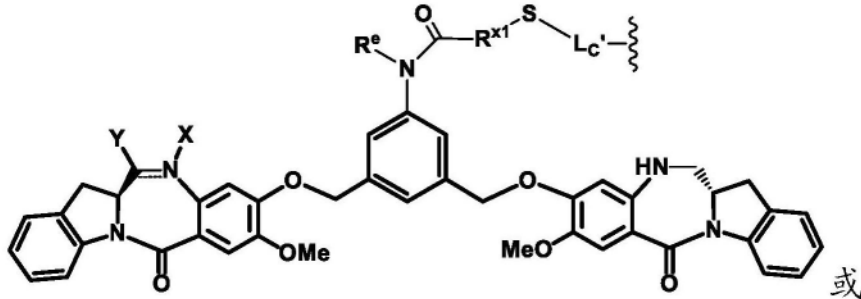


[2270] 其中:

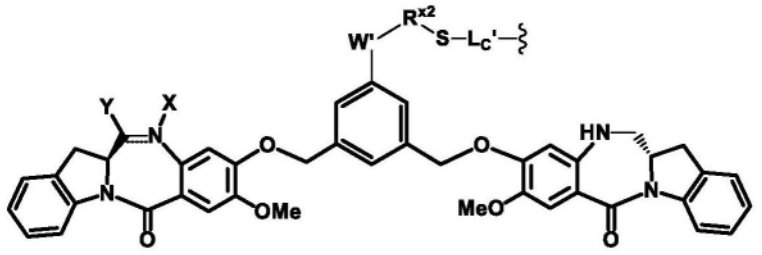
[2271] CBA是如项目37、29、30、38、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至 Cy^{C2} ;

[2272] w_c 是1或2;

[2273] Cy^{C2} 由以下各式表示:



[2274]



[2275] 或其药学上可接受的盐,其中:

[2276] 介于N与C之间的双线 $=$ 表示单键或双键,其限制条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H或 (C_1-C_4) 烷基;并且当其是单键时,X是-H或胺保护部分,Y是-OH或 $-SO_3M$,且M是 H^+ 或阳离子;

[2277] R^{x1} 是 (C_1-C_6) 烷基;

[2278] R^e 是-H或 (C_1-C_6) 烷基;

[2279] W' 是 $-NR^{e'}$;

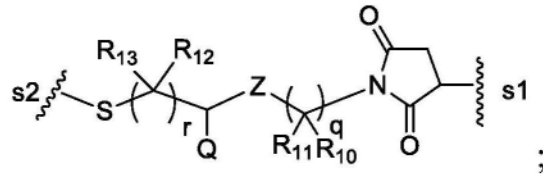
[2280] $R^{e'}$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

[2281] n是2至6的整数;

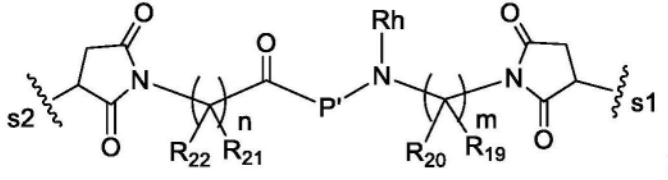
[2282] R^k 是-H或-Me;

[2283] R^{x2} 是 (C_1-C_6) 烷基;

[2284] L_c' 由以下各式表示:



[2285]



[2286] 其中:

[2287] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C2}上的-S-基团共价连接的位点;[2288] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[2289] Q是-H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[2290] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2291] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[2292] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

[2293] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

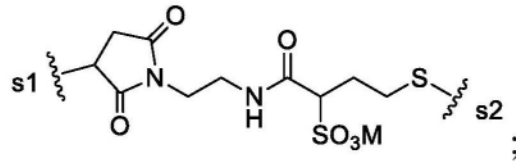
[2294] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

[2295] 117.如项目116所述的免疫缀合物,其中P'是含有2至5个氨基酸残基的肽。

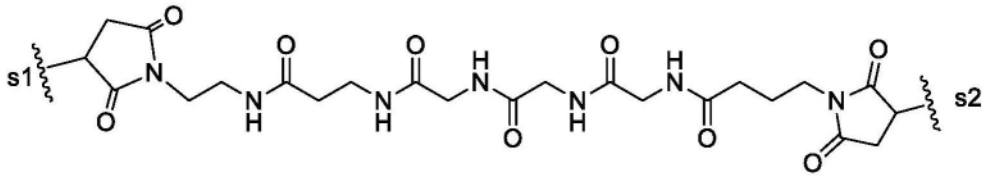
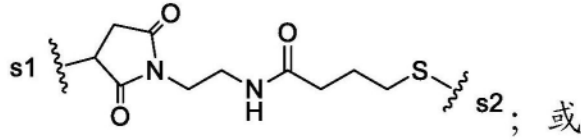
[2296] 118.如项目116或117所述的免疫缀合物,其中P'选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

[2297] 119.如项目118所述的免疫缀合物,其中P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[2298] 120.如项目116所述的免疫缀合物,其中-L_c'-由以下各式表示:



[2299]

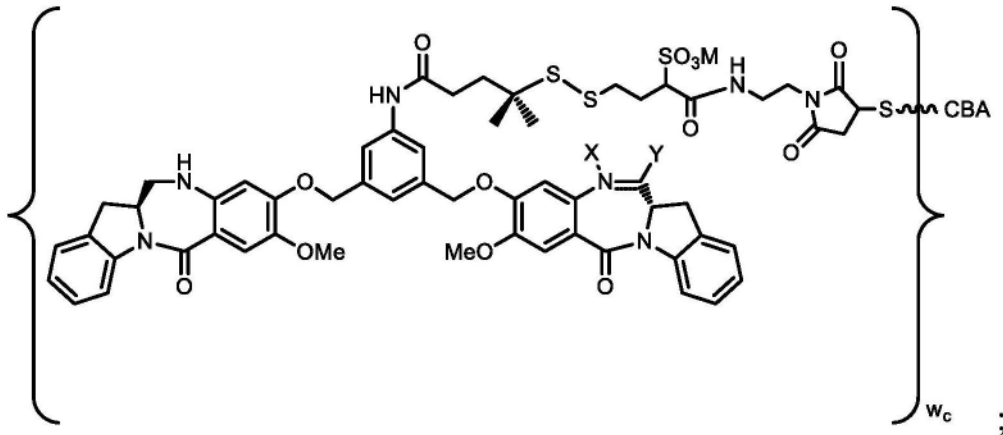


[2300] 121. 如项目116-120中任一项所述的免疫缀合物, R^e是H或Me; R^{x1}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, 且R^{x2}是-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, 其中R^f和R^g各自独立地是-H或(C₁-C₄)烷基; 并且p是0、1、2或3。

[2301] 122. 如项目121所述的免疫缀合物, 其中R^f与R^g相同或不同且选自-H和-Me。

[2302] 123. 如项目116所述的免疫缀合物, 其由以下各式表示:

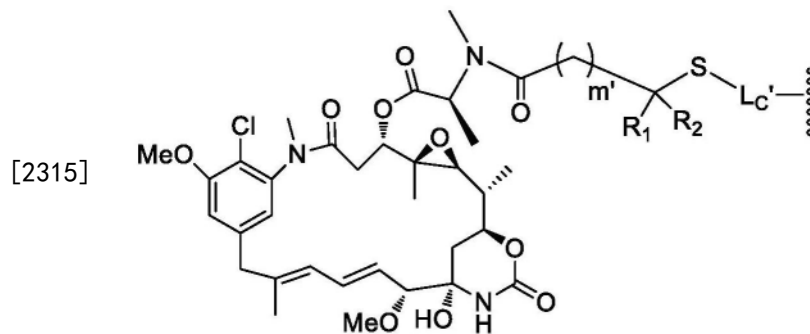
[2303]



项目55或56所述的其多肽,其通过半胱氨酸残基共价连接至Cy^{C3};

[2313] W_C是1或2;

[2314] Cy^{C3}由下式表示:

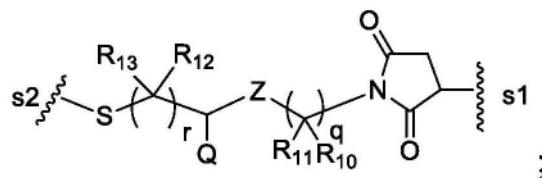


[2316] 其中:

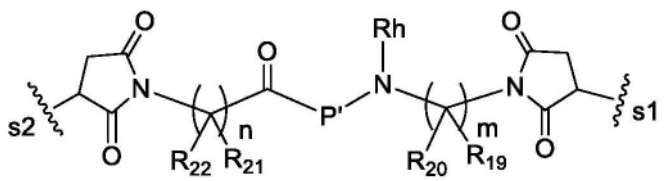
[2317] m'是1或2;

[2318] R₁和R₂各自独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2319] L_C'由以下各式表示:



[2320]



[2321] 其中:

[2322] s1是与所述CBA共价连接的位点且s2是与Cy^{C3}上的-S-基团共价连接的位点;

[2323] Z是-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

[2324] Q是H、带电荷的取代基或可离子化基团;

[2325] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₉、R₂₀、R₂₁和R₂₂在每次出现时独立地是-H或(C₁-C₃)烷基;

[2326] q和r在每次出现时独立地是介于0与10之间的整数;

[2327] m和n各自独立地是介于0与10之间的整数;

[2328] R^h是-H或(C₁-C₃)烷基;并且

[2329] P'是氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽。

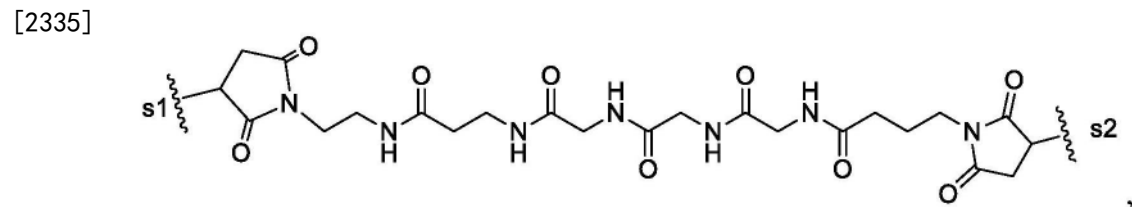
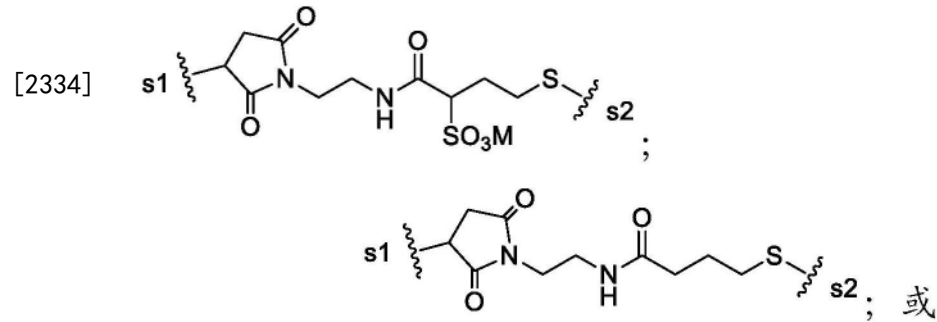
[2330] 128. 如项目127所述的免疫缀合物,其中P'是含有2至5个氨基酸残基的肽。

[2331] 129. 如项目127或128所述的免疫缀合物,其中P'选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:73)、Val-Arg、Arg-Val、

Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met和Met-Ala。

[2332] 130. 如项目129所述的免疫缀合物, 其中P'是Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[2333] 131. 如项目127所述的免疫缀合物, 其中-L_c'-由以下各式表示:

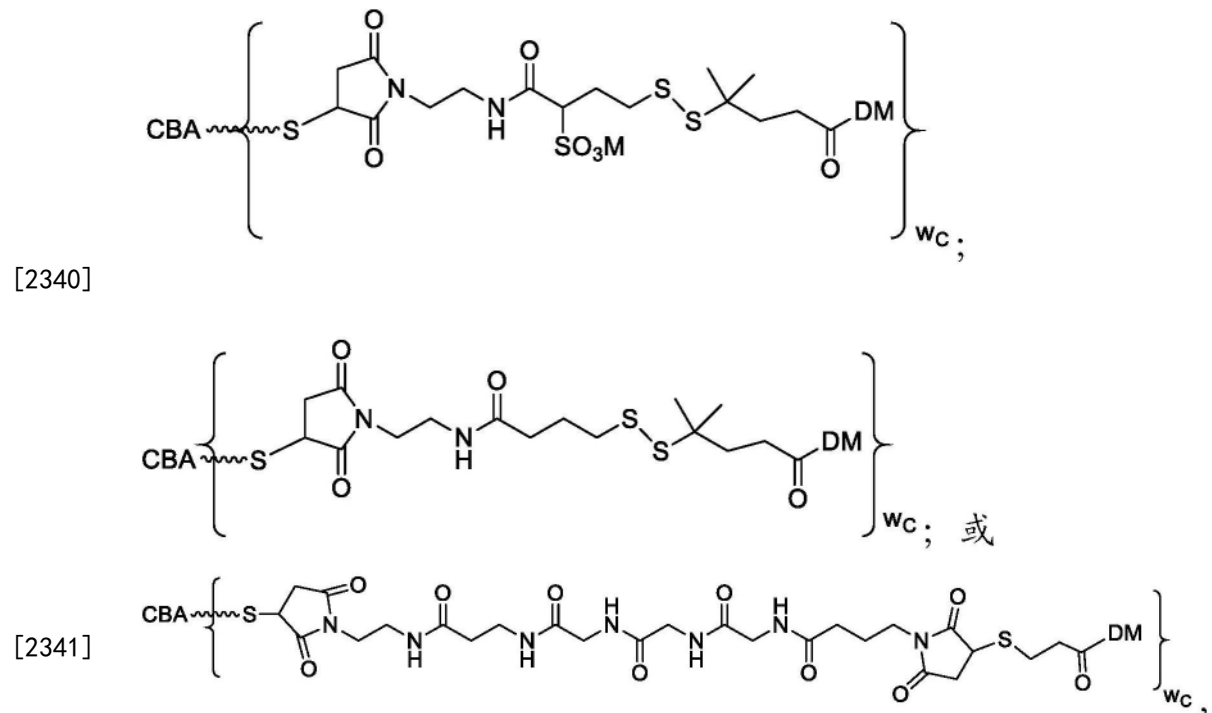


[2336] 其中M是H⁺或阳离子。

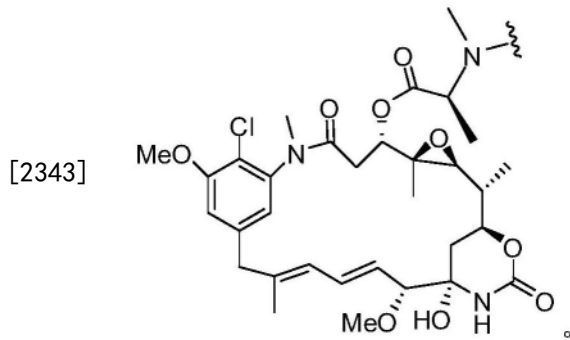
[2337] 132. 如项目127-131中任一项所述的免疫缀合物, 其中m'是1, 且R₁和R₂两者均是H。

[2338] 133. 如项目127-131中任一项所述的免疫缀合物, 其中m'是2, 且R₁和R₂两者均是Me。

[2339] 134. 如项目127所述的免疫缀合物, 其中所述免疫缀合物由以下各式表示:



[2342] 或其药学上可接受的盐,其中DM是由下式表示的药物部分:



[2344] 135. 一种药物组合物,其包含如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,和药学上可接受的载体。

[2345] 136. 一种用于抑制表达CD123的细胞的生长的方法,所述方法包括使所述细胞与如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物接触。

[2346] 137. 如项目136所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。

[2347] 138. 如项目137所述的方法,其中所述细胞是白血病细胞或淋巴瘤细胞。

[2348] 139. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述癌症的细胞表达CD123,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物。

[2349] 140. 如项目139所述的方法,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

[2350] 141. 如项目139所述的方法,其中所述癌症选自由以下各项组成的组:急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[2351] 142. 如项目141所述的方法,其中所述癌症是急性骨髓性白血病(AML)。

[2352] 143. 如项目141所述的方法,其中所述癌症是B细胞急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL)。

[2353] 144. 一种用于治疗受试者的细胞增殖性病症的方法,其中所述细胞增殖性病症的细胞表达CD123,所述方法包括以足以治疗所述细胞增殖性病症的量向所述受试者施用治疗有效量的如项目1-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如项目55或56所述的多肽,或如项目60-134中任一项所述的免疫缀合物,或如项目135所述的药物组合物。

[2354] 145. 如项目144所述的方法,其中所述细胞增殖性病症选自由以下各项组成的组:急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B细胞谱系急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、骨髓发育不良综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤以及霍奇金氏白血病(HL)。

对TF-1细胞的IL3依赖性增殖抑制

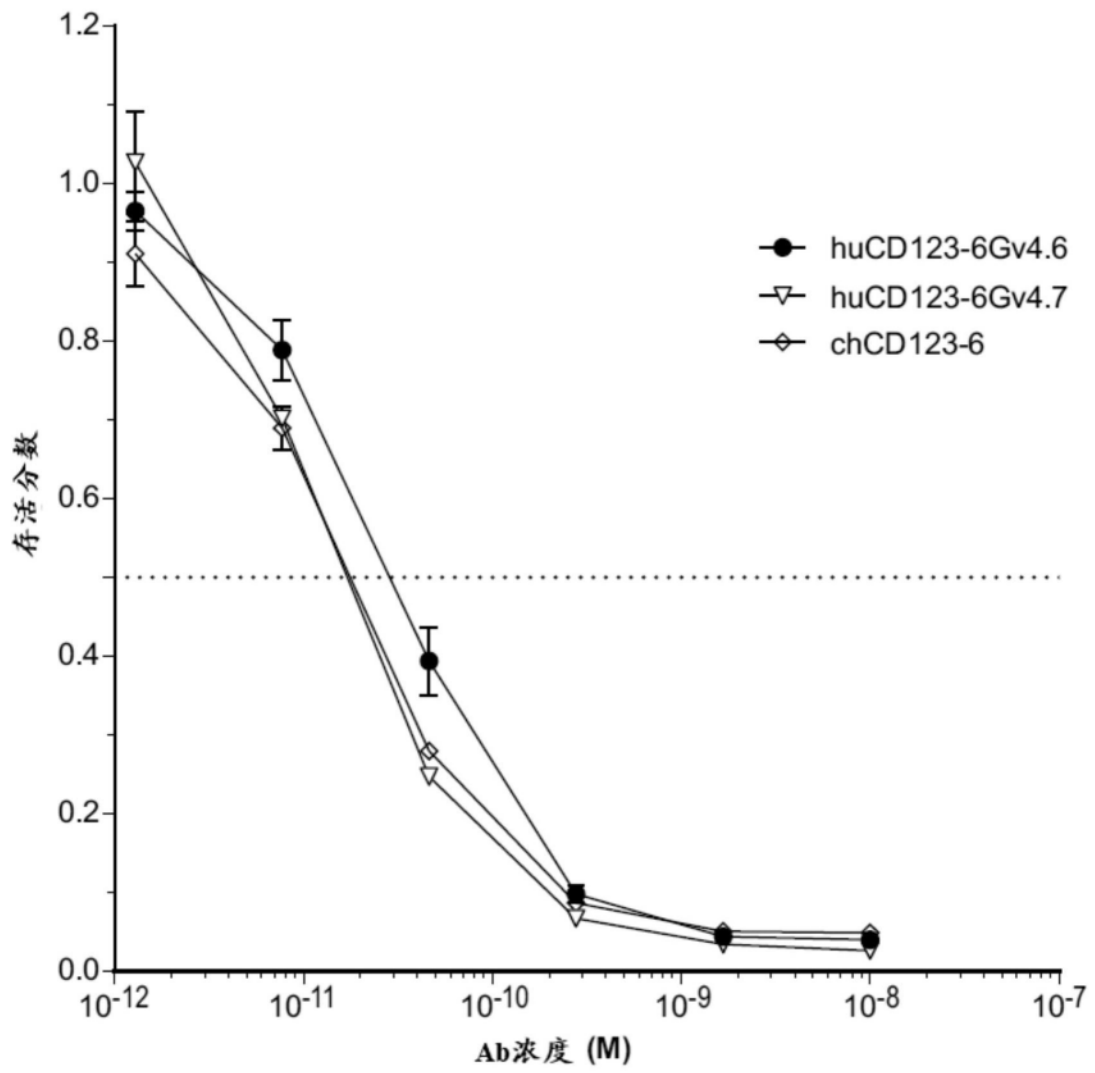


图1

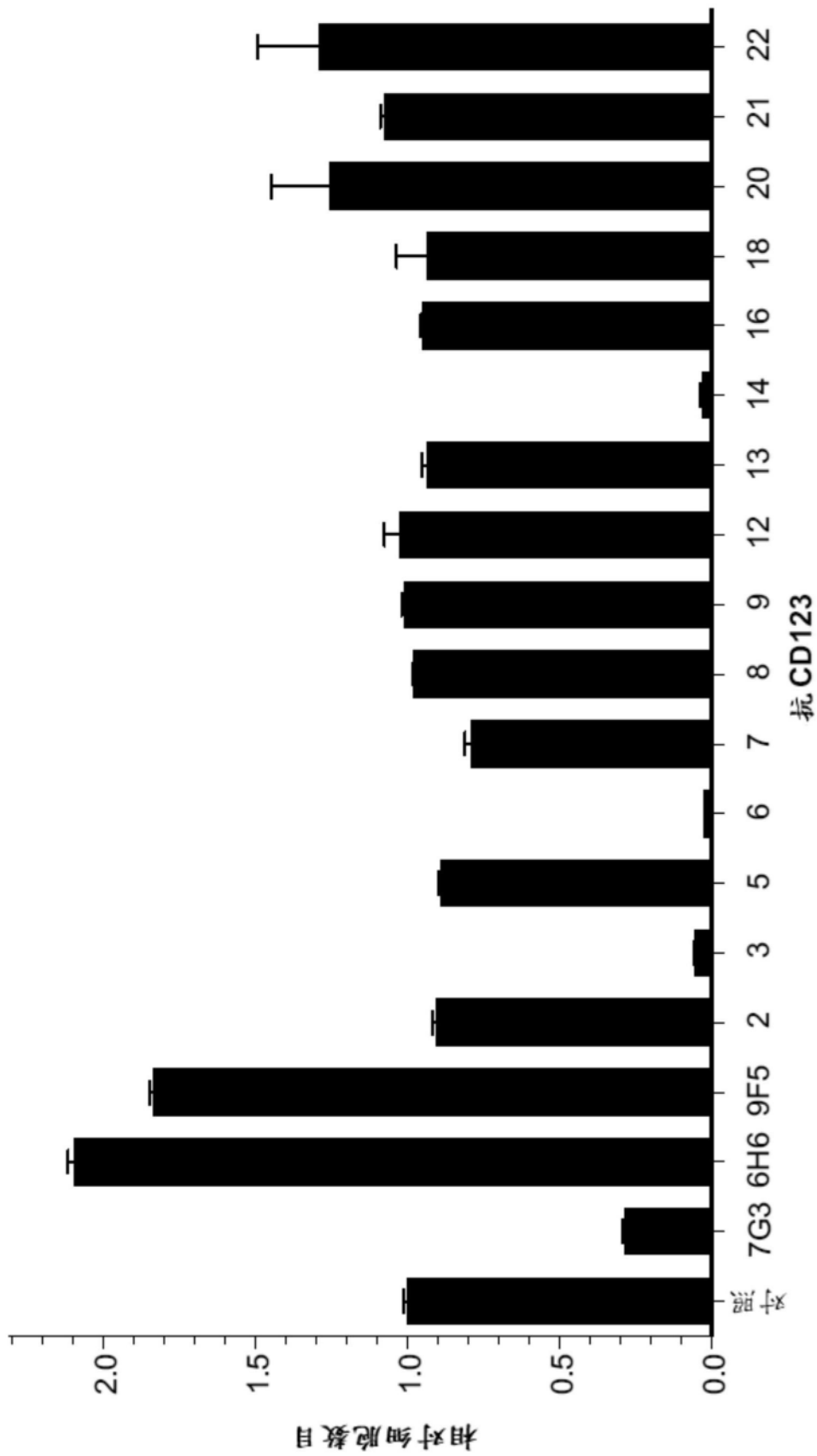


图2A

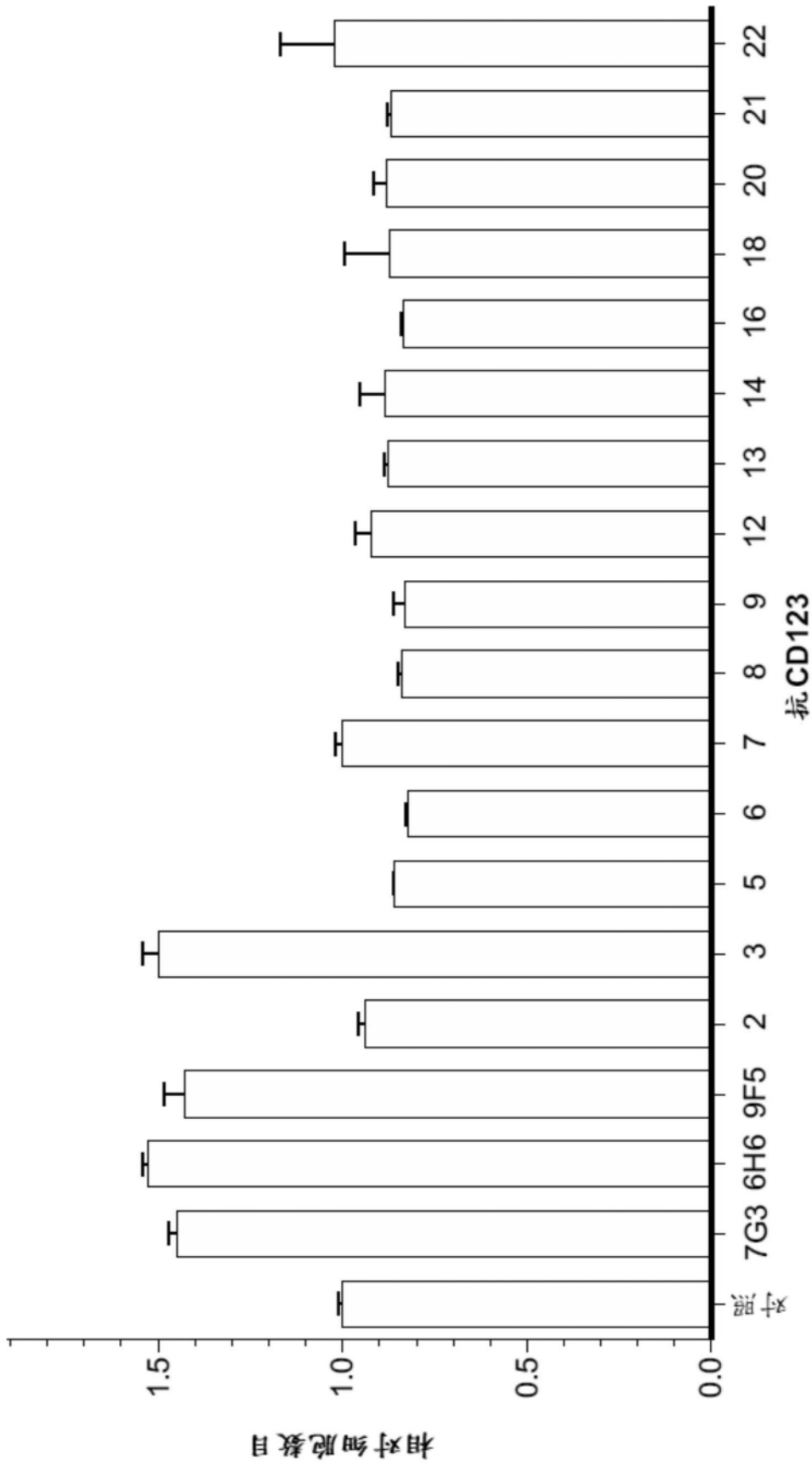


图2B

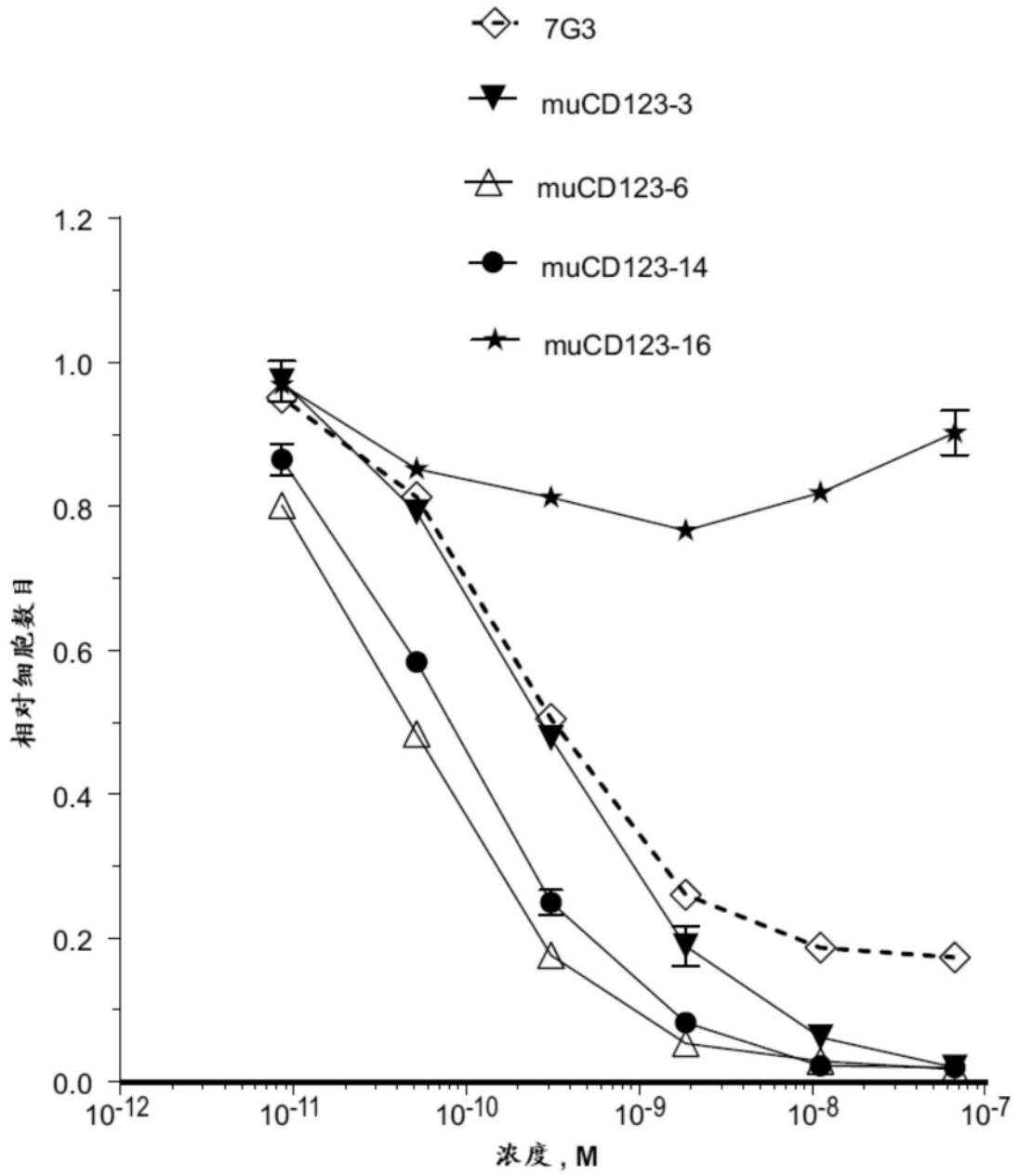


图3

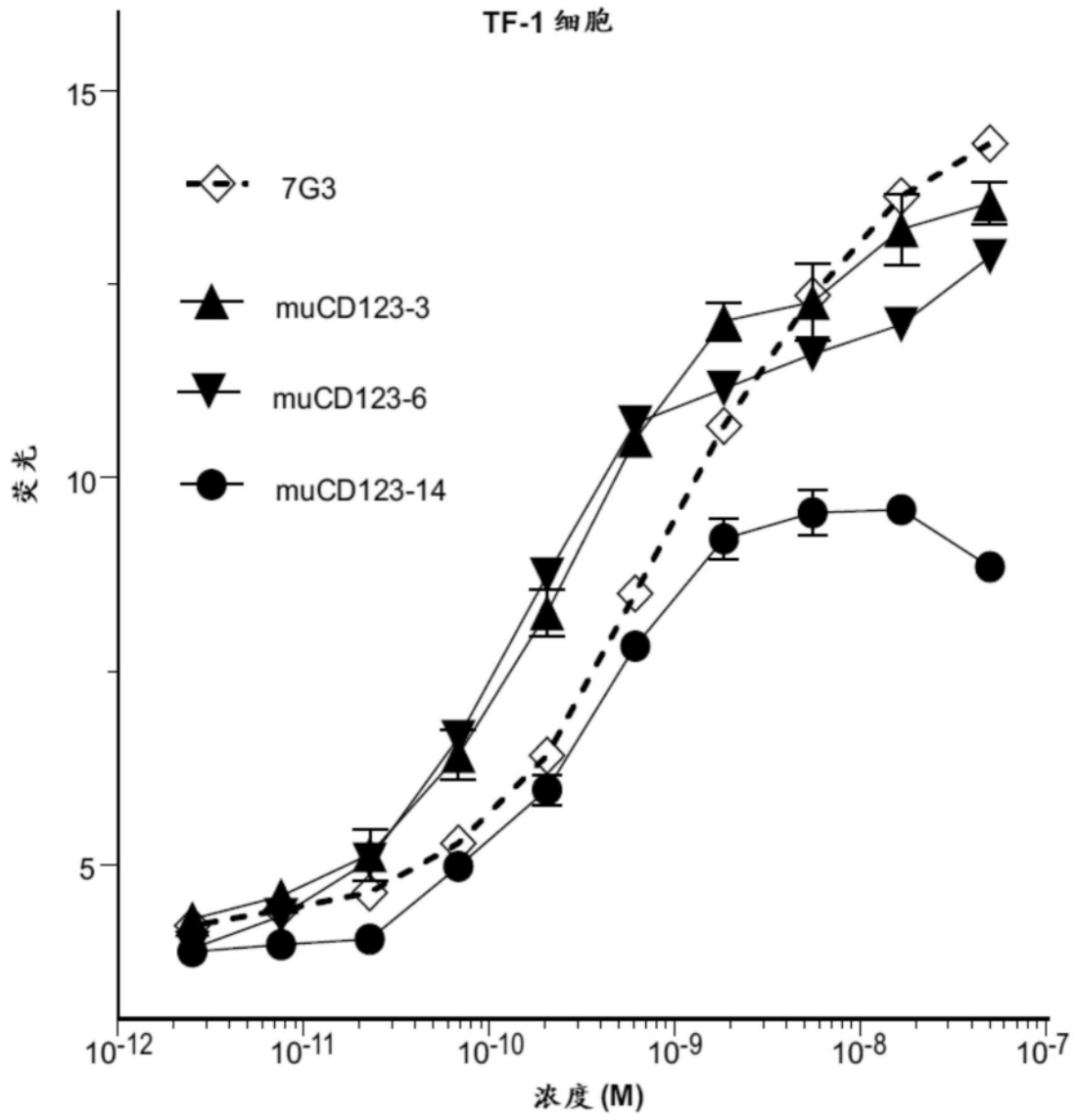


图4A

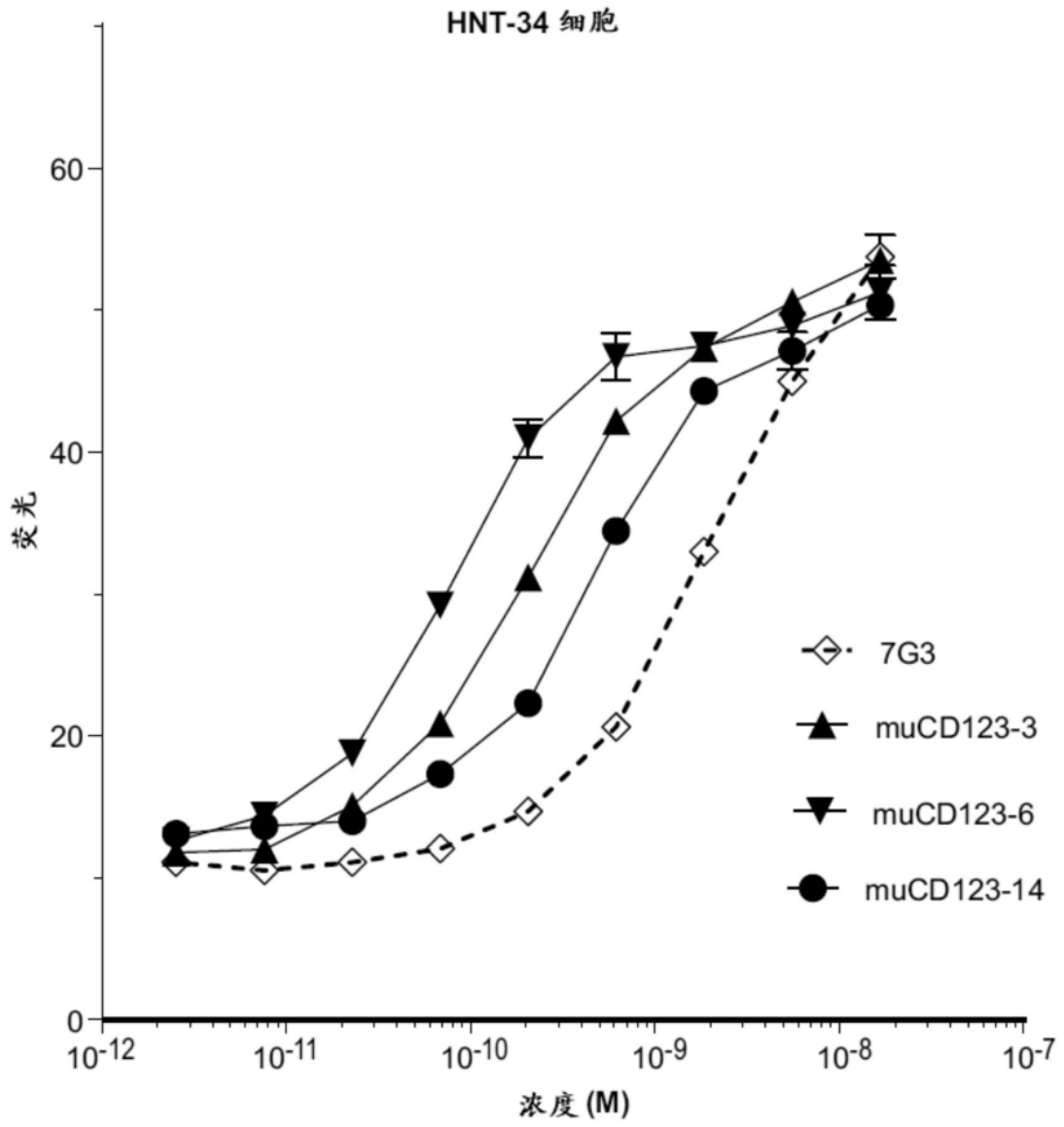


图4B

HNT-34 细胞

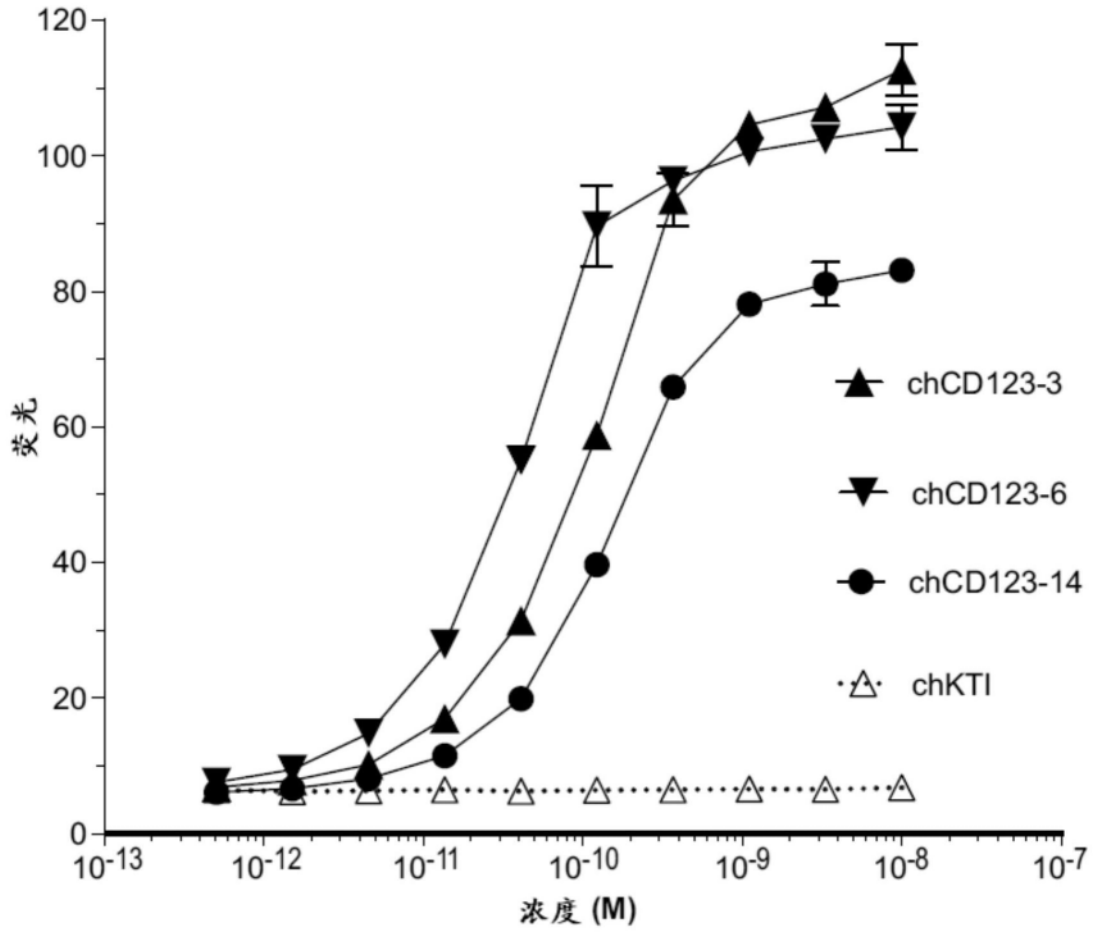


图5A

MOLM-13细胞

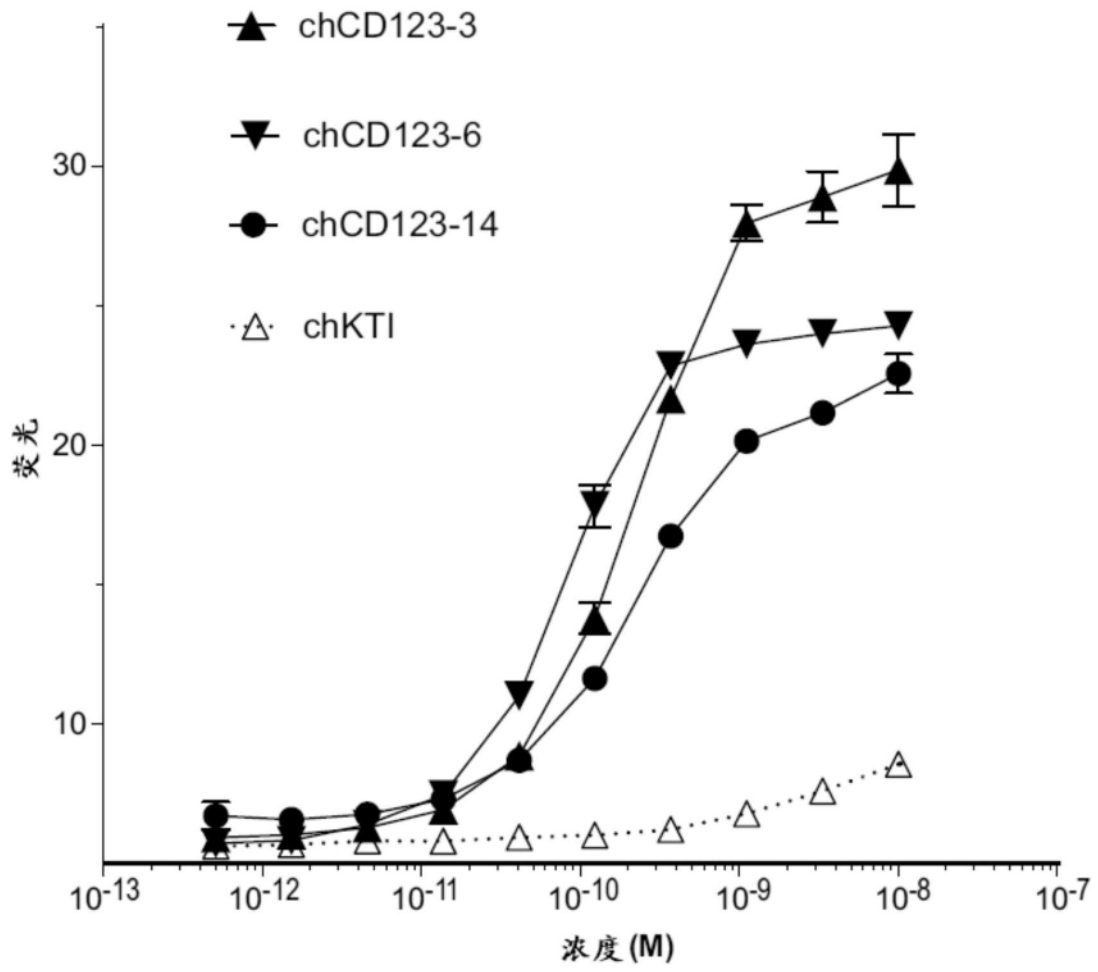


图5B

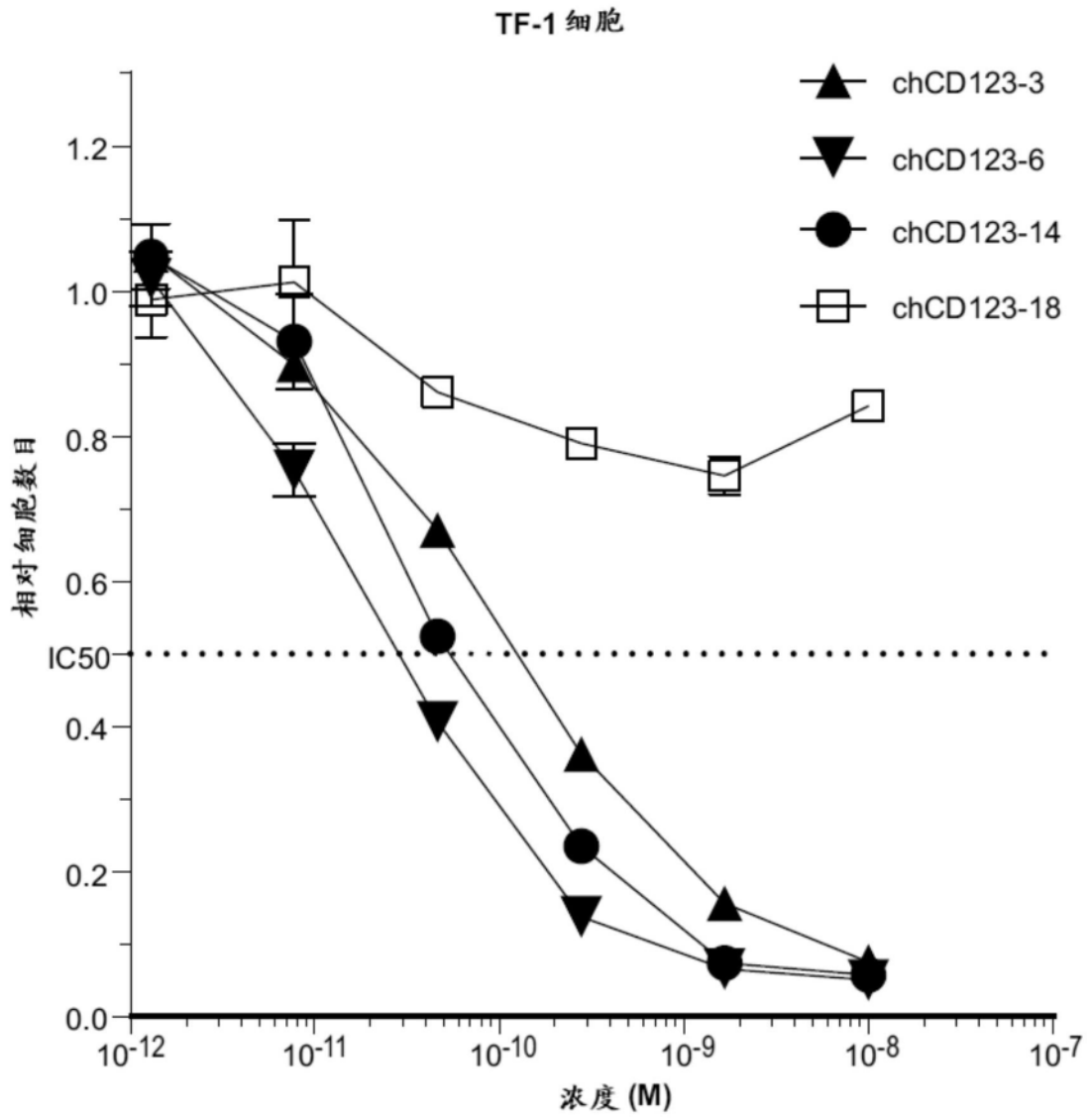


图6

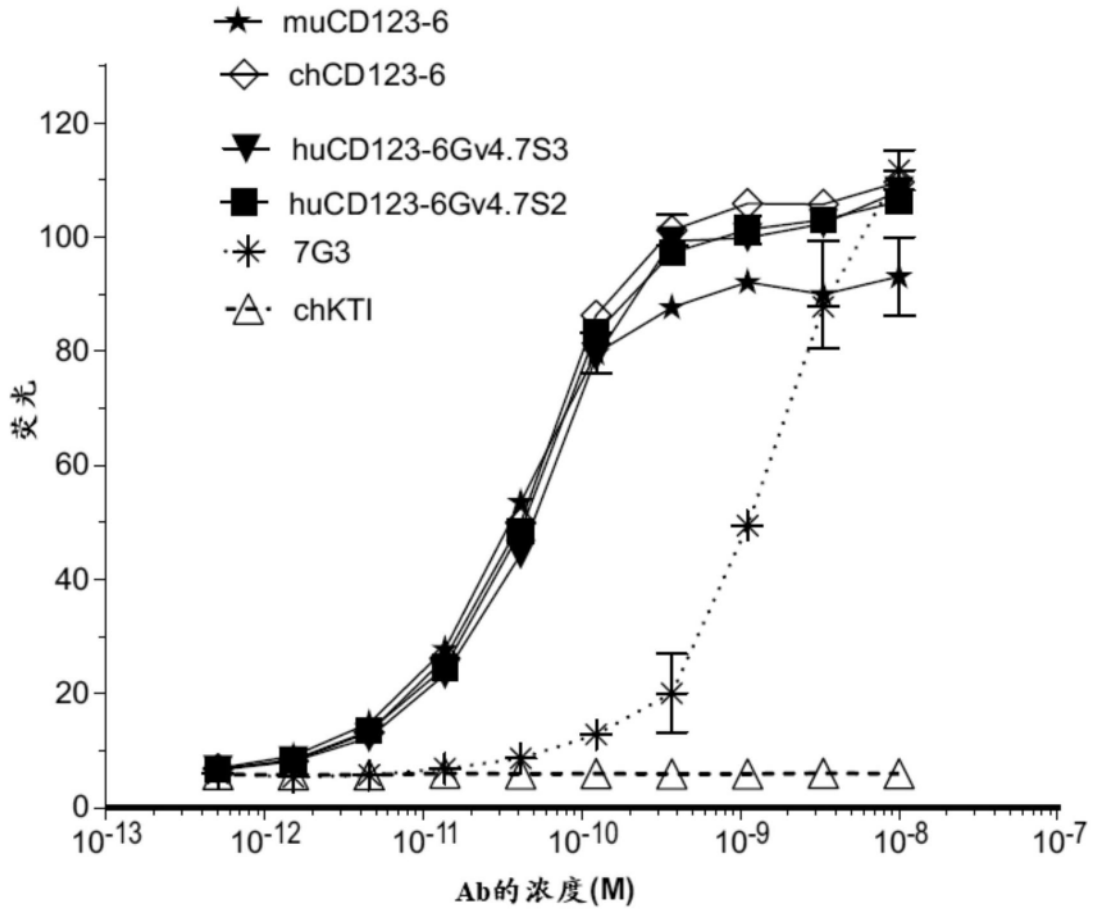


图7A

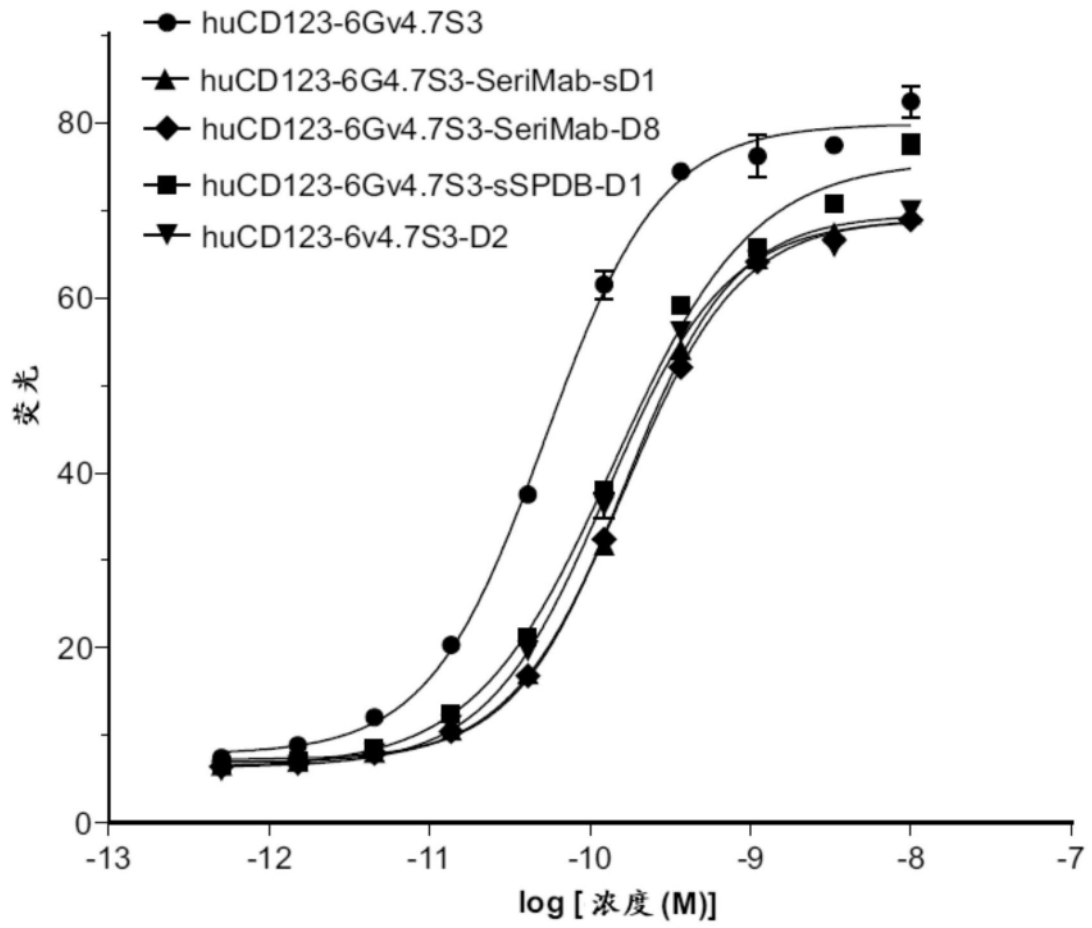


图7B

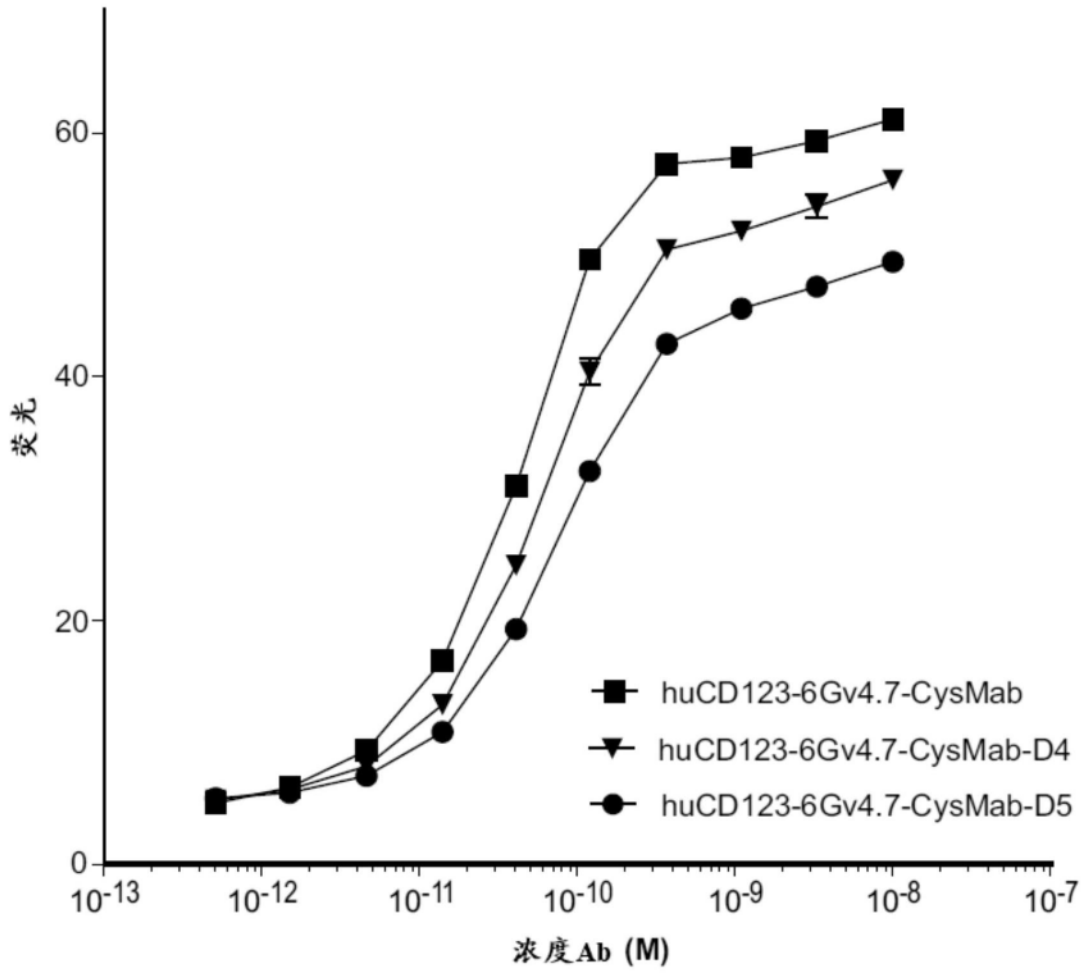


图7C

在IL-3存在下培养的TF-1细胞

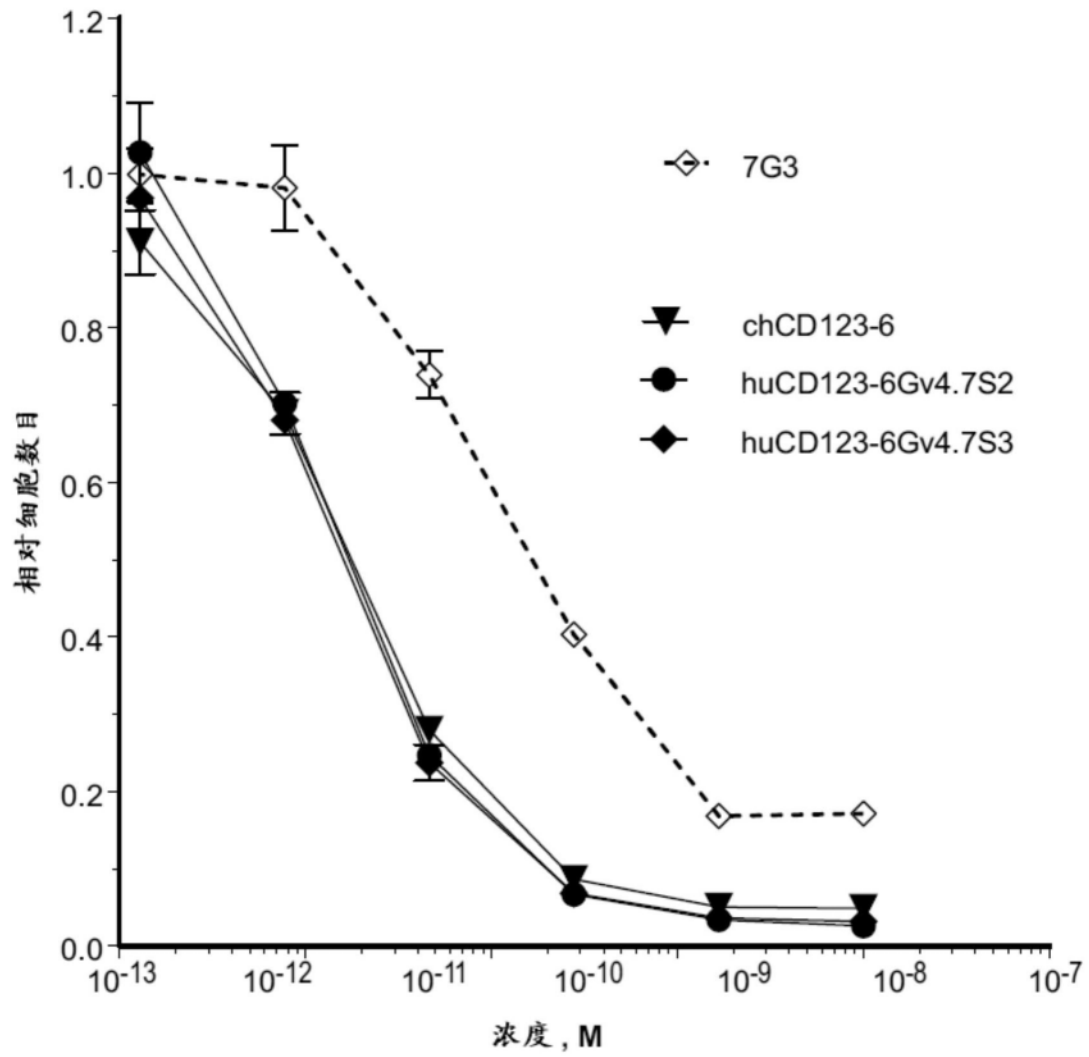


图8A

在GM-CSF存在下培养的TF-1细胞

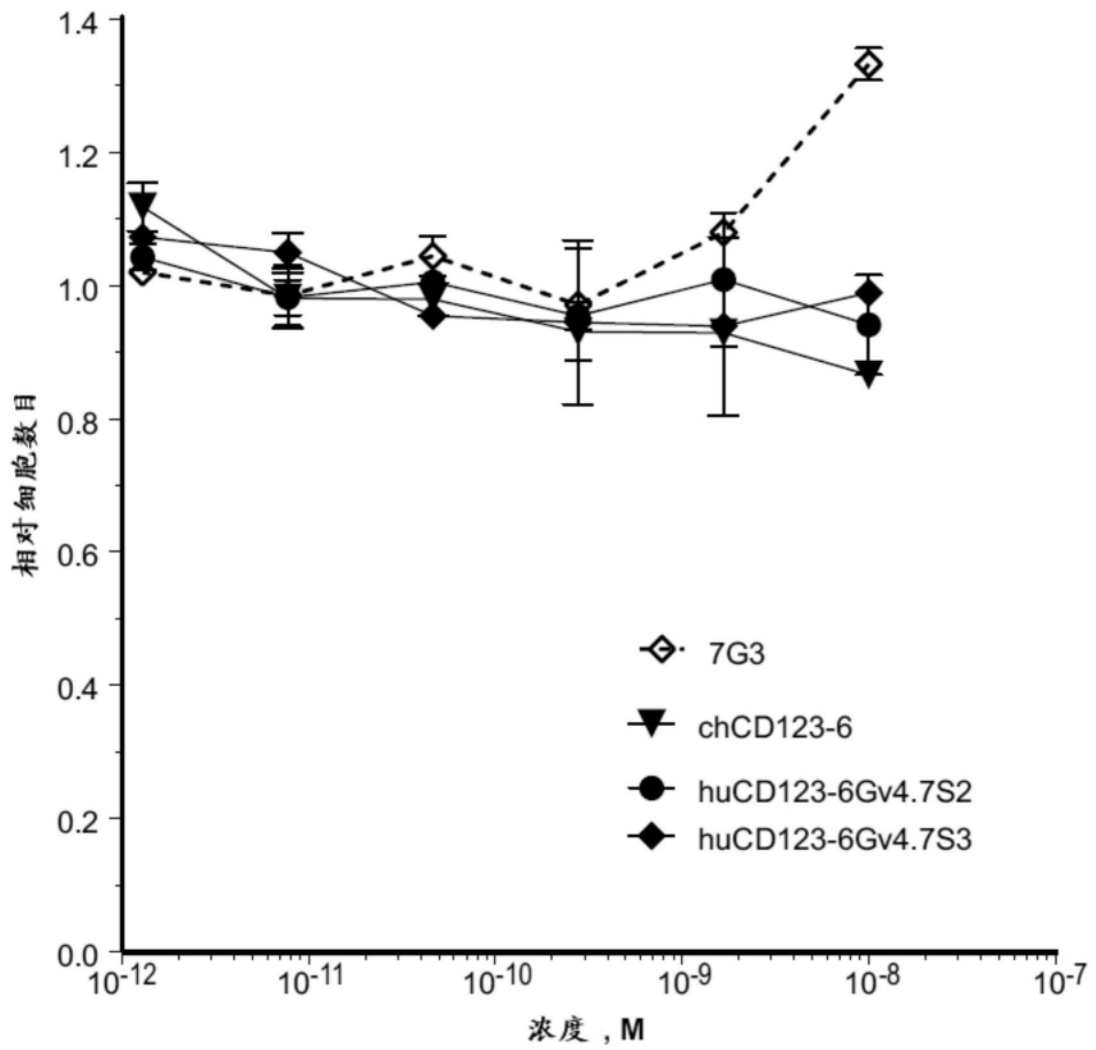


图8B

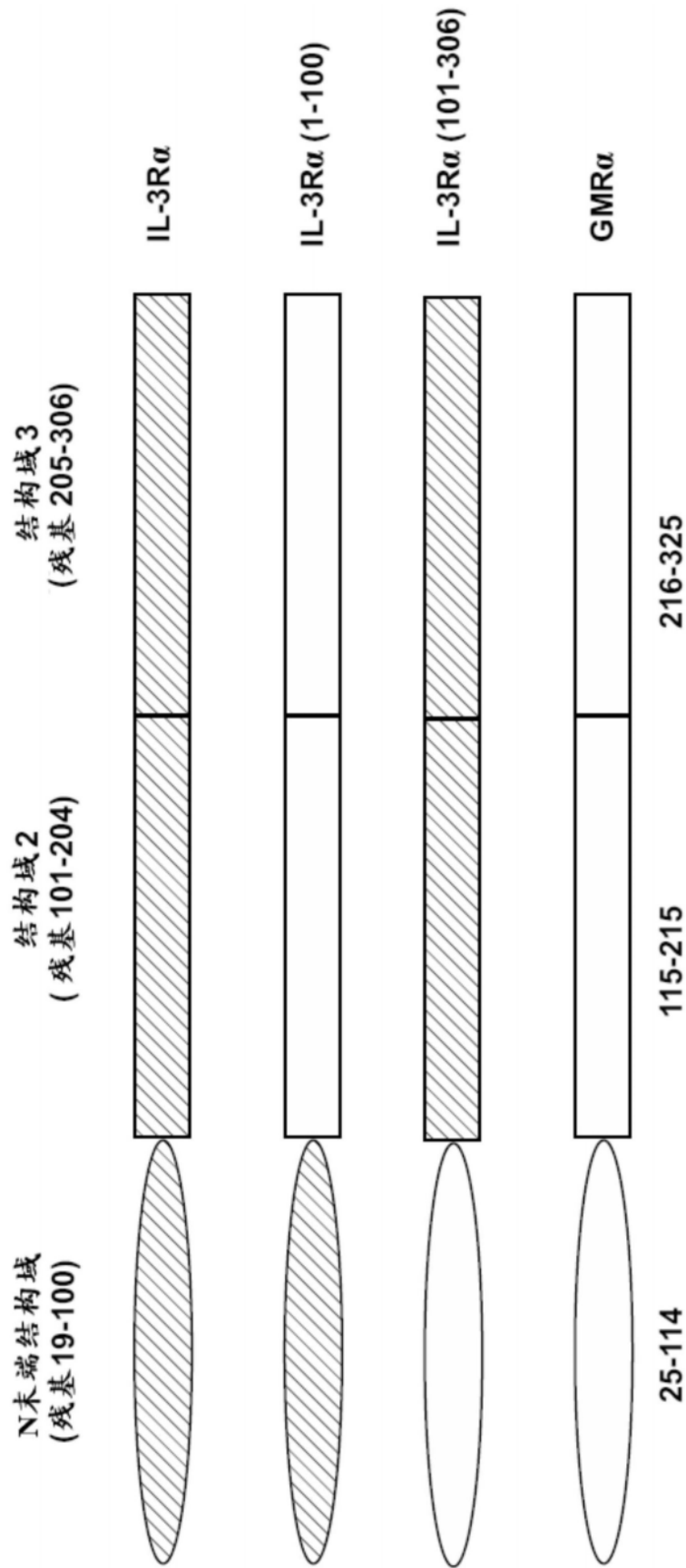
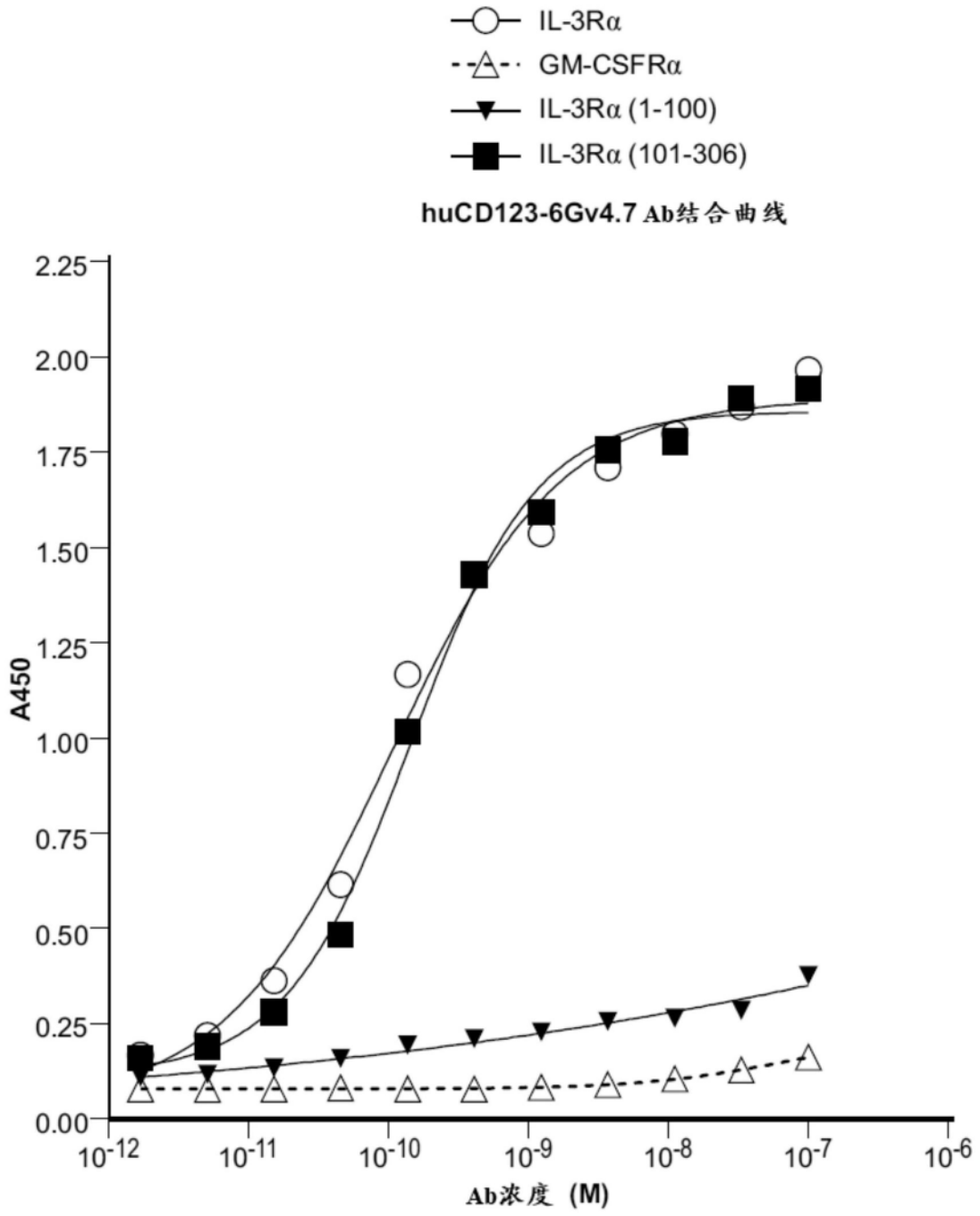
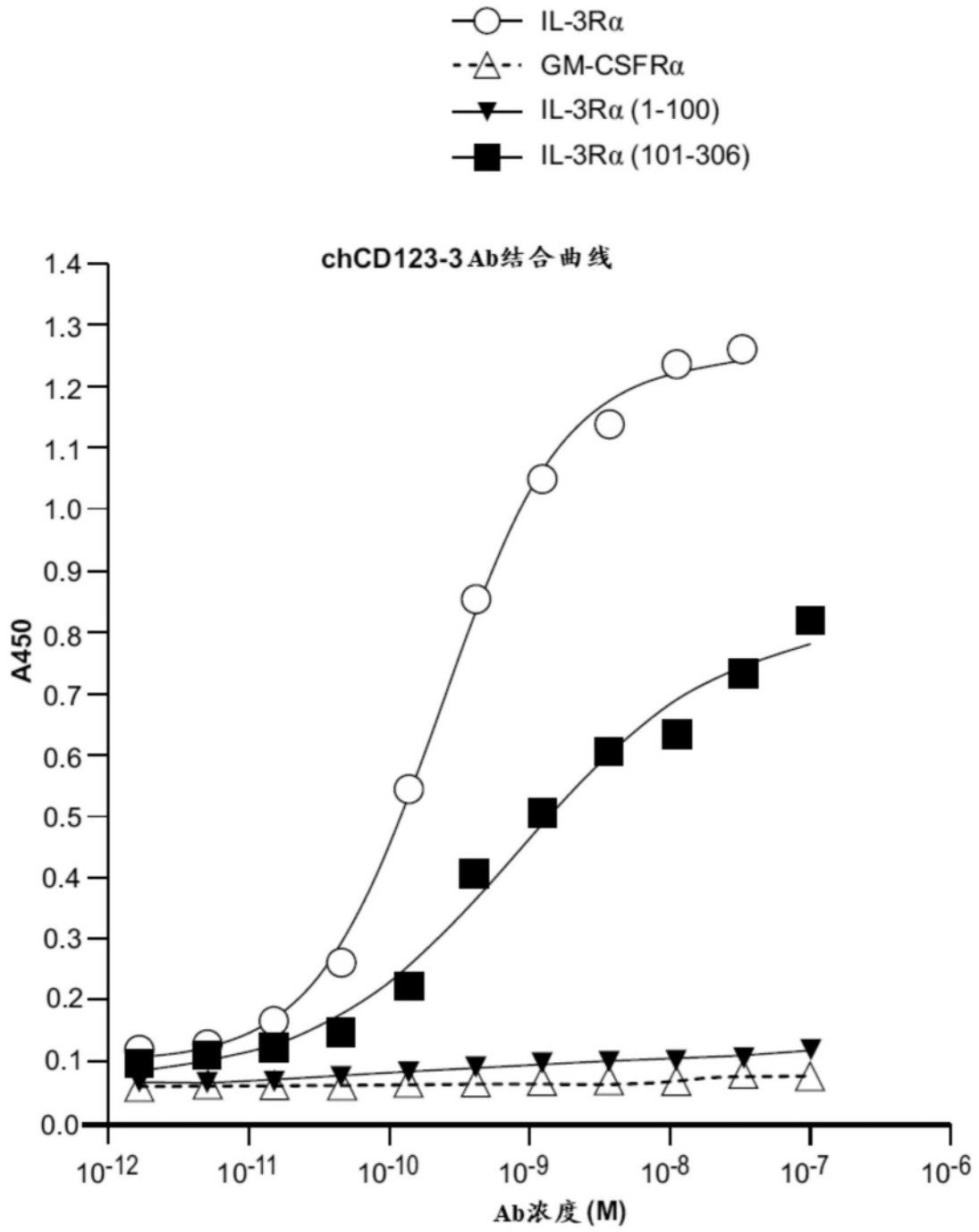


图9A



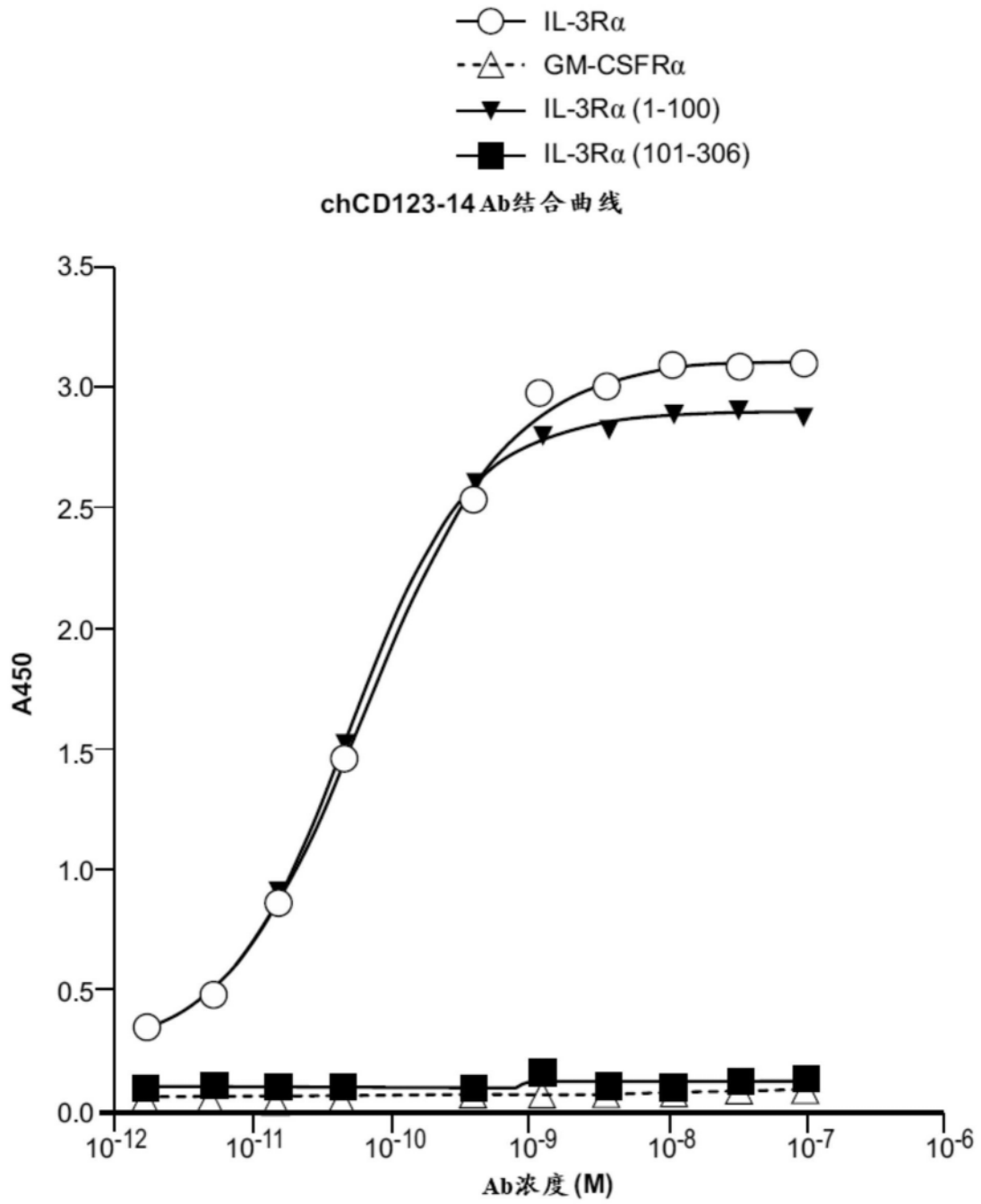
	EC ₅₀
IL-3R α	1.06E-10
IL-3R α (101-306)	1.45E-10

图9B



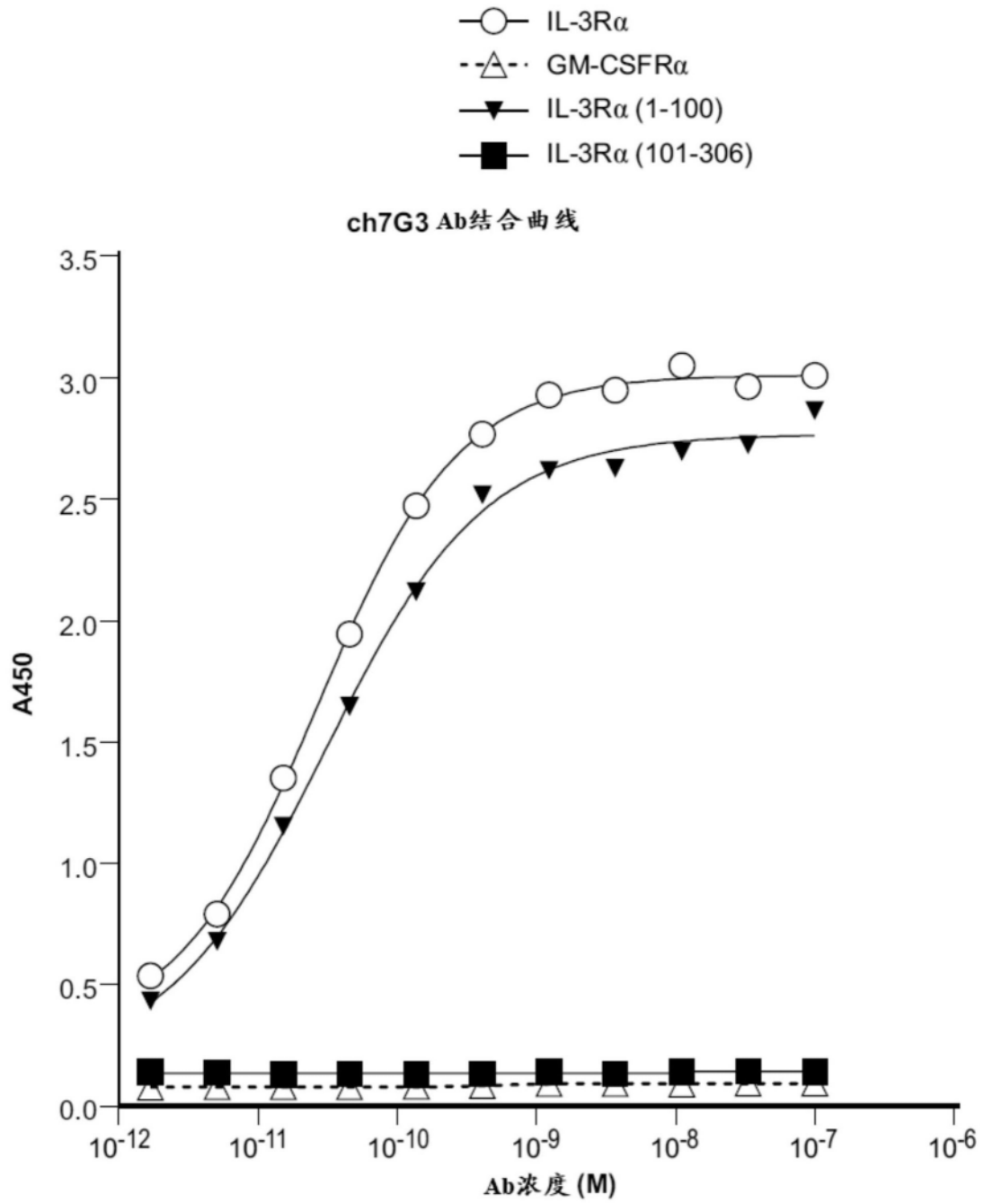
	EC ₅₀
IL-3Rα	2.74E-10
IL-3Rα (101-306)	8.52E-10

图9C



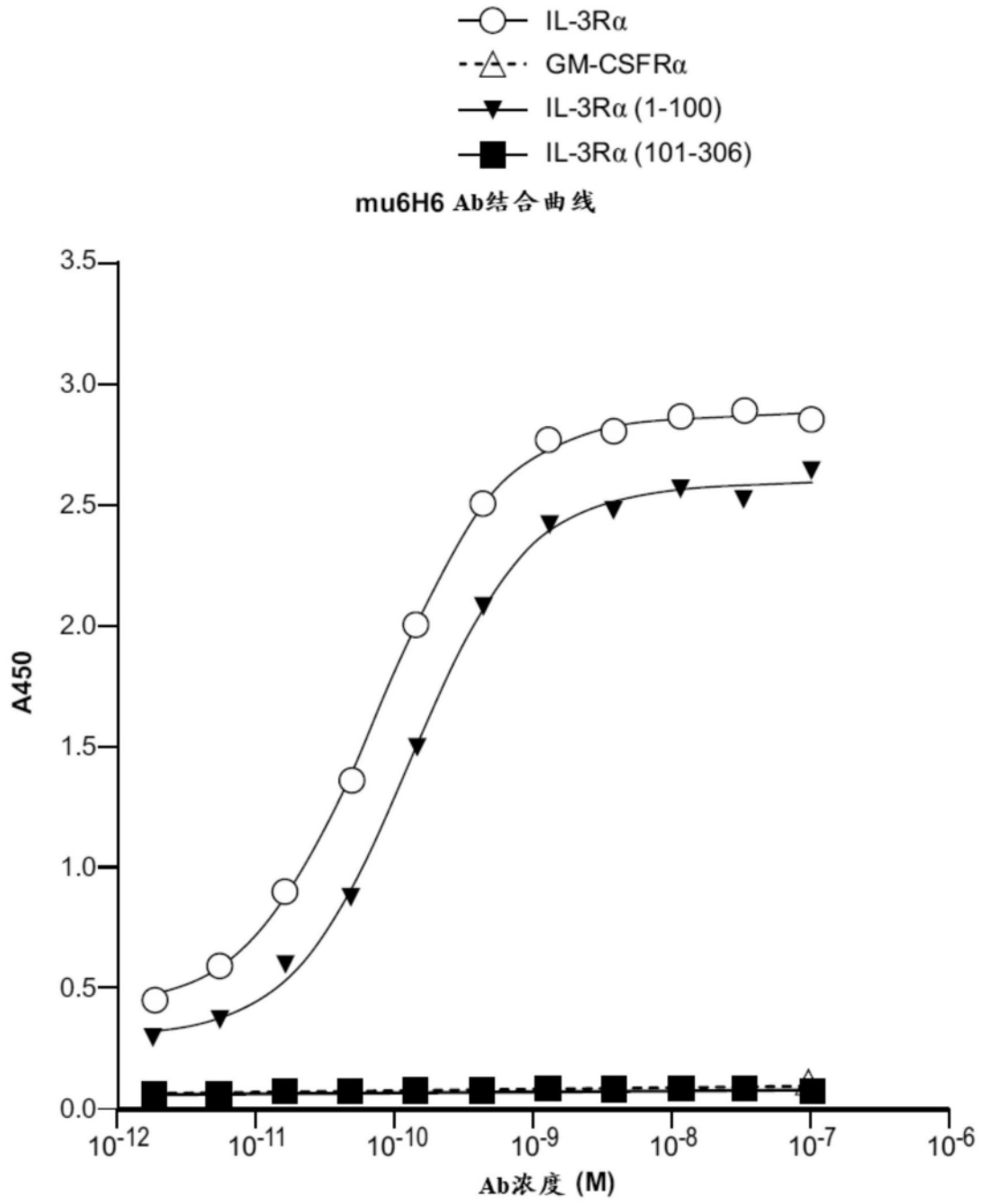
	EC ₅₀
IL-3R α	6.55E-10
IL-3R α (1-100)	4.79E-10

图9D



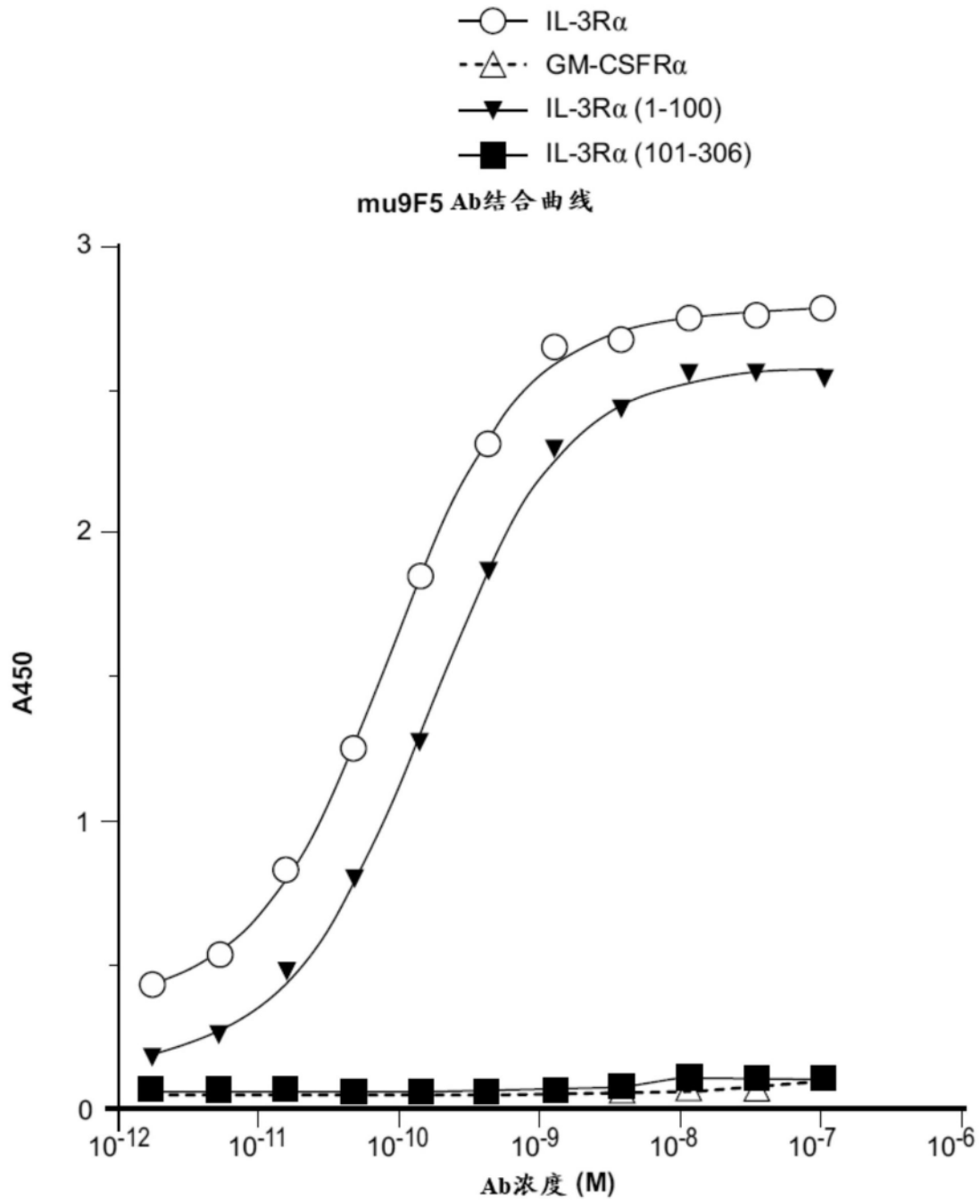
	EC ₅₀
IL-3Rα	2.701E-11
IL-3Rα (1-100)	3.061E-11

图9E



	EC ₅₀
IL-3Rα	7.2E-11
IL-3Rα (1-100)	1.22E-10

图9F



	EC ₅₀
IL-3Rα	8.12E-11
IL-3Rα (1-100)	1.52E-10

图9G

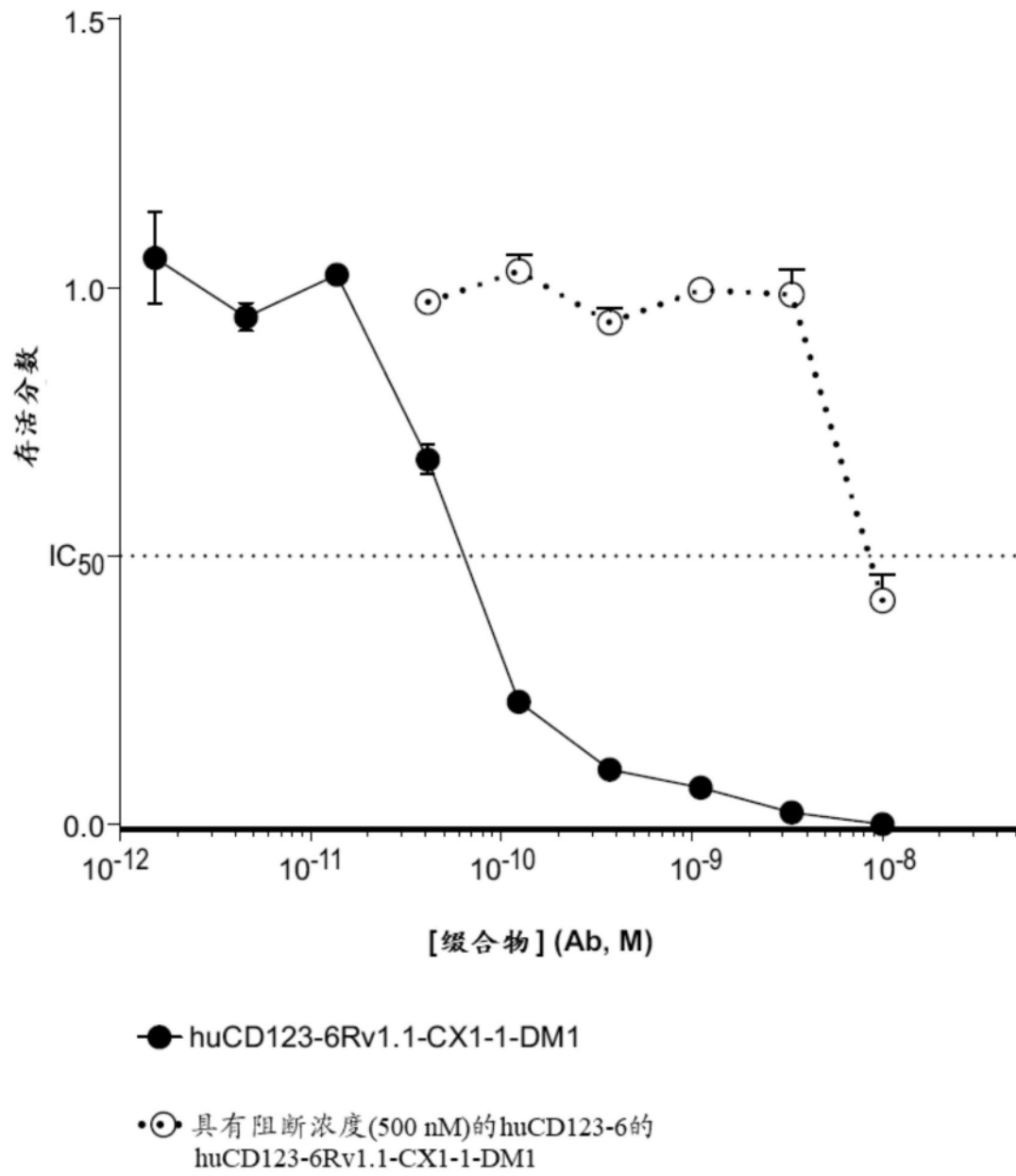


图10

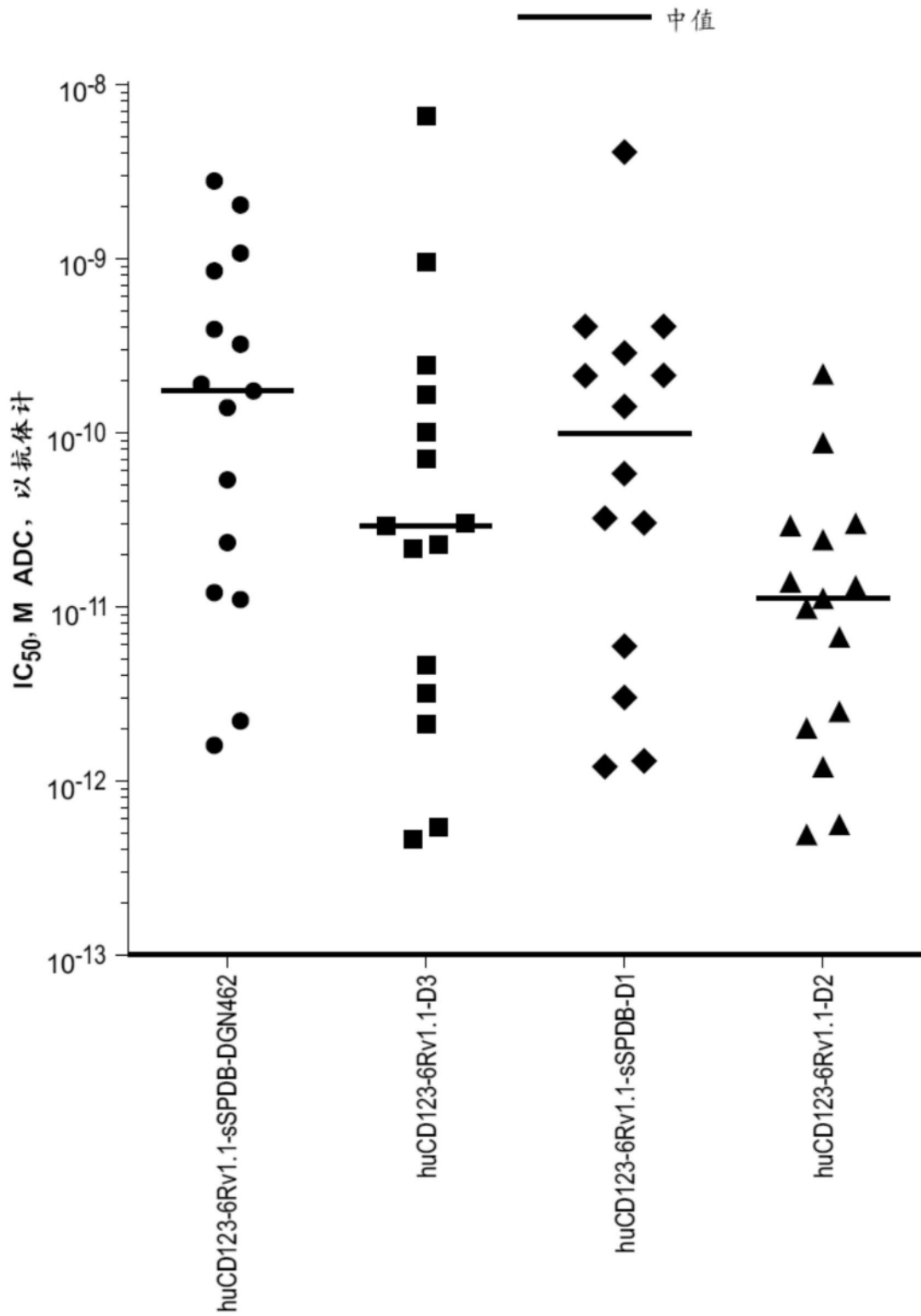


图11A

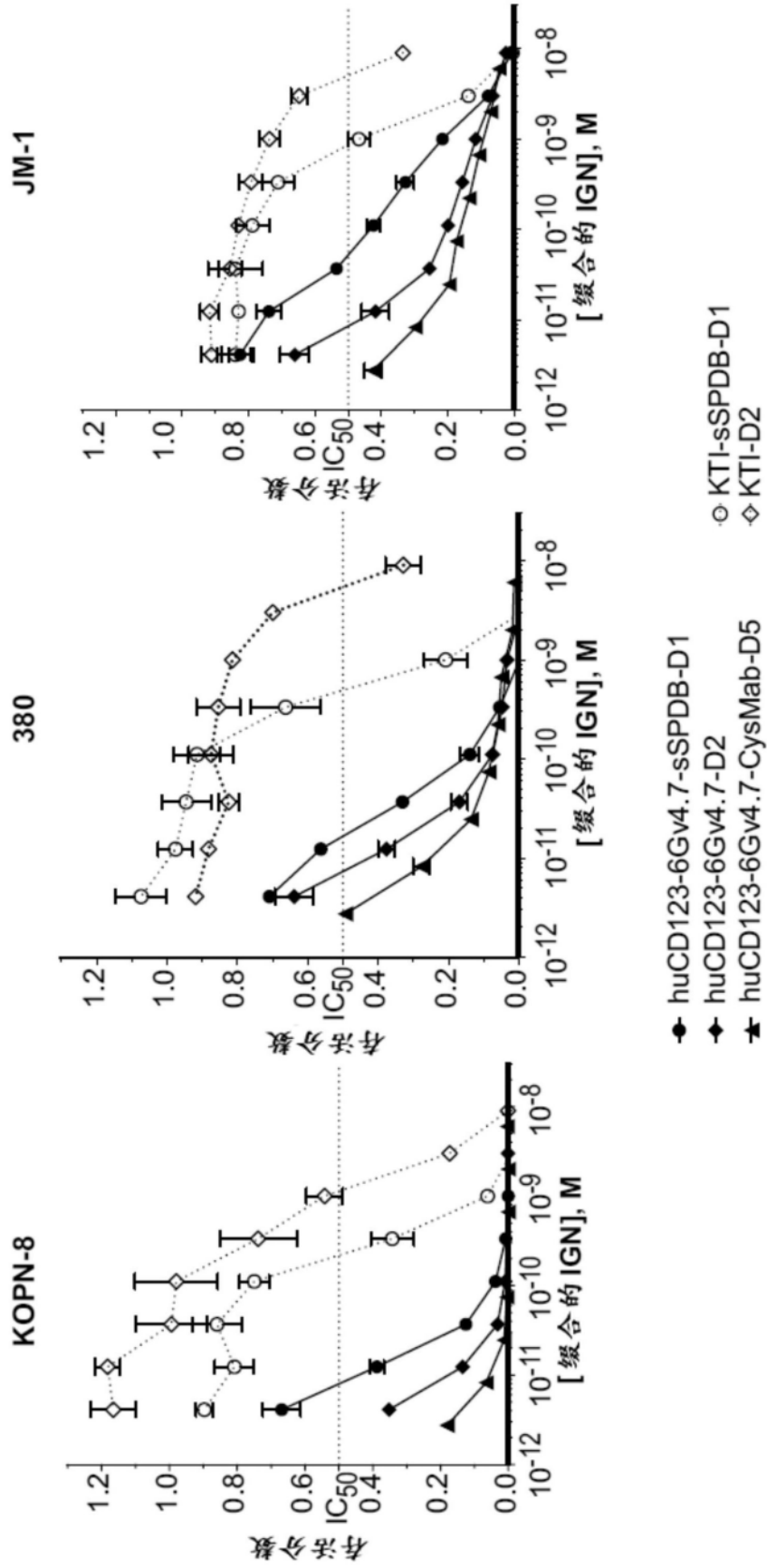


图11B

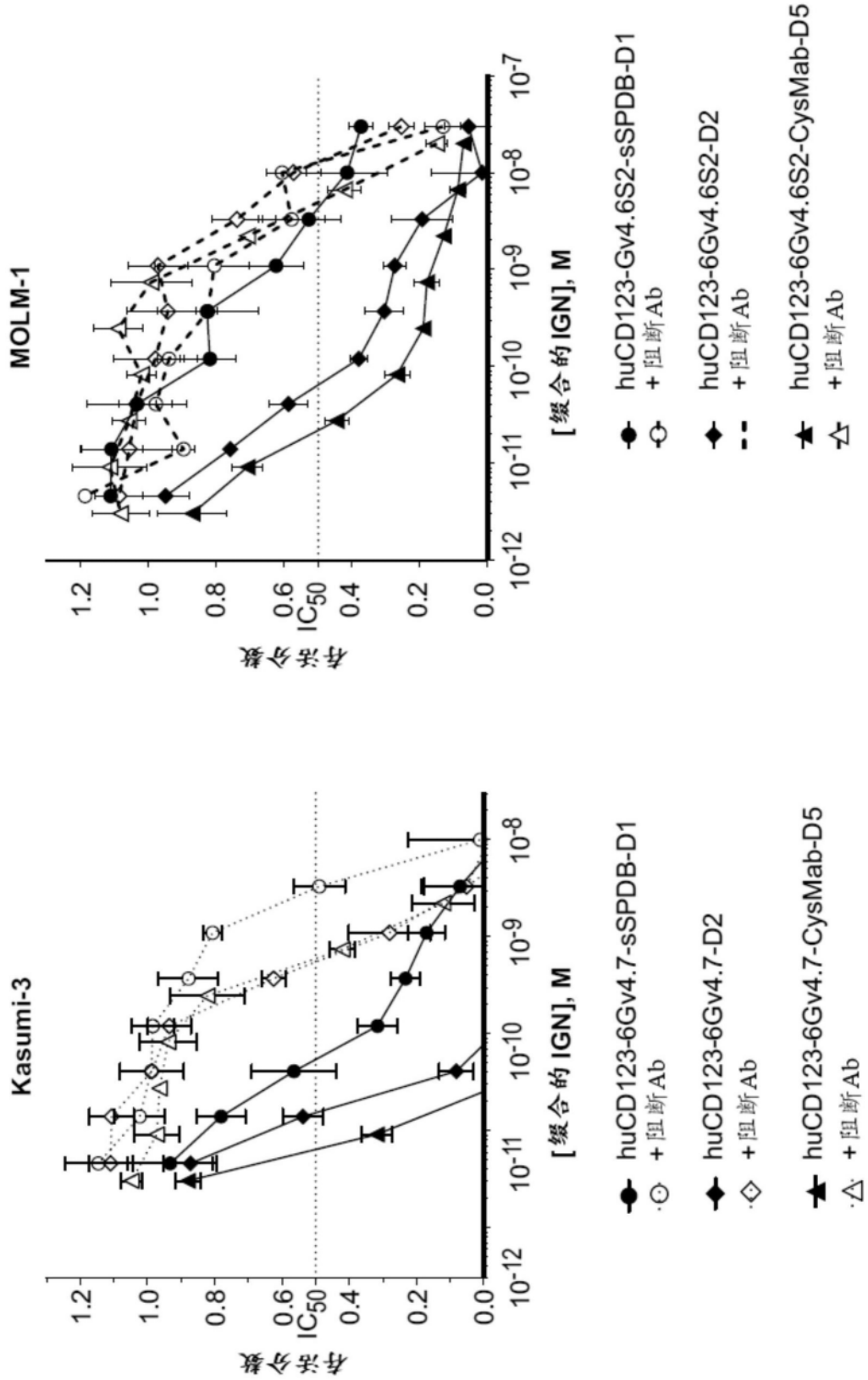


图11C

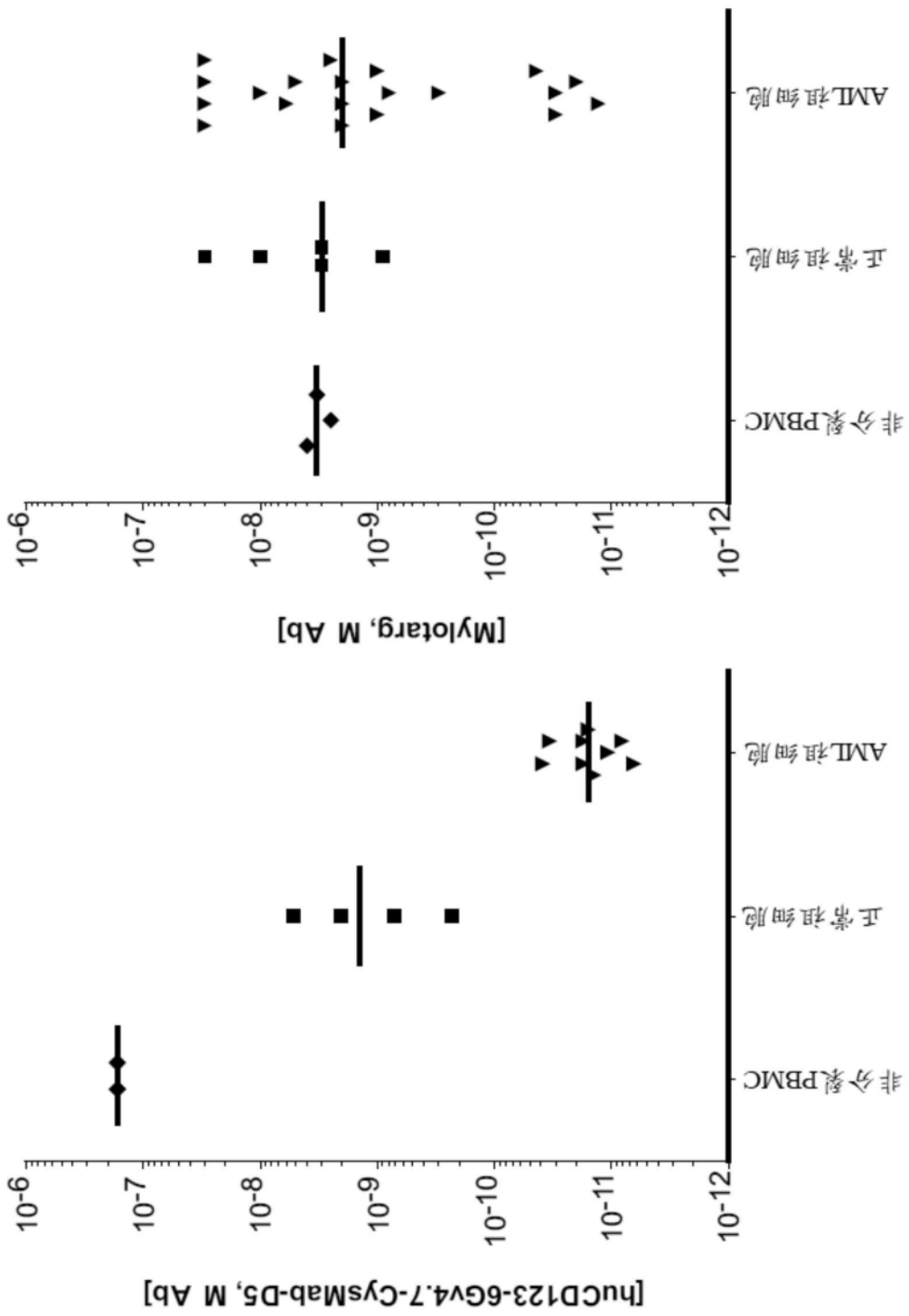


图11E

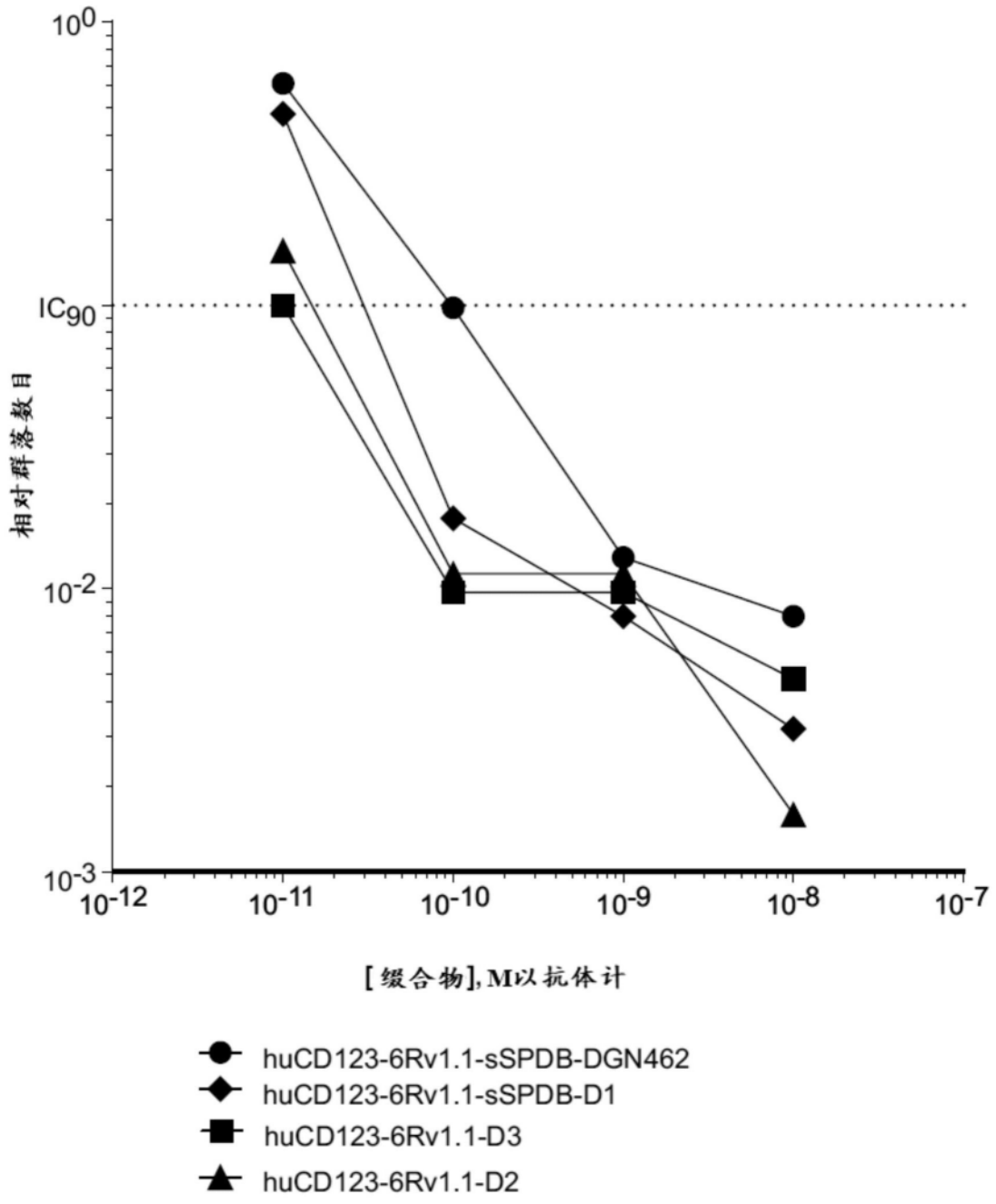


图12A

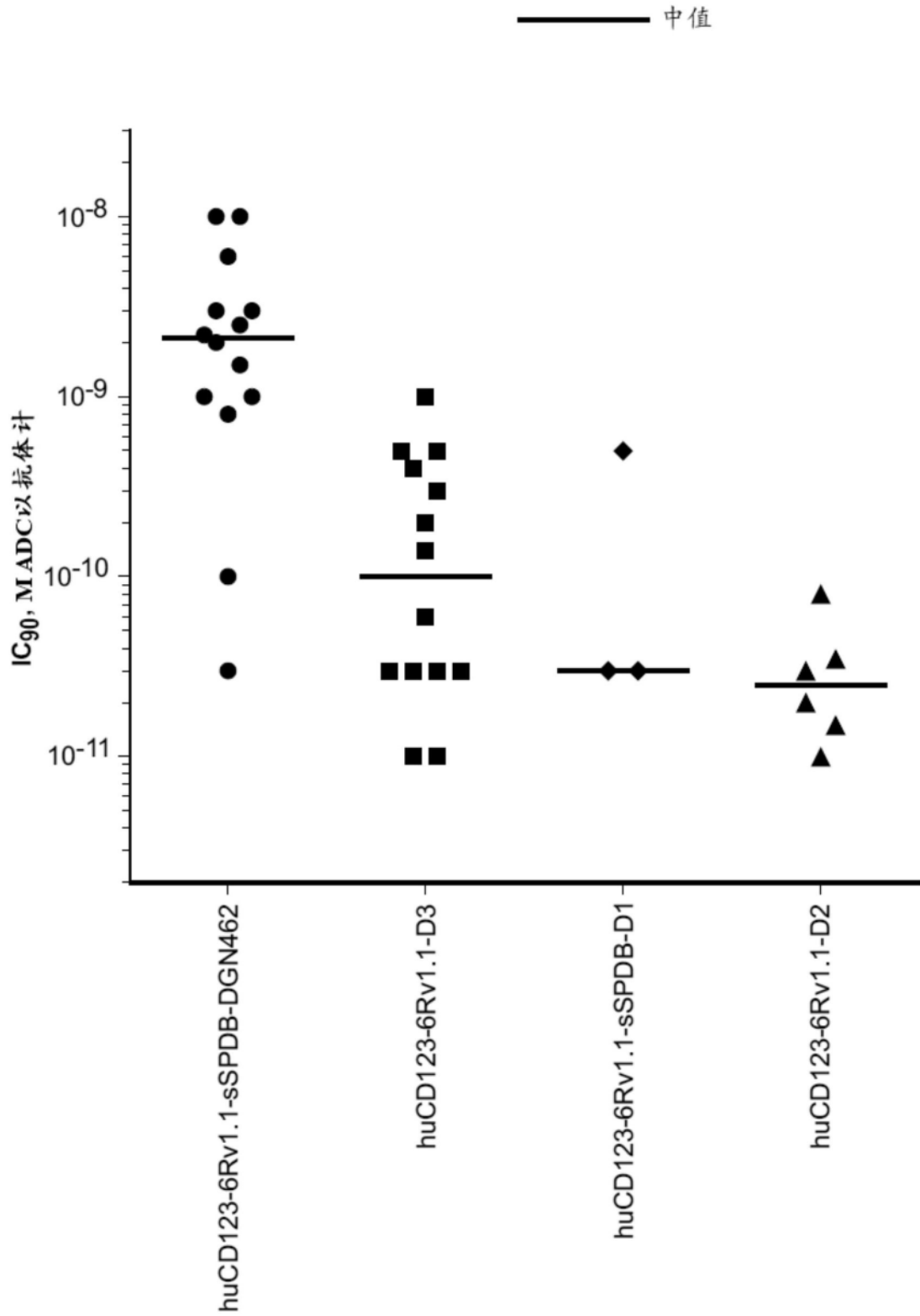


图12B

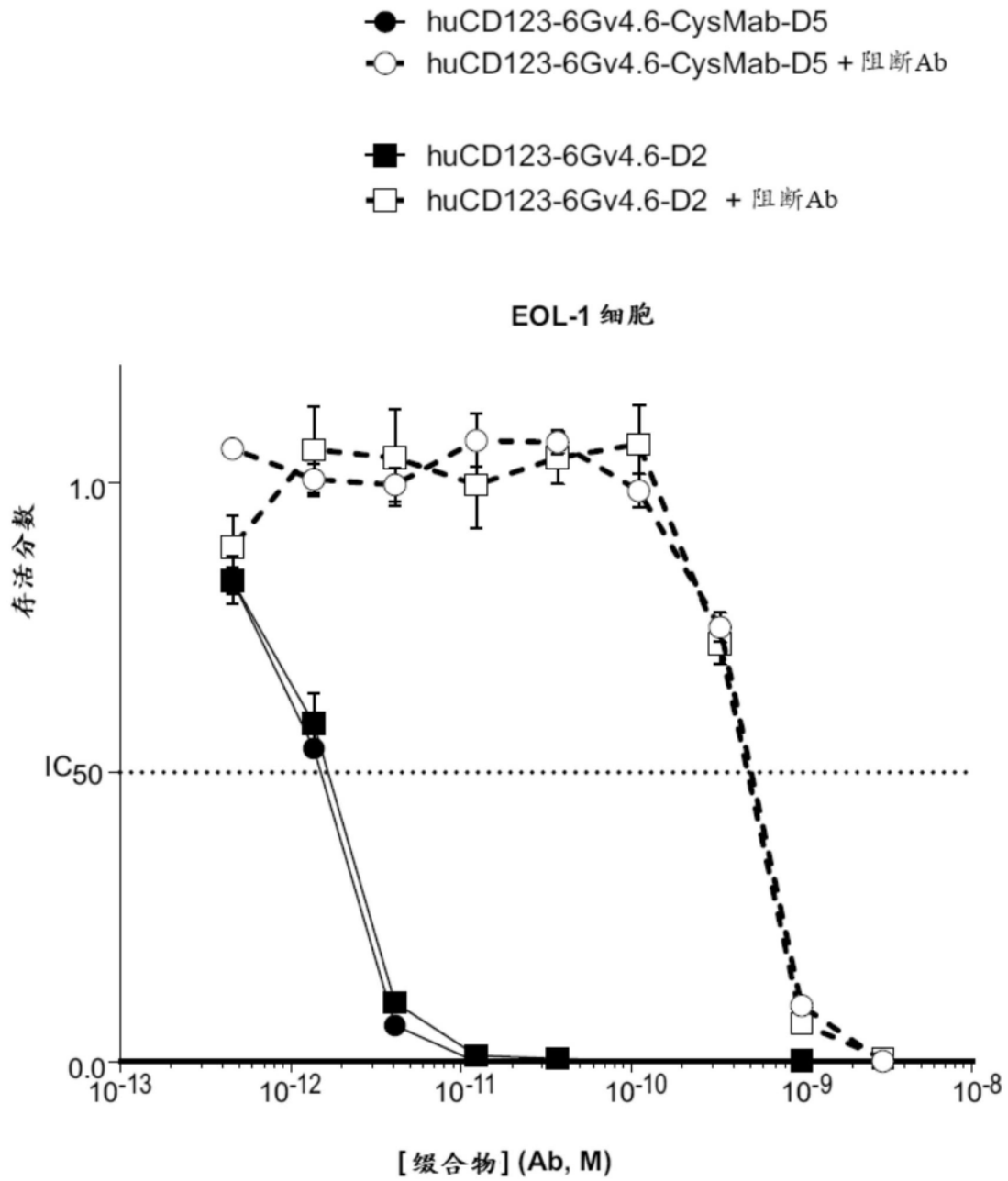


图13A

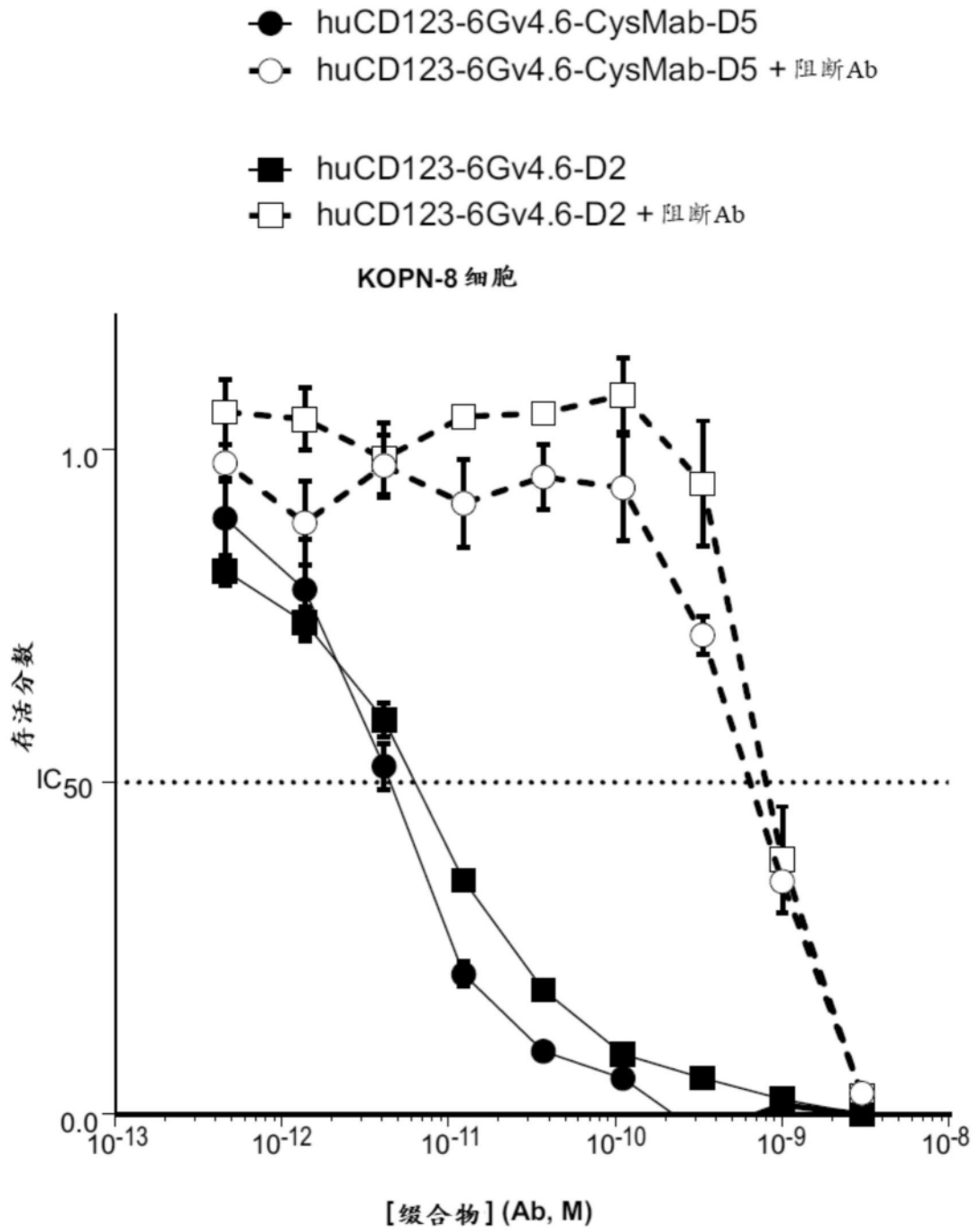


图13B

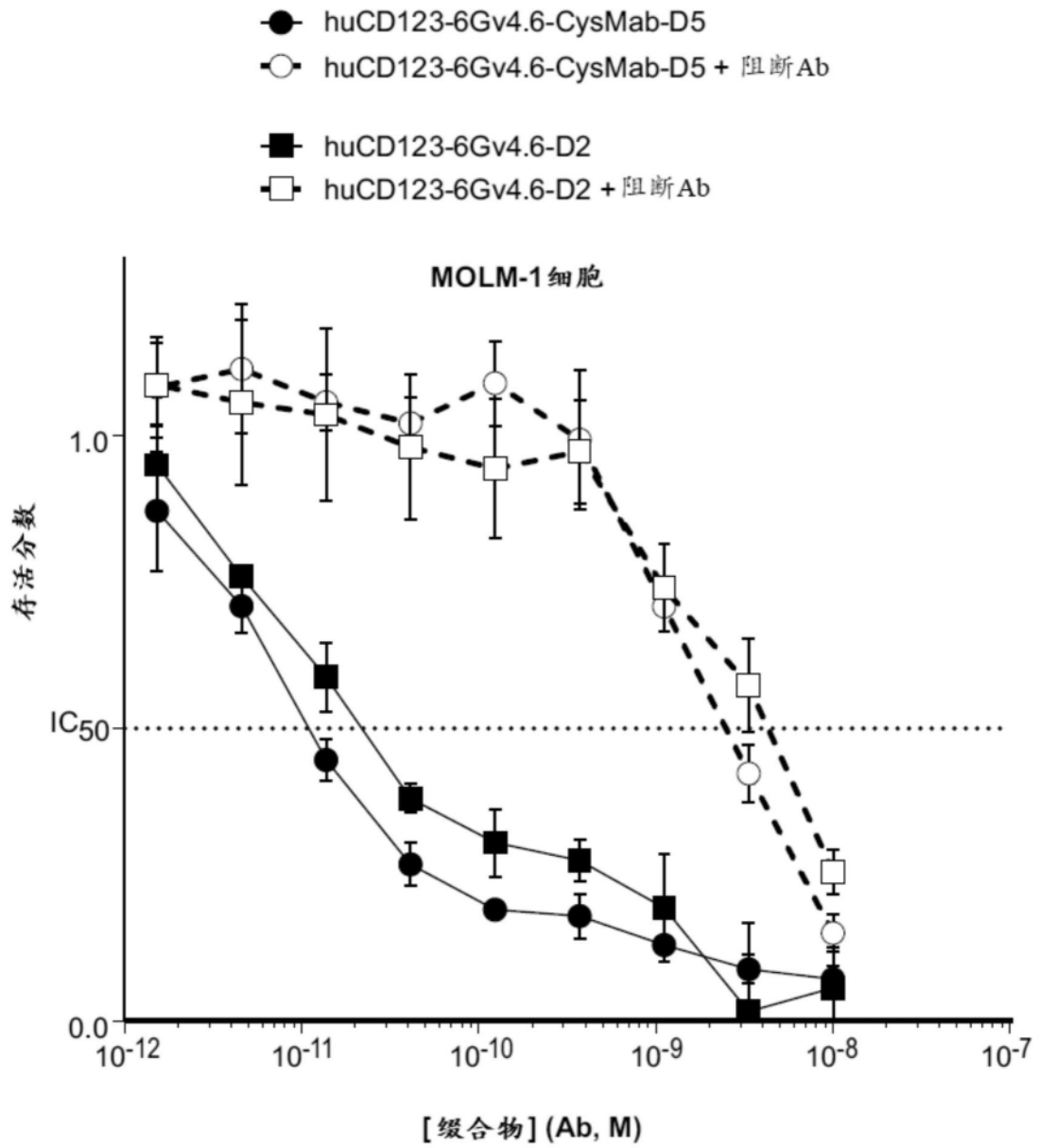


图13C

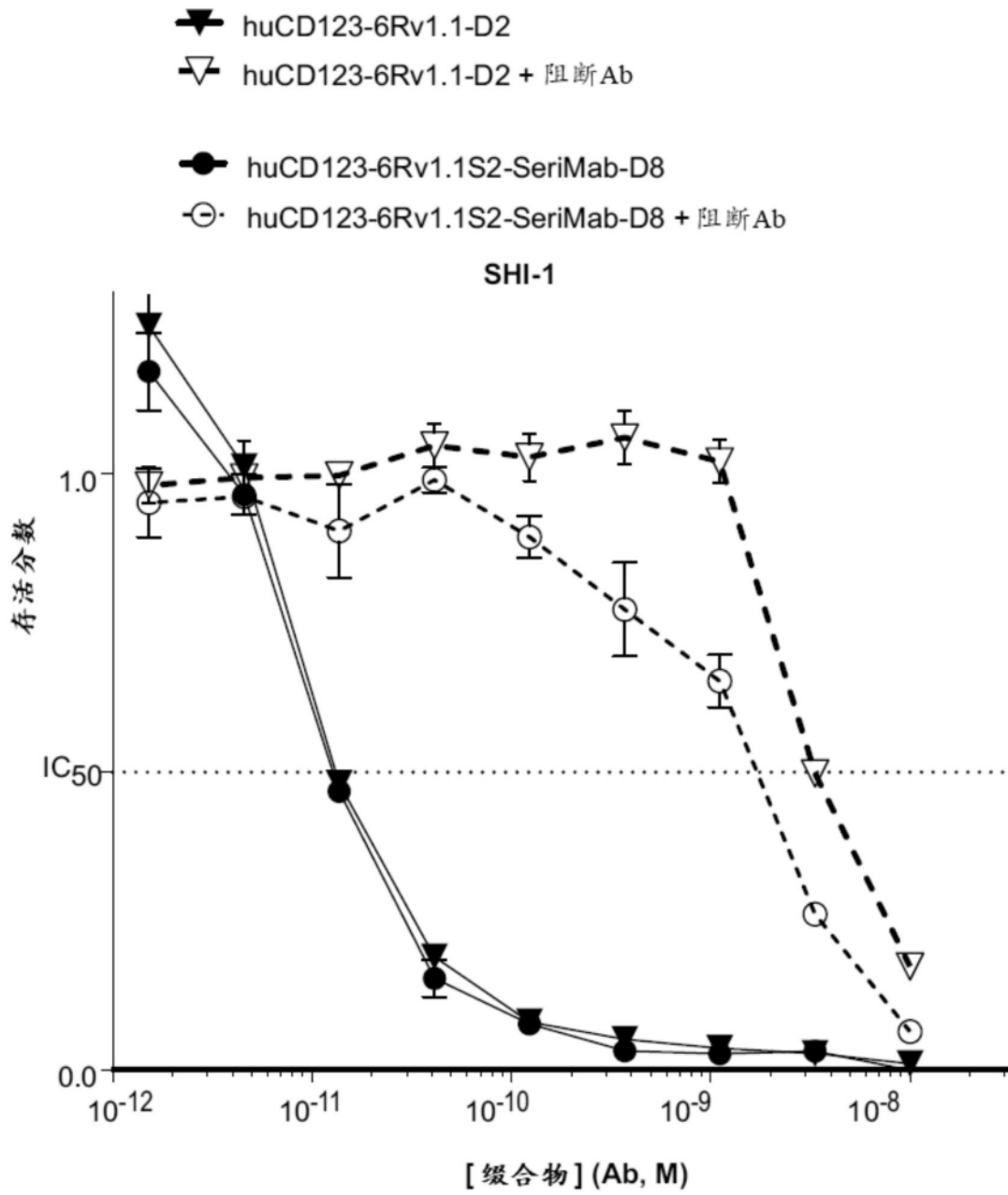


图14A

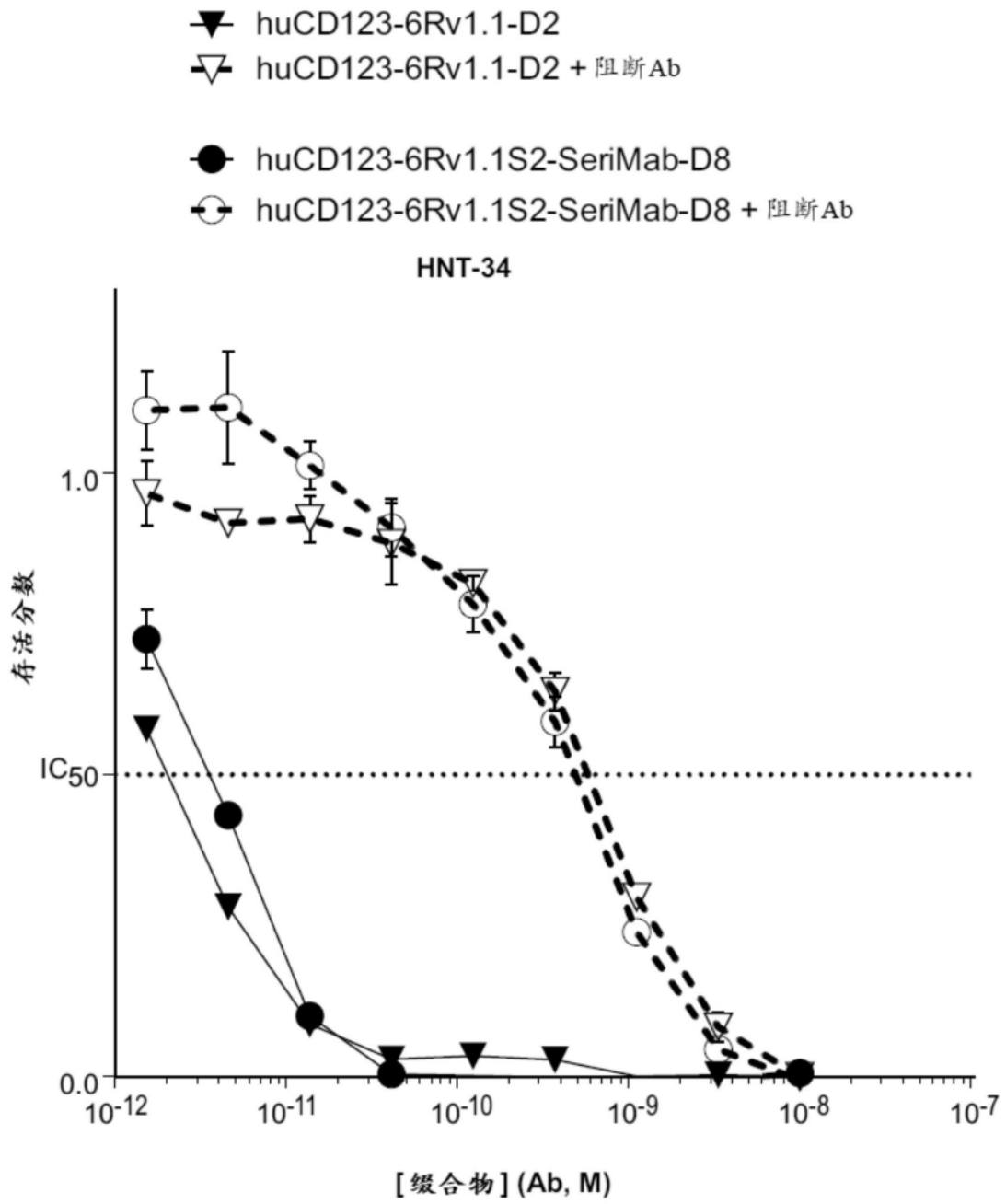


图14B

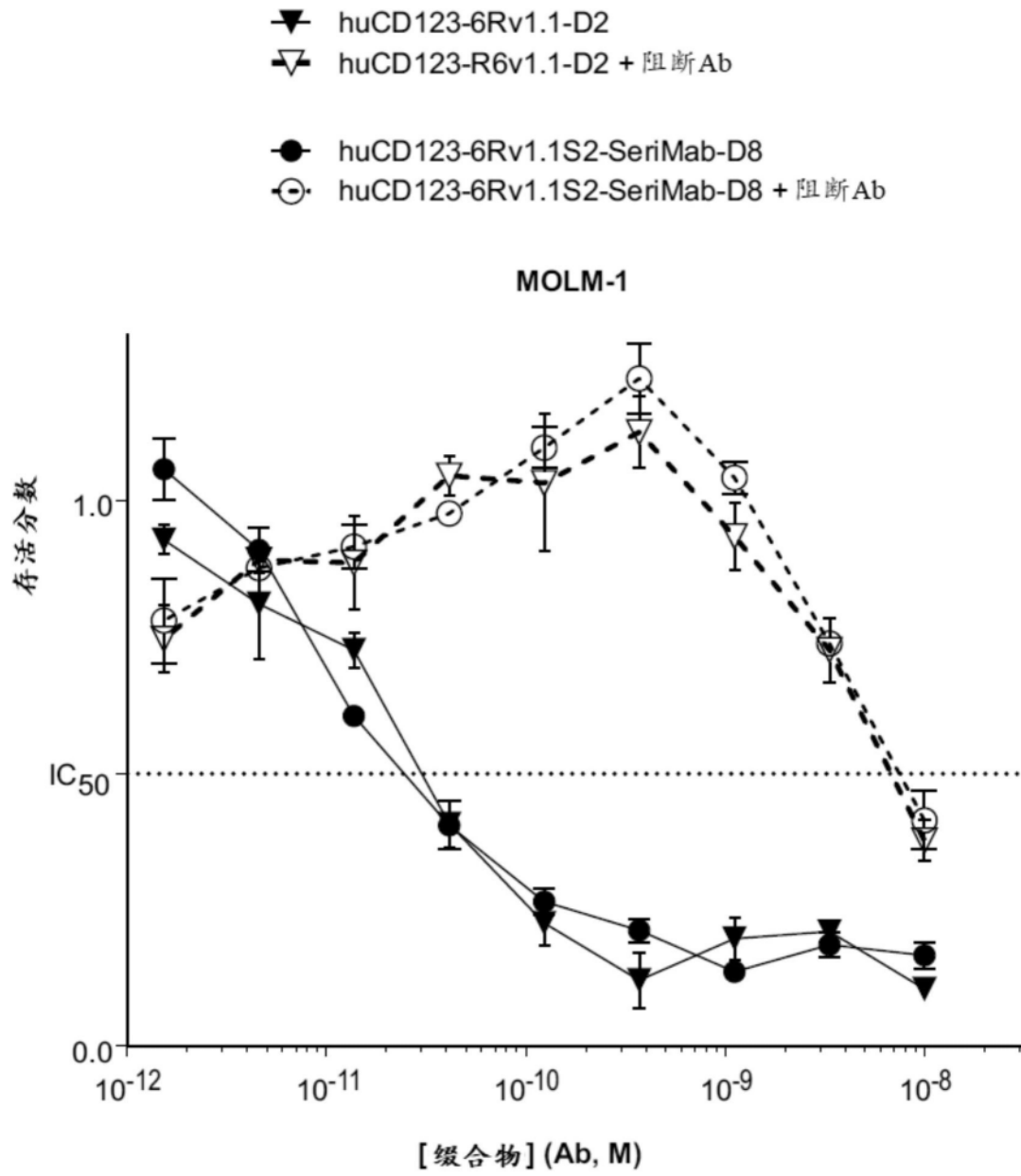


图14C

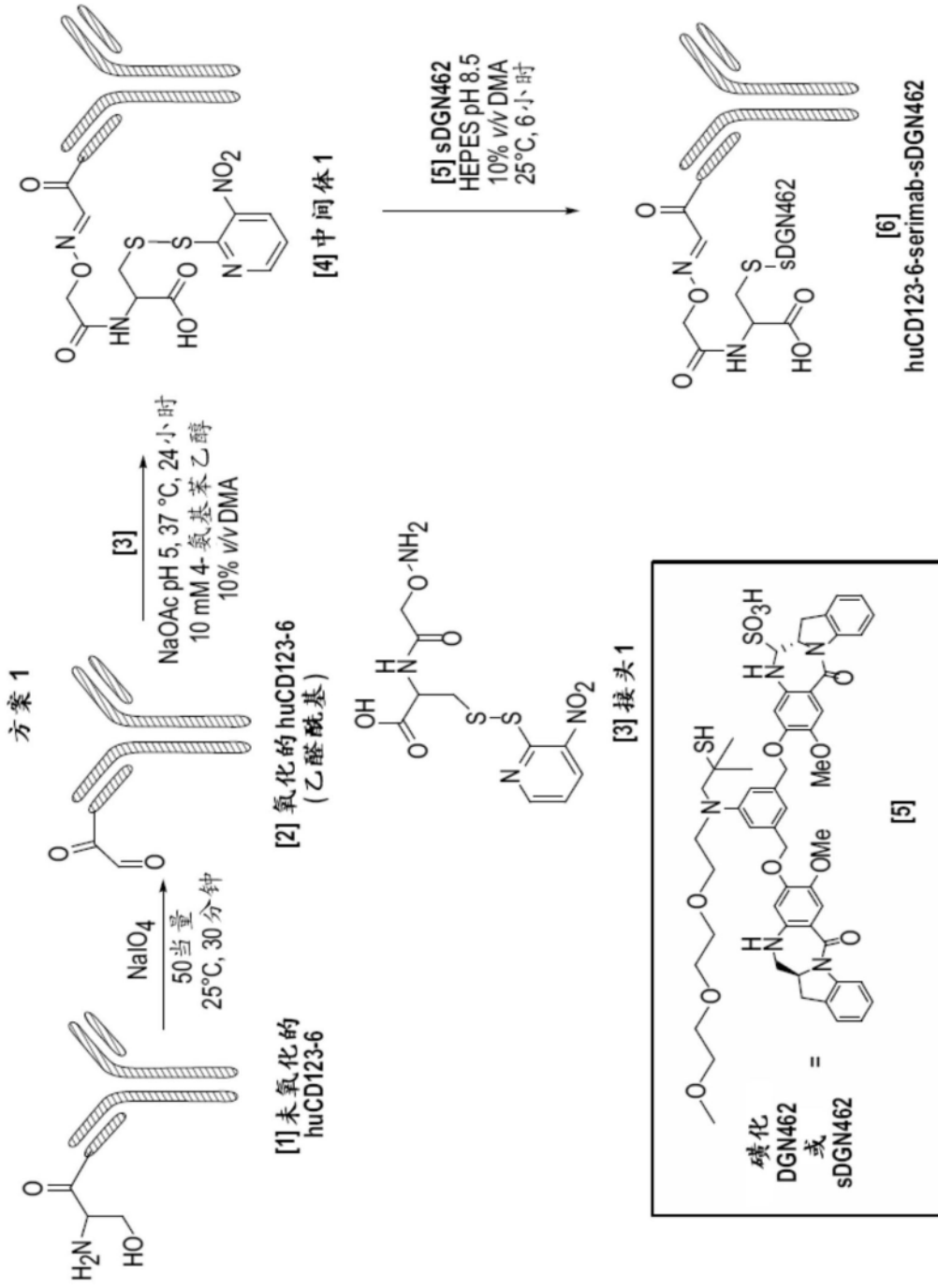


图15

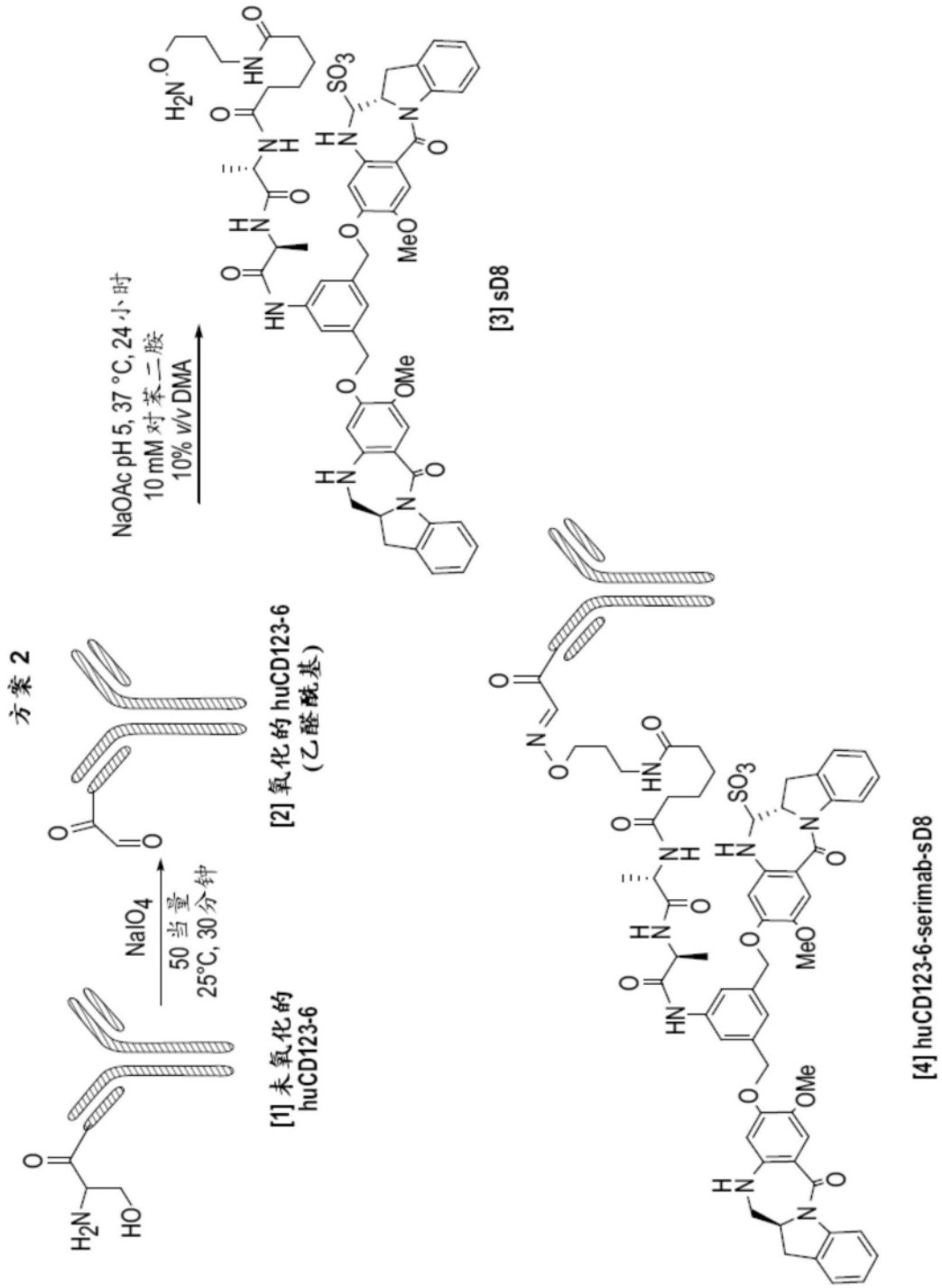


图16

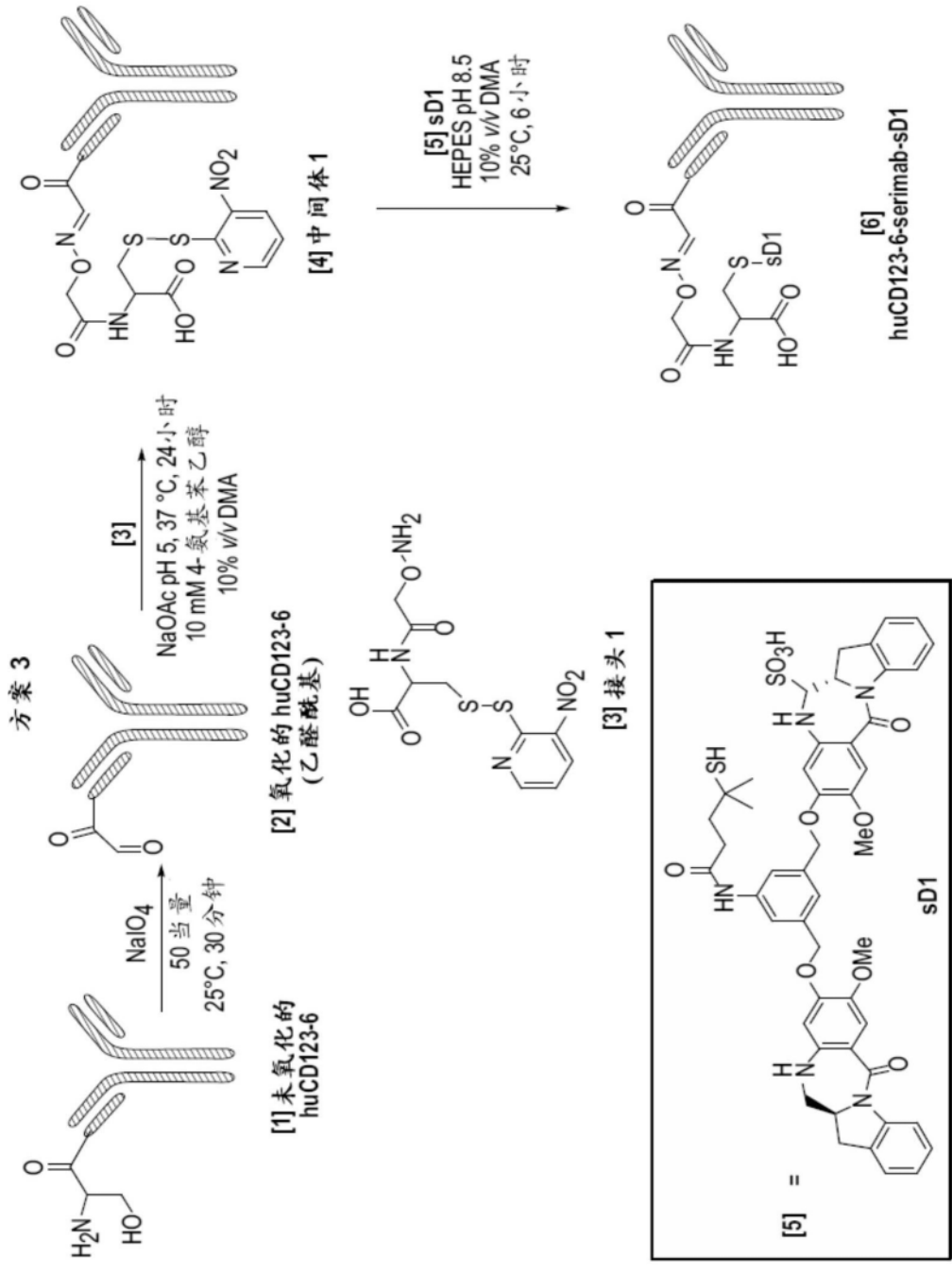
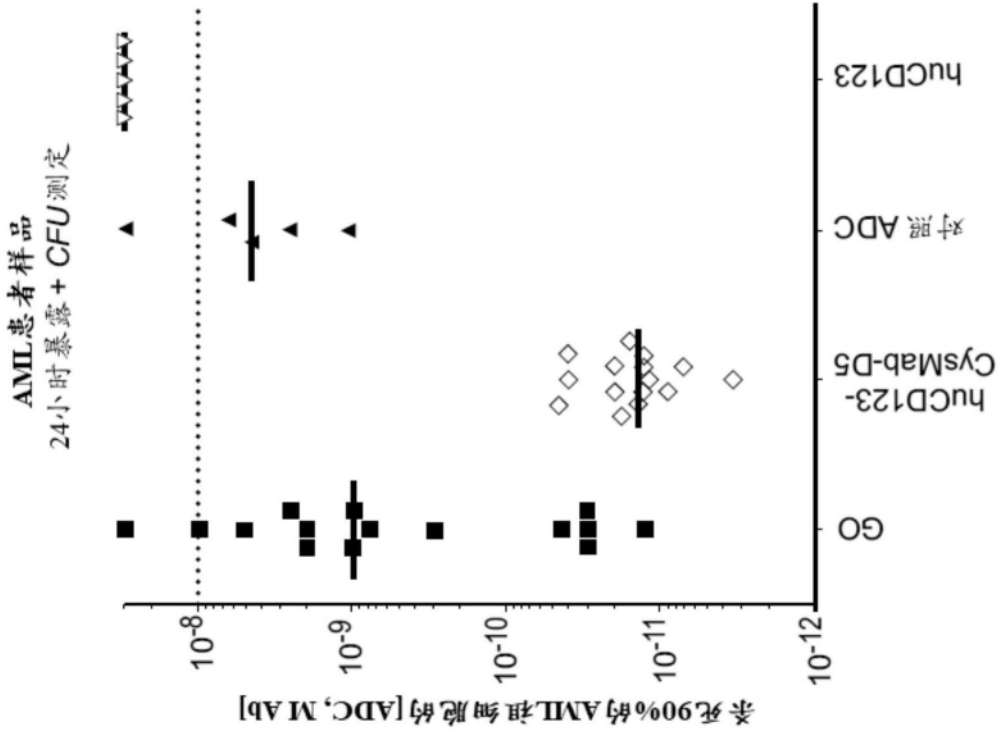


图17



治疗状态	MDR 状态	CD33 ABC	CD123 ABC
治疗前	neg	11,391	8,930
治疗前	NT	4,320	2,000
治疗前	pos	740	3,800
治疗前	pos	3,500	4,200
治疗前	neg	1,000	4,600
治疗前	neg	6,111	1,360
治疗前	pos	700	1,000
治疗前	neg	10,500	2,600
治疗前	pos	20,820	2,174
治疗前	neg	10,513	16,118
治疗前	pos	640	3,400
难治性	pos	600	1,400
复发性	neg	28,907	6,793
复发性/难治性	pos	28,782	2,252
复发性/难治性	pos	9,268	11,132
中值		6,111	3,400

图18

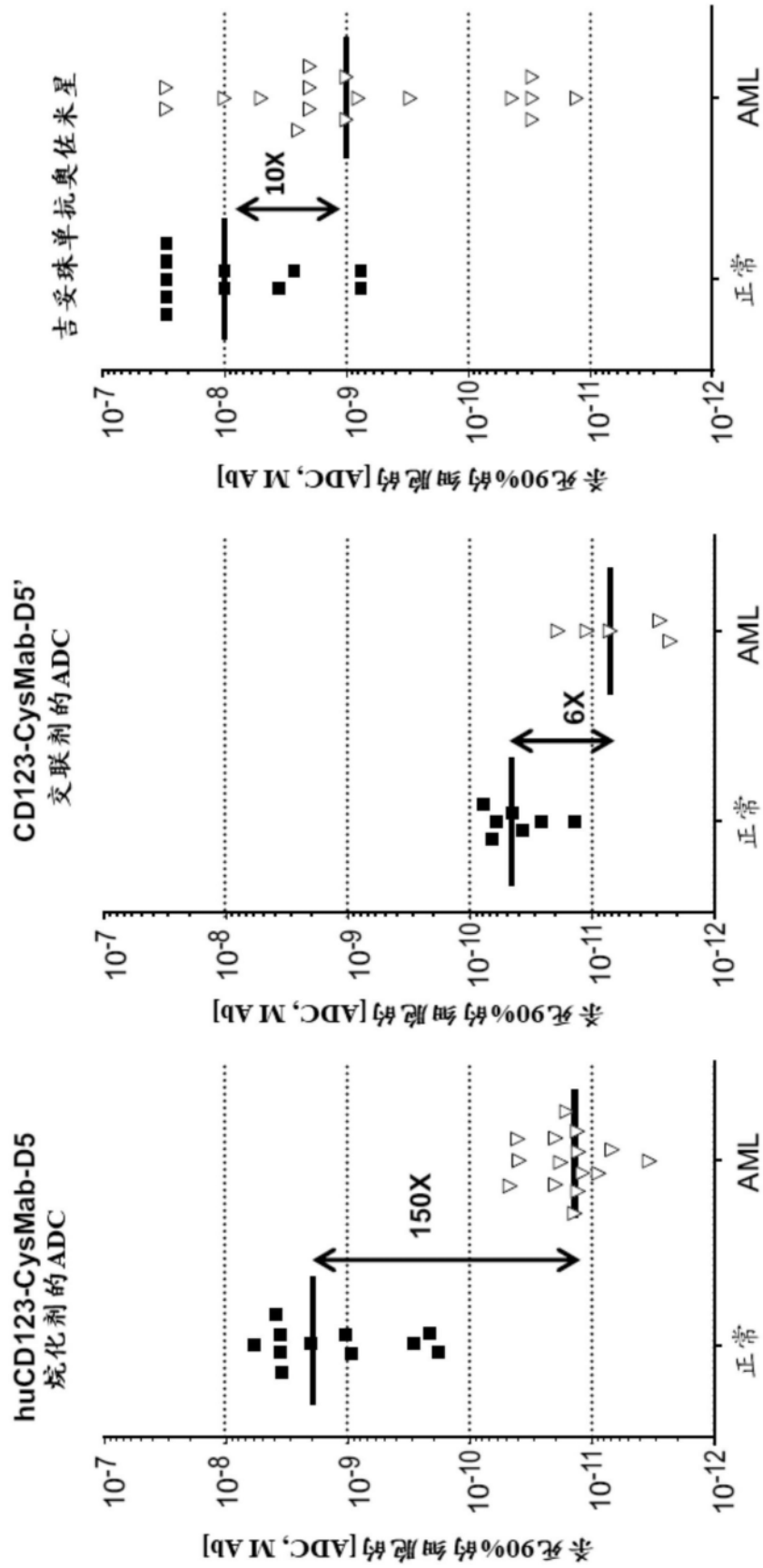
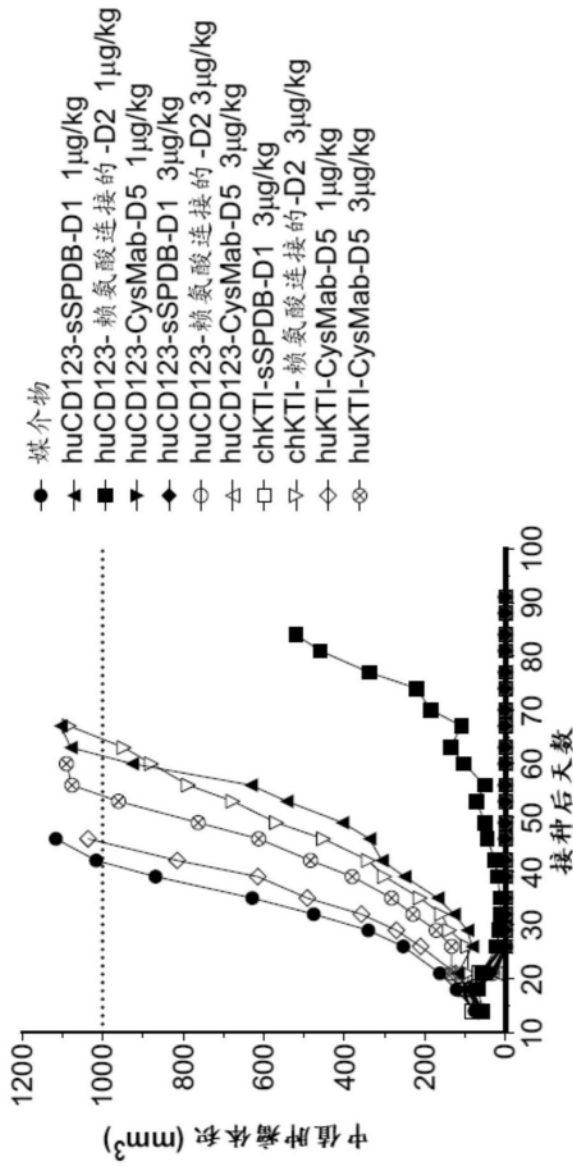


图19



治疗组	T/C	PR	CR
媒介物	-	0/6	0/6
huCD123-sSPDB-D1 (1 µg/kg)	30%	0/6	0/6
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (1 µg/kg)	3%	4/6	3/6
huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)	0%	6/6	5/6
huCD123-sSPDB-D1 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
huCD123-赖氨酸连接的-D2 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
chKTI-sSPDB-D1 (3 µg/kg)	0%	6/6	6/6
chKTI-赖氨酸连接的-D2 (3 µg/kg)	34%	1/6	1/6
huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)	80%	0/6	0/6
huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)	48%	1/6	1/6

图20

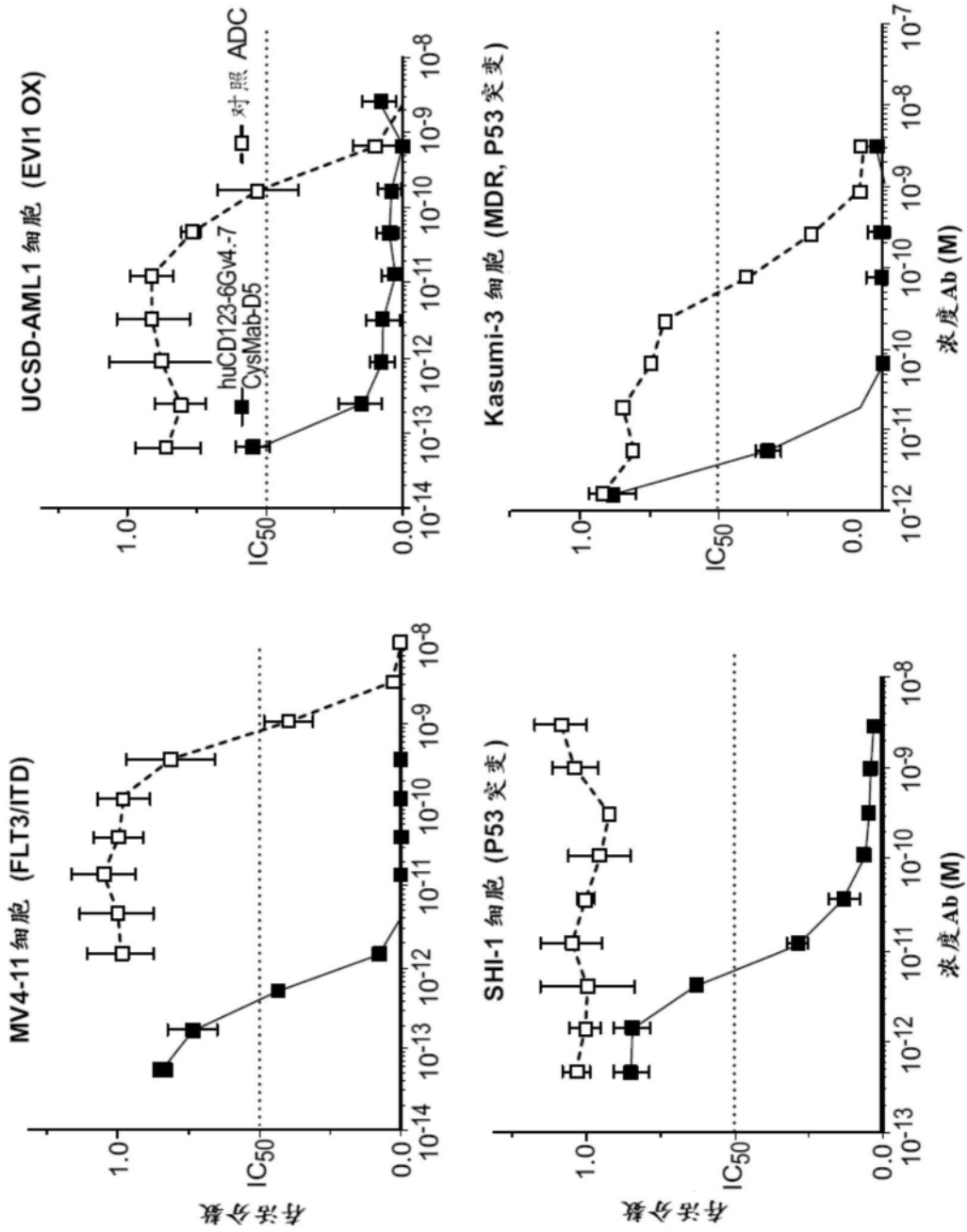


图21

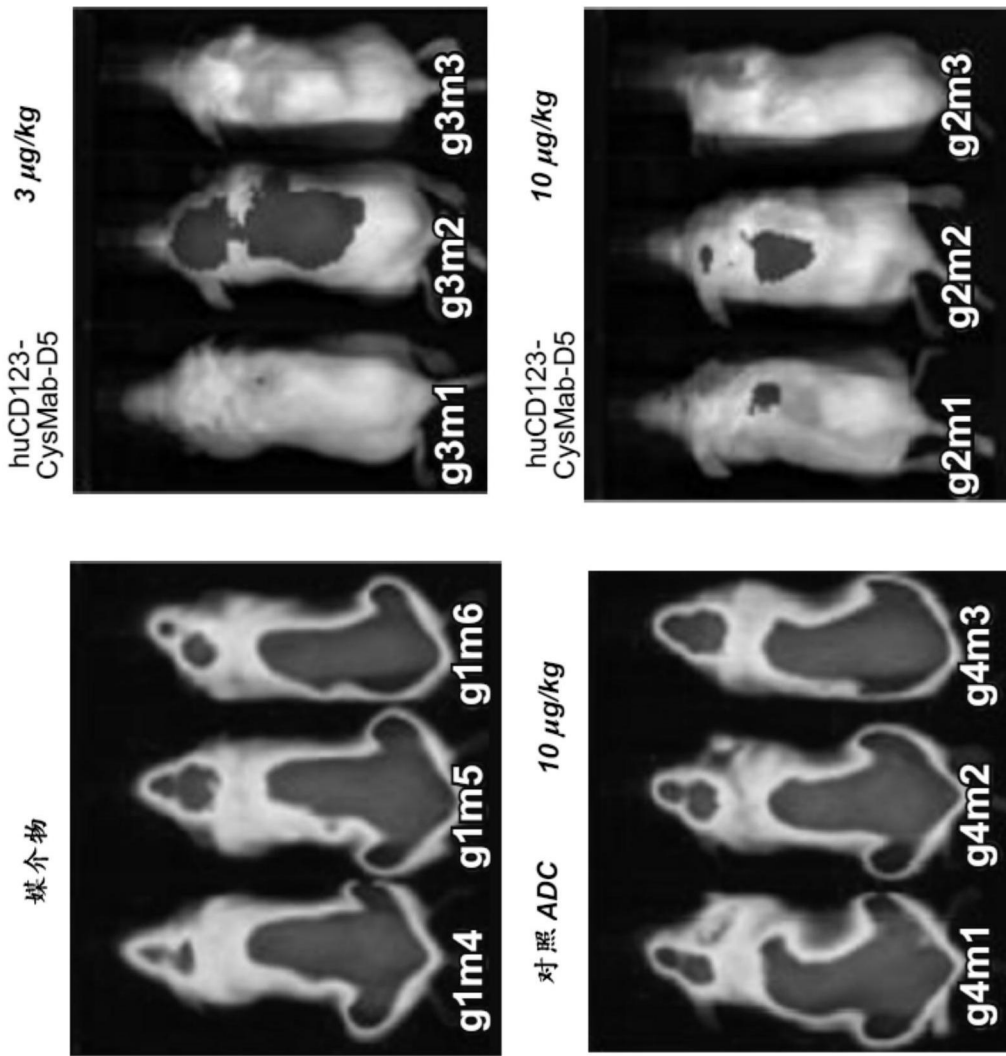


图22

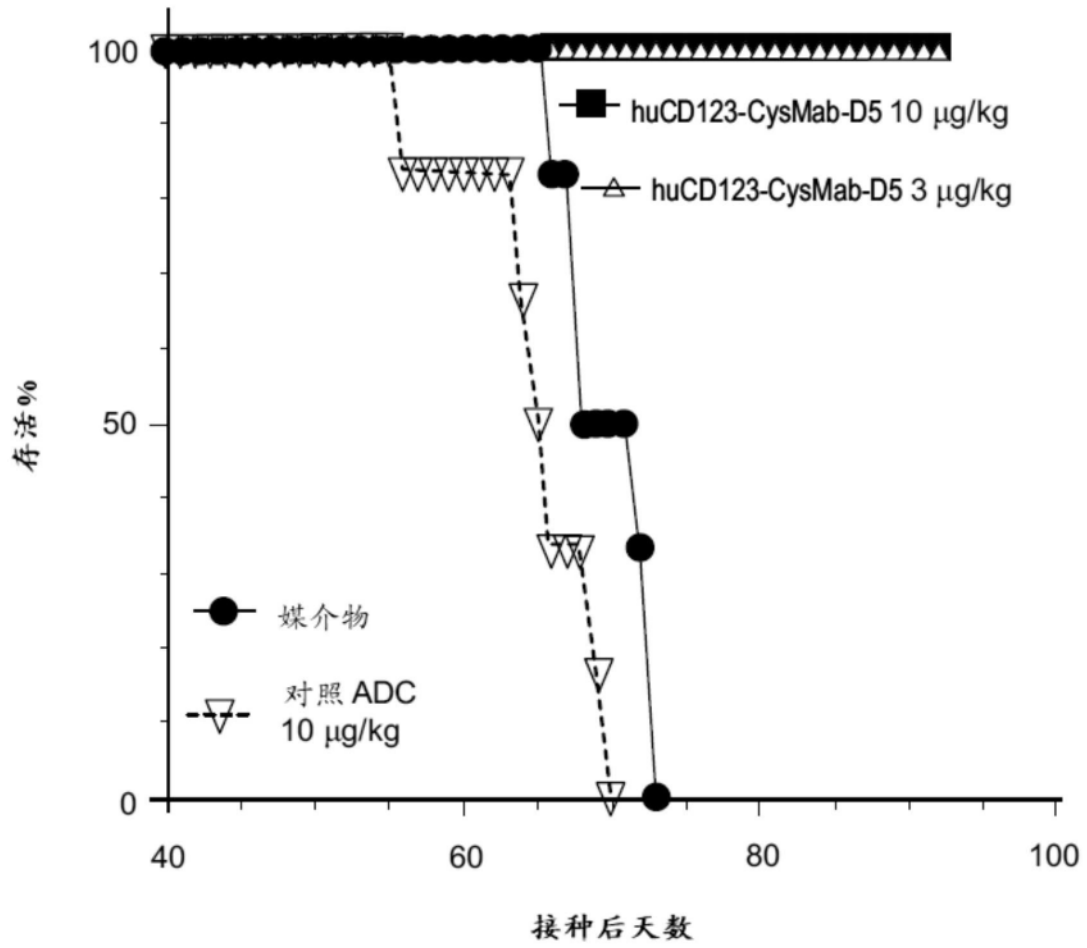


图23

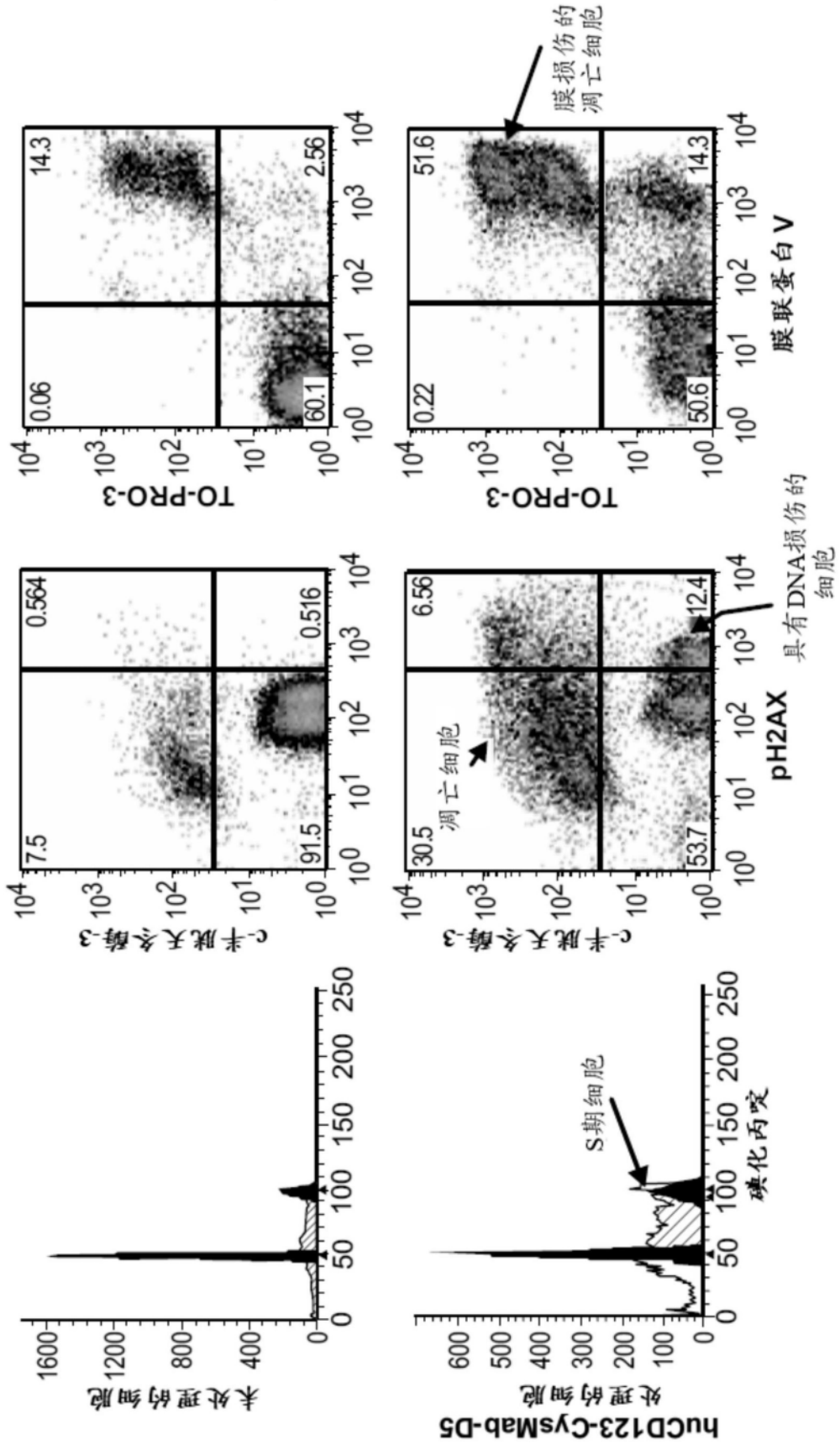


图24

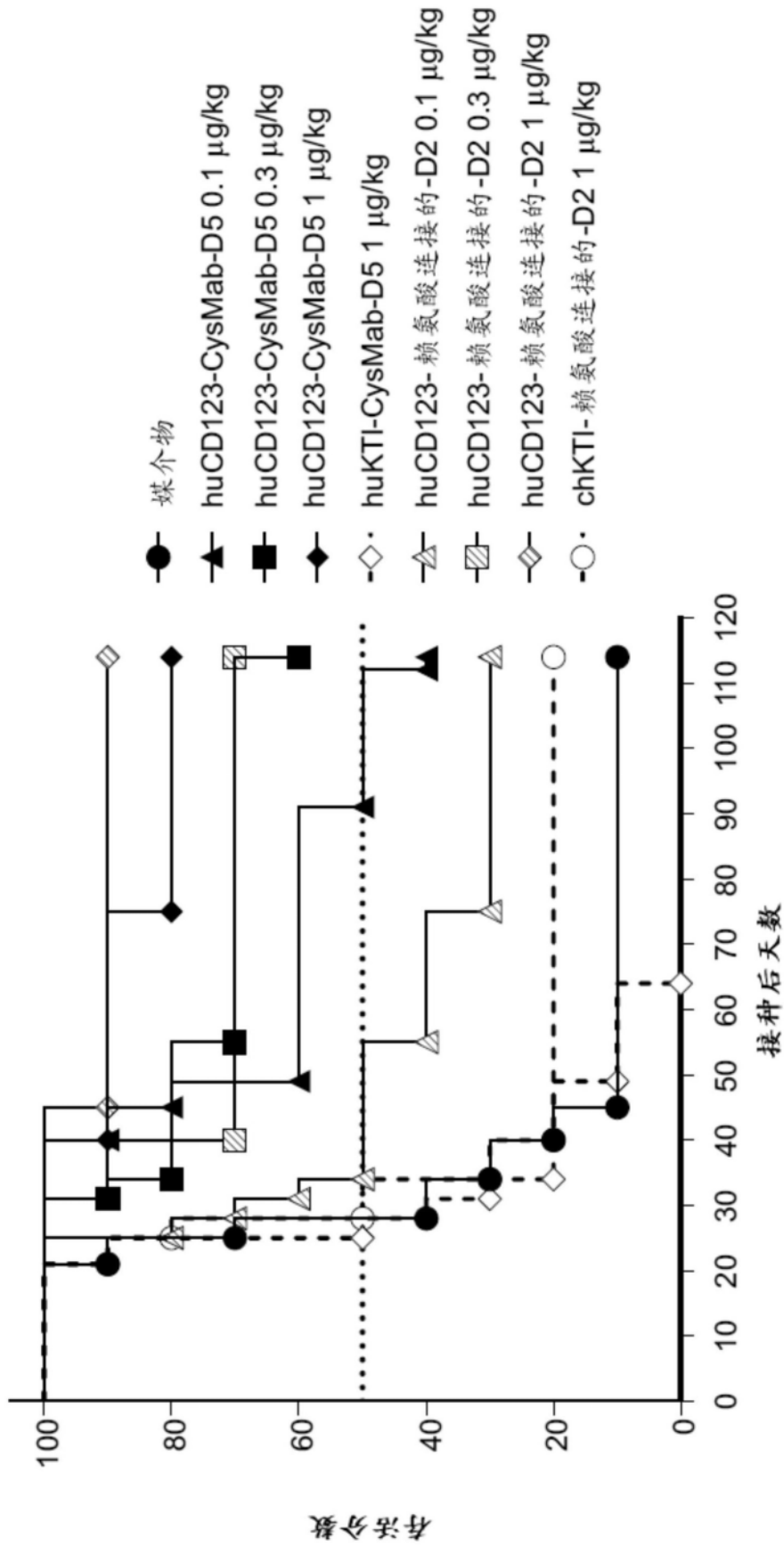


图25

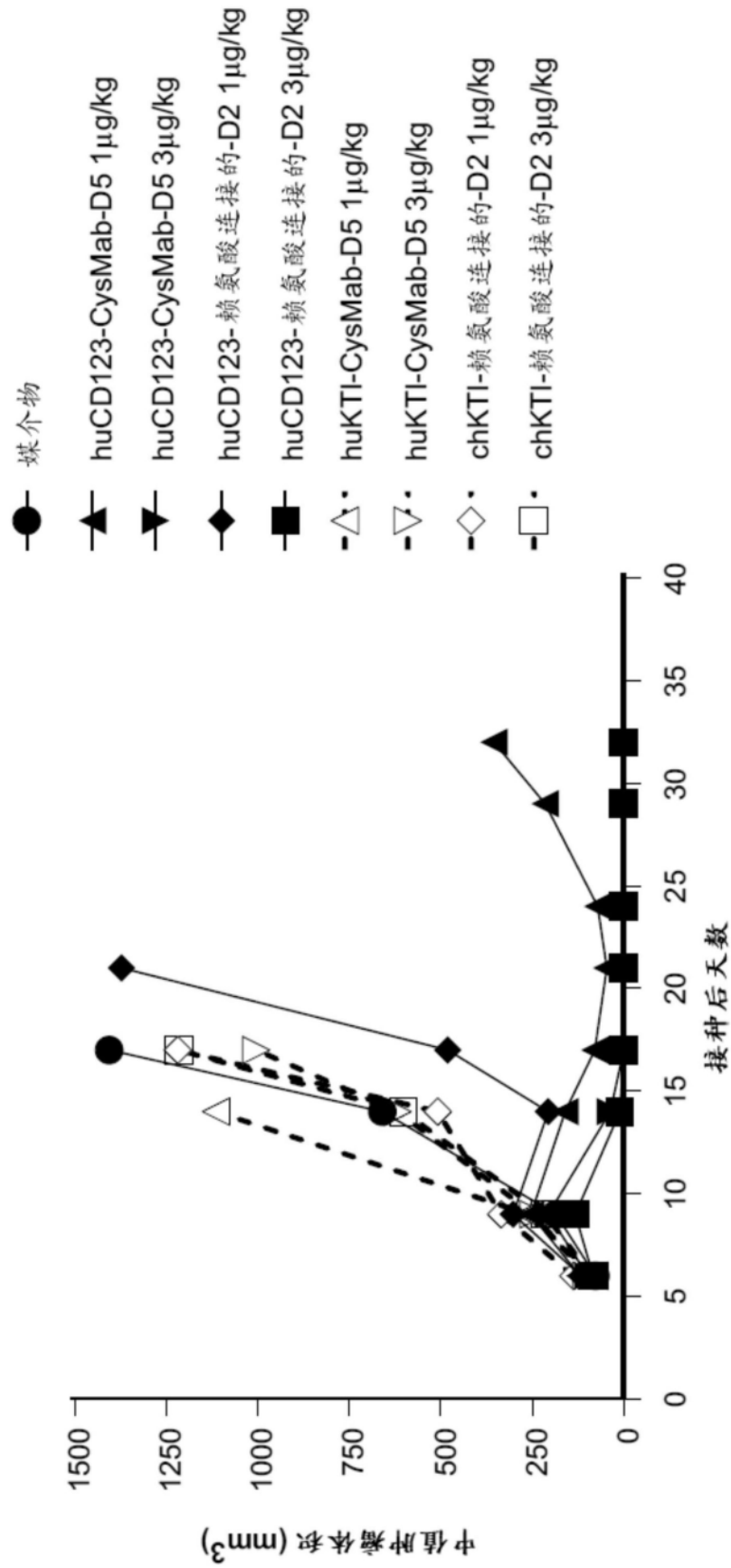


图26

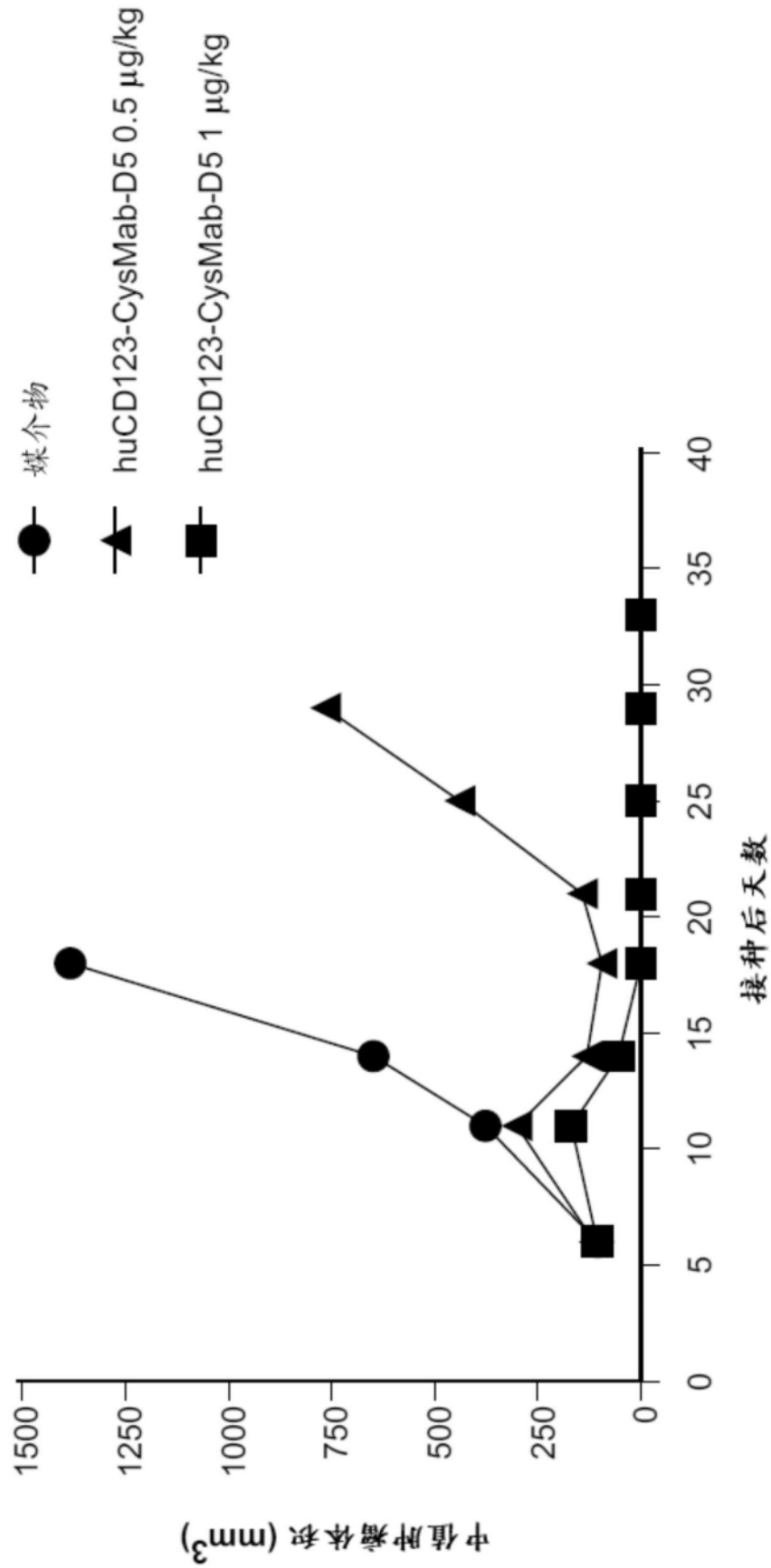


图27

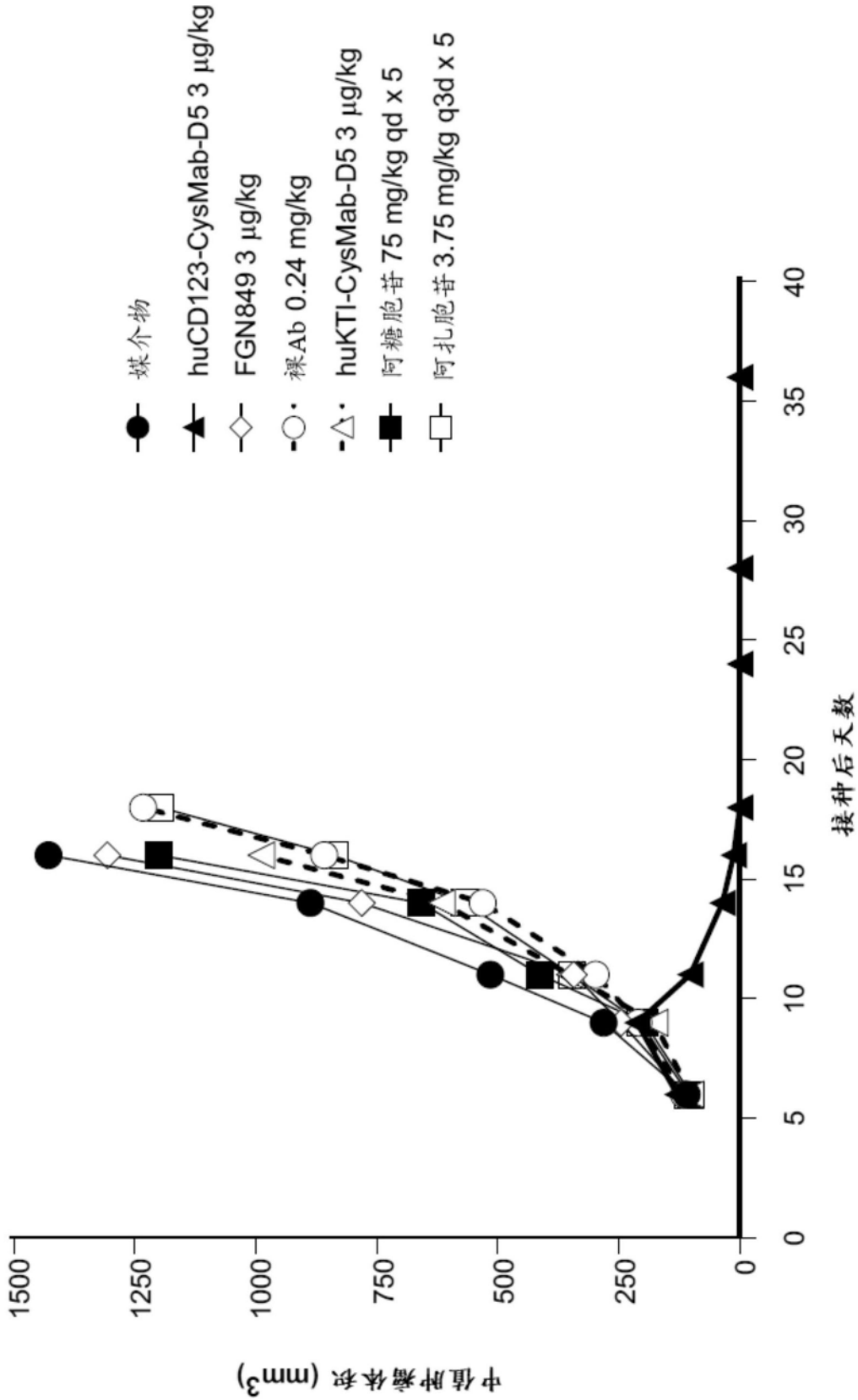


图28

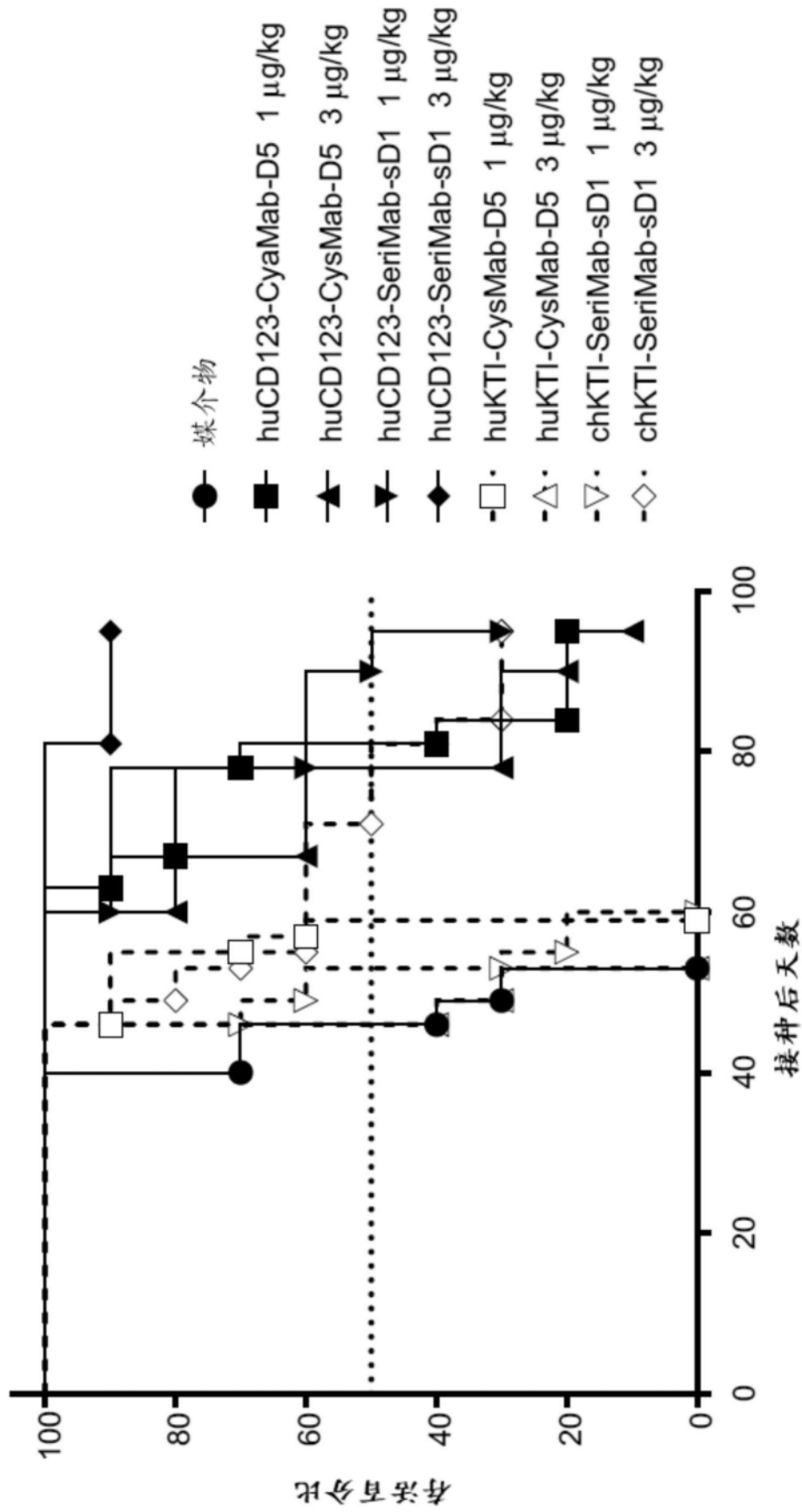


图29

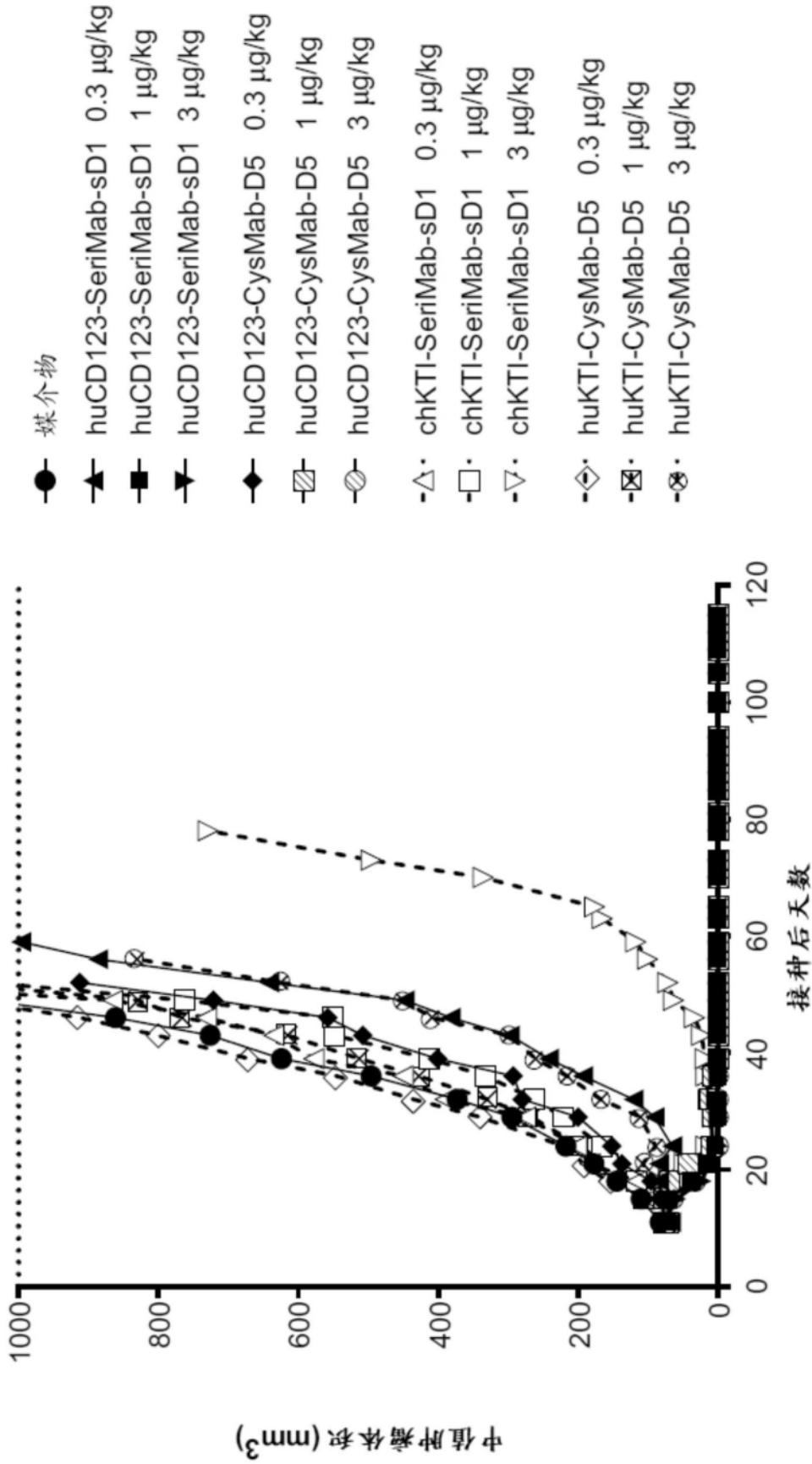


图30

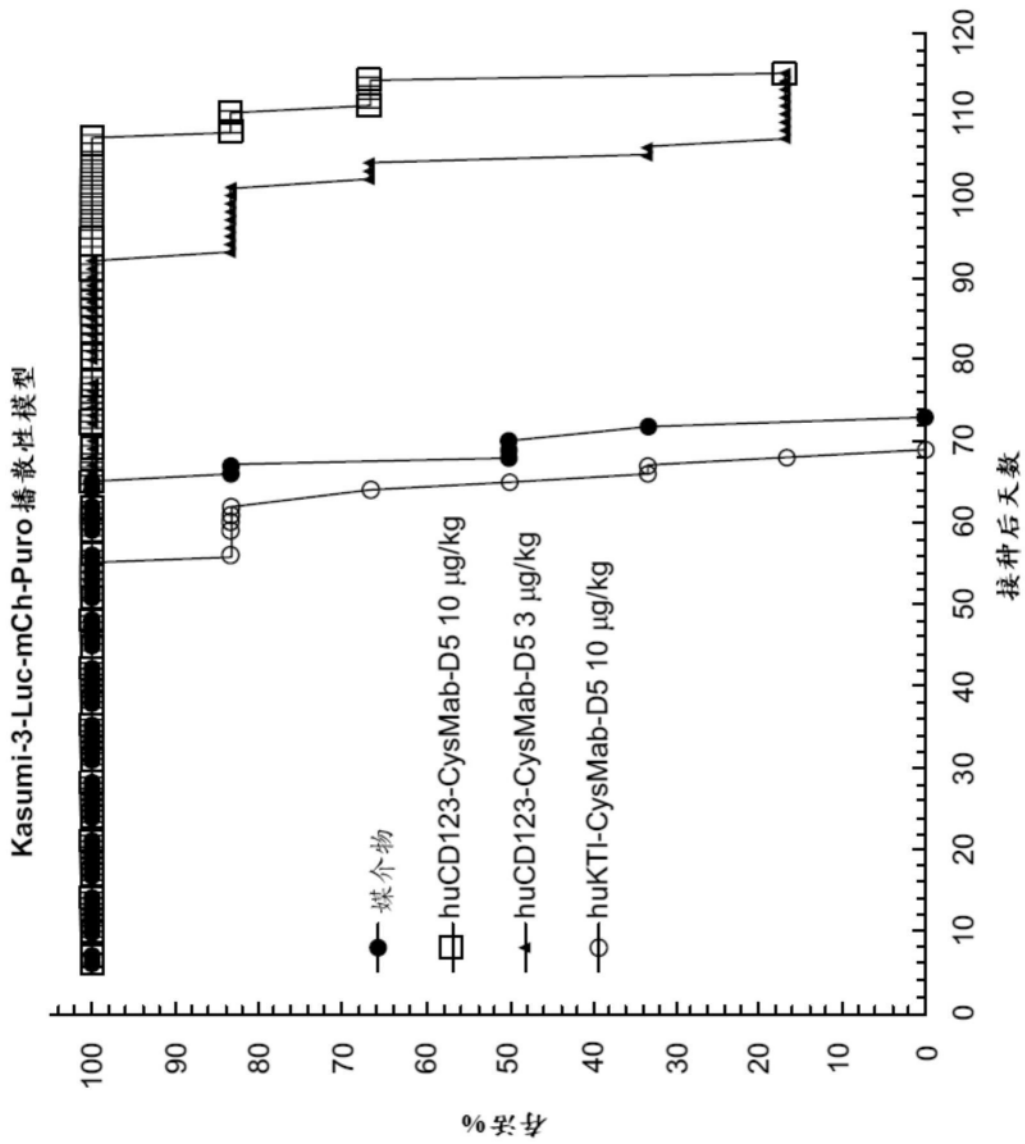


图31

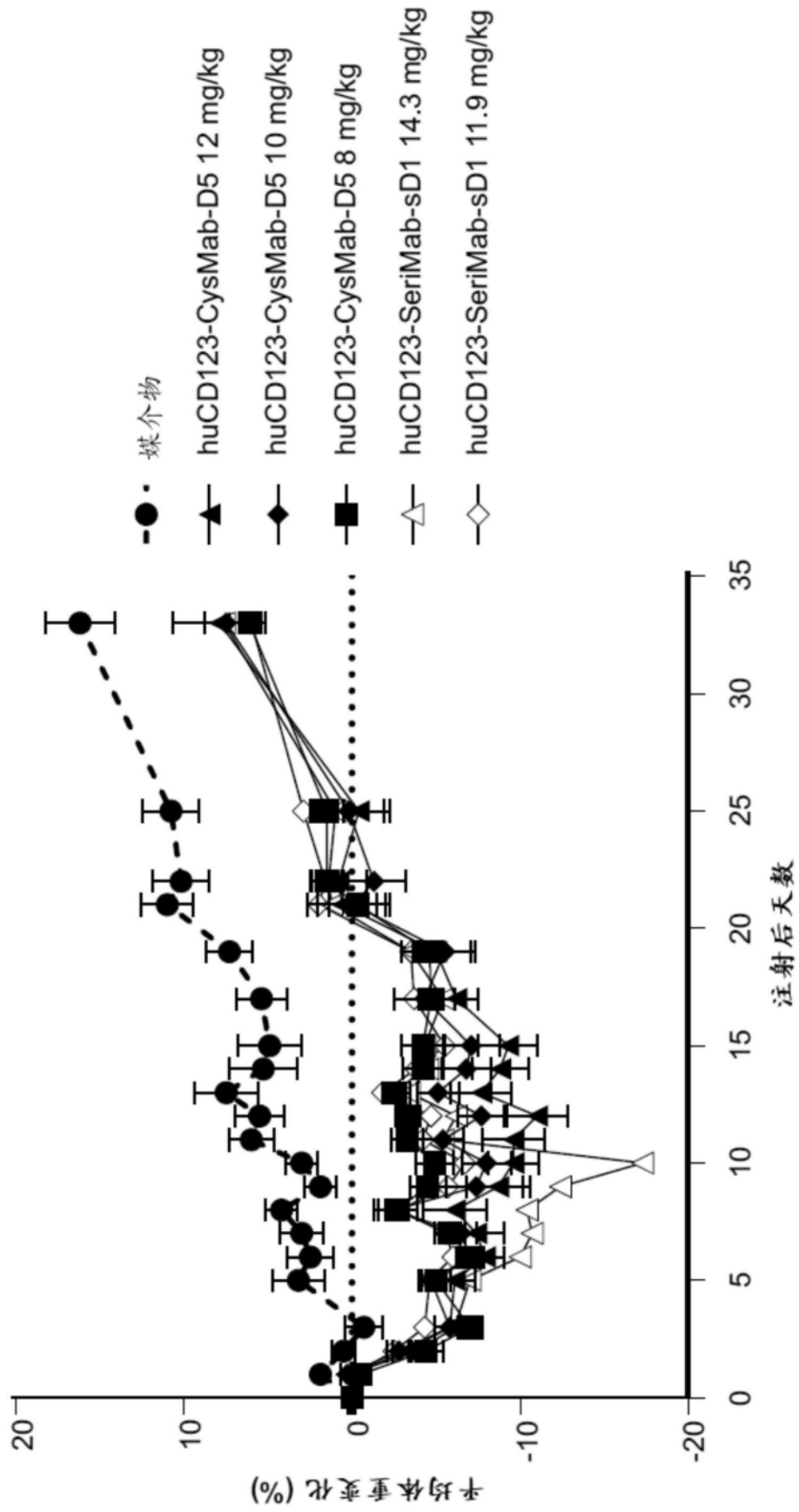


图32

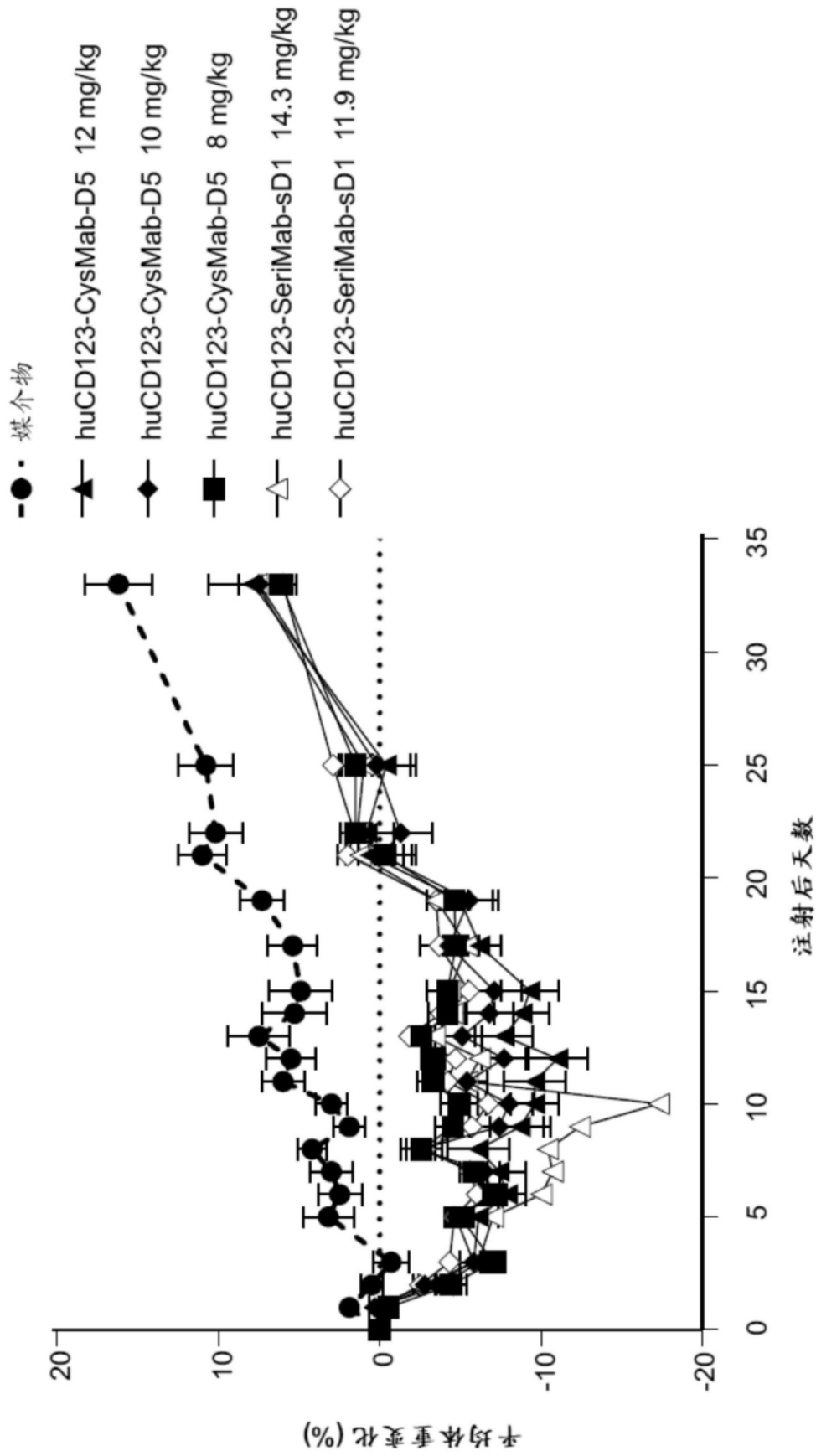


图33